



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO.

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE  
LA CUTINASA AN CUT1 DE *Aspergillus nidulans*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

FERNANDA PAMELA VEGA PÉREZ



MÉXICO, D.F.

2013



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:** Agustín López Munguía Canales

**VOCAL:** Marina Gavilanes Ruíz

**SECRETARIO:** Amelia María de Guadalupe Farrés González- Saravia

**1er. SUPLENTE:** Ruth Edith Martín Fuentes

**2º SUPLENTE:** Martha Giles Gómez

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

ASESOR DEL TEMA: Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González – Saravia

Firma: \_\_\_\_\_

SUPERVISOR TÉCNICO: Dra. Carolina Peña Montes

Firma: \_\_\_\_\_

SUSTENTANTE: Fernanda Pamela Vega Pérez

Firma: \_\_\_\_\_



## ÍNDICE GENERAL

<b>ABREVIATURAS</b>	V
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	VI
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	VII
<b>ÍNDICE DE GRÁFICOS</b>	VIII
<b>RESUMEN</b>	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	6
2.1 Cutinasas	6
2.2 Cutícula	7
2.3 Características de las cutinasas	9
2.4 Estructura y mecanismo catalítico de las hidrolasas $\alpha/\beta$	10
2.5 Aplicaciones de cutinasas	12
2.6 Microorganismos productores de cutinasas	13
2.7 Género <i>Aspergillus</i>	15
2.7.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	17
2.7.2 Cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i>	18
2.7.3 Identificación, Secuenciación y análisis bioinformático de la enzima ANCUT1	21
2.8 Purificación de proteínas	24
2.9 Métodos de purificación	25
2.10 Purificación y caracterización de cutinasas	26
<b>III. JUSTIFICACIÓN</b>	29



<b>IV. HIPÓTESIS</b>	30
<b>V. OBJETIVOS</b>	31
5.1 Objetivo general	31
5.2 Objetivos particulares	31
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	32
6.1 Reactivos y equipos	32
6.2 Estrategia experimental	34
6.3 Microorganismo	35
6.4 Obtención de cutícula	35
6.5 Conservación de la cepa	36
6.6 Reactivación de <i>A. nidulans</i> PW1 y cosecha de esporas	36
6.7 Preparación del medio mínimo de cultivo	37
6.7.1 Medio optimizado	39
6.8 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína	40
6.8.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca	40
6.8.2 Cuantificación de proteína en microplaca	41
6.8.3 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca	41
6.9 Preparación del perfil de proteínas y zimogramas	42
6.9.1 Electroforesis	42
6.9.1.1 Tinción con plata	42
6.9.2 Zimogramas	43
6.10 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	44
6.11 Purificación de la enzima	44
6.11.1 Acondicionamiento de la muestra	44
6.11.1.1 Precipitación con sulfato de amonio	44
6.11.1.2 Diálisis	44
6.11.1.3 Concentración de la muestra dializada por	45



ultrafiltración en Amicon	
6.12 Purificación mediante electroforesis de elución continua	45
6.12.1 Mini Prep Cell	45
6.12.2 Evaluación de las fracciones	47
6.13 Caracterización de la enzima purificada	47
6.13.1 pH óptimo	47
6.13.2 Estabilidad a pH	47
6.13.3 Temperatura óptima	48
6.13.4 Temperatura de estabilidad	48
6.13.5 Especificidad por sustrato	48
6.13.6 Ensayo cutinolítico	49
6.13.7 Ensayo de glicosilación	49
6.13.8 Determinación de punto isoelectrico	51
6.13.9 Actividad frente a iones, inhibidores y surfactantes	51
6.13.10 Estabilidad a solventes orgánicos	52
6.13.11 Determinación de los parámetros cinéticos	52
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>53</b>
7.1 Producción de la enzima	53
7.2 Concentración de la proteína y cuantificación de la actividad	55
7.3 Purificación mediante electroforesis de elución continua	58
7.4 Evaluación de la actividad de las fracciones colectadas	59
7.5 Caracterización de la enzima	65
7.5.1 pH óptimo de actividad del ensayo	65
7.5.2 Estabilidad a pH	66
7.5.3 Temperatura óptima de reacción del ensayo	67
7.5.4 Estabilidad a la temperatura	69
7.5.5 Especificidad sobre sustrato	70
7.5.6 Ensayo cutinolítico	72
7.5.7 Ensayo de glicosilación	73
7.5.8 Determinación del punto isoelectrico	75
7.5.9 Efecto de iones metálicos, inhibidores y surfactantes	76



7.5.10 Estabilidad en solventes orgánicos	78
7.5.11 Cálculo de parámetros cinéticos	80
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	82
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	84
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	85
<b>APÉNDICES</b>	97
APÉNDICE A: Métodos de purificación	97
APÉNDICE B: Cámara de Neubauer o Hematocitómetro para conteo de esporas	110
APÉNDICE C: Curva de calibración para cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford	111
APÉNDICE D: Curva de calibración de <i>p</i> -nitrofenol para la cuantificación de actividad enzimática	112



## **ABREVIATURAS**

<i>A. nidulans</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>
<i>A. fumigatus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>A. oryzae</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
aa	Aminoácidos
C	Carbono
CCF	Cromatografía por capa fina
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
kDa	kiloDalton
MPM	Marcador de peso molecular
NWCO	Límite de peso molecular nominal
pI	Punto isoeléctrico
PM	Peso molecular
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol
<i>p</i> -NPA	Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo
<i>p</i> -NPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo
<i>p</i> -NPL	Laurato de <i>p</i> -nitrofenilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
U	Unidad de actividad enzimática equivalente a la liberación de 1 $\mu$ mol de <i>p</i> -nitrofenol por minuto bajo las condiciones especificadas
U/mg	Actividad específica, unidad de actividad enzimática por mg de proteína
U/ml	Actividad volumétrica





## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1.	Unidad estructural de cutina	6
Figura 2.	Ubicación de la cutícula en tejido vegetal	7
Figura 3.	Plegamiento de hidrolasas $\alpha/\beta$	10
Figura 4.	Mecanismo catalítico de las serina hidrolasas	12
Figura 5.	Estructuras de reproducción asexual de <i>Aspergillus</i> sp.	16
Figura 6.	Análisis filogenético de las cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i> y otras especies	20
Figura 7.	Estructura primaria reportada para la cutinasa ANCUT1	22
Figura 8.	Localización del gen de la cutinasa ANCUT1	22
Figura 9.	Cutícula de manzana	36
Figura 10.	Crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> en el medio optimizado	53
Figura 11.	Medición de actividad cualitativa del extracto crudo	53
Figura 12.	Reacción llevada a cabo en el ensayo cualitativo	54
Figura 13.	Perfil de proteínas del extracto crudo en SDS-PAGE	55
Figura 14.	Precipitación con sulfato de amonio al 55% y al 65%	56
Figura 15.	Gel nativo utilizando los distintos métodos de concentración	57
Figura 16.	Perfil de proteínas con los distintos métodos de concentración	57
Figura 17.	Equipos para llevar a cabo la electroforesis de elución continua	59
Figura 18.	Actividad cualitativa de las fracciones obtenidas	59
Figura 19.	Actividad de las fracciones tras 24 h de renaturalización	60
Figura 20.	Perfil de proteínas en SDS-PAGE y zimograma de las fracciones	61
Figura 21.	Cromatograma de la cantidad de proteína en las 50 fracciones	62
Figura 22.	Cromatograma de la actividad volumétrica de las 50 fracciones	62
Figura 23.	Cromatograma de la actividad específica de las 50 fracciones	62
Figura 24.	Cromatografía en capa fina de la hidrólisis de la cutina	73
Figura 25.	Prueba de glicosilación de la ANCUT1	74
Figura 26.	Continuación de la prueba de glicosilación de la ANCUT1	74
Figura 27.	Determinación del pI para el extracto crudo de la ANCUT1	75
Figura 28.	Determinación del pI para la ANCUT1 pura	76



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Principales monómeros de cutina de manzana Golden Delicious	8
Tabla 2.	Cutinasas producidas por microorganismos	14
Tabla 3.	Cutinasas putativas o verdaderas reportadas en genomas	15
Tabla 4.	Enzimas y metabolitos producidos por el género <i>Aspergillus</i>	17
Tabla 5.	Cutinasas en genoma de <i>A. nidulans</i>	19
Tabla 6.	Composición de aminoácidos de cutinasa ANCUT1	23
Tabla 7.	Cutinasas que han sido purificadas	27
Tabla 8.	Reportes del uso de electroforesis de elución continua	28
Tabla 9.	Reactivos y marcas	32
Tabla 10.	Equipos	33
Tabla 11.	Composición del medio mínimo para <i>A. nidulans</i> PW1	37
Tabla 12.	Composición de solución de sales 20x para el crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i>	38
Tabla 13.	Composición de solución de elementos traza 100x para el crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i>	38
Tabla 14.	Composición del medio optimizado	39
Tabla 15.	Lectinas empleadas y tipo de glicosilación que reconocen	50
Tabla 16.	Comparación de las actividades del extracto crudo después de los distintos métodos de concentración empleados	56
Tabla 17.	Rendimiento y factor de purificación en cada paso para ANCUT1	63
Tabla 18.	Parámetros cinéticos de la cutinasa de la ANCUT1	81



## **ÍNDICE DE GRÁFICOS**

Gráfica 1.	Efecto del pH sobre la actividad de la cutinasa ANCUT1 pura	66
Gráfica 2.	Estabilidad a pH de la cutinasa ANCUT1 pura	67
Gráfica 3.	Temperatura óptima de reacción de la ANCUT1 pura	68
Gráfica 4.	Gráfica de Arrhenius para la cutinasa ANCUT1 pura	69
Gráfica 5.	Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la cutinasa ANCUT1 pura	70
Gráfica 6.	Especificidad de sustratos de la cutinasa ANCUT1 pura	71
Gráfica 7.	Efecto de iones metálicos, EDTA, inhibidores y surfactantes de la cutinasa ANCUT1 pura	77
Gráfica 8.	Estabilidad en solventes de la cutinasa ANCUT1 pura	79
Gráfica 9.	Gráfico de Michaelis-Menten y su representación de Lineweaver-Burk $1/v$ frente a $1/[S]$ de los datos de la ANCUT1 pura	80



## **RESUMEN**

Las cutinasas son enzimas que se clasifican como carboxilesterasas, ya que llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos. Su sustrato principal es la cutina, el componente lipídico estructural de la cutícula de las plantas, el cual es un poliéster compuesto de hidróxidos y epóxidos de ácidos grasos de cadena larga, estas enzimas también son capaces de hidrolizar ésteres de cadena corta. Son las primeras enzimas descubiertas a partir de hongos fitopatógenos que crecen en cutina como única fuente de carbono, siendo la más estudiada la cutinasa de *Fusarium solani*. Estas enzimas comparten propiedades catalíticas de las lipasas y esterasas, presentando la característica de ser activas con independencia de la presencia de una interfase aceite-agua, haciéndolas interesantes como biocatalizadores en varios procesos industriales que implican la hidrólisis, esterificación o transesterificación. Las cutinasas presentan una alta estabilidad en disolventes orgánicos y líquidos iónicos, tanto libres como microencapsulados. Estas características permiten la aplicación de estas enzimas en diferentes áreas, como la industria alimentaria, cosmética, química fina, los pesticidas y la degradación de insecticidas, tratamiento y lavado de textiles de fibra, y la química de polímeros.

Con el fin de tener una mayor comprensión de la enzima, el objetivo de este trabajo fue determinar las propiedades bioquímicas y cinéticas de la cutinasa AN CUT1 (22 kDa) de *Aspergillus nidulans* PW1. Para su producción se empleó un medio específico con cutícula de manzana como inductor. Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida SDS para corroborar el peso molecular de dicha enzima y se realizaron zimogramas para verificar la actividad de la enzima. La purificación de la cutinasa se llevó a cabo utilizando la electroforesis de elución



continua. Una vez purificada la enzima se determinaron sus propiedades bioquímicas y cinéticas.

Se determinó que la enzima ANCUT1 no posee sitios de glicosilación, lo que se refleja en el hecho de que el PM teórico de la enzima con y sin péptido señal es de 22.7 kDa y 20.55 kDa ( $\approx 21$  kDa) respectivamente, lo cual fue semejante al PM experimental de 22 kDa. El punto isoeléctrico experimental fue 6.0 aproximadamente, el cual también es muy cercano con el pI teórico (6.88 con péptido señal y sin péptido señal 6.32).

Los resultados mostraron que la enzima tiene un pH óptimo de 9, y es estable a pH 10 por 3 h, ya que presenta una actividad por arriba del 95% con respecto a su actividad original. Su temperatura óptima es de 60 °C, además de retener actividad aún a los 70 °C, lo que permite calificarla como termoestable. La enzima tuvo preferencia por sustratos de cadena corta, como son el *p*-NPA y *p*-NPB. Paradójicamente, en las condiciones de reacción evaluadas la enzima no realizó la hidrólisis de cutina, en teoría, su sustrato natural. Esta reacción se siguió por cromatografía en capa fina y concuerda con los resultados obtenidos con el extracto crudo (Esqueda-Domínguez, 2012). La actividad de la enzima se redujo en presencia del EDTA, que es un agente quelante de metales, para 1 mM y para 10 mM se obtuvo un 64.4% y 43.6% respectivamente, con respecto al control. Todos los iones mostraron un efecto inhibitorio medio, a excepción del  $\text{Fe}^{3+}$  a una concentración de 1 mM, con el que mostró una actividad de 102%, no diferente a su actividad original. El mayor efecto inhibitorio se observó con  $\text{Na}^+$ , 10 mM dando una actividad del 38.78% del control. El dodecilsulfato sódico (SDS) y el Tween 80 al 1% permitieron una actividad del 23% y 36% respectivamente, y para el caso del fenilmetilsulfonilo (PMSF) a ambas concentraciones se obtuvo un 35% y 36% con respecto al control. Fue



estable en Hexano ( $\log P_{Oct} = 3.5$ ) a una concentración del 30% pues retuvo el 105% de su actividad con respecto al control tras 24 h incubación a 4 °C. La enzima a concentraciones mayores tanto de solventes como de iones metálicos presenta una disminución de su actividad. Los parámetros cinéticos de la enzima purificada fueron calculados usando *p*-NPA, obteniéndose una afinidad de la enzima por el sustrato con una  $K_m$  7.63 mM, y velocidad máxima  $V_{max}$  de 2.33 mmol/min una  $k_{cat}$  de  $8.73 \text{ min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$  de  $1.14 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$  y Ciclo catalítico de 6.87.



## **I. INTRODUCCIÓN**

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas que catalizan la hidrólisis de cutina, un polímero insoluble compuesto de hidroxí- y epoxi- ácidos grasos de n-C16 y n-C18, unidos por enlaces éster.

Las cutinasas presentan propiedades tanto de esterasas como de lipasas, ya que son capaces de hidrolizar una gran variedad de ésteres y muestran actividad sobre ácidos grasos tanto de cadena corta como de cadena larga, lo que hace a estas enzimas muy versátiles. Las propiedades catalíticas con las que cuentan les confieren un uso potencial en diferentes industrias, por ejemplo, en la industria de alimentos, para la hidrólisis de grasa de leche, en la industria de detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel, entre otras aplicaciones. Algunos de estos procesos ya se aplican en la industria, mientras que otros están aún a nivel de investigación. Su nicho de mercado es muy semejante al de las lipasas, con la ventaja de que no se requiere el fenómeno de activación interfacial para que la reacción se lleve a cabo.

Se ha reportado la producción de cutinasas en polen de plantas, en bacterias y en levaduras, sin embargo las más comunes provienen de hongos fitopatógenos, siendo la más estudiada la cutinasa de *Fusarium solani*.

El genoma de *Aspergillus nidulans* está totalmente secuenciado y se han reportado 60 carboxilesterasas dentro de las cuales destacan 4 cutinasas putativas. En el grupo de trabajo se ha encontrado que *Aspergillus nidulans* produce dos cutinasas, las cuales fueron identificadas mediante zimogramas y secuenciación de aminoácidos. Las



cutinasas presentan pesos moleculares de 22 y 29 kDa, las cuales se inducen con cutina y aceite de olivo, respectivamente. Ambas enzimas presentaron actividad de esterasa, ampliamente utilizada en biocatálisis. Sin embargo, ninguna se ha purificado.

En virtud de que los extractos crudos con actividad de cutinasa obtenidos en diferentes condiciones de cultivo presentan diferentes propiedades, y dado que no hay muchos reportes sobre propiedades de cutinasas puras, se decidió purificar la enzima ANCUT1 (22 kDa) de *Aspergillus nidulans* PW1 para caracterizarla físico-química y bioquímicamente, y así tener mayor información sobre su posible papel en la fisiología del hongo o su potencial de aplicación. El conocer las características de una enzima permite tomar medidas para mejorar el rendimiento de la enzima bajo las condiciones de los procesos, así como aumentar su vida útil. La caracterización requiere de la purificación de la enzima y generalmente incluye el estudio de las propiedades moleculares, especificidad de sustrato, etc.





## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Cutinasas

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas que catalizan la hidrólisis del polímero cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos de cadena larga que están unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (Taiz y Zeiger, 2002). Está formada principalmente por ácidos grasos C16 y C18 con grupos hidroxilo o epóxidos situados en la parte media de la cadena o al final, en el lado opuesto al grupo carboxilo, aunque la composición precisa varía dependiendo de la especie (Figura 1) (Walton *et al.*, 1972).

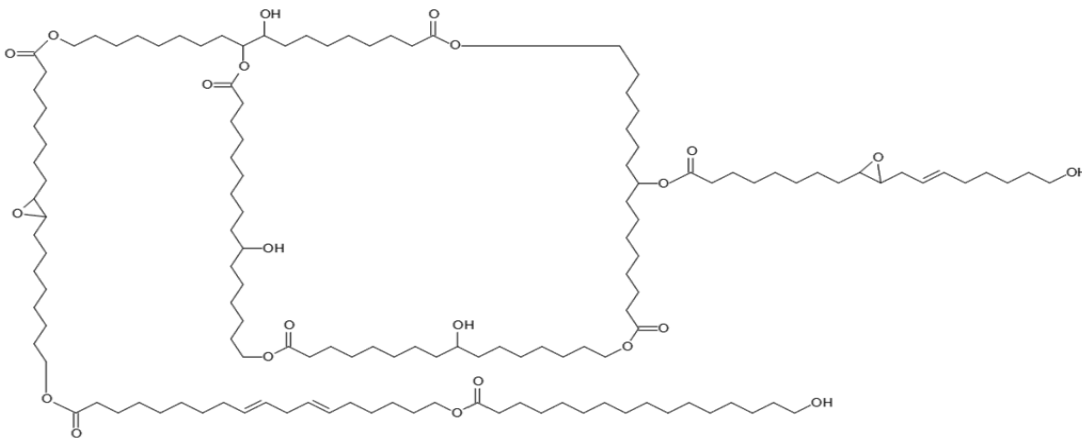


Figura 1. Unidad estructural de cutina.

Las cutinasas son enzimas inducibles producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de cutina. Las cutinasas han sido encontradas en diversas fuentes, especialmente en hongos (principalmente patógenos), ya que estas enzimas pueden colaborar a la penetración por parte del micelio a través de la cutícula de la planta (Purdy y Kolattukudy, 1975).



## 2.2 Cutícula

Las partes aéreas de las plantas superiores, hojas y estructuras especializadas como tallos, flores, frutos, están cubiertas por una barrera químicamente densa y resistente llamada cutícula.

El principal constituyente de la cutícula es la cutina, la cual se compone en gran parte de hidroxiácidos grasos de 16 y 18 carbonos con algunos grupos epóxido, y se unen por enlaces éster formando una red rígida tridimensional (Holloway, 1973). El biopolímero cutina se forma a través de esterificación de alcoholes primarios, resultando un complejo de estructura tridimensional en el que están incrustadas ceras.

El espesor de la cutícula varía entre 0.1-10 micras y su grosor es variable según las especies vegetales, la zona de la planta y su edad o estado de desarrollo. Entre las funciones de la cutícula está el fungir como aislante para evitar la pérdida de agua y de sustancias de los tejidos vegetales, así como para proteger a la planta de la irradiación y de agresiones físicas, químicas y biológicas, por lo que representa la primera barrera contra la invasión de patógenos y constituye una fuente de alimento para los saprobios cuando la planta está en descomposición (Figura 2) (Skamnioti *et al.*, 2008).

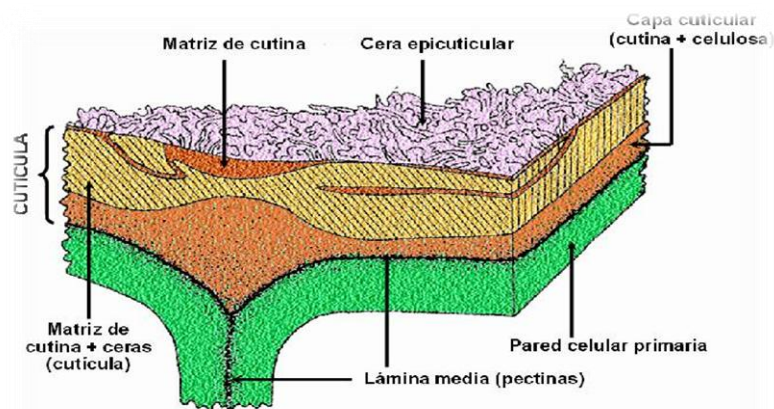


Figura 2. Ubicación de la cutícula en tejido vegetal.



Las ceras cuticulares son una mezcla de compuestos hidrofóbicos que están compuestos predominantemente de lípidos alifáticos, tales como largas cadenas de ácidos grasos y sus derivados. Además las ceras podrían contener otros compuestos tales como triterpenoides y fenilpropanoides (Nawrath, 2006). La cera epicuticular puede ser depositada como una capa o como cristales. Las ceras intracuticulares, en contraste, están embebidas en el polímero de la cutícula principalmente formando subunidades bien empaquetadas.

La mayoría de las cutículas caracterizadas corresponden a hojas y frutas (Kolattukudy, 1970; Deas *et al.*, 1974; Casado y Heredia, 1999; Vogg *et al.*, 2004), sobre todo la cutícula y cutina de manzana se han estudiado ampliamente (Richmond y Martin, 1959; Holloway, 1973; Croteau y Kolattukudy, 1974). La cutina de manzana, variedad Golden Delicious, fue utilizada como fuente de carbono e inductor en los primeros estudios de producción de cutinasas en *F. solani pisi*, con resultados favorables (Purdy y Kolattukudy, 1975; Lin y Kolattukudy, 1980). En la Tabla 1 se muestran los principales monómeros de la cutina de manzana variedad Golden Delicious. En algunas cutículas solo predomina un largo de cadena como, por ejemplo, en el tomate (*Lycopersicon esculentum*) y en la hoja de haba (*Vicia faba*) con C16, y con C18 la hoja de espinaca (*Spinacia oleracea*) (Stark y Tian, 2006).

Tabla 1. Principales monómeros de cutina de manzana variedad Golden Delicious (Holloway, 1973).

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



Se ha visto que la degradación enzimática es uno de los primeros pasos de infección de los hongos fitopatogénos para crecer en la cutícula de las plantas y utiliza la cutina como fuente de carbono a partir de la hidrólisis de esta con la producción extracelular de enzimas cutinolíticas, algunas de las cuales han sido purificadas y caracterizadas (Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999).

Estudios posteriores han explorado diferentes sustratos para lograr la producción de cutinasas en hongos (Guo *et al.*, 1996) y bacterias (Sebastian y Kolattukudy, 1988; Fett *et al.*, 1999; Fett *et al.*, 2000) y han concluido que la cáscara de tomate, la cutina de manzana y la suberina de papa son buenos inductores de estas enzimas.

### **2.3 Características de las cutinasas**

Las cutinasas, al igual que las lipasas y las esterases, pertenecen a la familia de proteínas que presentan un plegamiento conocido como  $\alpha/\beta$  hidrolasa, las cuales son los miembros más pequeños de la familia de serina-hidrolasas. Presentan la clásica triada catalítica compuesta por serina, histidina y ácido carboxílico, ya sea aspártico o glutámico, además de contar con el pentapéptido consenso Gly-His/Try-Ser-X-Gly, y una cavidad oxianiónica preformada. El sitio catalítico de la cutinasa no está protegido por una tapa y no presenta actividad interfacial, siendo estas características particulares de las cutinasas (de Barros *et al.*, 2009).

La primera cutinasa que fue purificada y caracterizada fue la del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). Desde entonces se han purificado cutinasas de varios hongos patógenos. La masa molecular esta típicamente en un rango entre 21 y 60 kDa, con excepción del patógeno *Botrytis cinerea* que tiene una masa molecular de aproximadamente 18 kDa (Wang *et al.*, 2000).



Las cutinasas exhiben actividad hidrolítica *in vitro* sobre una variedad de ésteres, pueden hidrolizar ésteres sintéticos solubles como los que contienen *p*-nitrofenol, así como triacilgliceroles de cadenas cortas y largas y también realizar reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua. Por lo tanto, las cutinasas comparten características con lipasas y esterasas, ya que hidrolizan eficientemente ésteres solubles y triacilgliceroles emulsificados (Carvalho *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2009).

## 2.4 Estructura y mecanismo catalítico de las hidrolasas $\alpha/\beta$

Las lipasas, esterasas y cutinasas comparten la maquinaria catalítica al tener el mismo tipo de plegamiento  $\alpha/\beta$ . Las hidrolasas  $\alpha/\beta$ , tienen una estructura formada por ocho hojas  $\beta$  plegadas dispuestas paralelamente, a excepción de la  $\beta_2$ , que se encuentra en sentido antiparalelo. De la hoja  $\beta_3$  a la  $\beta_8$  están conectadas por medio de  $\alpha$ -hélices dispuestas en ambos lados. En la Figura 3 se muestra el plegamiento canónico de las hidrolasas  $\alpha/\beta$  y se señala con puntos negros la posición de los residuos de la tríada catalítica.

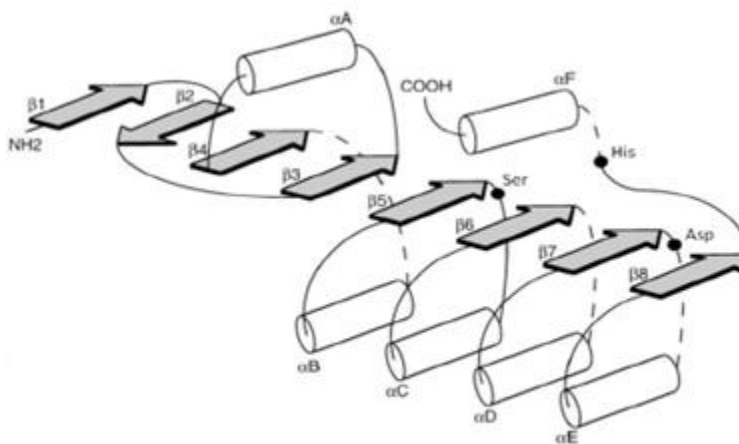


Figura 3. Plegamiento de hidrolasas  $\alpha/\beta$ . Éste se compone de una hoja  $\beta$  central rodeada por  $\alpha$ -hélices (Jaeger *et al.*, 1999).



El sitio activo de estas hidrolasas  $\alpha/\beta$  está formado por un residuo de serina (Ser), el cual es un aminoácido nucleofílico localizado en el extremo carboxílico de la hebra  $\beta 5$ , uno de histidina (His) que funciona como base general y un residuo ácido que puede ser glutámico (Glu) o aspártico (Asp), y en conjunto forman la triada catalítica.

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

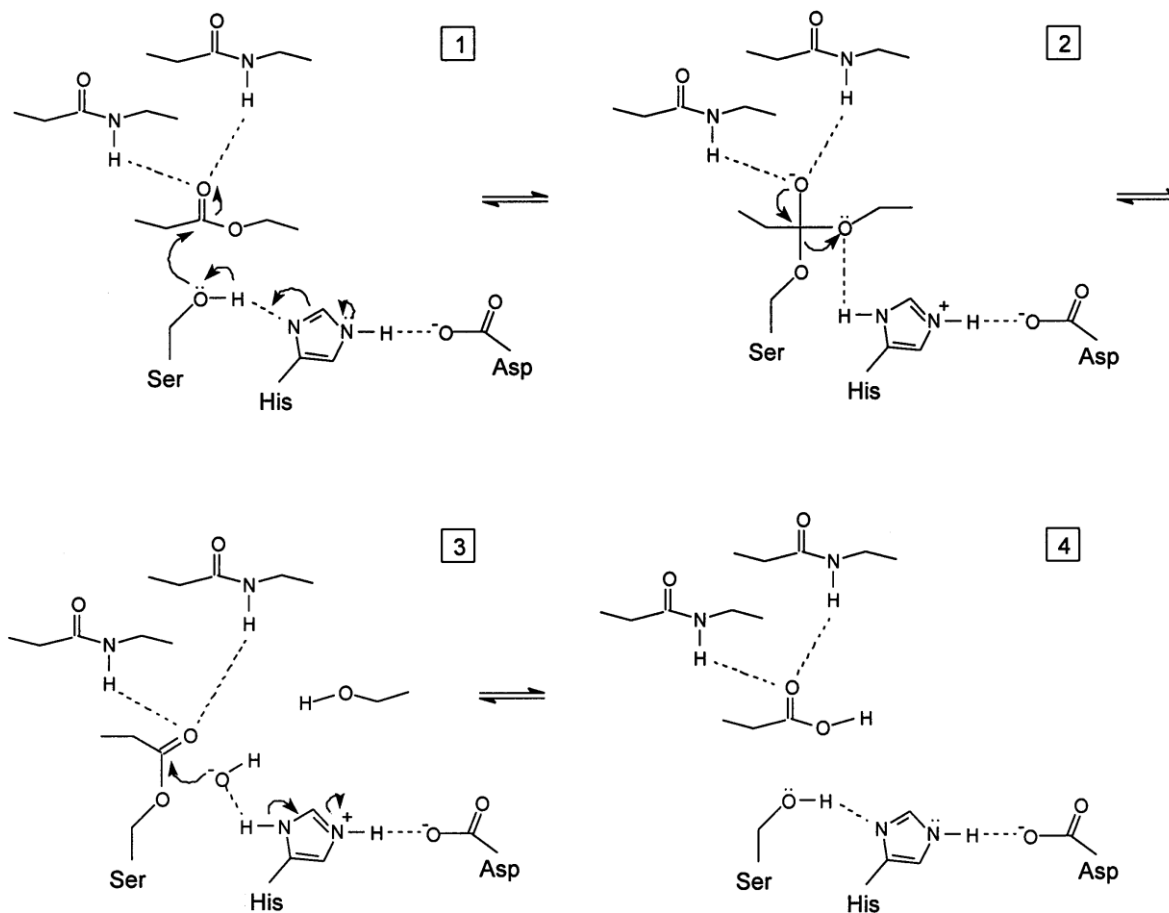


Figura 4. Mecanismo catalítico de las serina hidrolasas.

## 2.5 Aplicaciones de cutinasas

Debido a la heterogeneidad de las estructuras que se encuentran en las esterificaciones de cutina, las cutinasas se han propuesto para uso en una amplia variedad de aplicaciones en diferentes procesos industriales (Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999). Por ejemplo, han sido utilizadas como enzimas lipolíticas para la eliminación de grasa en la ropa sucia y en detergentes para lavavajilla, porque las cutinasas son activas tanto en ambientes acuosos como emulsionados (Flipsen *et al.*, 1997). Para el uso en la industria textil, específicamente en el algodón, han sido suficientemente probadas en combinación con pectina-liasas



para mejorar la humectabilidad de tejidos de algodón en bruto (Degani *et al.*, 2002). Las cutinasas también se han aplicado en la modificación enzimática de la superficie de las fibras de poliéster (Halonen *et al.*, 2009).

En la industria alimentaria, las cutinasas se podrían utilizar para la apertura de la estructura de la pared celular en conjunto con otras enzimas que la degradan (por ejemplo, enzimas celulolíticas) o para facilitar la liberación de compuestos bioactivos, por ejemplo, cáscaras de vegetales o frutas del bosque. Por lo tanto, se podrían utilizar en la producción de derivados químicos de cutina a partir de los residuos de plantas en el procesamiento industrial de las frutas y vegetales. 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 triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel (Carvalho *et al.*, 1999).

## **2.6 Microorganismos productores de cutinasas**

La producción de cutinasas se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en medios conteniendo cutina como única fuente de carbono (Purdy y Kolattukudy, 1973). Posteriormente, se reportó la producción de cutinasas en polen de plantas, en bacterias, levaduras e incluso en hongos no patógenos, sin embargo, a la fecha los hongos fitopatógenos se siguen considerando como los principales productores de cutinasas. Algunos microorganismos productores de cutinasa se muestran en la Tabla 2.



Tabla 2. Cutinasas producidas por microorganismos (Dutta *et al.*, 2009).

Fuente	Género	Especie	Referencia
<b>Hongos</b>	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Trail y Koller, 1993
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i> <i>flavus</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2005; Liu <i>et al.</i> , 2009 Guo <i>et al.</i> , 1996
	<i>Colleotrichum</i>	<i>kahawae</i> <i>gloesporioides</i> <i>capsici</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007 Chen <i>et al.</i> , 2007 Hijden
	<i>Fusarium</i>	<i>solani</i> <i>pisioxysporium</i> <i>roseum culmorum</i> <i>roseum</i> <i>sambucinum</i>	Purdy y Kolattukudy, 1975 Pio y Macedo, 2007 Goncalves <i>et al.</i> , 1996 Hijden
	<i>Monilinia</i> <i>Venturia</i> <i>Glomerella</i>	<i>fruticicola</i> <i>inaequalis</i> <i>cingualata</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002 Trail y Koller, 1990 Nyon <i>et al.</i> , 2009 Abu Bakar <i>et al.</i> , 2005
	<i>Helminthosporum</i> <i>Phytophthora</i> <i>Ulocladium</i>	<i>sativum</i> <i>cactorum</i> <i>consortiale</i>	Hijden Egmond y Bommel, 1997 Hijden
<b>Bacterias</b>	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i> <i>acidiscabies</i> <i>badius</i>	Lin y Kolattukudy, 1980 Fett <i>et al.</i> , 1992 Fett <i>et al.</i> , 1992
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i> <i>putida</i> <i>mendocina</i> <i>aeruginosa</i>	Sebastian y Kolattukudy, 1988 Sebastian <i>et al.</i> , 1987 Kim <i>et al.</i> , 2003 Fett <i>et al.</i> , 1992
	<i>Thermonospora</i> <i>Thermoactinomyces</i> <i>Botrytis</i>	<i>fusca</i> <i>vulgaris</i> <i>cineria</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999 Fett <i>et al.</i> , 2000 Hijden
<b>Polen</b>	( <i>Nasturtium</i> pollen) <i>Tropaelum</i>	<i>majus</i>	Maiti <i>et al.</i> , 1979

Algunas cutinasas sólo han sido reportadas como cutinasas putativas al secuenciar los genomas de los microorganismos productores. Otras se han denominado cutinasas por homología genética, pero la reacción no



ha sido evaluada sobre cutina, sino sobre sustratos diversos empleados para determinar actividad de esterasa. Algunos ejemplos se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Cutinasas putativas o verdaderas reportadas en genomas.

Sustrato	Organismo
<i>p</i> -NPB	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>p</i> -NPO	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>p</i> -NPB	<i>Monilinia fructicola</i>
Ácido poliláctico (PLA)	<i>Cryptococcus sp.</i> strain S-2

Fuente: Brenda Database

La producción de enzimas es afectada por diversos factores como concentración y tipo de nutrientes, así como condiciones de crecimiento del microorganismo (temperatura, pH, velocidad de agitación). La cutina ha sido utilizada como una fuente de carbono o un inductor para lograr niveles altos de rendimiento de cutinasa (Dutta *et al.*, 2009).

## 2.7 Género *Aspergillus*

Las especies del género *Aspergillus* son mayoritariamente ubicuas, están extensamente distribuidas en la naturaleza; se encuentran en el suelo, en la vegetación en descomposición y en una amplia variedad de materia orgánica. Algunas especies tienen interés por su importancia industrial, otras por ser agentes de biodeterioro, por producir micotoxinas o por ser patógenas para animales y vegetales.

Las colonias de las especies de este género se desarrollan de forma rápida y presentan diversidad de tonalidades: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas. Están formadas por densas agrupaciones de conidióforos sobre los que se encuentran las células conidiógenas que son las que originan las esporas asexuales o conidios.



El conidióforo característico de *Aspergillus* posee tres partes bien diferenciadas: vesícula (extremo apical hinchado), estripe (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final, que une el conidióforo con el micelio). Sobre la vesícula se disponen las células conidiógenas, denominadas habitualmente fiálides. En muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células denominadas métulas. Las vesículas, las métulas (si están presentes), las fiálides y los conidios constituyen la cabeza conidial. Los conidios pueden formar columnas compactas (cabeza conidial columnar) o divergentes (cabeza conidial radial) (Figura 5).

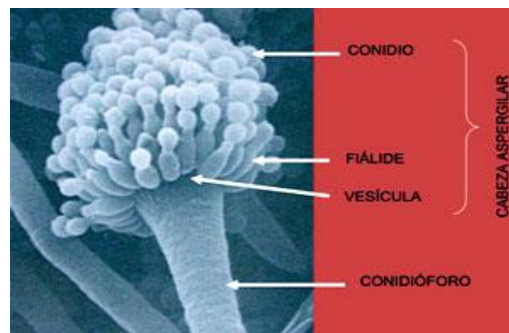


Figura 5. Estructuras de reproducción asexual de *Aspergillus* sp. Cabeza aspergilar donde se observa el conidióforo, vesículas, fiálides y cadenas de fialoconidias, estructuras todas ellas que intervienen en la reproducción asexual de los hongos de este género.

Gracias a la facilidad de dispersión de sus conidios y a su pequeño tamaño, éstos pueden permanecer en suspensión en el ambiente durante un largo período de tiempo, por lo que el hombre se encuentra expuesto constantemente a su inhalación.

Actualmente se conocen más de 185 especies en el género *Aspergillus*, de las cuales alrededor de 20 se han reportado como patógenos para el ser humano, siendo *A. fumigatus* la más común, seguida de *A. flavus* y *A. niger*.



Este grupo taxonómico se reconoce por su capacidad para secretar una variedad de compuestos biológicamente activos que son de alta importancia industrial, médica, farmacéutica, agrícola y científica; en la Tabla 4 se muestran algunos de los compuestos más importantes producidos por especies de *Aspergillus*.

Tabla 4. Enzimas y metabolitos producidos por el género *Aspergillus*.

Especie	Enzimas y metabolitos importantes
<i>Aspergillus niger</i>	Ácido cítrico, Ácido glucónico, $\alpha$ -galactosidasa, Pectinasa, Lipasa, Hemicelulasa, Catalasas, Lactasas, Glucoamilasa, Fosfodiesterasa, Maltasa, Invertasa, Proteinasa
<i>Aspergillus oryzae</i>	Ácido kójico, $\alpha$ -amilasa, Lactasa, Proteasa Glucoamilasa, Celulasa, Lipasa, Pectinasa
<i>Aspergillus terreus</i>	Lovastatina, Ácido itacónico
<i>Aspergillus melleus</i>	Peptidasa
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Micotoxinas (Ocratoxina, Patulina y Fumigilina)
<i>Aspergillus flavus</i>	Toxinas carcinogénicas (Aflatoxinas)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Celulasa, Proteinasa
<i>Aspergillus candidus</i>	Celulasa, Lipasa
<i>Aspergillus ficuum</i>	Fitasa
<i>Aspergillus awamori</i>	$\alpha$ -amilasa, Lipasa, Proteinasa
<i>Aspergillus carneu</i>	Lipasa, Amiloglucosidasa

Fuente: Tobert, 2003; Goldman y Osmani, 2008; Bennett, 2010; Berka *et al.*, 1992.

### ■ 2.7.1 *Aspergillus nidulans*

*Aspergillus nidulans* (*Emericella nidulans*) es un hongo ascomiceto que produce tanto esporas asexuales (conidias) como sexuales (ascoesporas), pertenece a la clase *Eurotiomycetes* y al orden Eurotiales (Rittenour *et al.*, 2009). Tiene un crecimiento rápido como hongo



filamentoso en medio sólido o líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales.

En los últimos 50 años, los esfuerzos de una larga lista de notables científicos han elevado a *A. nidulans* como un organismo modelo en estudios de Genética y Biología Celular, ya que está relacionado con un amplio número de especies de *Aspergillus* de importancia industrial y médica como son *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*. También se ha aislado un número de auxótrofos, mutantes que difieren en sus rutas metabólicas y mutantes para el estudio de la expresión de genes, lo que lo convierte en una herramienta útil dentro de la investigación.

En 2005 la secuencia del genoma de *A. nidulans* se publicó junto con el de *A. fumigatus* y *A. oryzae*. Esta publicación simultánea de los tres genomas colocó al género *Aspergillus* como organismo modelo en los estudios genómicos comparativos (Galagan *et al.*, 2005), sin embargo, los estudios sobre la expresión de proteínas en *Aspergillus* son relativamente pocos (David *et al.*, 2008). En consecuencia, se han desarrollado numerosos métodos para facilitar el análisis eficiente de la función de los genes en *A. nidulans* (Rittenour *et al.*, 2009).

### ■ 2.7.2 Cutinasas de *Aspergillus nidulans*

En los estudios iniciales, la producción de actividad cutinolítica en *A. nidulans* fue reportada por García-Lepe *et al.*, (1997), pero estos estudios no muestran aspectos sobre la regulación, purificación, caracterización o identificación de las enzimas producidas por este hongo.

Posteriormente a partir de la secuenciación del genoma de la cepa *Aspergillus nidulans* FGSC A4, se sabe que tiene 30.07 Mpb organizado



en ocho cromosomas con 10,560 genes, de los cuales 4 se han identificado como genes que codifican para cutinasas putativas (Galagan *et al.*, 2005). En la Tabla 5 se muestra la información recabada sobre estas cuatro enzimas. Puede observarse que en tres casos se ha confirmado que poseen actividad esterasa, pero no necesariamente se ha demostrado que son cutinolíticas, salvo en el caso de la reportada por el grupo de trabajo (Castro-Ochoa *et al.*, 2012), que es el caso de la ANCUT2.

Tabla 5. Cutinasas en el genoma de *A. nidulans* (UniProt, Broad Institute, *Aspergillus* Genome Database).

Gen	Nombre	No. aa	PM teórico (kDa)	Expresión de la proteína	Localización	Actividad reportada	Referencia
AN5309.2	ANCUT1	213	22.4	Si en <i>A. nidulans</i> , verificada por secuenciación de péptidos por LC MS/MS	Extracelular	Proteína con actividad de esterasa	Esqueda-Domínguez, 2012
AN7180.2	Cutinasa 3	221	23.0	Si, expresión heteróloga en <i>Pichia pastoris</i>	Extracelular	Proteína con actividad de esterasa	Bauer <i>et al.</i> , 2006
AN7541.2	ANCUT2	255	26.0	Si en <i>A. nidulans</i> , verificada por secuenciación de péptidos por LC MS/MS	Extracelular	Proteína con actividad de esterasa y cutinolítica	Castro-Ochoa <i>et al.</i> , 2012
AN10346.4	Cutinasa hipotética	223	22.7	No, se infiere por homología del gen*	Proteína no verificada	Proteína no verificada	--

\* Comparación con otros genes de cutinasas reportados en las bases de datos (GenBank, protein data bank (PDB), *Aspergillus* genome database).

Castro-Ochoa *et al.*, (2012), reportó que en la secuencia del genoma de *A. nidulans*, además de que se muestra el gen AN7145.2, que codifica para la cutinasa ANCUT2, hay otros tres genes que codifican para las cutinasa putativas (AN5309.2, AN7180.2 y AN10346.4).

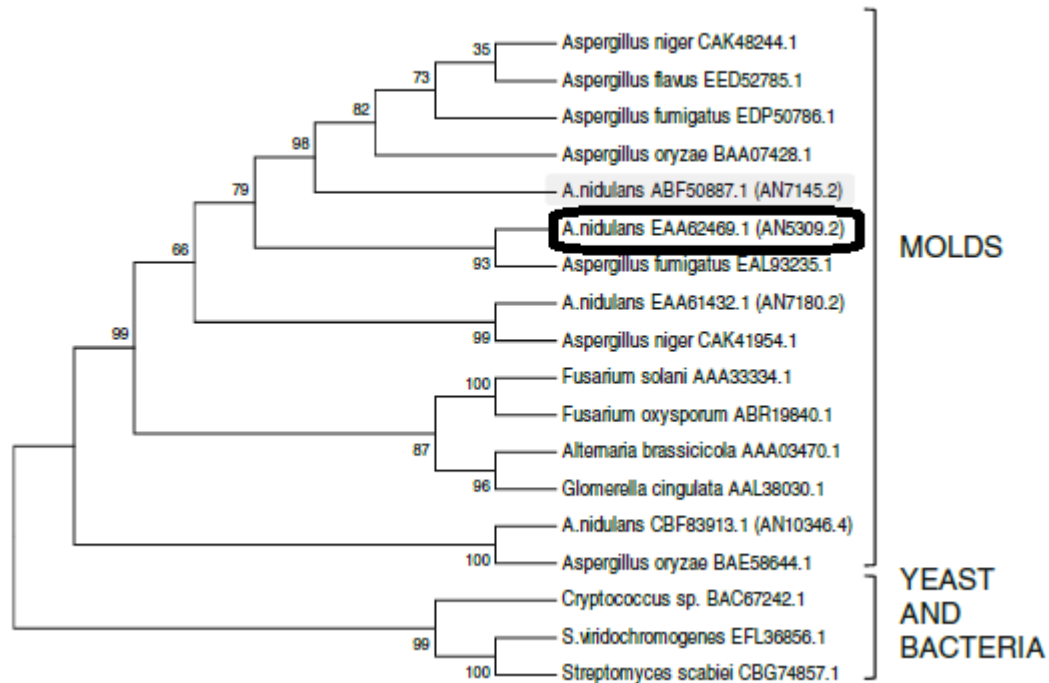


Figura 6. Análisis filogenético de las cutinasas de *Aspergillus nidulans* y otras especies.

Los estudios realizados en el grupo de trabajo permitieron detectar la producción de actividad sobre cutina de manzana en extractos crudos de la cepa de *Aspergillus nidulans* PW1. Los extractos crudos se obtuvieron a partir de un medio optimizado para la producción de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos, empleando aceite de olivo como inductor, se purificó e identificó por secuenciación de péptidos internos una proteína de aproximadamente 29 kDa que corresponde a la cutinasa producto del gen AN7541.2 (ANCUT2). Se estudió también la producción de esta enzima bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno (Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Se ha evaluado por otra parte el efecto de las condiciones de cultivo y nutrientes sobre la regulación de la producción de cutinasas de *Aspergillus nidulans*, utilizando como fuente de carbono e inductor a la cutina de manzana (Segoviano-Reyes, 2011).



También se ha inmovilizado la cutinasa ANCUT2 de *A. nidulans* en Accurel MP 1000 mostrando con este biocatalizador su regioselectividad en la producción de 7-*O*-lauroilo de ácido kójico, tanto en la hidrólisis (vía quimio-enzimática) como en la esterificación enzimática directa (Esquivel-Bautista, 2011).

Por otra parte, recientemente se reportó el estudio de la producción, identificación y caracterización de la proteína putativa AN5309.2 (ANCUT1) en extractos crudos de *A. nidulans* PW1 por el grupo de trabajo. Una vez identificada la enzima se realizaron ensayos cutinolíticos. El extracto con ANCUT1 no hidrolizó la cutina en las condiciones ensayadas. Sin embargo, degradó un sustrato análogo de menor tamaño, el ricinoleato de propilo. En este estudio, también se obtuvo la transesterificación del antioxidante cumarato de metilo en cumarato de butilo con ANCUT1. Esto es de interés, ya que la lipofilización de antioxidantes típicamente se reporta con lipasas como la lipasa B de *Candida antarctica*, por lo que este resultado representa una aplicación potencial para las cutinasas (Esqueda-Domínguez, 2012).

### ■ 2.7.3 Identificación, Secuenciación y análisis bioinformático de la enzima ANCUT1

Esqueda-Domínguez (2012), reportó que la enzima de 22 kDa corresponde a una de las cuatro cutinasas putativas reportadas en el genoma de *Aspergillus nidulans* FGSC A4, la cual se identificó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) como la proteína AN5309.2 (ANCUT1). La enzima tiene un peso molecular teórico de 22.74 kDa, y un valor calculado de punto isoelectrico (pI) de 6.88 (Figura 7).





```

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

```

Figura 7. Estructura primaria de *Aspergillus nidulans*. Los péptidos identificados abarcan el 65% de la secuencia total (señalados en rojo) de la cutinasa AN5309.2 (ANCUT1) (Esqueda-Domínguez, 2012).

La cutinasa AN5309.2 (reportada por el Broad Institute) consta de 213 aminoácidos. La longitud del gen abarca 984 nucleótidos, de los cuales 867 forman parte de la secuencia codificante. El transcrito del gen abarca desde la base 136145 hasta la 137128 y cuenta con 2 intrones que se distinguen como dos recuadros oscuros en el transcrito (Figura 8).

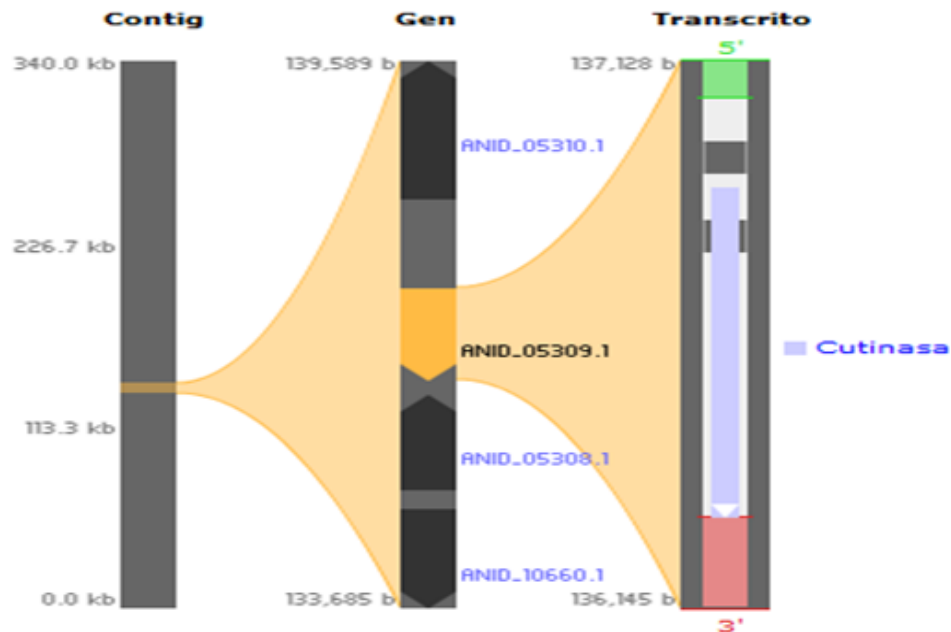


Figura 8. Localización en el genoma de *Aspergillus nidulans* del gen de la cutinasa AN5309.2. Los intrones se señalan con recuadros gris oscuro y el transcrito final en gris claro.



La secuenciación de la enzima señala que posee un péptido señal, una característica común de las enzimas extracelulares. La longitud del péptido señal abarca los primeros 18 aminoácidos de la secuencia, dicha ruptura ocurre entre un residuo de alanina y asparagina (VAA-NP); con este dato se calcularon los puntos isoeléctricos y PM de la enzima con y sin péptido señal. La secuencia total (213 aminoácidos) tiene un pI de 6.88 y un PM de 22.7 kDa, mientras que el producto final (195 aminoácidos) tiene un pI de 6.32 y un PM de 20.55 kDa ( $\approx 21$  kDa).

La composición de los aminoácidos de la cutinasa AN5309.2 (ANCUT1) se señala en la Tabla 6. Su análisis indica que el 46% corresponde a residuos de naturaleza alifática (Ala, Ile, Gly, Leu, Val) dando como resultado un índice alifático alto (102.21) y un valor calculado de hidropatía promedio de 0.184, lo que indica que la enzima es de naturaleza hidrofóbica, lo cual se refleja en los residuos hidrofóbicos que se localizan cercanos al sitio activo y al sitio de unión del sustrato, y en su estructura central de lámina  $\beta$  (Esqueda-Domínguez, 2012).

Tabla 6. Composición de aminoácidos de cutinasa ANCUT1.

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



Los residuos catalíticos de la cutinasa AN5309.2 se localizan en Ser127, Asp182 e His195. Se observa en la Tabla 6 que existen seis residuos de cisteína en la secuencia de AN5309.2 que pueden formar puentes disulfuro que brinden mayor estabilidad a la enzima. Los resultados obtenidos también permiten inferir que la cutinasa AN5309.2 (ANCUT1) no posee sitios de glicosilación, hecho que se refleja en que el PM teórico es semejante al PM experimental.

## 2.8 Purificación de proteínas

La purificación de proteínas es la separación de proteínas de interés del resto de una mezcla compleja para su posterior caracterización. Esta metodología es necesaria antes de intentar comprender las interacciones de las proteínas con otras moléculas (Mathews *et al.*, 2002). Es sumamente importante mencionar que no existe la técnica ni el esquema de purificación que permita purificar todo tipo de proteína, por lo que se debe desarrollar una estrategia para la purificación de cada proteína.

Se han purificado varios miles de proteínas en forma activa con base en características como solubilidad, tamaño, carga afinidad específica de unión. El mecanismo habitual consiste en que la mezcla de proteínas se somete a diferentes separaciones, cada una de ellas basada en propiedades diferentes, para obtener una proteína pura. En cada paso de la purificación, se ensaya la actividad de la proteína deseada y se determina la concentración proteica. Se necesitan cantidades importantes de proteínas puras, del orden de muchos miligramos, para esclarecer sus estructuras tridimensionales y sus mecanismos de acción. Por lo tanto el rendimiento global es un rasgo importante de un esquema de purificación (Berg *et al.*, 2003).



En cuanto a la eficiencia de cada paso ésta viene dada por el «rendimiento» o la «recuperación» (que es el porcentaje retenido de la actividad original de la enzima) y por la «purificación» o «factor de purificación» (que es el factor en que ha aumentado la actividad específica de la preparación). El objetivo es optimizar ambos factores. Algunas veces un buen rendimiento se sacrifica a causa de un paso de purificación excelente; algunas otras veces un buen paso de purificación no se utiliza porque el rendimiento es demasiado bajo (Segel *et al.*, 1982).

Las principales limitaciones en los procesos de purificación tradicionales incluyen los bajos rendimientos y largos períodos de tiempo, por lo que nuevas técnicas como los procesos en membrana, sistemas acuosos de dos fases e inmunopurificación han ido cambiando el panorama de la purificación de enzimas (Kumar *et al.*, 2009).

## **2. 9 Métodos de purificación**

Existe una gran variedad de métodos de purificación de proteínas, los cuales van desde la concentración de la proteína de interés por precipitación con iones o la precipitación con solventes orgánicos, hasta los métodos de separación cromatográficos, los cuales ofrecen no solo una mayor rentabilidad de uso sino que también son más flexibles y más sencillos de utilizar.

Un primer paso en el estudio, purificación y caracterización de una proteína es generalmente el lavado del tejido y la aplicación de una técnica que rompa las células si la enzima es intracelular. La separación del extracto proteico de los restos celulares se realiza generalmente por centrifugación, aunque una técnica de filtración puede ser útil.



Como ya se mencionó no hay reglas generales respecto al orden de las etapas de purificación, aunque el tratamiento con calor (cuando es posible) y la precipitación con sulfato de amonio se realizan generalmente al principio de la secuencia de purificación. La filtración con gel puede ir a continuación de la precipitación con sulfato de amonio y, por lo tanto, servir para desalinizar la preparación, así como para fraccionar las proteínas de acuerdo a su tamaño. Si la cromatografía de intercambio iónico va a continuación de la etapa del sulfato de amonio, entonces será conveniente el dializar primero la preparación, o pasar la preparación a través de una columna de filtración con gel. La eliminación del sulfato de amonio facilitará la unión de las proteínas a la columna de intercambio iónico. Hay otros pasos para la purificación que pueden ser eficaces para determinadas enzimas como son: la centrifugación diferencial (para enzimas de mitocondrias, cloroplastos, núcleos, microsomas, ribosomas), precipitación por pH, precipitación por disolventes orgánicos (por ejemplo etanol, acetona), precipitación por sulfato de protamina o por sulfato de estreptomicina (para precipitar ácidos nucleicos y proteínas ácidas), cromatografía de afinidad y electroforesis en gel. La pureza de la preparación final debe comprobarse por varios métodos antes de concluir que la preparación es homogénea (Segel *et al.*, 1982).

En el Apéndice A se explican más a detalle algunos métodos utilizados para la purificación de las proteínas.

## **2. 10 Purificación y caracterización de cutinasas**

La purificación de enzimas de fuentes microbianas se inicia con la separación de la biomasa del medio de cultivo por filtración, si la enzima es extracelular, o con el uso de choques osmóticos si la enzima es intracelular. A continuación se realiza una concentración selectiva por



precipitación a pH ácidos, con sulfato de amonio, o con solventes orgánicos, como acetona fría, o por medios físicos como la ultrafiltración. Luego el extracto enzimático concentrado se pasa por columnas de cromatografía de afinidad, de intercambio iónico (SP-Sephadex, DEAE-celulosa) y filtración en gel para recuperar la fracción de interés (Longhi y Cambillau, 1996).

En la Tabla 7 se muestran ejemplos de algunas cutinasas que han sido purificadas.

Tabla 7. Cutinasas que han sido purificadas.

Fuente de Cutinasa	Método de purificación	Referencia
<i>Venturia inaequalis</i>	Precipitación con acetona al 75% v /v y diálisis Cromatografía de filtración en gel, Cromatografía de intercambio aniónico, Electroforesis SDS-PAGE.	Köller y Parker, 1989
<i>Colletotrichum kahawae</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Precipitación con sulfato de amonio 50% (w/v), ácido acético 30 % v/v y Cromatografía de filtración en gel, Cromatografía de intercambio aniónico débil, Cromatografía de intercambio catiónico fuerte, Electroforesis SDS-PAGE.	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>Fusarium solani</i>	Choque osmótico, precipitación ácida, diálisis, Cromatografía de intercambio iónico.	Brissos <i>et al.</i> , 2008
<i>Fusarium roseum culmorum</i>	Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 50% y diálisis, Cromatografía de filtración por gel y de intercambio iónico, Electroforesis SDS-PAGE.	Soliday y Kolattukudy, 1976
<i>Tropaeolum majus</i>	Cromatografía de filtración por gel, de intercambio iónico y de isoelectroenfoque, Electroforesis SDS-PAGE.	Maiti <i>et al.</i> , 1979
<i>Monilinia fructicola</i>	Purificación con trifluorometil cetonas (TFK), Cromatografía de afinidad, Electroforesis SDS-PAGE.	Wang <i>et al.</i> , 2000
<i>Coprinopsis cinérea</i>	Fraccionamiento de espuma, esta técnica es de separación de burbuja por adsorción, Isoelectroenfoque. Electroforesis SDS-PAGE.	Merz <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas fluorescens putida</i>	Precipitación con acetona, Cromatografía por filtración en gel y de intercambio iónico, Electroforesis SDS-PAGE.	Sebastian y Kolattukudy, 1988



<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Precipitación con (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> al 50% y diálisis, Cromatografía de filtración por gel, Cromatografía de intercambio iónico, Electroforesis SDS-PAGE.	Dickman <i>et al.</i> , 1982
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	Precipitación con acetona, Cromatografía de intercambio iónico, Cromatografía de interacción hidrofóbica, Electroforesis SDS-PAGE	Bonnen y Hammerschmidt, 1989
<i>Botrytis cinerea</i>	Cromatografía de filtración por gel, DEAE, Electroforesis SDS-PAGE	Gindro y Pezet, 1999
<i>Alternaria brasicaicola</i>	Cromatografía de filtración por gel, Cromatografía de intercambio iónico, Electroforesis SDS-PAGE.	Trail y Köller, 1993

En la Tabla anterior se observa que se han empleado muchas técnicas para purificar cutinasas, sin embargo en ninguna de ellas se ha utilizado la electroforesis de elución continua. A continuación se muestran casos en donde se ha utilizado exitosamente esta técnica para purificar enzimas.

En la Tabla 8 se muestran algunos reportes donde emplean la electroforesis de elución continua.

Tabla 8. Artículos que reportan el uso de electroforesis de elución continua.

<b>Muestra purificada</b>	<b>Referencia</b>
Proteína de <i>Salmonella</i>	Dinjus y Müller, 1992
Proteína de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	González <i>et al.</i> , 2005
Carboxilesterasa de <i>Bacillus pumilus</i> GMA1.	Ayala-Esquivel, 2011
Cutinasa ANCUT2 de <i>Aspergillus nidulans</i>	Castro-Ochoa <i>et al.</i> , 2012
Cutinasa ANCUT2 de <i>Aspergillus nidulans</i>	Bermúdez-García, 2013

Utilizando el equipo Prep Cell ó Mini Prep cell de Bio-Rad, donde la única diferencia que hay entre ambos es el tamaño.

Por la facilidad de operación y la posibilidad de coleccionar material que pueda ser analizado por otras técnicas, como LC-MS, se seleccionó esta metodología para la purificación de ANCUT1.



### **III. JUSTIFICACIÓN**

Las cutinasas han sido consideradas como enzimas versátiles, con potencial de aplicación en diversas industrias. Es importante conocer sus propiedades para maximizar su desempeño, por lo que se requiere de su purificación y caracterización.

Las cutinasas mejor conocidas son las producidas por el hongo fitopatógeno *Fusarium solani* y, en menor medida, las de *Aspergillus oryzae*. En el grupo de trabajo se ha trabajado con diversas carboxilesterasas producidas por *A. nidulans*, organismo ampliamente estudiado como modelo de estudio en análisis genético, y del que se cuenta con la secuencia del genoma completo. Por ello, se sabe que existen cuatro genes que codifican para cutinasas putativas (Tabla 5), de las cuales el grupo de trabajo ha identificado a los productos de dos de ellas: a) la cutinasa ANCUT2 (29 kDa), la cual ha sido purificada y caracterizada y b) la cutinasa ANCUT1, que se ha trabajado en extracto crudo, con el cual no se observó hidrólisis de la cutina en las condiciones evaluadas pero cuya producción es inducida por cutina y no por otras fuentes lipídicas.

El presente proyecto toma como modelo de estudio la enzima ANCUT1 (22 kDa) de *Aspergillus nidulans* PW1, de la cual existe poco conocimiento, para su purificación y posterior caracterización bioquímica. Esto permitirá tener información acerca de la verdadera naturaleza de la enzima, de sus posibles aplicaciones como cutinasa o como esterasa.





#### **IV. HIPÓTESIS**

A partir de un medio optimizado que utiliza cutina como inductor será posible obtener la cutinasa ANCUT1 de 22 kDa producida por *Aspergillus nidulans* PW1. Tras su purificación y caracterización bioquímica y cinética será posible determinar su naturaleza cutinolítica o esterolítica.



## **V. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

- Determinar las propiedades bioquímicas y cinéticas de la cutinasa de 22 kDa de *Aspergillus nidulans* PW1.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Producir el extracto enzimático crudo que contenga la enzima de 22 kDa de *Aspergillus nidulans* PW1 utilizando cutícula de manzana como inductor.
- Concentrar la enzima por ultrafiltración y/o precipitación con sulfato de amonio.
- Purificar la enzima de 22 kDa de *Aspergillus nidulans* PW1 mediante electroforesis de elución continua y determinar sus propiedades bioquímicas y cinéticas.



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Reactivos y equipos

Tabla 9. Reactivos y marcas.

<b>Reactivo</b>	<b>Marca</b>
➤ Acetona	Sigma-Aldrich
➤ Acetato de <i>p</i> -nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Acetato de sodio	Baker
➤ Ácido acético glacial	Baker
➤ Ácido bórico	Baker
➤ Ácido oxálico	Baker
➤ Acrilamida	Bio-Rad
➤ Agar	Difco
➤ Alcohol etílico	Baker
➤ Alcohol isopropílico	Baker
➤ $\alpha$ -naftil acetato	Sigma-Aldrich
➤ Arginina	Sigma-Aldrich
➤ Azul de bromofenol	Bio-Rad
➤ Biotina	Sigma-Aldrich
➤ $\beta$ -mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
➤ Bis-Acrilamida	Bio-Rad
➤ Butirato de <i>p</i> -nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ CAPS	Sigma-Aldrich
➤ Carbonato de sodio	Baker
➤ Cloruro de cobalto hexahidratado	Baker
➤ Cloruro de manganeso tetrahidratado	Baker
➤ Cloruro de potasio	Baker
➤ Cloruro de sodio	Baker
➤ Decanoato de <i>p</i> -nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Dextrosa	Baker
➤ Dimetil sulfóxido	Sigma-Aldrich
➤ EDTA tetrasódico	Baker
➤ Estearato de <i>p</i> -nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Fast Red TR	Sigma-Aldrich
➤ Fenilmetilsulfonilo	Sigma-Aldrich
➤ Fosfato de potasio monobásico	Baker
➤ Fosfato de sodio dibásico	Baker
➤ Fosfato de sodio monobásico	Baker
➤ Glicerol	Baker
➤ Glicina	Bio-Rad
➤ Hexano	Baker
➤ Hidróxido de sodio	Baker
➤ Laurato de <i>p</i> -nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Marcador de bajo peso molecular	Bio-Rad
➤ Metanol	Baker
➤ Metionina	Research organics



➤ Miristato de p-nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Molibdato de amonio tetrahidratado	Baker
➤ Nitrato de plata	Sigma-Aldrich
➤ Nitrato de sodio	Baker
➤ Octanoato de p-nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Oxalato de amonio	Baker
➤ Palmitato de p-nitrofenilo	Sigma-Aldrich
➤ Persulfato de amonio	Bio-Rad
➤ Reactivo de Bradford	Bio-Rad
➤ SDS	Bio-Rad
➤ Silica gel	Baker
➤ Skim Milk	Oxoid
➤ Sulfato cúprico	Baker
➤ Sulfato de amonio	Baker
➤ Sulfato de magnesio	Baker
➤ Sulfato de magnesio heptahidratado	Merck
➤ Sulfato de zinc heptahidratado	Baker
➤ Sulfato ferroso heptahidratado	Baker
➤ Temed	Bio-Rad
➤ Tolueno	Baker
➤ Tris base	Bio-Rad
➤ Tritón X-100	Sigma-Aldrich
➤ Tween 80	Cosmopolita

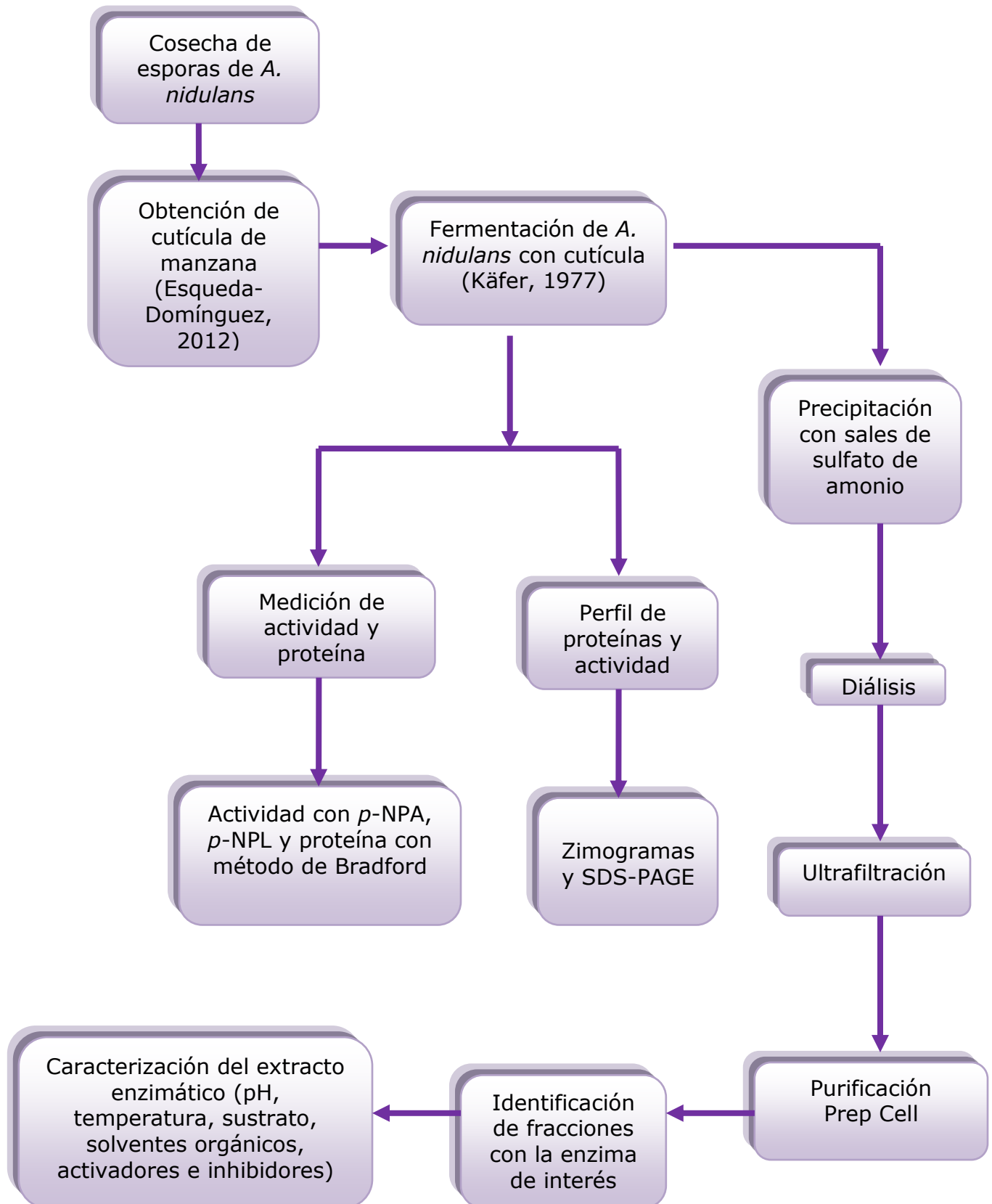
Tabla 10. Equipos.

### Equipo

- Amicón, equipo de ultrafiltración
- Autoclave Yamato SM300
- Balanza analítica Voyager
- Balanza granataria Adamson
- Bomba peristáltica Modelo EP-1 Bio-Rad
- Centrifuga Biofuge
- Centrifuga Beckman J2-MC
- Colector de fracciones Bio Rad
- Equipo Phastsystem Pharmacia modelo LKB
- Fuente de poder Modelo 164-5070 Bio-Rad
- Kit para electroforesis
- Kit para glicosilación Roche
- Lector de microplacas Epoch Biotek
- Membrana MF-Millipore 0.22  $\mu\text{m}$
- Membrana de ultrafiltración de Amicón de 10 kDa de límite de corte nominal (NWCO)
- Membrana de Diálisis de 14 kDa NWCO
- Membrana de ultrafiltración de Amicón de 1 kDa NWCO
- Mini Prep cell modelo 491 Bio-Rad
- Membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF)
- Papel filtro Whatman #1
- Trans Blot<sup>®</sup> SD "Semi-dry Transfer Cell" Bio-Rad



## 6.2 Estrategia experimental





### 6.3 Microorganismo

Se utilizó una cepa de *A. nidulans* PW1 auxótrofa de arginina y no patógena, la cual fue proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

### 6.4 Obtención de cutícula

Para la obtención de cutícula se lavaron y pelaron 10 kg de manzana de la variedad Golden Delicious. Se disolvieron 32 g de ácido oxálico (4 g/L) y 128 g de oxalato de amonio (16 g/L) en 8 L de agua destilada y posteriormente se adicionó la cáscara. Al comenzar a hervir se contaron 30 min, al finalizar el tiempo se lavó y filtró la cáscara hasta quedar libre de residuos y se puso a secar en estufa a 50 °C durante una noche. Una vez seca se molió hasta obtener un polvo fino y se almacenó en un bote etiquetado a temperatura ambiente (Esqueda-Domínguez, 2012).

De los 10 kg de manzana pelados se obtuvieron 27.3 g de cutícula, (Figura 9). En el grupo de trabajo ya se ha empleado cutina pura como inductor, pero al ser su método de extracción laborioso, se optó por la utilización de la cutícula de manzana la cual presenta las ventajas de ser un sustrato de fácil obtención y bajo costo. Se sabe que a partir de 12 kg de manzana se obtienen aproximadamente 38 g de cutícula, de los cuales 15 g corresponden a cutina (Segoviano-Reyes, 2011). De este modo, se realizó un ajuste a la concentración inicial empleada de cutícula de 200 mg/ 50 mL, para adicionar al medio la cantidad equivalente de cutícula a la cantidad de cutina utilizada por Segoviano-Reyes (2011) y así poder asemejar más las condiciones de producción de enzima entre ambos tipos de inductores. Se determinó que la cutina constituye aproximadamente el 40% de peso de la cutícula, lo que concuerda con lo reportado por Heredia (2002).



Figura 9. Cutícula de manzana después de haber sido tratada con ácido oxálico, oxalato de amonio y molida.

### 6.5 Conservación de la cepa

Las esporas de *A. nidulans* fueron cosechadas en placas de medio mínimo descrito por Käfer (1977), y resuspendidas en una solución de leche al 5% y se conservaron en sílica gel a 4 °C. La conservación de las esporas se llevó a cabo de la siguiente manera:

- 1.- Se colocó 1 mL de leche estéril al 5% de la marca Skim-Milk en la caja petri donde se hizo la cosecha de esporas y se raspó con un asa micológica.
- 2.- Se tomaron 100  $\mu$ L de la leche con las esporas y se pasaron a un frasco de vidrio con sílica-gel estéril lleno a una tercera parte. El tubo de sílica gel se llenó hasta una tercera parte, se esterilizó y se dejó medio abierto en la estufa de 50 °C para que se evaporara el agua.
- 3.-La muestra se agitó en vórtex hasta deshacer los grumos.

### 6.6 Reactivación de *A. nidulans* PW1 y cosecha de esporas

Se prepararon 10 cajas Petri con medio mínimo de Käfer (1977), a las cuales se les sembró aproximadamente 5 granos de sílica gel con esporas de *A. nidulans* PW1 y se incubaron durante cuatro días a 37 °C. Para cosechar las esporas se agregaron 5 mL de Tween 80 estéril al 0.1% a cada una de las cajas Petri y se rasparon cuidadosamente con



una asa micológica; las esporas se recuperaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Posteriormente, se centrifugó el contenido del tubo durante 15 min a 10,000 rpm (Centrifuga Beckman, rotor J20), se desechó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril para nuevamente centrifugar el contenido bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces y finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de agua destilada estéril. Una vez obtenida la solución final, se realizó un conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Apéndice B) para lo cual se tomaron 990  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y 10  $\mu\text{L}$  de la solución de esporas en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó y se colocaron 20  $\mu\text{L}$  en cada extremo de la cámara y se realizó el conteo para calcular la concentración y el volumen de solución de esporas a adicionar para futuras inoculaciones con  $1 \times 10^6$  esporas/mL. Las esporas se almacenaron a 4 °C.

Del conteo realizado a la solución tras la cosecha de esporas se supo que contenía  $6.27 \times 10^8$  esporas/mL. Se realizaron los cálculos para ajustar el volumen de solución para la inoculación, resultando que un volumen de 79  $\mu\text{L}$  era necesario para inocular 50 mL de medio para obtener una concentración final de  $1 \times 10^6$  esporas/mL.

## 6.7 Preparación del medio mínimo de cultivo

Se elaboró el medio mínimo de acuerdo a lo descrito por Käfer (1977); los componentes y sus concentraciones se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Composición del medio mínimo para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

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





Requerimientos		
Arginina	5 mL/L	16.8 % w/v
Biotina	0.5 mL/L	0.05 %
Metionina	0.11 g/L	--

Para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* se le adicionaron al medio mínimo los requerimientos nutricionales de la cepa. Para preparar la solución stock de arginina se disolvieron 1.68 g a 10 ml de agua destilada y la biotina se disolvió en etanol al 70%. Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C.

Se ajustó el pH a 6.5 con una solución de NaOH 0.1 M y se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C por 15 min.

La composición de las soluciones de sales 20x y de elementos traza 100x se especifican en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Composición de la solución de sales 20x para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

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

Tabla 13. Composición de la solución de elementos traza 100x para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

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



Para preparar cada una, los compuestos se adicionaron en el orden descrito llevando a un volumen de 80 mL de agua destilada, disolviendo cada uno antes de adicionar el siguiente. La solución de elementos traza se calentó hasta ebullición y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones se aforaron a 100 mL con agua destilada.

### ➤ 6.7.1 Medio optimizado

El medio mínimo utilizado originalmente se modificó de acuerdo a la optimización realizada por Esqueda-Domínguez (2012). La composición se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición del medio optimizado.

Compuesto	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza 100x	1 mL/L
Glucosa	10 g/L
Arginina	5 mL/L
Biotina	0.5 mL/L
Metionina	0.11 g/L
cutícula	4 g/L

Al medio de cultivo se le midió el pH para ajustarlo a pH de 6.5 con una solución de NaOH 0.1 M. Una vez alcanzado, se repartió en volúmenes de 50 mL en matraces de 250 mL, se adicionó la cutícula molida de manzana al medio como fuente inductora de la enzima, en una concentración de 200 mg por cada 50 mL de medio y se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C por 15 min. Al término de la esterilización se dejaron reposar los matraces a temperatura ambiente antes de inocular el medio.

Cada uno de los matraces con 50 mL de medio se inoculó con  $1 \times 10^6$  esporas/mL de *Aspergillus nidulans* PW1. Las fermentaciones se



realizaron a temperatura de 37 °C y 300 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific) por 48 h.

Pasado este tiempo se filtraron los matraces al vacío utilizando un papel filtro Whatman # 1. El extracto crudo se guardó para realizar las pruebas de actividad, de proteína y sus respectivas separaciones en geles.

## **6.8 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína**

### **➤ 6.8.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca**

Para evaluar de manera rápida la actividad de la enzima se realizaron ensayos en microplaca utilizando soluciones de  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato (*Solución A*) y Fast Red como revelador (*Solución B*). En un pozo de la microplaca se adicionaron 75  $\mu$ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 (buffer de trabajo), el cual sirvió de blanco. Se tomaron 75  $\mu$ L de muestra de extracto y se adicionaron a los pozos siguientes. Al blanco y muestras se le adicionaron 75  $\mu$ L de la solución de  $\alpha$ -naftil acetato y se dejó incubar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 75  $\mu$ L de la solución de Fast Red a cada pozo y se observó la aparición de un color marrón, cuya intensidad depende de que haya actividad de esterasa en las muestras tomadas.

*Preparación de las soluciones A y B:*

- *Solución A:* Se pesaron 0.8 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, se disolvieron en 0.2 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2
- *Solución B:* Se pesaron 2 mg de Fast Red TR, se agregaron 1.92  $\mu$ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 2 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2.



### ➤ 6.8.2 Cuantificación de proteína en microplaca

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford, cuya sensibilidad es de 1-100  $\mu\text{g}$  (Lee y Whiteley, 2006). El volumen final de reacción fue de 200  $\mu\text{L}$ . Se colocaron en la microplaca 160  $\mu\text{L}$  de muestra, 40  $\mu\text{L}$  del reactivo de Bradford (Bio-Rad) y un blanco con 160  $\mu\text{L}$  con de agua desionizada y 40  $\mu\text{L}$  de dicho reactivo. Todo se mezcló perfectamente y se incubó 5 min a temperatura ambiente. El color generado se cuantificó en el lector de microplacas Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, a una absorbancia de 595 nm. Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entrara en un rango confiable de una curva estándar, realizada con albúmina sérica (Apéndice C).

### ➤ 6.8.3 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca

La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustrato acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA). Se preparó un stock de *p*-NPA 10 mM en etanol, de este stock se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se añadieron 900  $\mu\text{L}$  de etanol para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM. Se adicionaron para el blanco 180  $\mu\text{L}$  de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7.2 y 20  $\mu\text{L}$  de *p*-NPA en etanol a una concentración 1 mM y para el caso de la muestra se colocaron 170  $\mu\text{L}$  del mismo buffer, 10  $\mu\text{L}$  de enzima a una concentración de 0.08 mM y 20  $\mu\text{L}$  de sustrato. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada min, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Nawani, 2006; Bornscheuer *et al.*, 2005). Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato



por min. La cantidad de acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA) se interpoló en una curva patrón de *p*-NP (Apéndice D).

## 6.9 Preparación del perfil de proteínas y zimogramas

El perfil de proteínas y la demostración de la presencia de actividad de esterasa se realizaron por medio de geles de acrilamida teñidos con plata y zimogramas, cuya preparación se detalla a continuación.

### ➤ 6.9.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Utilizando como detergente dodecilsulfato sódico (SDS) y como agente reductor el  $\beta$ -mercaptoetanol, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Las muestras de extracto se trataron previamente con un buffer de carga 4x con  $\beta$ -mercaptoetanol y se calentaron a 95 °C durante 5 min para desnaturalizar a las proteínas. Como referencia se utilizó un marcador de bajo peso molecular (97 a 14 kDa de Bio-Rad) y las muestras se cargaron en los carriles asignados previamente. Los geles se corrieron con un buffer de corrida 1x en una cámara de electroforesis (MiniProtean II y IV Bio-Rad) inicialmente a 80 V; después de 30 min, el voltaje se subió a 120 V a 4 °C.

#### ✓ 6.9.1.1 Tinción con plata

El perfil de proteína de la muestra se evidenció con la técnica de tinción con plata, la cual consistió en que los geles se dejaron en una solución con 30% de etanol y 10% de ácido acético (solución fijadora) durante toda una noche. Pasado este tiempo se realizaron 2 lavados con etanol al 30% durante 30 min cada uno, después se hicieron 2 lavados con agua desionizada durante 10 min cada uno. Posteriormente se agregó la



solución de plata que consistió en 250  $\mu$ L de un stock de nitrato de plata al 20% en 50 mL de agua desionizada. Esto se incubó durante 30 min con agitación constante, después se hicieron 2 lavados con agua desionizada durante 40 s y por último se reveló con una solución de carbonato de sodio 2.5%/formaldehído 37% durante 4-6 min o hasta la aparición de bandas ópticas. Al final se realizaron 3 lavados con agua desionizada y al último lavado se le adicionó una pequeña cantidad de ácido acético para equilibrar el pH.

### ➤ 6.9.2 Zimogramas

Para observar la actividad de esterasa de la cutinasa se realizaron geles de poliacrilamida con las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Una vez llevada a cabo la electroforesis, el gel se incubó en una solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 durante 30 min, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos 50 mM pH 7.2 con Tritón X-100 al 5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de  $\alpha$ -naftil acetato (*Solución A*) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente y finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red (*Solución B*) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

*Preparación de la soluciones A y B:*

- *Solución A.* Se pesaron 10 mg de  $\alpha$ -naftil acetato, se disolvieron en 2.5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2
- *Solución B.* Se pesaron 25 mg de Fast Red TR, se agregaron 24  $\mu$ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2.



## **6.10 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).**

Para el gel que se va a teñir con plata el extracto crudo se precipitó con ácido tricloroacético (TCA).

A 1 mL de muestra se le adicionaron 100  $\mu$ L (1/10 volumen) de 100% TCA (p/v). Se mantuvo en hielo por un mínimo de 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró y desechó. El pellet se lavó con 100  $\mu$ L de acetona, al adicionar la acetona, se agitó y centrifugó por 5 min a 14,000 rpm. Se retiró y desechó la acetona del pellet, este paso se realizó dos veces más. El pellet se secó completamente (el tubo se dejó abierto en la campana durante 15 min). Para evitar la presencia de acetona residual debido a que puede ocasionar que sea más difícil la resuspensión.

## **6.11 Purificación de la enzima**

### **➤ 6.11.1 Acondicionamiento de la muestra**

#### **✓ 6.11.1.1 Precipitación con sulfato de amonio**

Se colocaron en un vaso de precipitados 10 mL del extracto crudo en un baño de hielo sobre una parrilla de agitación. Mientras se encontraba en agitación se agregaron lentamente 6.5 g de sulfato de amonio para obtener una concentración al 65%. Este paso se realizó en un tiempo de 5-10 min. Se continuó con la agitación por 30 min más. Se centrifugó por 10 min a 8500 rpm. El sobrenadante se retiró y desechó y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer de fosfatos pH 7.2, 50 mM.

#### **✓ 6.11.1.2 Diálisis**

Para eliminar el sulfato de amonio se procedió a dializar la muestra con una membrana de 12-14 kDa NWC0. Se dejó en 4 L de agua desionizada con agitación constante durante toda la noche.



### ✓ 6.11.1.3 Concentración de la muestra dializada por ultrafiltración en Amicón

Para obtener un extracto concentrado de la enzima se realizó una ultrafiltración con una membrana de 1 kDa NWCO. El dializado se vació a la cámara con agitación de Amicon, la cual se debe mantener aproximadamente a 4 °C. La ultrafiltración se llevó a cabo a una velocidad de aproximadamente 1 gota/s y, para comprobar que la cutinasa no se estuviera filtrando al saliente, se realizaron a éste pruebas rápidas cualitativas de actividad.

## 6.12 Purificación mediante electroforesis de elución continua

### ➤ 6.12.1 Mini Prep cell

Se utilizó el equipo Mini Prep Cell de Bio-Rad, con un gradiente de poliacrilamida de 14% y un flujo de 0.1 mL/min. Se cargaron al equipo 400 µL de muestra previamente ultrafiltrada con 100 µL de buffer de carga 4x. Todo esto se calentó a 95 °C durante 5 min. Se recolectaron 50 fracciones en tubos eppendorf de 1.5 ó 2 mL, con un volumen de 250 µL cada tubo.

La purificación en el equipo se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se prepararon soluciones de acrilamida, buffer de Tris pH 8.8 y 6.8, agua desionizada filtrada y esterilizada. Todos se desgasificaron utilizando un matraz Kitasato conectado al vacío y con agitación por 15 min. Primero se niveló la base utilizando los tornillos, el tubo del gel va dentro de la base redonda con tornillos. Se preparó el gel separador al 14% de acuerdo a lo descrito por Laemmli (1970), se vació la solución dentro del tubo cilíndrico con ayuda de una jeringa, lentamente para no formar burbujas. Se añadió 1 mL de isopropanol y se dejó polimerizar el





gel durante 2 h. Pasado ese tiempo, se eliminó el isopropanol y se añadió buffer pH 8.8, en el que el gel permaneció hasta el otro día.

Al otro día se retiró el buffer y se preparó el gel concentrador al 4% con las soluciones (buffer pH 6.8) desgasificadas, se vació sobre el gel separador con una jeringa o punta teniendo cuidado de no formar burbujas y se dejó polimerizar durante 2 h.

Para montar el equipo, se ensambló el "harvest ring" junto con la membrana y el "frit" en el "support frit" purgando el sistema con ayuda de una jeringa llena de buffer de corrida 1x, hasta que no se observaron burbujas. Enseguida se ensambló el "harvest ring" armado con la base del gel, apretando los tornillos uniformemente para evitar que hubiera fugas. Una vez realizado este paso, el buffer salió a través de la manguera que va conectada a la base del gel. Esta se unió a la cámara de electroforesis y se conectó la manguera a la cámara interior, se purgó la manguera hasta que el buffer salió dentro de la cámara interna, se llenaron la cámara interna y la externa con 100 mL de buffer de corrida y la cámara de abajo, que es la más grande, con 400 mL. Por último, se inyectó la muestra dentro del tubo conteniendo al gel ya polimerizado.

Finalmente se tapó la cámara, se conectaron los electrodos a la fuente de poder y se conectó la manguera de la cámara elución a la bomba peristáltica y la manguera de ésta hacia el colector de fracciones previamente purgado con buffer de corrida.

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



### ➤ 6.12.2 Evaluación de las fracciones

A las fracciones colectadas a partir del Mini Prep Cell de Bio-Rad se les realizó la evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca descrita anteriormente. La única variante fue que se utilizó el buffer de fosfatos con la misma concentración, pero a pH 6, para asegurar que el pH del medio no interfiriera con la actividad enzimática.

## 6.13 Caracterización de la enzima purificada

### ➤ 6.13.1 pH óptimo

Se prepararon buffers de pH de 5-11. Los buffers utilizados fueron: para pH 5, acetatos 50 mM; para pH 6-7, fosfatos 50 mM; para pH 8 y 9, Tris-HCl 50 mM y para pH 10 y 11, CAPS 50 mM. La reacción se llevó a cabo adicionando en la microplaca un blanco de autohidrólisis, el cual consistió en 180  $\mu$ L de buffer correspondiente a cada pH, 20  $\mu$ L de sustrato acetato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPA), para las muestras se colocaron 170  $\mu$ L de dichos buffers, 20  $\mu$ L de sustrato (*p*-NPA) y 10  $\mu$ L de la enzima pura. También se realizó un control, por triplicado. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada min en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.

### ➤ 6.13.2 Estabilidad a pH

Se probó la estabilidad usando una microplaca a la cual se le adicionarón 170  $\mu$ L del buffer a evaluar (pH de 5-10) y 20  $\mu$ L la enzima pura. La mezcla se incubó a 4 °C durante 1 h y 3 h. Pasado este tiempo se le adicionó 20  $\mu$ L de (*p*-NPA), conservando las mismas cantidades que se ocuparon para el ensayo de pH óptimo realizando un blanco de autohidrólisis y un control, el análisis se efectuó por triplicado. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada min, excepto



para los pH 9 y 10 que fueron 5 min cada medio s en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.

### ➤ 6.13.3 Temperatura óptima

Se probaron temperaturas en el rango de 30 °C a 70 °C, utilizando buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2, se incubó con la enzima pura a dichas temperaturas durante 2, 4, 6, 8 y 10 min, y se utilizaron las mismas cantidades que se ocuparon para los ensayos anteriores, corriendo a la par un blanco de autohidrólisis para cada condición. Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 420 nm en espectrofotómetro Epoch (Biotek). La actividad enzimática fue medida por triplicado. Con los parámetros obtenidos de esta medición fue posible calcular la Energía de Activación ( $E_a$ ) de la enzima.

### ➤ 6.13.4 Temperatura de estabilidad

Se probó un rango de temperaturas de 30 a 70 °C; se permitió que el buffer de incubación alcanzara la temperatura a evaluar y a continuación se agregó la enzima pura. Se tomaron tres muestras para evaluar la estabilidad: a los 15 min, a los 30 min y 1 h de incubación. Se conservaron las mismas cantidades en microplaca que las que se ocuparon en los ensayos anteriores. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada min, en el espectrofotómetro Epoch (Biotek), a una absorbancia de 420 nm.

### ➤ 6.13.5 Especificidad por sustrato

Para estas pruebas se prepararon soluciones stock de 1 mM de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo en etanol, los cuales fueron: *p*-NPE (C18), *p*-NPP (C16), *p*-NPM (C14), *p*-NPL (C12), *p*-NPD (C10), *p*-NPO (C8), *p*-NPB (C4) y *p*-NPA (C2). Se agregaron 170  $\mu$ L de buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2. Se incubó la microplaca 1 h a 37 °C. Se agregaron 20



μL de enzima pura. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada min en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm. Se conservaron las mismas cantidades en microplaca que se ocuparon en los ensayos anteriores.

#### ➤ **6.13.6 Ensayo cutinolítico**

En un frasco vial se puso una reacción para un volumen final de 1 mL que contenía 700 μL de una dilución 2.5 de la enzima pura con 50 U de enzima y 5 mg de cutina pura previamente disueltos en 300 μL de tolueno (100%). De igual manera se puso un control de reacción con los mismos componentes de la reacción a excepción de la enzima. Se utilizó como referencia al ácido palmítico (C16), para observar los hidroxiácidos grasos de 16 carbonos liberados como producto de la reacción de hidrólisis de la cutina. Las reacciones se dejaron correr durante 5 días a 37 °C y 100 rpm; cada 24 h se tomaron muestras para monitorear la aparición de hidroxiácidos grasos libres, los cuales se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF).

- La fase móvil del Sistema de CCF: Éter de petróleo: dietil éter: ácido acético (60:40:1 v/v/v)
- Revelador: Diclorofluoresceína al 0.1%

#### ➤ **6.13.7 Ensayo de glicosilación**

Se realizó una prueba para determinar si la cutinasa de estudio se encontraba glicosilada y que esto pudiera causar un incremento en su peso molecular.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE de la muestra pura y las proteínas control. Posteriormente, se realizó una transferencia a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de la marca



PolyScreen<sup>®</sup> (Perkin-Elmer) durante 1 h a 15 V en un equipo Trans Blot<sup>®</sup> SD Semi-dry Transfer cell (Bio-Rad).

La membrana se utilizó para la detección y diferenciación de las glicosilaciones, empleando el kit "DIG Glycan Differentiation Kit" (Roche). En el kit se usa a la fosfatasa alcalina para la visualización de bandas de proteína glicosilada. La detección se logra mediante la unión de una lectina a la cadena de carbohidrato de la probable glicoproteína. La lectina está acoplada a digoxigenina, una molécula esteroidea que es reconocida a su vez por un anticuerpo antidigoxigenina acoplado a la fosfatasa alcalina. Al incubar con el 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (BCIP por sus siglas en inglés), que es sustrato de la fosfatasa alcalina, se lleva a cabo su hidrólisis, lo propicia la reducción del cloruro de 4-nitrotetrazolio (NBT), generando un compuesto colorido, permitiendo así la detección de glicoproteínas como bandas de color negro.

La diferenciación entre los tipos de glicosilaciones se hace probando la misma muestra con las diferentes lectinas, cada una de las cuales tiene afinidad por un tipo específico de glicosilación.

Las lectinas empleada correspondientes al kit en este ensayo se muestran en la siguiente Tabla 15.

Tabla 15. Lectinas empleadas y tipo de glicosilación que reconocen.

Lectinas	Azúcar que reconoce	Proteína control
Aglutinina de <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Manosa (N-glicanos)	Carboxipeptidasa
Aglutinina de <i>Sambucus nigra</i> (SNA)	Ácido siálico (2-6) galactosa, N-acetilgalactosamina, (N- y O-glicanos)	Transferrina
Aglutinina de <i>Maackia amurensis</i> (MAA)	Ácido siálico (2-3) galactosa (N- y O-glicanos)	Fetulina
Aglutinina de cacahuate (PNA)	Galactosa $\beta$ (1-3) N-acetilgalactosamina (O-glicanos)	Asialofetulina
Aglutinina de <i>Datura stramonium</i> (DSA)	Galactosa $\beta$ (1-4) N-acetilglucosamina (N- y O-glicanos)	Fetulina y asialofetulina



### ➤ **6.13.8 Determinación del punto isoelectrico**

Se realizó la determinación en el equipo "Phastsystem" modelo LKB (Pharmacia). Se usaron placas de isoelectroenfoque (IEF) "PhastGel" (GE Healthcare). Se colocaron 3  $\mu\text{L}$  de la enzima pura, la corrida se llevó a cabo en 30 min a 200 V y 3 W. Se usó un marcador de amplio rango de Bio-Rad. Los geles se tiñeron con plata, previamente sumergidos en una disolución de TCA al 20% y con  $\alpha$ -naftil acetato y Fast red como se ha mencionado anteriormente.

### ➤ **6.13.9 Actividad frente a iones metálicos, inhibidores y surfactantes**

Se utilizaron concentraciones al 1 mM y 10 mM para las cuales se realizaron stocks 100 mM, los iones metálicos empleados fueron:  $\text{MgSO}_4$ , KCl, NaCl,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{FeCl}_3$  y el quelante EDTA, como inhibidores fueron: el fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), y como surfactantes fueron: el dodecilsulfato sódico (SDS) y el Tween 80, estos dos últimos al 0.1% y al 1%. Se colocaron en un tubo eppendorf de 600  $\mu\text{L}$  las siguientes cantidades para las concentraciones de 1 mM y 0.1%; 0.25  $\mu\text{L}$  del stock correspondiente a cada uno de los activadores e inhibidores y 24.75  $\mu\text{L}$  de enzima pura, para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y para las concentraciones de 10 mM y 1%; 2.5  $\mu\text{L}$  del stock correspondiente y 22.5  $\mu\text{L}$  de la enzima pura para un volumen final también de 25  $\mu\text{L}$ .

Se preparó un blanco en donde la concentración del compuesto no cambió, solo se sustituyó la cantidad de enzima pura por buffer de corrida 1x. Todo esto se incubó a 4 °C por 1 h y pasado este tiempo se siguió la reacción durante 5 min en el equipo ya mencionado.



### ➤ 6.13.10 Estabilidad a solventes orgánicos

Para este ensayo se utilizaron concentraciones al 30% y al 50% de los siguientes solventes orgánicos: hexano, dimetil sulfóxido (DMSO), alcohol isopropílico (IPA), etanol y acetona. Se colocaron en un tubo eppendorf de 600  $\mu\text{L}$  las siguientes cantidades; 7.5  $\mu\text{L}$  de cada uno de los solventes y 17.5  $\mu\text{L}$  de enzima pura para un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y 12.5  $\mu\text{L}$  del solvente y 12.5  $\mu\text{L}$  de la enzima pura para un volumen final también de 25  $\mu\text{L}$ . Se preparó un blanco en donde la concentración del solvente no cambió, solo se sustituyó la cantidad de enzima pura por buffer de corrida 1x, todo esto se realizó por duplicado y se incubó a 4  $^{\circ}\text{C}$  por 24 h y pasado este tiempo se siguió la reacción durante 5 min en el equipo ya mencionado.

### ➤ 6.13.11 Determinación de los parámetros cinéticos

Se utilizaron diferentes concentraciones de *p*-NPA (ya que fue el éster por el que la enzima presenta una mayor actividad), las cuales fueron 0.5 mM, 0.75 mM, 1.5 mM y 2 mM, esto se hizo por duplicado. Se incubó la microplaca 30 minutos a 37  $^{\circ}\text{C}$ . La reacción se siguió durante 7 min tomando la lectura cada 40 s, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm. Esto se realizó para calcular los parámetros cinéticos  $k_m$ ,  $k_{cat}$  y la eficiencia catalítica.



## **VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **7.1 Producción de la enzima**

Se inoculó la concentración de esporas de *Aspergillus nidulans*  $1 \times 10^6$  esporas/mL en el medio optimizado para la producción de la cutinasa previamente descritos en Materiales y Métodos y se incubó durante 48 h, a 37 °C y 300 rpm para su producción. Como se aprecia en la Figura 10, el crecimiento ocurre homogéneo, en forma de pellets.



Figura 10. Crecimiento de *Aspergillus nidulans* en el medio optimizado utilizando cutícula de manzana como inductor, tras 48 h de incubación a 37 °C.

Transcurrido el tiempo de fermentación, se filtraron las células, se recuperó el extracto crudo y se le midió actividad de esterasa cualitativamente en microplaca, utilizando  $\alpha$ -naftil acetato y Fast Red, lo que se demuestra en la Figura 11.



Figura 11. Medición de actividad cualitativa del extracto crudo. (1) Blanco: 75  $\mu$ L de buffer fosfatos 50 mM pH 7.2, (2) y (3): 75  $\mu$ L Extracto crudo del medio optimizado para la cutinasa ANCUT1. En todos los casos se adicionaron 75  $\mu$ L de  $\alpha$ -naftil acetato y 75  $\mu$ L de Fast Red.





Se puede observar que el extracto crudo tiene buena actividad, ya que aparece una coloración rojo intenso, porque las enzimas con actividad de esterasa hidrolizan el  $\alpha$ -naftil acetato liberando  $\alpha$ -naftol, el cual reacciona con el Fast Red que es una sal de diazolio para formar un cromógeno de color rojo. La reacción se esquematiza en la Figura 12.

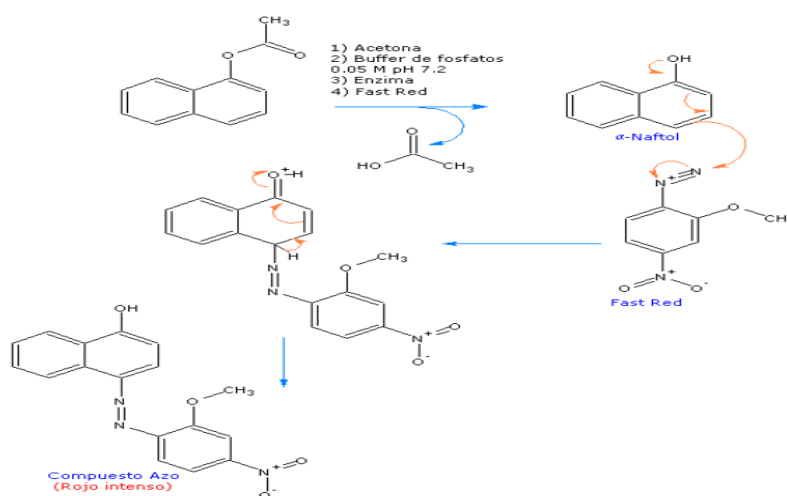


Figura 12. Reacción llevada a cabo en el ensayo cualitativo, usando como sustrato y revelador al  $\alpha$ -naftil acetato y Fast Red, respectivamente.

Una vez que se comprobó cualitativamente la presencia de actividad esterasa en el extracto crudo, se prosiguió a realizar geles de electroforesis (SDS-PAGE) al 14% y zimogramas para observar el peso molecular de la(s) enzima(s) responsable(s) de la actividad.

El perfil proteínico en gel desnaturizante se muestra en la Figura 13, en el panel A, no se aprecia un número elevado de bandas de proteínas en el rango de 15 y 20 kDa. En el panel B se muestra el zimograma, que permite identificar una única banda con actividad, en el peso molecular esperado (22 kDa). El gel fue analizado con el software GelDoc de Bio-Rad.

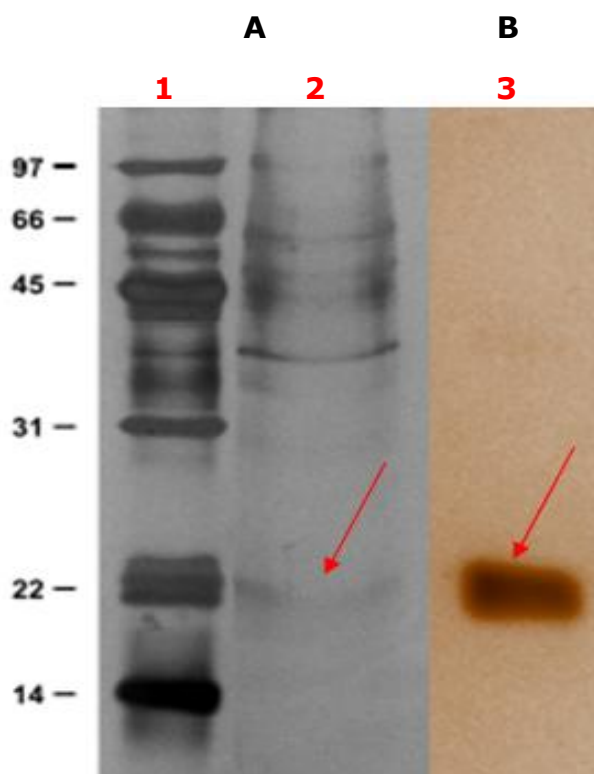


Figura 13. Perfil de proteínas del extracto crudo en SDS-PAGE. Panel A, tinción con plata: carril (1) MPM Low Range, Bio-Rad; Carril 2: Extracto crudo después del crecimiento de *A. nidulans* en medio optimizado para producción de ANCUT1. Panel B, tinción de actividad con  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato: carril 3: Zimograma del extracto crudo de *A. nidulans* en el medio optimizado para ANCUT1. Las flechas indican las bandas de interés correspondientes a la ANCUT1.

## 7.2 Concentración de la proteína y cuantificación de la actividad

Con el fin de contar con material suficiente para la posterior purificación de la enzima, se siguieron dos métodos para la concentración de la proteína: la ultrafiltración y la precipitación mediante sulfato de amonio. Para realizar estos dos pasos el volumen total del extracto crudo de 360 mL se dividió de la siguiente manera: 250 mL para ultrafiltración y 110 mL para precipitación con sulfato de amonio.

Para la ultrafiltración se utilizó una membrana de 10 kDa NWCO y se concentró la muestra reduciendo su volumen a 12.5 mL.

En el caso de la precipitación con sulfato de amonio se probaron dos concentraciones de sal diferentes: 55% y 65% (Figura 14).

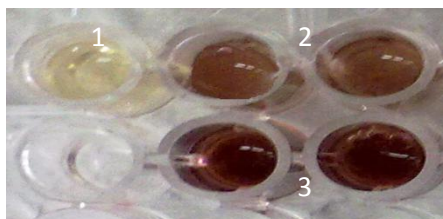


Figura 14. (1): Blanco, (2): Precipitación con sulfato de amonio al 55%, (3): Precipitación al 65%. Ambos realizados por duplicado.

Se observó que se tiene una mejor actividad cualitativa si se utiliza la precipitación con sulfato de amonio al 65%, por esto se trabajó con esta concentración. Posteriormente para eliminar el sulfato de amonio se dializó la muestra utilizando una membrana de 14 kDa NWCO.

Se midió la concentración de proteína mediante el método de Bradford y se cuantificó la actividad espectrofotométricamente con laurato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPL) para calcular la actividad específica y ver cuál de los métodos utilizados para la concentración del extracto crudo resultó más eficiente. La Tabla 16 muestra un resumen de los distintos métodos de concentración empleados.

Tabla 16. Comparación de las actividades del extracto crudo después de los distintos métodos de concentración empleados. Los resultados son los promedios de dos experimentos independientes para cada tratamiento.

Etapa	Volumen (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad vol. (U/mL)	Actividad vol. total (U)	Actividad específica (U/mg P)	Rendimiento (%)	Factor de Purificación (veces)
Extracto crudo	360	5.6	2016	1990.87	716713.2	355.51	100	1
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (65%) y Dializado (14 kDa NWCO)	110	0.066	7.26	419.94	46193.4	6362.78	6.45	17.89
Ultrafiltración (10 kDa NWCO)	12.5	0.042	0.53	2479.28	30991	59384.04	4.32	167



Para verificar cuál de los métodos utilizados para la concentración del extracto crudo resultaba en una menor pérdida de actividad, y que la enzima de interés era la que se estaba concentrando y la responsable de la actividad encontrada, se realizaron nuevamente geles SDS, nativo y zimogramas a estas muestras. Los resultados se muestran en las Figuras 15 y 16.

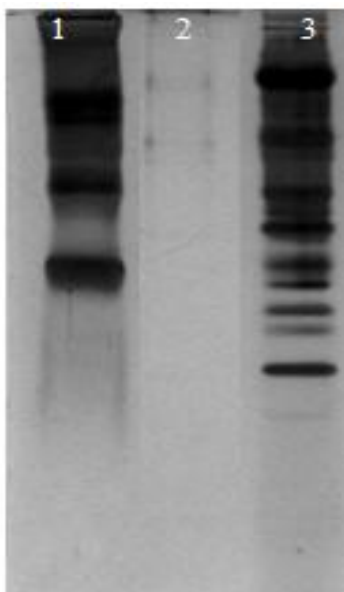


Figura 15. Gel nativo. Tinción con plata de las muestras después de utilizar los distintos métodos de concentración. Carril (1): extracto crudo; Carril (2): Precipitado y Dializado del extracto crudo; Carril (3): Ultrafiltrado del extracto crudo.

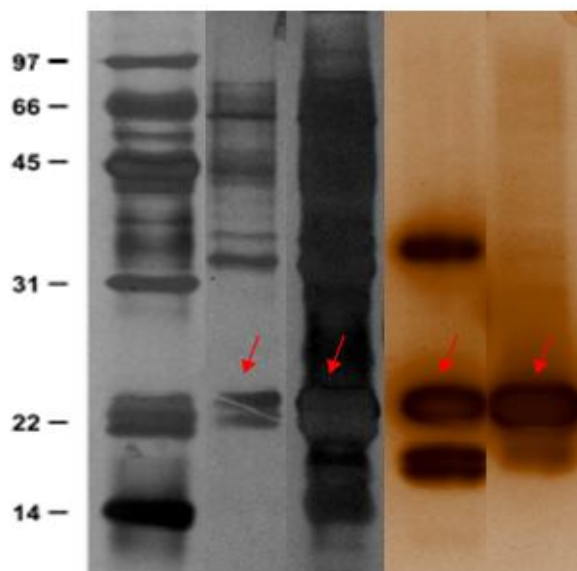


Figura 16. Perfil de proteínas en SDS-PAGE de las muestras después de utilizar los distintos métodos de concentración. Panel A, Tinción con plata. Carril (1): MPM Low Range de Bio-Rad; Carril (2): Precipitado y Dializado del extracto crudo; Carril (3): Ultrafiltrado del extracto crudo. Panel B, Zimograma, tinción con  $\alpha$ -naftil como sustrato. Carril (4): ultrafiltrado del extracto crudo; Carril (5): precipitado y dializado del extracto crudo. Las flechas indican la enzima ANCUT1.

En la Tabla 16 se muestran los valores de la actividad que se obtuvieron al emplear los distintos métodos de concentración, para el método de la precipitación y la diálisis posterior de la muestra, la actividad de esterasa disminuye notablemente con respecto a la ultrafiltración, lo que se puede deber a diversos factores tales como que la enzima se



desnaturaliza, las sales actúan como inhibidores o que la enzima se agrega y por tanto pierde actividad. Por otro lado, a pesar de que con la ultrafiltración se detecta un aumento considerable en la actividad específica, se puede ver claramente en el zimograma la presencia de otras bandas con actividad al concentrar la muestra, una de las cuales se ha reportado como una proteasa de 37 kDa que también presenta actividad esterasa (Peña-Montes *et al.*, 2008; Castro-Ochoa *et al.*, 2012). Probablemente estas bandas no se observan en el extracto crudo sin ultrafiltrar porque están en una baja concentración. Por este motivo se decidió llevar a cabo el paso de precipitación y diálisis, ya que así en el zimograma solo se observa una banda con actividad intensa de la cutinasa de 22 kDa, que es la que interesa purificar.

### **7.3 Purificación mediante electroforesis de elución continua**

Para purificar la cutinasa de interés se utilizó la electroforesis de elución continua utilizando un equipo llamado Mini Prep Cell de Bio-Rad, en condiciones desnaturizantes, conectado a una bomba peristáltica y a un colector de fracciones (Figura 17). Una vez que se tuvo la muestra precipitada y dializada se prosiguió a concentrarla por ultrafiltración utilizando una membrana de 1 kDa NWCO. Se resuspendieron 400  $\mu$ L de la muestra en 100  $\mu$ L de buffer de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol y SDS y se calentó por 5 min a 95 °C antes de cargarse dentro de la columna del gel.

Se corrió el gel desnaturizante a 1 W constante y se colectaron 50 fracciones de 250 mL cada una.

En la Figura 17 se muestran los equipos que se utilizaron para llevar a cabo la electroforesis de elución continua.

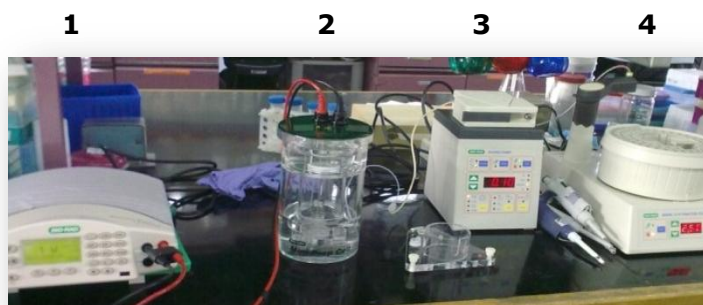


Figura 17. Equipos para llevar a cabo la electroforesis de elución continua. (1): Fuente de poder, (2): Mini Prep Cell de Bio-Rad, (3): Bomba peristáltica, (4): Colector de fracciones.

#### 7.4 Evaluación de la actividad de las fracciones colectadas

Una vez terminada la separación de las proteínas, se tomaron fracciones de tres en tres y se observó la actividad cualitativa en microplaca utilizando buffer de fosfatos 50 mM pH 6. Lo anterior, para asegurar que el pH del medio no interfiera con la actividad enzimática. Se detectaron algunas fracciones con actividad baja (Figura 18).

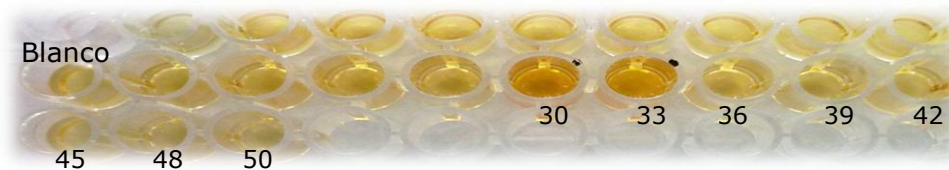


Figura 18. Actividad cualitativa de las fracciones obtenidas con el Mini Prep Cell de Bio-Rad. Se colocaron para el blanco 30  $\mu$ L de buffer de fosfatos 50 mM a pH 6, 30  $\mu$ L de cada fracción y 30  $\mu$ L de  $\alpha$ -naftil acetato y 30  $\mu$ L de Fast Red. Se observa una mayor actividad enzimática en las fracciones 30 y 33.

Por lo anterior se tomaron las fracciones de la 30 a la 40 para hacer un perfil de proteínas en SDS-PAGE, pero fue necesario primero renaturalizar las fracciones porque como ya mencionó anteriormente la separación se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes. Para esto se utilizó el buffer de de trabajo con Tritón 100-X al 0.5%. Las fracciones se incubaron en este buffer durante 24 h y posteriormente se observó actividad cualitativamente utilizando  $\alpha$ -naftil acetato y Fast Red.



Las fracciones que presentaron actividad fueron las que van de la 30 a la 39 (Figura 19).

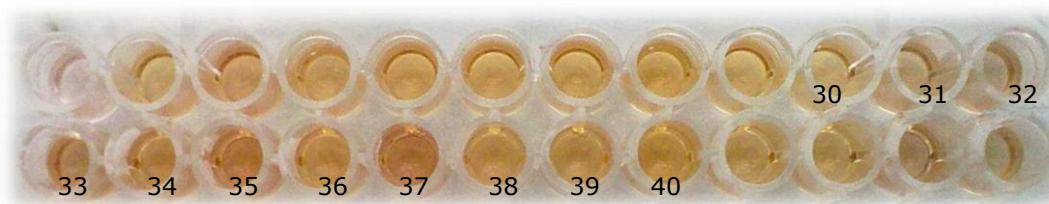


Figura 19. Fracciones de la 30 a la 40, las cuales son las que muestran mayor actividad enzimática después de 24 h de renaturalización. Se colocaron 30  $\mu$ L de cada fracción y 30  $\mu$ L de  $\alpha$ -naftil acetato y 30  $\mu$ L de Fast Red.

Estas fracciones se analizaron en SDS-PAGE y fueron teñidas con plata y  $\alpha$ -naftil acetato como sustrato para verificar que en dichas fracciones se encontraba la enzima pura y el gel fue analizado con el equipo GelDoc de Bio-Rad y el software Image Lab versión 3.0. Los resultados nos muestran una banda con el peso experimental (22 kDa) de la cutinasa en estudio (22 kDa) (Figura 20).

Se observaron adicionalmente dos bandas juntas a lo largo de todo el gel en la región de 50-70 kDa. Estas bandas están presentes en todas las fracciones eluidas por el método. Hay reportes en el grupo de trabajo de la presencia constante de estas bandas que indican que pudiera tratarse de contaminación con queratina de la piel debido a la manipulación de la muestra o por parte del equipo. Sin embargo, los zimogramas mostraron una única banda de actividad correspondiente a la ANCUT1.

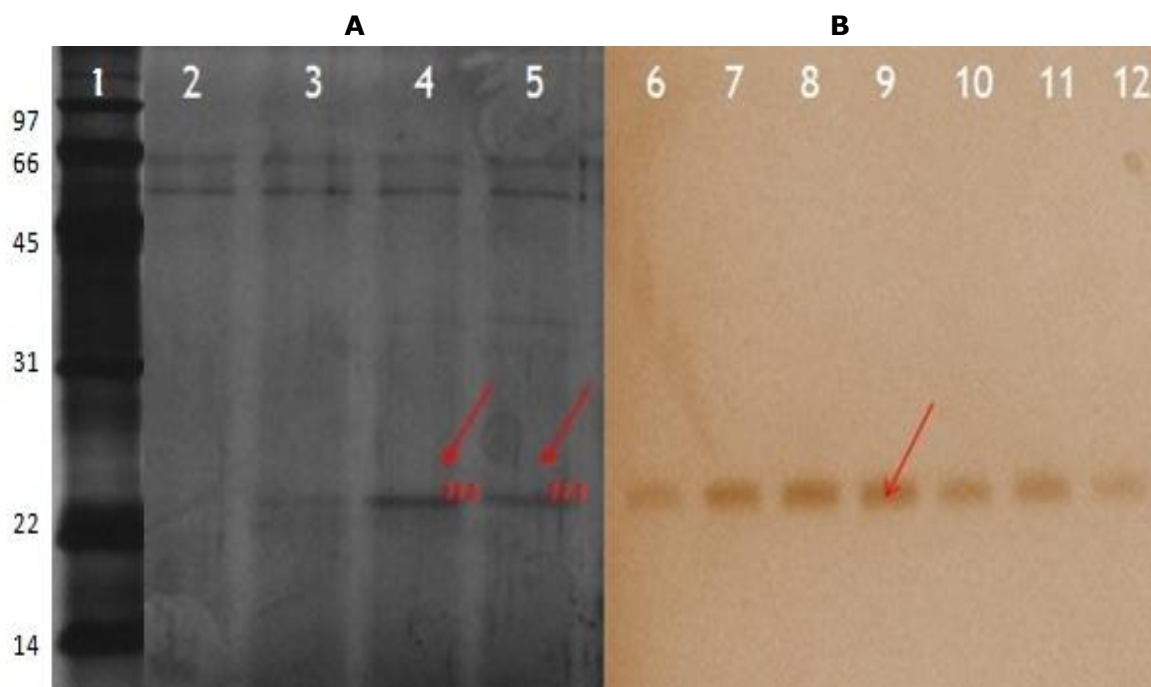


Figura 20. Perfil de proteínas en SDS-PAGE de las fracciones con actividad después de la purificación con el Mini Prepcell de Bio-Rad. Panel A: Tinción con plata: Carril (1): MPM, Low Range de Bio-Rad. Carril (2): fracción 30 (sin actividad); Carril (3): fracción 33 se observa muy tenue la banda; Carril (4): fracción 36; Carril (5): fracción 39. Panel B: Zimograma: Carril (6): fracción 33; Carril (7): fracción 34; Carril (8): fracción 35, Carril (9): fracción 36; Carril (10): fracción 37; Carril (11): fracción 38; Carril (12): fracción 39. Las flechas indican a la ANCUT1.

A continuación, en las Figuras 21, 22 y 23 se muestra los cromatogramas de la cuantificación de proteína, la actividad volumétrica y la actividad específica (respectivamente) de las 50 fracciones obtenidas con en el Mini Prep Cell de Bio-Rad.



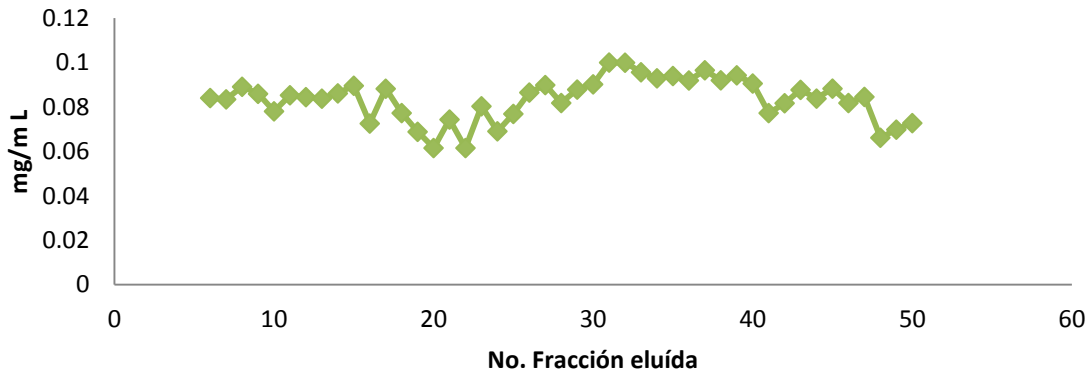


Figura 21. Cromatograma de la cantidad de proteína presente en las 50 fracciones, obtenida por el método de Bradford en microplaca descrito en el apartado 6.8.2.

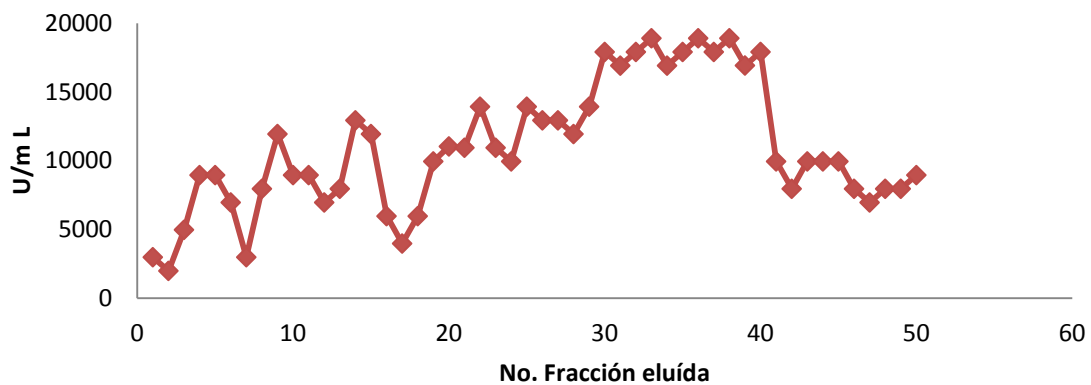


Figura 22. Cromatograma de la actividad volumétrica de las 50 fracciones, obtenida con *p*-NPL por el método en microplaca descrito en el apartado 6.8.3.

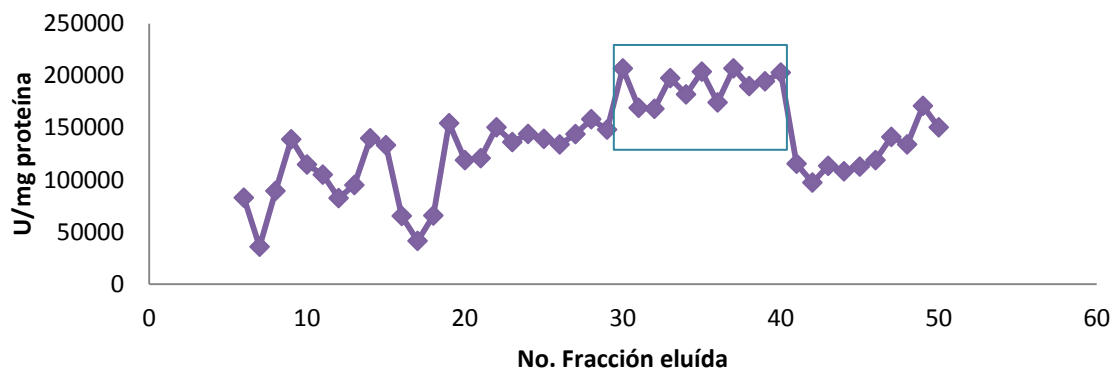


Figura 23. Cromatograma de la actividad específica de las 50 fracciones, obtenida de dividir la actividad volumétrica entre la cantidad de proteína. En el recuadro se muestran las fracciones en las que se identificó la presencia de la cutinasa ANCUT1.



Una vez verificada la pureza, se juntaron las fracciones y se midió la concentración de proteína por el método de Bradford, así como la actividad de hidrólisis con *p*-NPA en microplaca en el espectrofotómetro Epoch. Estos datos se muestran, junto con un resumen de los pasos purificación, en la Tabla 17.

Tabla 17. Rendimiento y factor de purificación en cada paso de la cutinasa ANCUT1.

Etapa	Volumen Fracción (mL)	Volumen final (mL)	Concentración Proteína (mg/mL)	Proteína total (mg)	Actividad Volumétrica (U/mL)*	Actividad Volumétrica total (U)	Actividad Específica total (U/mg P)	Rendimiento (%)	Factor Purificación (veces)
Extracto Crudo	10	10	5.6	56	132.03	1320.29	23.58	100	1
Precipitación (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , Dializado (14 kDa NWCO)	10	2	0.066	0.132	56.72	113.45	859.45	8.59	36.45
Ultrafiltración (1 kDa NWCO)	2	0.4	0.04	0.016	78.97	31.59	1974.33	2.39	83.74
Electroforesis de elución continua Mini Prep Cell	0.4	1.5	0.087	0.130	201.96	302.93	2333.22	22.94	98.96

\*Una unidad de actividad de la cutinasa fue definida como la cantidad de enzima requerida para convertir 1  $\mu$ mol de *p*-NPA a *p*-nitrofenol por minuto, bajo las condiciones especificadas (Speranza *et al.*, 2011).

Se puede decir que con la electroforesis de elución continua en gel de acrilamida se obtuvo a la cutinasa ANCUT1 con un peso experimental de 22 kDa. Los inconvenientes presentados son que se pierde mucha actividad en el paso de precipitación por lo que sería conveniente buscar otro método para obtener mejores resultados y el otro es la necesidad de una renaturalización de la enzima en las fracciones, ya que la corrida se lleva a cabo en condiciones desnaturalizantes. Sin embargo, se logró obtener la enzima ANCUT1 en cantidades suficientes para su caracterización.

Se obtuvo un factor de purificación para la ANCUT1 de 98.96 utilizando la electroforesis de elución continua, también se tienen otros reportes



utilizando este método, como son el caso de la cutinasa ANCUT2 de *A. nidulans* que tiene factor de purificación de 243.34 (Bermúdez-García, 2013) y para de *Bacillus pumilus* GMA1, aunque el factor de purificación es de 76.5 (Ayala-Esquivel, 2011), ambos valores fueron obtenidos empleando el Mini Prep Cell de Bio-Rad y el Prep Cell respectivamente.

Se ha reportado el valor del factor de purificación para *Colletotrichum kahawae* Z1 y para *Colletotrichum gloeosporioides* Ch27 que son de 15.5 y 16.5 respectivamente (Chen *et al.*, 2007). Para el caso de *B. cinerea* el factor de purificación es de 66.5 (Gindro y Pezet, 1999). La cutinasa de *Tropaeolum majus* tiene un factor de purificación de 42.2. En el caso de *Pseudomonas fluorescens putida*, su valor del factor de purificación reportado es de 207 (Sebastian y Kolattukudy, 1988), también se sabe que el factor de purificación para *Monilinia fructicola* es de 14.2 (Wang *et al.*, 2000), estos valores reportados para estas cutinasas se obtuvieron después de utilizar varios métodos tal como se muestra en la Tabla 7.

Con el objetivo de comparar el método de purificación empleado se comparó con otros métodos reportados para llevar a cabo la purificación de otras enzimas y se obtuvo que los valores que se reportan utilizando la electroforesis de elución continua (equipo el Mini Prep Cell de Bio-Rad y el Prep Cell) son más altos que los reportados anteriormente donde se emplean más métodos para llegar a la purificación, aunque el factor de purificación de *Pseudomonas fluorescens putida* es considerablemente alto, hay que tener en cuenta que se utilizan más métodos para llegar a dicha purificación.

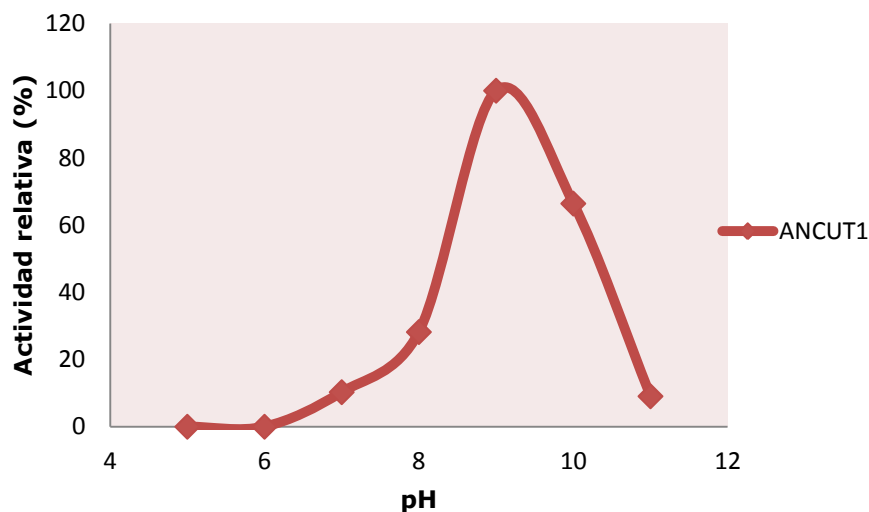


## 7.5 Caracterización de la enzima

### 7.5.1 pH óptimo de actividad del ensayo

En la Gráfica 1 se observa que la enzima mostró actividad a partir de pH cercanos al neutro y que el pH óptimo en las condiciones del ensayo evaluadas es de 9 para la enzima pura, lo que indica que es una cutinasa de naturaleza alcalina, lo cual coincide con lo reportado para esta cutinasa en el extracto crudo (Esqueda-Domínguez, 2012) y para otras cutinasas como las de *Pseudomonas putida* (Sebastian y Kolattukudy, 1988), *Fusarium solani pisi* (Speranza et al., 2011), *A. oryzae* (Liu et al., 2009), (Maeda et al., 2005) y *Thermomonospora fusca* (Fett et al., 1999).

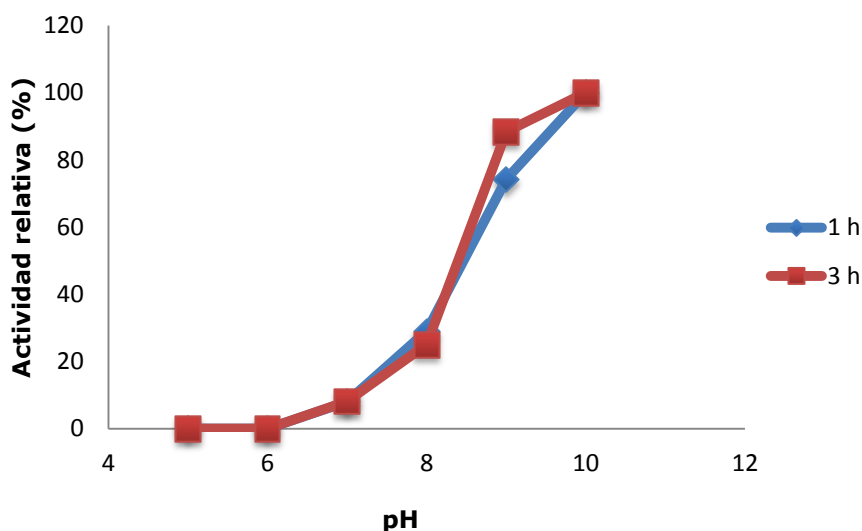
Observando la Gráfica 1 se puede ver que la cutinasa pierde totalmente su actividad a valores de pH menores a 7. Se ha reportado que la cutinasa de *F. solani* recombinante tenía la máxima actividad a pH alcalino. La tapa típica de algunas lipasas está ausente en cutinasas y el sitio catalítico está fuertemente afectado por el pH, lo que es debido al estado de protonación / desprotonación de los residuos catalíticos (Ser, His y Asp). A pH alcalino (8.5 a 10) el potencial electrostático que rodea el sitio activo es ligeramente negativo que favorece la actividad enzimática máxima, en contraste con un pH ácido que hay un exceso de carga positiva que conduce a la agregación irreversible de la enzima (Petersen et al., 2001).



Gráfica 1. Efecto del pH sobre la actividad de la ANCUT1 pura. El pH óptimo de reacción para la ANCUT1 fue de 9. Se usaron diferentes buffers; pH 5 con acetatos, pH 6 y 7 con fosfatos, pH 8 y 9 con Tris, pH 10 y 11 con CAPS, todos en concentración 50 mM.

### 7.5.2 Estabilidad a pH

El efecto del pH sobre la estabilidad de la enzima se evaluó determinando la actividad de la enzima pura después de 1 y 3 h de incubación en buffers a los correspondientes pH, a temperatura de 4 °C. En la Gráfica 2 se observa que no hay una diferencia marcada entre ambos tiempos de incubación. La enzima pura retuvo su actividad a las 3 h en pH 10 por arriba del 85% de su actividad inicial lo contrario que pasa a pH 8 donde su actividad disminuye por debajo del 50% con respecto a la actividad inicial. Se sigue observando que a valores de pH de 5 y 6 la enzima no tiene actividad, con lo que se confirma la naturaleza alcalina de la cutinasa.



Gráfica 2. Estabilidad a pH de la cutinasa ANCUT1 reflejada en base a su actividad residual después de incubación a 4 °C, diferentes tiempos.

### 7.5.3 Temperatura óptima de reacción del ensayo

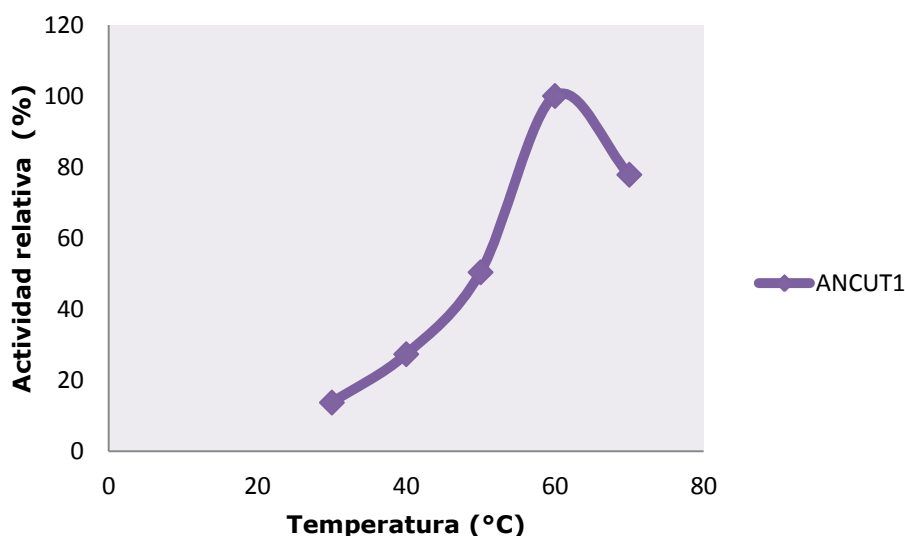
Se midió la actividad frente a *p*-NPA en un rango de temperatura de 30 a 70 °C para observar el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.

Las cutinasas se han reportado como enzimas termoestables y en algunos casos pueden tolerar temperaturas muy altas, hasta 80-85 °C (Carvalho *et al.*, 1998; Dutta *et al.*, 2009). La cutinasa en estudio mostró su máxima actividad a los 60 °C, además de presentar actividad significativa aún a 70 °C mostrando una actividad por arriba del 70 % de su actividad original. Esto se puede observar en la Gráfica 3, este resultado es comparable con el de la cutinasa termostable de *Thermobifida fusca*, que tiene una temperatura óptima de 60 °C (Zhang *et al.*, 2010). La enzima entonces se clasifica como termoestable.

Como se sabe, al aumentar la temperatura, existe un aumento en la energía cinética de las moléculas, lo que genera un mayor número de

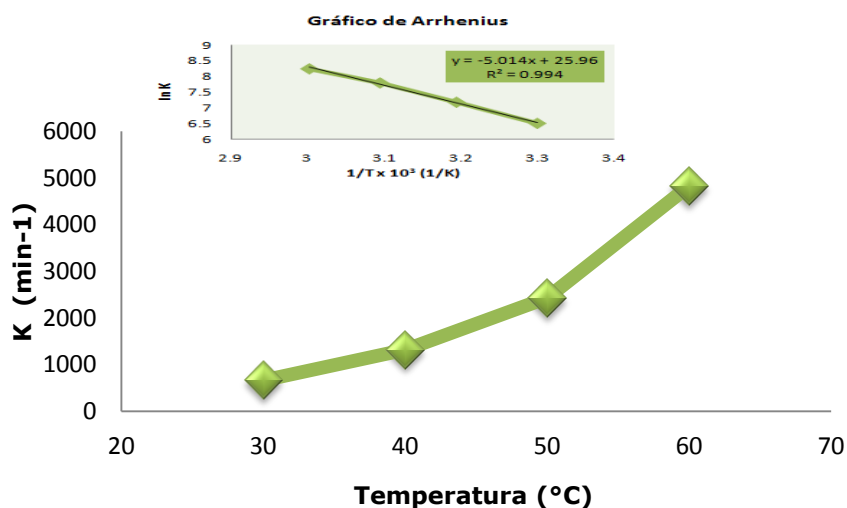


colisiones entre ellas, disminuyendo así la energía de activación necesaria para llevar a cabo la reacción. En las reacciones catalizadas enzimáticamente el efecto positivo de la temperatura está contrastado por el efecto de la desnaturalización térmica. La actividad catalítica de la enzima se debe a una estructura terciaria altamente compleja y ordenada dada por fuerzas no covalentes principalmente, por lo que ante un aumento en la entalpía, la estructura terciaria se rompe y la enzima se desnaturaliza, perdiendo así su actividad catalítica (Segel, 1982). Esto explica que la actividad de la enzima alcance un máximo en la temperatura idónea y a partir de este comience a disminuir al seguir aumentando la temperatura.



Gráfica 3. Temperatura óptima de reacción, la cual fue de 60 °C para la ANCUT1. Se emplearon temperaturas en un rango de 30 °C a 70 °C.

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



Gráfica 4. Gráfica de Arrhenius para la hidrólisis de *p*-NPA por la cutinasa ANCUT1.

A partir de esta Gráfica se calculó que para la hidrólisis de *p*-NPA, la  $E_a$  es de 22.834 kcal/mol.

El valor obtenido de  $E_a$  para esta cutinasa es comparable, ya que se encuentra en el rango reportado al de otras enzimas termoestables como por ejemplo al de la pectin liasa de *Thermophilic bacillus* sp ( $E_a=35$  kcal/mol) y la  $\beta$ -glicosil hidrolasa de *Pirococcus furiosus* ( $E_a=17.22$  kcal/mol), estas dos enzimas citadas pertenecen a microorganismos termófilos (Thomsen *et al.*, 2008; Takao *et al.*, 2000).

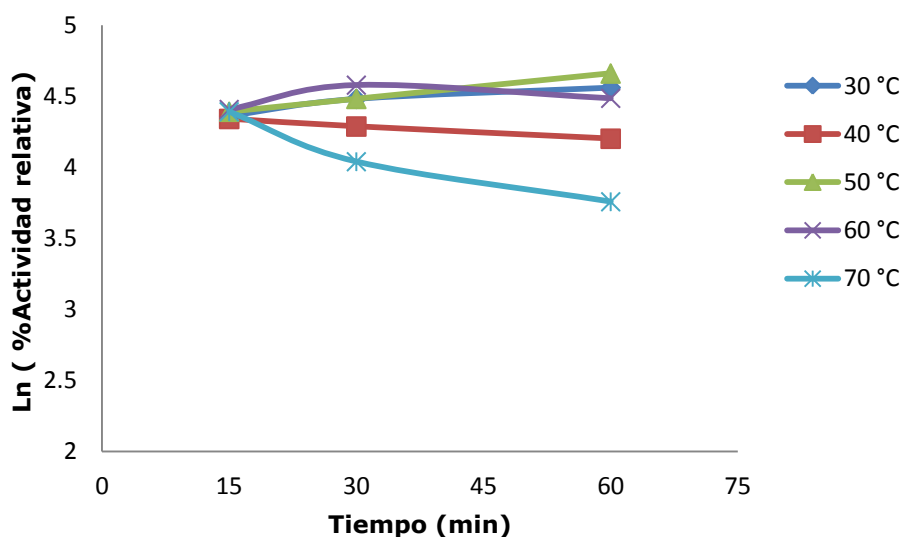
#### 7.5.4 Estabilidad a la temperatura

Para probar la estabilidad de la enzima en el tiempo frente a la temperatura se incubó la misma a diferentes intervalos de tiempo que fueron de 15, 30, y 60 min en un rango de temperaturas de 30 a 70 °C. Los resultados que se obtuvieron fueron que la enzima ANCUT1 tiene estabilidad térmica en un rango de 30 a 60 °C durante los tiempos ensayados, conservando el 70% de su actividad con respecto al control a excepción de la temperatura de 40 °C donde conservo el 60% de





actividad con respecto al control. En 70 °C se observa que la enzima pierde el 40% de su actividad con respecto al control después de 30 min y el 60% después de 60 min (Gráfica 5). La tolerancia mostrada tras incubar a 50 °C reflejó termoestabilidad que se asocia en algunas cutinasas a la presencia de tres puentes disulfuro (Liu *et al.*, 2009), los cuales ayudan a mantener la estructura activa de las enzimas a pesar de ser sometidas a calentamiento. En el caso de la ANCUT1, la secuencia de aminoácidos sí muestra la presencia de 6 cisteínas que pueden formar tres puentes disulfuro.



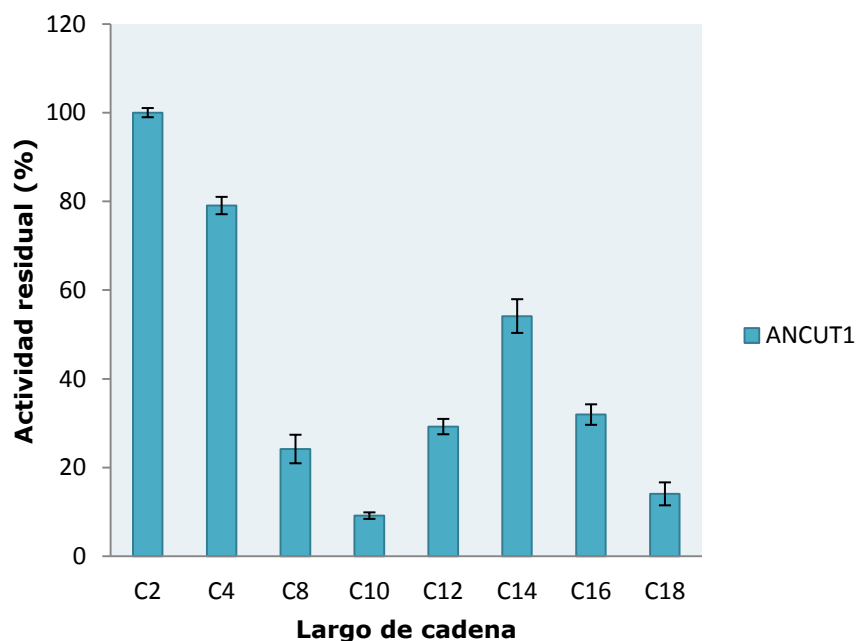
Gráfica 5. Efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la ANCUT1, después de incubar a las temperaturas (30, 40, 50, 60 y 70 °C) frente al tiempo.

### 7.5.5 Especificidad sobre sustrato

Se realizaron diversos ensayos de actividad con diferentes *p*-NP ésteres los cuales fueron *p*-NPE (C18), *p*-NPP (C16), *p*-NPM (C14), *p*-NPL (C12), *p*-NPC (C10), *p*-NPO (C8), *p*-NPB (C4) y *p*-NPA (C2), con la finalidad de observar la selectividad de la actividad de hidrólisis de la enzima pura.



Como ya se ha mencionado, la cutinasa actúa naturalmente sobre un polímero de ácidos grasos de cadena larga; sin embargo, la mayor especificidad de sustrato para la ANCUT1 pura (Gráfica 6), se encontró en el rango de ésteres de cadena corta (C2 y C4) que son el *p*-NPA y *p*-NPB, pero también tiene una actividad aceptable frente a ésteres de cadena media (C10 y C14). Se ha reportado que las cutinasas no tienen un patrón claro de preferencia a sustratos, ya que pueden hidrolizar ésteres de cadena corta y de cadena larga y que hay cutinasas que tienen una mayor actividad frente a ésteres de cadenas cortas como la cutinasa de *F. solani* (Sebastian y Kolattukudy, 1988), incluso mostrando mayor afinidad por sustratos de cuatro carbonos (Kodama *et al.*, 2009) y también se han reportado cutinasas con un comportamiento intermedio entre estererasas y lipasas (Speranza *et al.*, 2011; Kademi *et al.*, 1999).



Gráfica 6. Especificidad de sustratos de la enzima pura utilizando como sustratos ésteres de *p*-NP de diferente largo de cadena. La enzima se incubó con cada uno de los sustratos durante 30 min en Tris 50 mM, pH 8 a 37 °C.



### 7.5.6 Ensayo cutinolítico

Para saber si la cutinasa ANCUT1 era capaz de llevar a cabo la hidrólisis de cutina, se realizó un ensayo con 50 U de enzima y 5 mg de cutina pura previamente disueltos en 300  $\mu$ L de tolueno, a pH óptimo de 9 y a 37 °C durante 5 días (Castro-Ochoa *et al.*, 2012), se corrieron placas de cromatografía en capa fina (CCF) y se revelaron con diclorofluoresceína al 0.1% para observar al ácido palmítico de 16 carbonos liberado como producto de la reacción de hidrólisis de la cutina. De todas las placas realizadas en ninguna se observaron manchas que pudieran indicar la presencia del hidroxiaácido graso libre. Esto indicó que la ANCUT1 pura, no pudo degradar este biopolímero en estas condiciones (Figura 24). Es posible que el método empleado para dicha determinación no fuera el adecuado para lograr una separación de los productos, aunque Esqueda-Domínguez (2012), realizó un ensayo cutinolítico utilizando 10 mg de extracto crudo liofilizado de ANCUT1 en 700  $\mu$ L de buffer de fosfatos de potasio 0.05 M, pH 7.5 y 5 mg de cutina pura previamente disueltos en 300  $\mu$ L de tert-butanol dejando la reacción correr durante 1 semana a 37 °C y 250 rpm, para el sistema de CCF los solventes empleando fueron: (hexano: éter etílico: ácido acético, 40:60:0.01 v/v) y observó que el extracto enzimático con la ANCUT1 no pudo degradar tampoco este biopolímero. Esto fue confirmado mediante espectroscopía de infrarrojo (IR) y de este modo se comprobó que el extracto crudo con la cutinasa ANCUT1 no hidrolizó la cutina, en las condiciones ensayadas, lo mismo que sucede con la ANCUT1 pura.

De acuerdo a estos datos y a la preferencia exhibida por los sustratos de cadena corta, se podría sugerir que la cutinasa ANCUT1 pura no es la enzima encargada de iniciar la degradación de este biopolímero, sino que probablemente se induce con los monómeros de cutina o cuando se



detectan componentes de menor tamaño presentes en la cutícula de las plantas.

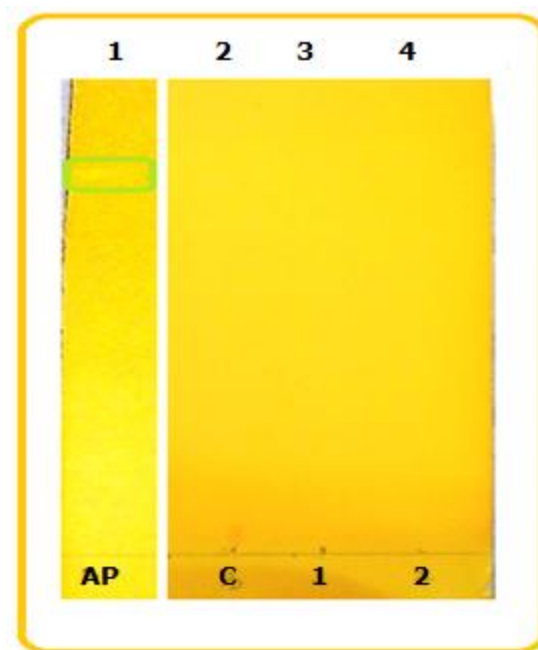


Figura 24 . Cromatografía en capa fina de los productos de reacción de la hidrólisis de cutina. Carril (1): estándar de ácido palmítico (AP), es la única mancha visible (recuadro); carril (2): reacción control sin enzima (C); carril (3) y (4): reacción con cutinasa ANCUT1 pura (1, 2). En los carriles (3) y (4) no se observaron manchas que pudieran indicar la liberación de hidroxiácidos grasos.

### 7.5.7 Ensayo de glicosilación

Los resultados para este ensayo mostrarón que no se detectaron sitios de glicosilación para la ANCUT1 pura ya que no hubo reacción positiva con ninguna de las lectinas probadas. Los se muestra en la Figuras 25 y Figura 26.

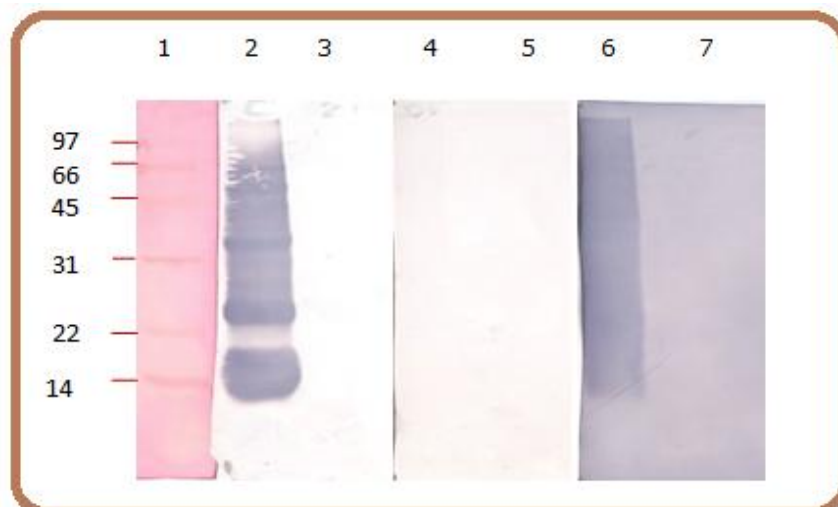


Figura 25. Resultados de la prueba de glicosilación de la ANCUT1 pura. Carril (1): MPM, Low Range de Bio-Rad; Carril (2): carboxipeptidasa (control positivo); Carril (3): ANCUT1 incubada con GNA (aglutinina de *Galanthus nivalis*); Carril (4): transferrina (control positivo); Carril (5): ANCUT1 incubada con SNA (aglutinina de *Sambucus nigra*); Carril (6): fetuina (control positivo); Carril (7): ANCUT1 incubada con MAA (aglutinina de *Maackia amurensis*).

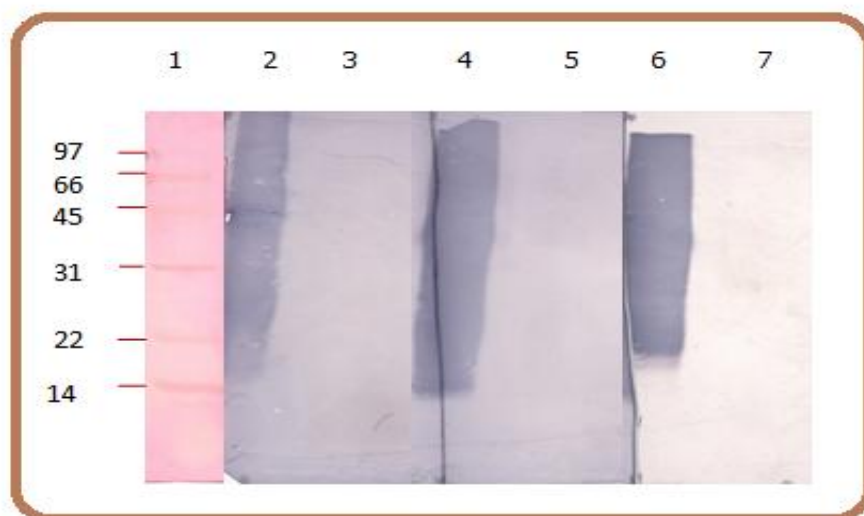


Figura 26. Resultados de la prueba de glicosilación de la ANCUT1 pura. Carril (1): MPM, Low Range de Bio-Rad; Carril (2): fetuina (control positivo); Carril (3): ANCUT1 incubada con DSA I (aglutinina de *Datura stramonium*); Carril (4): asialofetuina (control positivo); Carril (5): ANCUT1 incubada con PNA (aglutinina de cacahuate); Carril (6): asialofetuina (control positivo); Carril (7): ANCUT1 incubada con DSA II (aglutinina de *Datura stramonium*).



### 7.5.8 Determinación del punto isoelectrico

El gel de isoelectroenfoque mostró para el extracto crudo de la cutinasa de 22 kDa una sola banda con un pI experimental de 5.2 aproximadamente (Figura 27). En cuanto a la cutinasa de 22 kDa pura esta mostró una única banda con un pI experimental de 6.0 aproximadamente (Figura 28), lo cual concuerda con el pI teórico que es de 6.32. El pI que se determinó es similar al reportado para otras cutinasas que han sido purificadas como la de *Coprinopsis cinerea*, la cual tiene un pI de 6.7 (Merz *et al.*, 2009), y para la de *Colletotrichum kahawae* y *Colletotrichum gloeosporioides*, que tienen un pI de 7.5 y 8.5, respectivamente (Chen *et al.*, 2007).

Por otra parte, este ensayo también nos permitió descartar una posible comigración de alguna otra esterasa en la electroforesis de elución y por tanto corroboró la pureza de la cutinasa.

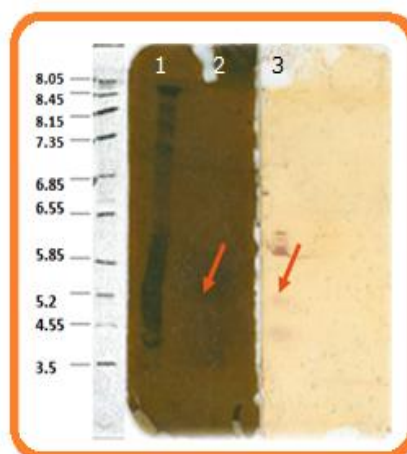


Figura 27. Resultados de la determinación del punto isoelectrico, tinción con plata y  $\alpha$ -nafitl acetato respectivamente. Carril (1): Marcador de amplio rango de Bio-Rad; Carril (2): Extracto crudo de la ANCUT1. Las flechas indican el pI de 5.2 que corresponde al extracto crudo de la cutinasa ANCUT1.

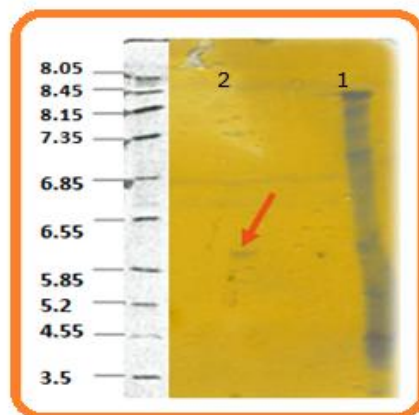


Figura 28. Resultados de la determinación del punto isoeléctrico en tinción con plata. Carril (1): Marcador de amplio rango de Bio-Rad; Carril (2): Cutinsa ANCUT1 pura. La flecha indica el valor del pI el cual es de 6.0.

### 7.5.9 Efecto de iones metálicos, inhibidores y surfactantes

Para determinar si la cutinasa ANCUT1 requiere de un cofactor metálico para la actividad, se incubó 1 h a 4 °C con un agente quelante como el EDTA y con los iones metálicos:  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , utilizando concentraciones de 1 mM y 10 mM y luego se analizó su actividad contra *p*-NPA.

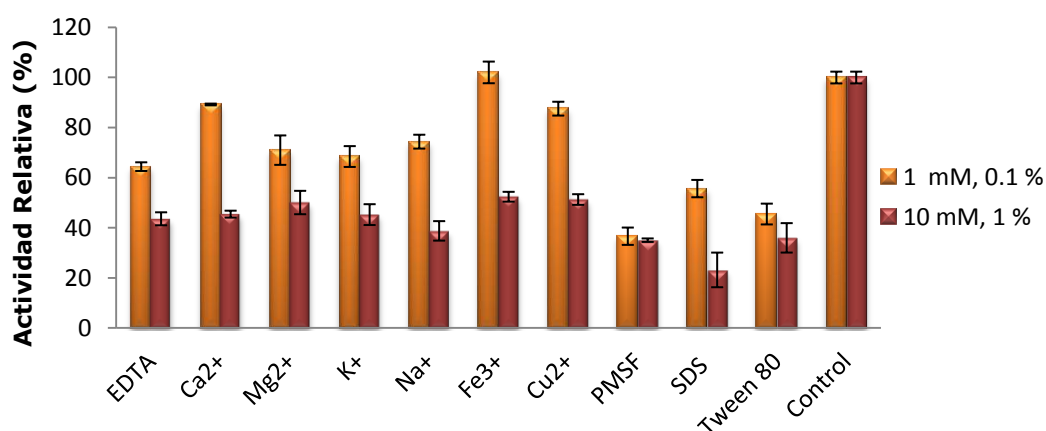
Además se probaron como surfactantes el SDS y Tween al 0.1% y al 1% y como inhibidores al PMSF (1 mM y 10 mM) en las condiciones descritas anteriormente.

En la Gráfica 7 se observa que la actividad de la enzima se redujo en presencia del EDTA que es un agente quelante de metales, para 1 mM y para 10 mM se obtuvo un 64.4% y 43.6% respectivamente de sus actividades en comparación con el control. Todos los iones mostraron un efecto inhibitorio medio a excepción del  $\text{Fe}^{3+}$  a una concentración de 1 mM con el que mostró una actividad de 102%, no diferente a su actividad original. El mayor efecto inhibitorio se observó con  $\text{Na}^+$  10 mM con 38.78% con respecto al control.



El dodecilsulfato sódico (SDS) y el Tween 80 al 1% permitieron una actividad residual del 23% y 36% de su actividad original, respectivamente una posible explicación a este fenómeno se debe al efecto que tienen los surfactantes sobre la tensión superficial del medio. En el caso de los detergentes aniónicos como el SDS afectan las interacciones hidrofóbicas de la proteína exponiendo los grupos hidrofóbicos y generando la desnaturalización de la enzima.

Se sabe que el fenilmetilsulfonilo (PMSF) es un inhibidor de las serin proteasas y aunque actúa específicamente sobre proteasas de serina, no inhibe a todas las enzimas conocidas de este tipo. Se ha visto que la inhibición de la proteólisis ocurre cuando se utiliza a una concentración de entre 0.1 y 1 mM. Para el caso del PMSF a ambas concentraciones (1 mM y 10 mM) se obtuvo un 36.6% y 35% de su actividad original respectivamente, para la cutinasa AN CUT1 no se observa una pérdida totalmente de la actividad en presencia de este reactivo; lo cual también se ha observado en otras cutinasas que tampoco se inhiben totalmente en presencia de PMSF (Stöcklein *et al.*, 1993; Ohnishi *et al.*, 1994).



Gráfica 7. Efecto de iones metálicos, EDTA, inhibidores y surfactantes sobre la actividad de la AN CUT1 pura. Se determinó la actividad de la enzima en presencia del ión o compuesto indicado durante 1 h en buffer Tris 50 mM, pH 9.





### 7.5.10 Estabilidad en solventes orgánicos

La aplicación de enzimas en solventes orgánicos es restringida, ya que muchas de las enzimas son menos activas y estables en presencia de solventes. Por lo tanto, se han desarrollado varios métodos para mantener o aumentar la actividad y estabilidad de las enzimas en presencia de solventes orgánicos para uso industrial.

Es por eso que se realizó la determinación de estabilidad a solventes, en donde la enzima pura se probó en 5 solventes orgánicos a dos concentraciones distintas en las condiciones descritas anteriormente.

La actividad enzimática en disolventes orgánicos depende dramáticamente de factores tales como la actividad termodinámica del agua, la solvatación del sustrato y el producto en el disolvente empleado, el control del pH, la forma enzimática y la naturaleza del disolvente.

En términos generales, la actividad enzimática es mayor en disolvente orgánicos hidrofóbicos que en hidrofílicos; de hecho se puede establecer una relación directa entre la actividad y la hidrofobicidad del disolvente expresada como  $\log P$ , donde  $P$  es el coeficiente de reparto de un disolvente dado entre n-octanol y agua (Laane *et al.*, 1987).

La estabilidad de la enzima podría verse afectada por solventes orgánicos hidrofílicos ( $\log P_{\text{oct}} \leq 2$ ), ya que éstos podrían extraer el agua enlazada a la enzima. Sin embargo, los solventes orgánicos hidrofóbicos ( $a_w < 1$ ,  $\log P_{\text{oct}} > 2$ ) 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 (Yahya *et al.*, 1998; Paiva *et al.*, 2000).

En la Gráfica 8 se puede observar que la enzima pura es estable durante 24 h a 4 °C en todos los solventes probados en concentración de 30% y

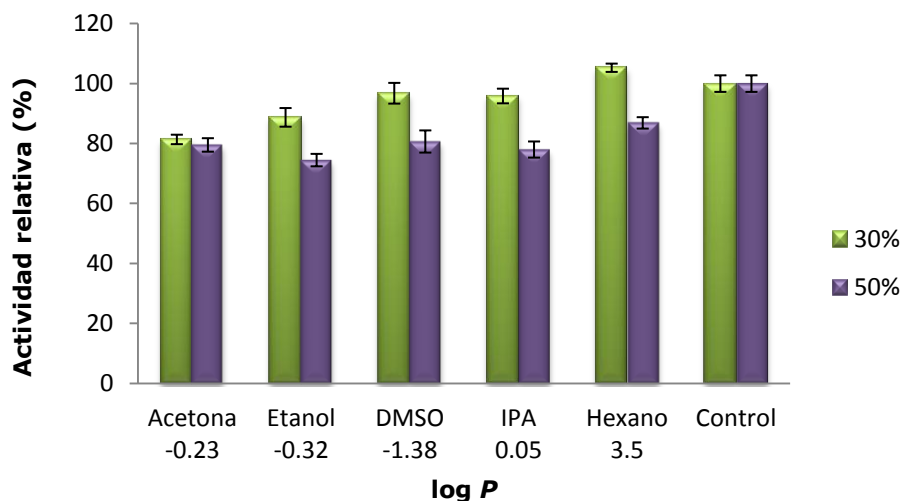


50%, conservando arriba del 80% y del 70% de su actividad inicial respectivamente.

Para el caso de la adición del hexano ( $\log P_{\text{oct}} = 3.5$ ) en concentración de 30% se observa un incremento del 105% de su actividad inicial.

Es bien sabido que la mayoría de las enzimas son más estables en disolventes hidrófobos, lo que podría ser debido a que en disolventes hidrófilos se disuelven las proteínas hasta la pérdida de su estructura terciaria (Chin *et al.*, 1994).

Se reportó por Chen *et al* (2010) que las dos cutinasas de *Thermobifida fusca*, Tfu 0882 y Tfu 0883 exhibieron excelente tolerancia en hexano en el que mantuvieron el 96% y el 84% de su actividad respectivamente con respecto al control. Este ensayo de la estabilidad en solventes orgánicos las cutinasas se incubaron con 75% (v/v) de los distintos solventes en un buffer pH 8 Tris-HCl 20 mM y la concentración de las cutinasas fue de 5 nM. La reacción se incubó a 20 °C durante 18 h.



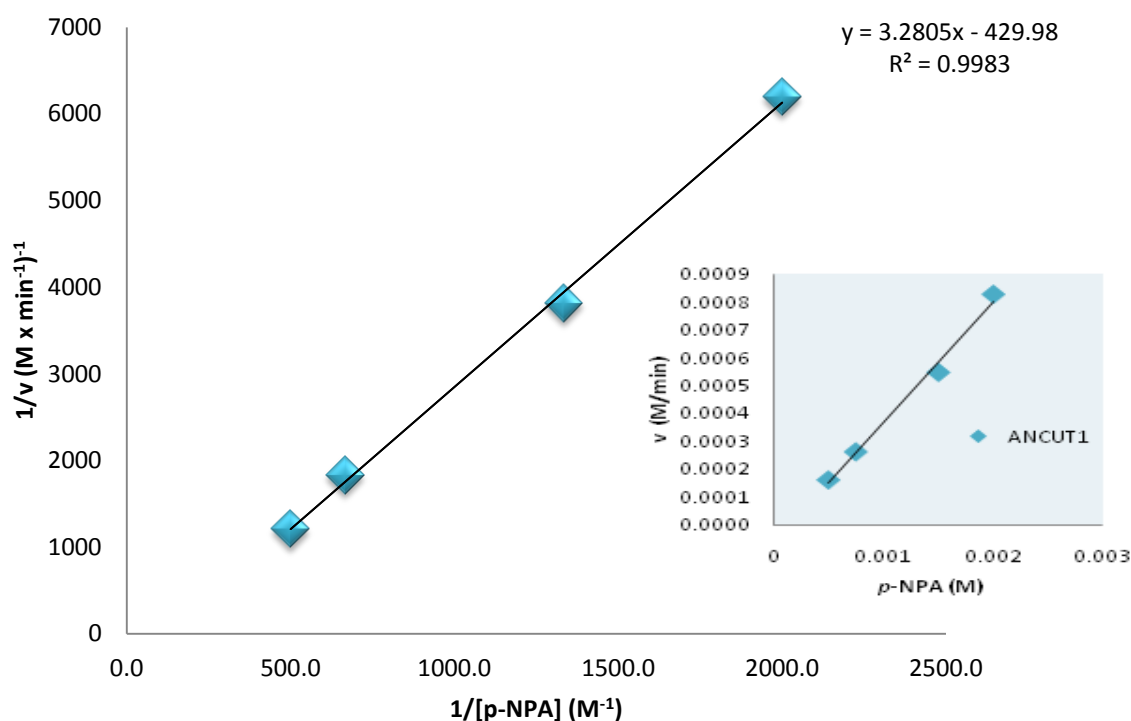
Gráfica 8. Estabilidad en solventes de la cutinasa ANCUT1 pura. Se probaron cinco solventes los cuales son: acetona, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), alcohol isopropílico (IPA). El 100% correspondió a la actividad del control (hidrólisis de *p*-NPA en buffer sin solvente y enzima). La ANCUT1 pura mostró mayor estabilidad en hexano el cual es un solvente hidrofóbico con  $\log P_{\text{oct}} = 3.5$ .



### 7.5.11 Cálculo de parámetros cinéticos

Se hizo una exploración de los parámetros cinéticos  $K_m$ ,  $k_{cat}$  y la eficiencia catalítica para la ANCUT1 y los resultados preliminares se muestran a continuación.

Se midió la actividad frente a diferentes concentraciones (0.5 mM, 0.75 mM, 1.5 mM y 2 mM) de *p*-NPA, ya que fue el sustrato por el que la enzima presenta una mayor actividad. Esto se incubó 30 min a una temperatura de 37 °C y se siguió el procedimiento descrito en Materiales y Métodos. Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten mediante el modelo de linearización de Lineweaver-Burk para calcular  $K_m$  y  $V_{max}$  (Gráfica 9).



Gráfica 9. Gráfico de Michaelis-Menten y su representación de Lineweaver-Burk  $1/v$  frente a  $1/[S]$  de los datos de la ANCUT1 a diferentes concentraciones (0.5 mM, 0.75 mM, 1.5 mM y 2 mM) de *p*-NPA).



Los parámetros obtenidos fueron:

Tabla 18. Parámetros cinéticos preliminares de la cutinasa de la ANCUT1.

$V_{max}$ (mmol/min)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (min <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (mM <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )	Ciclo catalítico
2.33	7.63	8.73	1.14	6.87

Los resultados anteriores se pueden explicar ya que si las concentraciones de sustrato elegidas son muy bajas que es este el caso, respecto al valor de  $K_m$ , la recta cortará a ambos ejes demasiado cerca del origen, no permitiendo que puedan determinarse exactamente ni  $V_{max}$  ni  $K_m$ . (A concentraciones de sustrato muy bajas, la reacción es prácticamente de primer orden. No hay indicios de saturación  $V_{max}$  y  $K_m$  parecen ser infinitas.)

Si  $K_m \gg [S]$ , entonces la velocidad es muy sensible a los cambios en las concentraciones de sustrato.

Por lo tanto las concentraciones elegidas de sustrato para trazar la representación inversa deben estar en las proximidades del valor de  $K_m$ . Si conocemos  $K_m$ , se podrían ajustar las condiciones de ensayo de forma que  $[S] \gg K_m$  y con eso determinar  $V_{max}$ .



## **VIII. CONCLUSIONES**

Se logró obtener, a partir de un medio optimizado que utiliza cutina como inductor, una banda proteínica correspondiente al producto del gene AN5309.2 que codifica para la cutinasa ANCUT1 (22 kDa) de *A. nidulans*. Presentó un peso molecular experimental de 22 KDa y un pI experimental de 6. El factor de purificación fue de 98.96 y el rendimiento de actividad de 22.94%.

La cutinasa ANCUT1 no está glicosilada, por lo que el peso obtenido experimentalmente de 22 kDa corresponde con el teórico de 22.74 kDa

Las características bioquímicas obtenidas de la enzima pura, indican que la enzima presenta una temperatura óptima de 60 °C y un pH óptimo de 9, por lo que puede afirmarse que es una enzima termoalcalina y que a valores de pH 5 o menores pierde toda su actividad.

La ANCUT1 resultó ser termoestable después de incubarse a 50 °C por 1 h ya que mantiene el 100% de su actividad original, además resiste valores de pH básicos de hasta 10 durante 3 h, manteniendo una actividad por arriba del 85% con respecto a la original. Estas características son interesantes para aplicación industrial.

La proteína en estudio mostró preferencia por ésteres de cadena corta que son el *p*-NPA y *p*-NPB, presentando una mayor actividad por *p*-NPA; aunque también tiene una actividad aceptable frente a ésteres de cadena media (C12 y C14). El ensayo cutinolítico mostró que la cutinasa ANCUT1 no hidrolizó la cutina bajo las condiciones empleadas. Por lo tanto, su caso corresponde a las proteínas reportadas como cutinasas por homología con los genes que codifican enzimas que presentan esta actividad, pero de los que no en todos los casos se ha encontrado que catalicen ruptura de cutina, sino que han mostrado actividad esterasa.



Se observó que el EDTA reduce la actividad de la ANCUT1 a ambas concentraciones (64.4% y 43.6%) y en presencia del ión  $\text{Fe}^{3+}$  mostró una actividad similar a la original.

Con respecto a la estabilidad en solventes, la cutinasa ANCUT1 mostró mayor actividad en el hexano, que es un solvente hidrofóbico a una concentración del 30%, en el que alcanzó 105% de su actividad inicial tras 24 h de incubación. La estabilidad de la enzima observada en los solventes es otro punto importante para su aplicación en biocatálisis.

Además se calcularon de forma preliminar los parámetros cinéticos para la cutinasa ANCUT1 para la hidrólisis de *p*-NPA. La cutinasa presenta una  $K_m$  de 7.63 mM, una  $V_{max}$  de 2.33 mmol/min, una  $k_{cat}$  de  $8.73 \text{ min}^{-1}$  y una eficiencia catalítica de  $1.14 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$ . Como no se trabajó en las concentraciones de sustrato óptimas, existe un amplio margen para mejorar la eficiencia de esta enzima lo que abre las puertas para realizar más ensayos sobre esta proteína.



## **IX. PERSPECTIVAS**

Con este trabajo se logró purificar la enzima de estudio y conocer sus propiedades bioquímicas y cinéticas.

A continuación se plantean algunos puntos de interés para profundizar en el conocimiento de la cutinasa ANCUT1 de *A. nidulans*:

- Buscar aplicaciones que puedan ser de utilidad industrial, con base en las propiedades mostradas por esta cutinasa pura.
- Emplear otros inductores y elucidar el verdadero motivo por el que no hidroliza la cutina.
- Realizar ensayos de inmovilización y poder facilitar la recuperación y reutilización de la enzima.



## **X. BIBLIOGRAFÍA**

- Abu Bakar FD, Murad AMA, Hamidi AA, Zamrod Z, Mahadi NM & Sullivan P. (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. Asia Pac J Mol Biol Biotech. (13): 63-69.
- Ayala-Esquivel H. (2011). Purificación e identificación de enzimas de *Bacillus pumillus* GMA1 con potencial en biocatálisis. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Bauer S, Vasu P, Staffan PS, Mort AJ & Somerville CR. (2006). Development and application of a suite of polysaccharide degrading enzymes for analyzing plant cell walls. Proc Natl Acad Sci USA. (103): 11417-11422.
- Bennett JW (2010). An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. pp. 1-17.
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. (2003). Bioquímica. 5<sup>ta</sup>. Ed. Reverté S.A., México. pp. 78-86.
- Berka RM, Dunn-Coleman N & Ward M. (1992). Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: *Aspergillus Biology and Industrial Applications*, Bennett JW & Klich MA (eds). Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA. pp. 152-202.
- Bermúdez-García EP. (2013). Bases bioquímicas y moleculares para el estudio del sistema cutinolítico en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Bonnen AM & Hammerschmidt R. (1989). Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. Phys Mol Plant Pathol. (35): 463-474.





- Bornscheuer UT, Rodríguez OG, Hidalgo A, Gollin A, Lyon J, Hitchman TS & Weiner DP. (2005). Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. *J Mol Catal B: Enzymatic*. (36): 8-13.
- Bornscheuer UT & Kazlauska RJ. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations*. 2° ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 61-74
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. (72): 248-254.
- Brissos V, Melo EP, Martinho JMG, Cabral JMS. (2008). Biochemical and structural characterisation of cutinase mutants in the presence of the anionic surfactant AOT. *Biochim Biophys Acta*. (1784): 1326–1334.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electron J Biotechnol*. (1): 160-173.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng*. (66): 17-34.
- Casado CG & Heredia A. (1999). Structure and dynamics of reconstituted cuticular waxes of grape berry cuticle (*Vitis vinifera* L.). *J Exp Bot*. (50): 175–182.
- Castro-Ochoa LD, Peña-Montes C, González-Canto A, Alva-Gasca A, Esquivel-Bautista R, Navarro-Ocaña A & Farrés-González Sarabia A. (2012). ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. *Appl Biochem Biotechnol*. (166): 1275-1290.
- Chen Z, Franco CF, Baptista RP, Cabral JMS, Coelho AV, Rodrigues Jr. CJ. & Melo EP. (2007). Purification and identification of



- cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. Appl Microbiol Biotechnol. (73): 1306–1313.
- Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J & Wu J. (2010). Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. J Mol Catal B: Enzymat. (63): 121–127.
  - Croteau R & Kolattukudy PE. (1974). Direct evidence for the involvement of epoxide intermediates in the biosynthesis of the cl, family of cutin acids. Arch Biochem Biophys. (162): 471-480.
  - David H, Özçelik IS, Hofmann G & Nielsen J. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. BMC Genomics. (9): 163.
  - Deas AHB, Baker EA & Holloway PJ. (1974). Identification of 16-hydroxyoxohexadecanoic acid monomers in plant cutins. Phytochem. (13): 1901-1905.
  - Degani O, Gepstein S & Dosoretz CG. (2002). Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. Appl Biochem Biotechnol. (102–103): 277–89.
  - de Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS & Mojovic L. (2009). Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. J Mol Catal. (60): 178–185.
  - Dickman MB, Patil SS & Kolattukudy PE. (1982). Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* on *Carica papaya* L. Phys Plant Pathol. (20): 333-347.
  - Dinjus U & Müller W. (1992). Preparative electrophoresis of surfactant proteins and *Salmonella* protein antigens using the BIO-RAD Model 491 Prep Cell. Fresenius J Anal Chem. (343): 95.



- Dutta K, Sen S & Veeranki VD. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Proc Biochem.* (44): 127–134.
- Egmond MR & Van Bommel CJ. (1997). Impact of structural information on understanding lipolytic function. *Meth Enzymol*, (284): 119-129.
- Esqueda-Domínguez KL. (2012). Producción, Identificación y Caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM.
- Esquivel-Bautista R. (2011). Producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico por carboxilesterasas. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Fett WF, Gerard HC, Moreau RA, Osman SF & Jones LE. (1992). Cutinase production by *Streptomyces* spp. *Curr Microbiol.* (25): 165–71.
- Fett WF, Gerard HC, Moreau RA, Osman SF, Jones LE. (1992). Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Appl Environ Microbiol.* (58): 2123–30.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA & Osman SF. (1999). Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. *J Appl Microbiol.* (86): 561–568.
- Fett WF, Wijey C, Moreau RA. & Osman SF. (2000). Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol.* (31): 25–29.
- Flipsen JAC, Appel ACM, van der Hijden HTMW & Verrips CT. (1997). Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in sequential laundry wash process. *Enz Microb Technol.* (23): 274–80.
- Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Baştürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V,



- Jurka J, Scazzocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MA, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA & Birren BW. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. (438): 1105-15.
- García-Lepe R, Nuero OM, Reyes F, Santamaría F. (1997). Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol*. (25): 127 – 130.
  - Gindro K & Pezet R. (1999). Purification and characterization of a 40.8-kDa cutinase in ungerminated conidia of *Botrytis cinerea* Pers.:Fr. *FEMS Microbiol Lett*. (171): 239-243.
  - Goldman GH & Osmani SA. (2008). *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*. CRC Press.
  - Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Cabral JMS & Aires-Barros MR. (1996). On the importance of the support material for the hydrolysis of triglycerides with a recombinant cutinase. *Proceedings of the III Congreso Ibérico de Biotecnología*. Valladolid, Spain. pp. 217-220.
  - González A, Gómez BL, Díez S & Hernández O. (2005). Purification and partial characterization of a *Paracoccidioides brasiliensis* protein with capacity to bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*. pp. 2486–2495.
  - Gordon NF, Cooney CL & Moore Christine MV. (1990). An overview of continuous protein purification process. *Biotech. Adv.* (8): 741-762.



- Guo BZ, Russin JS, Cleveland TE, Brown R & Damann KE. (1996). Evidence for cutinase production by *Aspergillus flavus* and its possible role in infection of corn kernels. *Phytopathol.* (86): 824-829.
- Halonen P, Reinikainen T, Nyyssölä A & Buchert J. (2009). A high throughput profiling method for cutinolytic esterases. *Enz Microb Technol.* (44): 394-399.
- Harris DC. (2007). *Análisis Químico Cuantitativo*. 3<sup>ra</sup>. Ed. Reverté S.A., Barcelona, España. pp. 641-644.
- Heredia A. (2002). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochim Biophys.* (1620): 1-7.
- Hijden V, Marugg HTJD, Warr JF, Klugkist J, Musters W & Hondmann DHA. Enzyme- containing surfactants compositions. Unilever patent WO 9403578. 94.02.
- Holloway P. (1973). Cutins of *Malus pumila* fruits and leaves. *Phytochem.* (12): 2913-2920.
- Jaeger KE, Dijkstra BW & Reetz MT. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol.* (53): 315-351.
- Kademi A, Ait-Abdelkader N, Fakhreddinea L, Baratti JC. (1999). A thermostable esterase activity from newly isolated moderate thermophilic bacterial strains. *Enz Microb Technol.* (24): 332-338.
- Käfer E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. *Adv Genet.* (19): 33-131.
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S & Schmid RD. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp. associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (67): 59-69.



- Kim Y, Jeewon L & Seung-Hyeon M. (2003). Uniqueness of microbial cutinases in hydrolysis of *p*-nitrophenyl esters. *J Microbiol Biotech.* (13): 57-63.
- Kodama Y, Masaki K, Kondo H, Suzuki M, Tsuda S, Nagura T, Shimba N, Suzuki E & Iefuji H. (2009). Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2. *Proteins.* (77): 710–717.
- Kolattukudy PE. (1970). Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: the structural component of plant cuticle. *Biochem Biophys Res Commun.* (41): 299-305.
- Köller W, Parker DM. (1989). Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phys Biochem.* (79): 278-283.
- Kumar M, Saxena A, Tripathi BP & Shahi VK. (2009). Membrane-based techniques for the separation and purification of proteins: An overview. *Advan Colloid Interf Scien.* (145): 1-22.
- Laane C, Boeren S, Vos K & Veeger C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng.* (30): 81-87.
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (227): 680-685.
- Lee D & Whiteley C. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enz Microb Technol.* (38): 291-316.
- Lin TS & Kolattukudy PE. (1980). Isolation and characterization of a cuticular polyester (cutin) hydrolyzing enzyme from phytopathogenic fungi. *Phys Plant Pathol.* (17): 1-15.
- Liu L, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss GL, Kong X, Gross R & Montclare JK. (2009). Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced



- thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc.* (131): 15711–15716.
- Longhi S & Cambillau C. (1996). Dynamics of *Fusarium solani* cutinase investigated through structural comparison among different crystal forms of its variants. *Proteins.* (26): 442-458.
  - Maeda H, Yamagata Y, Abe K, Hasegawa F, Machida M, Ishioka R, Gomi K & Nakajima T. (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* (67): 778–788.
  - Maiti IB, Kolattukudy PE & Shaykh M. (1979). Purification and characterization of a novel cutinase from Nasturtium (*Tropaeolum majus*) pollen. *Arch Biochem Biophys.* (196): 412–423.
  - Mathews CK, van Holde KE & Ahern KG. (2002). *Bioquímica* 3<sup>a</sup> ed. Addison Wesley. Madrid. pp. 168-170.
  - Merz J, Schembecker G, Riemer S, Nimtz M & Zorn H. (2009). Purification and identification of a novel cutinase from *Coprinopsis cinerea* by adsorptive bubble separation. *Separat Purific Technol.* (69): 57–62.
  - 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. *Electron J Biotechnol.* (9): 559-565.
  - Nawrath C. (2006). Unraveling the complex network of cuticular structure and function. *Curr Opin Plant Biol.* (9): 281-287.
  - Nyon MP, Rice DW, Berrisford JM, Hounslow AM, Moir AJG, Huang H, Nathan S, Mahadi NM, Abu Bakar FD & Craven CJ. (2009). Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *J Mol Biol.* (385): 226–235.



- Ohnishi K, Yoshida Y, Toida J, & Sekiguchi J. (1994). Purification and characterization of a novel lipolytic enzyme from *Aspergillus oryzae*. J Ferment Bioeng. (78): 413–419.
- Paiva AL, Balcao VM & Malcata X. (2000). Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. Enz Microbiol Technol. (27): 187 – 204.
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD & Farrés A. (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. Appl Microbiol Biotechnol. (78): 603-12.
- Petersen SB, Fojan P, Petersen EI, Neves PMT. (2001). The thermal stability of the *Fusarium solani* f.sp. *pisi* cutinase as a function of pH. J Biomed Biotechnol. (1): 62-69.
- Pio TF & Macedo GA. (2007). Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporium* using response surface methodology. Enz Microb Technol. (41): 613–9.
- Purdy RE & Kolattukudy PE. (1973). Depolymerization of a hydroxyl fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f.sp. *pisi* isolation and some properties of the enzyme. Arch Biochem Biophys. (159): 61-69.
- Purdy RE & Kolattukudy PE. (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, amino acid composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f.sp. *pisi*. Biochem. (14): 2824–2831.
- Richmond DV & Martin JT. (1959). Studies on plant cuticle: the composition of the cuticle of apple leaves and fruits. Ann Appl Biol. (47): 583–592.
- Rittenour WR, SI H, Harris SD. (2009). Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. Fungal Biol Rev. (23): 20–29.





- Sebastian J & Kolattukudy PE. (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. Arch Biochem Biophys. (263): 77-85.
- Segel IH, Montejó de Garcini G.E. (1982). Cálculos de Bioquímica: Cómo Resolver Problemas Matemáticos de Bioquímica General. 2<sup>da</sup>. Ed. Acirbia Zaragoza España. pp. 307-317
- Segoviano-Reyes LM. (2011). Regulación de la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Skamnioti P, Furlong RF & Gurr SJ. (2008). Evolutionary history of the ancient cutinase family in five filamentous Ascomycetes reveals differential gene duplications and losses and in *Magnaporthe grisea* shows evidence of sub- and neo-functionalization. New Phytol. (180): 711-21.
- Soliday CL & Kolattukudy PE. (1976). Isolation and characterization of a cutinase from *Fusarium roseum culmorum* and its immunological comparison with cutinases from *F. solani* f.sp. *pisi*. Arch Biochem Biophys. (176): 334-343.
- Speranza P, de Oliveira P & Alves MG. (2011). Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. J Mol Catal B: Enzymat. (72): 181-186.
- Stark RE & Tian S. (2006). The cutin biopolymer matrix. In. M Riederer, C Müller, eds. Biol Plant Cut. Blackwell Publishing Ltd., Oxford. pp. 126-144.
- Stöcklein W, Sztajer H, Menge U, Schmid RD. (1993). Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. Biochem Biophys Acta. (1168): 181-189.



- Taiz L & Zeiger E. (2002). Plant Physiology. 3<sup>rd</sup> Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. pp.690.
- Takao M, Nakaniwa T, Yoshikawa K, Terashita T & Sakai T. (200). Purification and characterization of thermostable pectate lyase with protopectinase activity from thermophilic *Bacillus* sp. TS 47. Biosci Biotechnol Biochem. (64): 2360-2367.
- Thomsen MS & Nidetzky B. (2008). Microfluidic reactor for continuous flow biotransformations with immobilized enzymes: the example of lactose hydrolysis by a hyperthermophilic  $\beta$ -glycoside hydrolase. Eng Life Sci. (1): 40-48.
- Tobert JA. (2003). Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nat Rev Drug Discov. (2): 517-26.
- Trail F & Köller W. (1990). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. Physiol Mol Plant Pathol. (36): 495-508.
- Trail F & Köller W. (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. Physiol Mol Plant Pathol. (42): 205-220.
- Voet D, Voet JG. (2006). Bioquímica. 3<sup>a</sup>. Ed. Médica Panamericana. México. pp. 136-162.
- Vogg G, Fischer S, Leide J, Emmanuel E, Jetter R, Levy AA & Riederer M. (2004). Tomato fruit cuticular waxes and their effects on transpiration barrier properties: functional characterization of a mutant deficient in a very-long--ketoacyl-CoA synthase. J Exp Bot (55): 1401-1410.
- Walton TJ & Kolattukudy PE. (1972). Determination of the structure of cutin monomers by a novel depolymerization



procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochem.* (11): 1885-1897.

- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee YM & Bostock RM. (2000). Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Arch Biochem Biophys.* (382): 31–38.
- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee YM & Bostock RM. (2002). Molecular cloning, characterization, and expression of a redox-responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) Honey. *Fungal Genet Biol.* (35): 261–276.
- Yahya ARM, Anderson WA, Moo-Young M. (1998) Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enz Microb Technol.* (23): 438–450.
- Zhang Y, Chen S, Xu M, Cavaco-Paulo A, Wu J, & Chen J. (2010). Characterization of *Thermobifida fusca* cutinase–carbohydrate-binding module fusion proteins and their potential application in bioscouring. *Appl Environ Microbiol.* (76): 6870–6876.
- **UniProtKB** [www.uniprot.org/help/uniprotkb](http://www.uniprot.org/help/uniprotkb)
- **Aspergillus Genome Database**
- [www.aspgd.org/cache/A\\_nidulans\\_FGSC\\_A4\\_genomeSnapshot.html](http://www.aspgd.org/cache/A_nidulans_FGSC_A4_genomeSnapshot.html)
- **Aspergillus Comparative Database**
- [www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus\\_group](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group)
- **Information on EC 3.1.1.74 - cutinase**
- [www.brenda-enzymes.org/index.php4](http://www.brenda-enzymes.org/index.php4)



## **APÉNDICES**

### **❖ APÉNDICE A: Métodos de purificación.**

#### **✓ Precipitación**

Los múltiples grupos ácido-base de una proteína determinan que sus propiedades de solubilidad dependan de la concentración de las sales disueltas, de la polaridad del disolvente, del pH y de la temperatura. Las diferentes proteínas varían mucho en sus solubilidades bajo un conjunto dado de condiciones en las que otras permanecen completamente solubles. Este efecto se emplea rutinariamente como base de la purificación de una proteína.

#### **✓ Precipitación con sales**

Las proteínas globulares aumentan su solubilidad al incrementar la concentración de iones, fenómeno denominado de "salting in". Pero cuando se eleva en exceso la concentración de iones, disminuye la solubilidad de las proteínas y precipitan, "salting out" o efecto llamado precipitación salina. La mayor parte de las proteínas presentan en su superficie una capa de agua (capa de solvatación) que disminuye cuando se incrementa la concentración de los iones. El mecanismo de "salting out" se basa en la exclusión del cosolvente, es decir la sal establece puentes de hidrógeno con el agua y al hacerlo sustrae el agua de la proteína. Por lo anterior, la conformación de la proteína se modifica para evitar la exposición de sus residuos apolares con el solvente, dando como resultado nuevas interacciones y por lo tanto lleva a la formación de plegamientos o asociaciones que pueden llevar a su precipitación. El método del "salting out" es uno de los métodos más utilizados en la purificación de proteínas, ya que permite deshacerse de una gran cantidad de contaminantes de una forma económica.



La precipitación de una proteína a una concentración dada de sal depende las propias características iónicas y de contenido de residuos polares, por lo que cada proteína precipita a cierta concentración y tipo de sal. Para establecer esta concentración se deben de realizar pruebas. Además, se tiene que determinar si la proteína permanece activa o pierde su actividad biológica al ser precipitada.

### ✓ **Precipitación con solventes orgánicos**

Los disolventes orgánicos, tales como la acetona y etanol (ver Tabla), son generalmente buenos precipitantes de proteínas, ya que sus constantes dieléctricas pequeñas provocan la disminución del poder de solvatación de sus disoluciones acuosas respecto a los iones disueltos, entre ellos los de las proteínas. Esta disminución de la constante dieléctrica aumenta también las diferencias en el comportamiento de la precipitación por salado de las proteínas, de modo que pueden combinarse efectivamente las dos técnicas (Voet, 2006).

Después de la precipitación hay que retirar el agente precipitante, que es comúnmente la sal. Una manera es diluir la solución para reducir la concentración del compuesto, otra forma puede ser la diálisis.

Tabla. Agentes precipitantes utilizados en la purificación de proteínas (Harris, 2007).

<b>Agente</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Propiedades</b>
Sulfato de amonio	Sal	Fácil solubilidad, estabilizante
Sulfato de sodio	Sal	----
Etanol	Solvente	Inflamable, con riesgo de desnaturalización
Acetona	Solvente	
Politilenglicol	Polímero	Sin carga

### ✓ **Diálisis**

La diálisis es un proceso que separa moléculas de acuerdo con su tamaño, mediante el empleo de membranas semipermeables que



contienen poros de dimensiones inferiores a las macromoleculares. Estos poros permiten que moléculas pequeñas tales como las de los disolventes, sales y metabolitos pequeños, se difundan a través de la membrana pero bloqueen el tránsito de las moléculas mayores. El celofán (acetato de celulosa) es el material de diálisis más empleado, aunque también se emplean nitrocelulosa y colodión.

### ✓ **Métodos cromatográficos**

Existe una gran variedad de métodos cromatográficos empleados para la purificación de proteínas. La diversidad de todos ellos radica en las diferentes propiedades de los polipéptidos y que pueden ser aprovechadas. En la mayoría de los casos no basta con hacer uso de un solo método, por lo tanto, para obtener mejores resultados es necesario hacer diferentes combinaciones de estos procedimientos. A continuación se enlistan algunos métodos cromatográficos:

#### ✓ **Cromatografía de intercambio iónico**

La cromatografía de intercambio iónico ("Exchange Ion Chromatography", EIC) está basada en la atracción entre los iones del soluto y los centros cargados unidos a la fase estacionaria.

Si una proteína tiene carga neta positiva a pH 7, ésta se unirá normalmente a una columna de esferas que contengan grupos carboxilos, mientras que una proteína con carga negativa, no lo hará. Las proteínas cargadas positivamente (proteínas catiónicas) se pueden separar en columnas de carboximetil-celulosa cargadas negativamente. Mientras que las proteínas cargadas negativamente (proteínas aniónicas) se pueden separar en columnas de dietilaminoetil-celulosa cargadas positivamente (DEAE) (Berg *et al.*, 2003).



En la siguiente Tabla se muestran algunos grupos activos comunes de geles de intercambio iónico.

Tabla. Algunos intercambiadores iónicos empleados habitualmente en separaciones cromatográficas (Voet, 2006).

Nombre comercial	Tipo	Grupo ionizable	Observaciones
Dowex 1	Resina de poliestireno fuertemente básica	$+$ $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$	Intercambio de anión
Dowex 50	Resina de poliestireno fuertemente ácida	$-\text{SO}_3\text{H}$	Intercambio de catión
DEAE-celulosa	Básico	Dietilaminoetilo $-\text{CH}_2$ $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Empleado en el fraccionamiento de proteínas ácidas y neutras
ECTEOLA-celulosa	Básico	Mezcla animal	Empleado para la cromatografía de ácidos nucleicos
CM-celulosa	Ácido	Carboximetil $-\text{CH}_2\text{COOH}$	Empleado en el fraccionamiento de proteínas básicas y neutras
P-celulosa	Fuertemente y débilmente ácida	Fosfato $-\text{OPO}_3\text{H}_2$	Dibásico; retiene a las proteínas básicas fuertemente
DEAE-Sephadex	Gel de dextrano con enlaces transversales, básico	Dietilaminoetilo $-\text{CH}_2$ $\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	Combinación de cromatografía y filtración en gel de proteínas ácidas y neutras
CM-Sephadex	Gel de dextrano con enlaces transversales, ácidos	Carboximetil $-\text{CH}_2\text{COOH}$	Combinación de cromatografía y filtración en gel de proteínas básicas y neutras
Bio-Gel CM 100	Gel de poliacrilamida con enlaces transversales, ácido	$-\text{CH}_2\text{COOH}$	Combinación de cromatografía y filtración en gel de proteínas básicas y neutras

### ✓ Cromatografía de filtración por gel

En la cromatografía de filtración por gel, que también se llama cromatografía de exclusión molecular ("Molecular Exclusion Chromatography", MEC), las moléculas se separan de acuerdo a sus tamaños y sus formas.



Las moléculas con masas moleculares comprendidas por debajo del límite de exclusión de un gel se eluirán desde el gel en el orden de sus masas moleculares, siendo las de mayor masa las que eluyan en primer lugar. Ello es debido a que los tamaños de poro en cualquier gel varían en un intervalo limitado de modo que las moléculas mayores disponen de menos volumen en el interior del gel que las moléculas menores. Este efecto es la base de la cromatografía de filtración por gel (Voet, 2006). En la Figura se muestran las estructuras de algunos soportes empleados para este tipo de cromatografía (Gordon *et al.*, 1990).

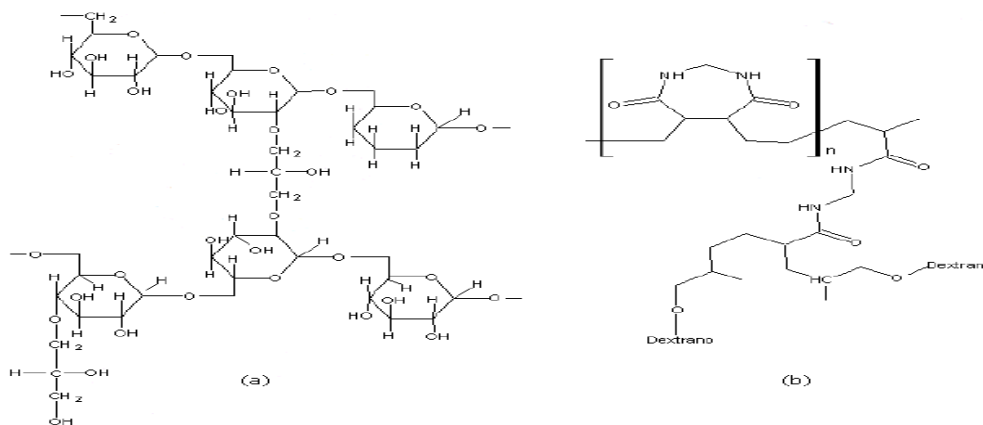


Figura. Estructura química del Sephadex (a) gel dextrano entrelazado y Sephacryl (b) gel dextrano entrelazado con *N,N'*-metilen-bisacrilamida, comúnmente utilizados en cromatografía de filtración en gel.

### ✓ Cromatografía de afinidad

En esta técnica una molécula conocida como ligando, a la que se une específicamente la proteína que interesa, se une por covalencia a una matriz inerte y porosa. Cuando se hace atravesar a través de este material cromatográfico una disolución de proteína no pura, la proteína deseada se une al ligando inmovilizado, mientras que las demás sustancias son eliminadas de la columna con el tampón. La proteína deseada puede recuperarse entonces, en forma muy purificada,





variando las condiciones de elución de modo que se libere la proteína de la matriz cromatográfica. La ventaja que tiene esta técnica es su capacidad de aprovechar las propiedades bioquímicas singulares de la proteína deseada en lugar de las pequeñas diferencias entre las propiedades fisicoquímicas de las proteínas que utilizan otros métodos cromatográficos. En esta técnica, la matriz cromatográfica debe ser inerte químicamente, tener porosidad elevada y gran número de grupos funcionales capaces de formar enlaces covalentes con los ligandos (Voet, 2006).

#### ✓ **Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)**

La técnica de Interacción Hidrofóbica (HIC) se basa en que aunque las cadenas laterales no polares tienden a ocupar los interiores no acuosos de las proteínas nativas, una fracción significativa de estos grupos hidrofóbicos está, al menos, parcialmente expuesta al solvente acuoso en la superficie de la proteína. Por consiguiente, en condiciones apropiadas, las proteínas interaccionan con los grupos apolares de una matriz inmovilizada. Estas interacciones constituyen la base no sólo de la HIC sino también de la cromatografía de fase reversa. En la HIC la fase estacionaria es una sustancia hidrofílica, tal como un gel de agarosa, sólo sustituida en parte por grupos hidrofóbicos, generalmente restos octilo o fenilo. En la HIC las interacciones hidrofóbicas son relativamente débiles, con lo que las proteínas conservan sus estructuras nativas.

En la HIC, los gradientes deben reducir progresivamente estas interacciones hidrofóbicas débiles. Los eluyentes son tampones acuosos con, por ejemplo, concentraciones decrecientes de sal (las interacciones hidrofóbicas aumentan al aumentar la fuerza iónica), concentraciones crecientes de detergentes, o incrementando el pH. Así pues la HIC



separa proteínas nativas según su grado de hidrofobicidad superficial, criterio que difiere de los que constituyen la base de otros tipos de cromatografía (Voet, 2006).

✓ **Métodos de electroforesis**

✓ **Isoelectroenfoque**

Las proteínas pueden ser separadas electroforéticamente con base en sus contenidos relativos de aminoácidos ácidos o básicos. El punto isoeléctrico (pI) de una proteína es el pH en que su carga neta es cero. El gradiente de pH se consigue sometiendo previamente a electroforesis una mezcla de polianfolitos (polímeros pequeños con carga múltiple) con diferentes valores de pI. El isoelectroenfoque permite distinguir proteínas que difieren en sus pI tan poco como 0.01, lo que significa que se pueden separar proteínas que difieren en una sola carga neta. En la Figura se muestra el principio del isoelectroenfoque, donde antes de cargar la muestra se establece un gradiente de pH en el gel (Berg *et al.*, 2003).

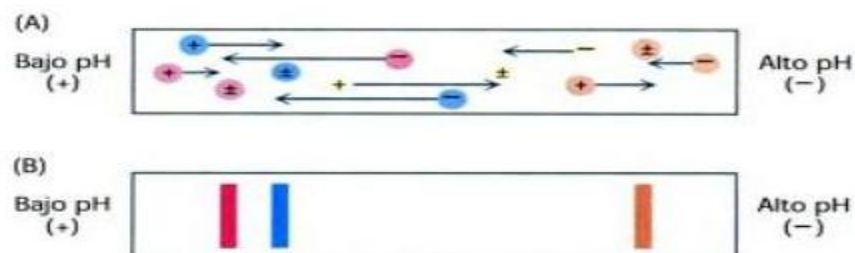


Figura. Principio del isoelectroenfoque. (A) Se carga la muestra y se aplica el voltaje. Las proteínas emigrarán hacia su pH isoeléctrico. (B) Las proteínas forman bandas que se pueden separar y usar en experimentos futuros.

✓ **Electroforesis en gel**

El fenómeno, llamado electroforesis, se da cuando una molécula con carga eléctrica neta es desplazada en un campo eléctrico. Este método ofrece un procedimiento poderoso para separar proteínas y otras



macromoléculas. La velocidad de migración de una proteína (o cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza de dicho campo, de la carga neta de la proteína y del coeficiente de fricción.

Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel) porque el gel sirve como un tamiz molecular que potencia la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros del gel se desplazarán fácilmente a través de este, mientras que las moléculas mayores que los poros del gel permanecerán casi inmóviles y las moléculas de tamaño intermedio se desplazarán a través del gel con diversos grados de dificultad. Este método se lleva a cabo en un bloque delgado, vertical, de poliacrilamida. La dirección del flujo es vertical descendente. En la siguiente Figura se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida.

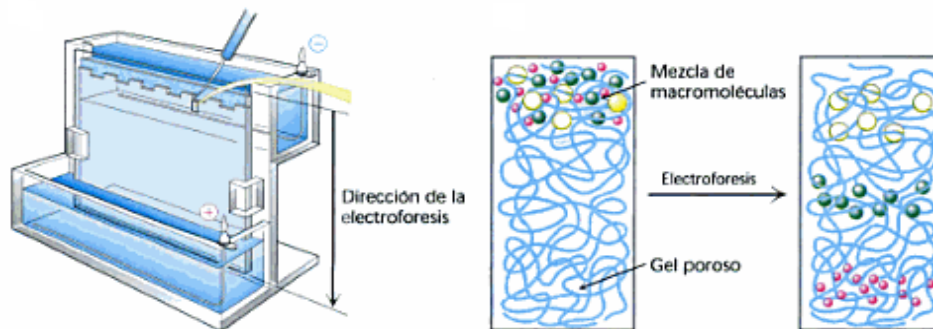


Figura. Equipo para electroforesis en gel. Se usa una micropipeta para colocar las disoluciones de las proteínas en los pocillos del gel, se coloca una tapa sobre la cámara y se aplica un voltaje. Los complejos SDS-proteína cargados (-) migrarán en dirección al ánodo en la parte inferior del gel.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida entrecruzada por *N,N'*-metilen-bis-acrilamida, ya que estos son el soporte preferido porque son inertes químicamente y se forman con facilidad. En la siguiente Figura inciso (B) se muestra la formación de un gel de poliacrilamida.



Las proteínas pueden separarse según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre un gel de poliacrilamida, en condiciones desnaturizantes. La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato sódico (SDS), el cual es un detergente aniónico capaz de romper casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas. En la Figura inciso (A) se muestra la estructura del SDS.

También se añade  $\beta$ -mercaptoetanol o ditioneitol (DTT) para reducir los puentes disulfuro de la proteína. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos residuos de aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína.

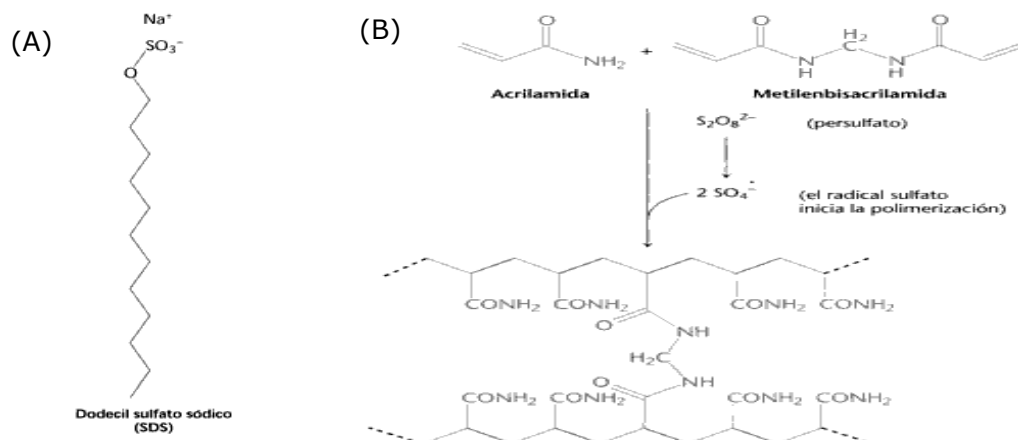


Figura. (A) Estructura química del SDS. (B) Formación de un gel de poliacrilamida.

Por último, las proteínas pueden visualizarse tiñéndolas con azul de Coomassie, bastando  $0.1 \mu\text{g}$  de una proteína para dar una banda diferencial visible, mientras que con la tinción de plata se pueden detectar cantidades menores de aproximadamente  $0.02 \mu\text{g}$ .



La electroforesis en gel SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE, “polyacrylamide gel electrophoresis”) es rápida, sensible y capaz de un alto grado de resolución, ya que se pueden distinguir, normalmente, entre proteínas que difieren entre sí aproximadamente en un 2% de su masa molecular (Berg *et al.*, 2003).

#### ✓ **Electroforesis de elución continua**

La electroforesis de elución continua permite purificar proteínas o ácidos nucleicos a partir de mezclas complejas. Consiste en una combinación de electroforesis en gel, que puede ser nativo o desnaturizante, una fuente de poder para aplicar la carga, un sistema de enfriamiento y una bomba peristáltica para generar un flujo.

Las bandas de proteína se recuperan en un colector de fracciones como ocurre en la cromatografía en columna. Un equipo diseñado para este fin es el equipo Prep Cell modelo 491 o Mini Prep Cell de Bio-Rad.

Para el uso del equipo Mini Prep Cell de Bio-Rad se debe tener en cuenta lo siguiente:

- Usando un gel SDS-PAGE, se separan y purifican las proteínas que difieren en su masa molecular por lo menos en 1,000 Da.
- Usando un gel Nativo-PAGE se aíslan proteínas que difieren en su punto isoeléctrico por lo menos en un pH de 0.1 unidades.
- Usando electroforesis de gel de agarosa, se purifican proteínas grandes y fragmentos de DNA y RNA (hasta 18 kb).

Durante una corrida, las muestras son separadas por electroforesis a través de un gel cilíndrico, en el cual, las bandas de las moléculas separadas se observan en forma de anillos. En la siguiente Figura se muestra el gel en forma cilíndrica.



Figura. Bandas individuales de color azul, durante la electroforesis de elución continua.

Las bandas individuales migran hasta el borde inferior del gel, desde donde pasan directamente a la cámara de elución para su colección.

Las tres variables a considerar para una resolución óptima en un gel preparativo SDS-PAGE son:

- i. *Tamaño de poro*: dependerá del tamaño de las proteínas de interés. Para geles analíticos y preparativos generalmente se usa 2.67% del entrecruzador *N,N'*-metilen-bis-acrilamida (puede usarse también premezclada con acrilamida en una proporción 37.5:1). La concentración total del monómero es referida como %T. El tamaño del poro que mejor da resultados es aquél que permita una movilidad relativa  $R_f$  ("relative mobility") entre 0.55-0.6. El valor de  $R_f$  obtenido en un mini gel puede ser usado para estimar el  $R_f$  en el Prep Cell Modelo 491 siempre y cuando se emplee la misma concentración de acrilamida.
- ii. *Longitud del gel*: es usada para incrementar la resolución entre las proteínas. Sin embargo, a mayor longitud del gel, también se incrementa la difusión de las bandas. La mínima longitud del gel dependerá de la diferencia entre el peso molecular de la proteína de interés y de su contaminante más cercano. La diferencia entre estas dos proteínas es inversamente proporcional a la longitud del



gel, es decir, diferencias pequeñas requerirán de geles más largos para una mejor resolución. La resolución también puede mejorar si se carga una cantidad menor de muestra.

El empleo y funcionamiento del equipo Mini Prep Cell de Bio-Rad se mencionan a continuación.

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

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

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

Los componentes principales del sistema Mini Prep Cell de Bio-Rad son:

- Cámaras de buffer superior e inferior
- Ensamble del tubo para el gel



- Soporte de elución
- Ensemble de colección del buffer de elución
- Estante de preparación del gel (“casting stand”)

En la figura se muestran los componentes del equipo Mini Prep Cell de Bio-Rad.

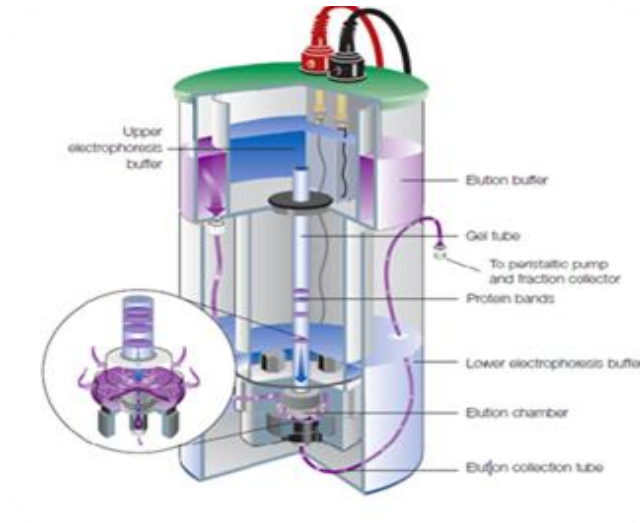


Figura. Mini Prep Cell de Bio-Rad.

El tamaño de la muestra que se cargará en el Prep Cell modelo 491 y Mini Prep Cell de Bio-Rad se determinará con base en las siguientes especificaciones mostradas en la Tabla.

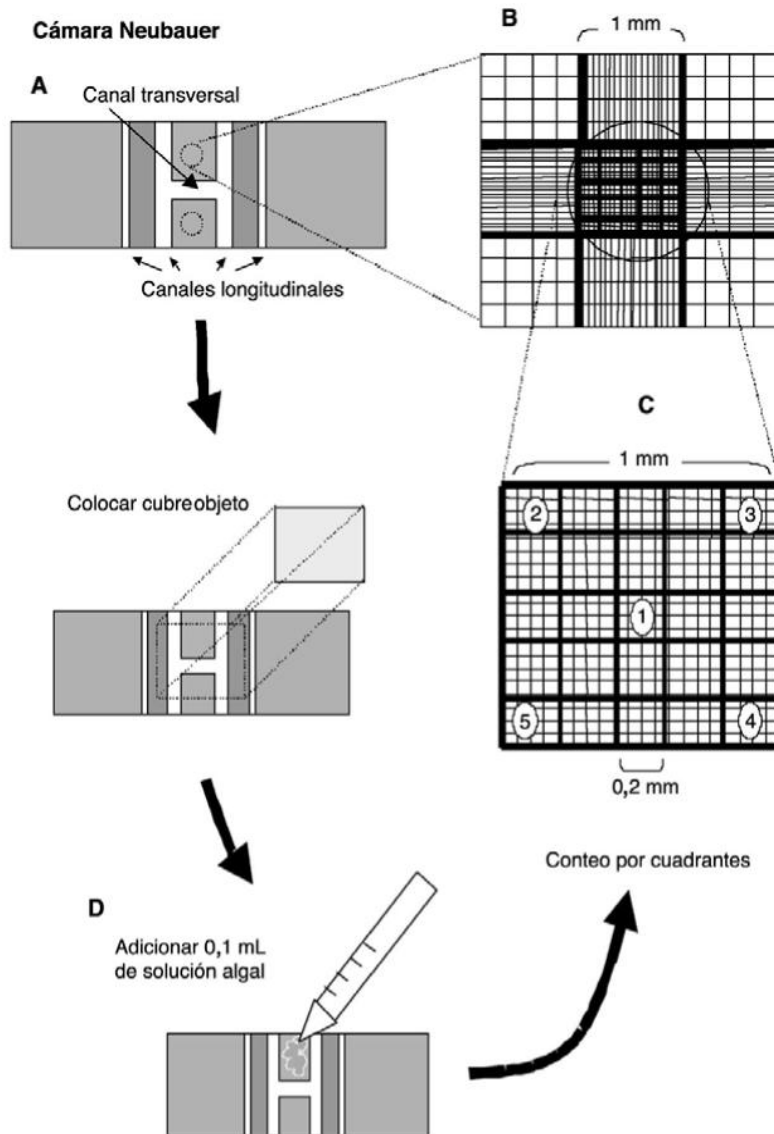
Tabla. Especificaciones del Prep Cell modelo 491 y del Mini Prep Cell de Bio-Rad.

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



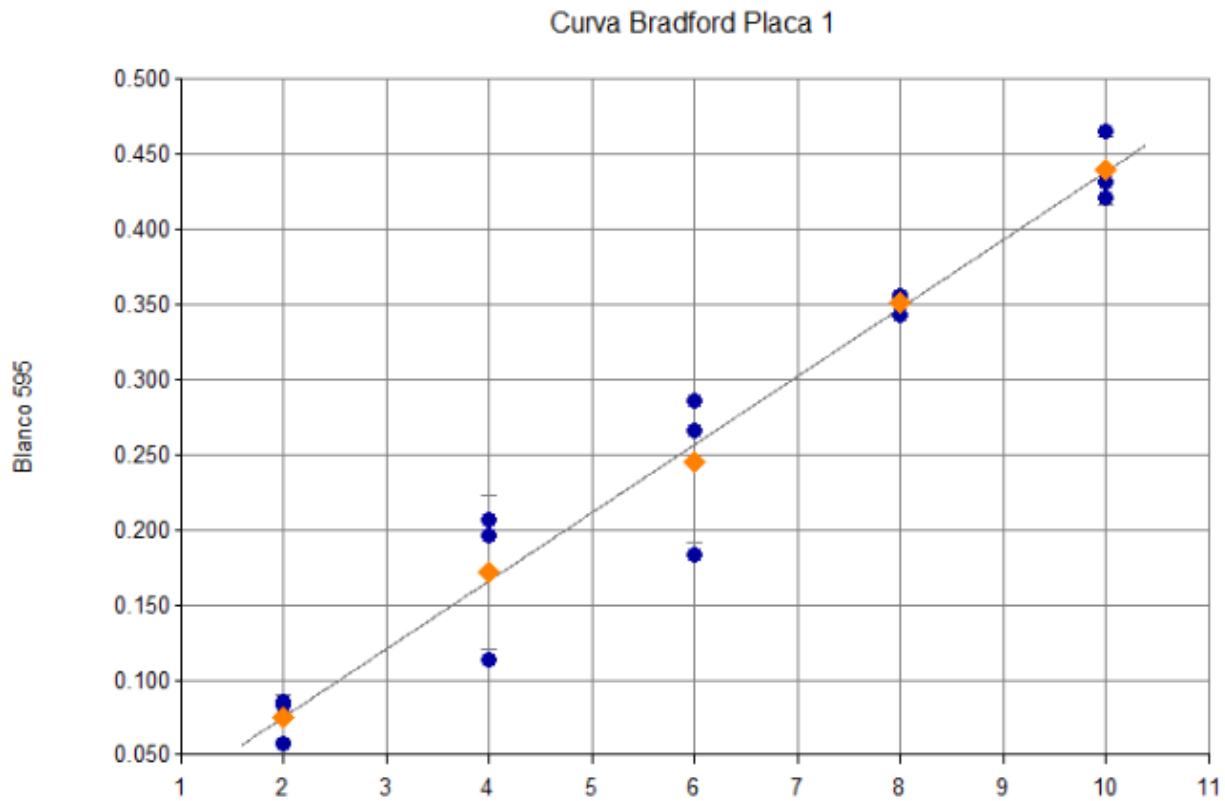


❖ **APÉNDICE B: Cámara de Neubauer o Hematocitómetro para conteo de esporas.**





❖ **APÉNDICE C: Curva de calibración para cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford.**

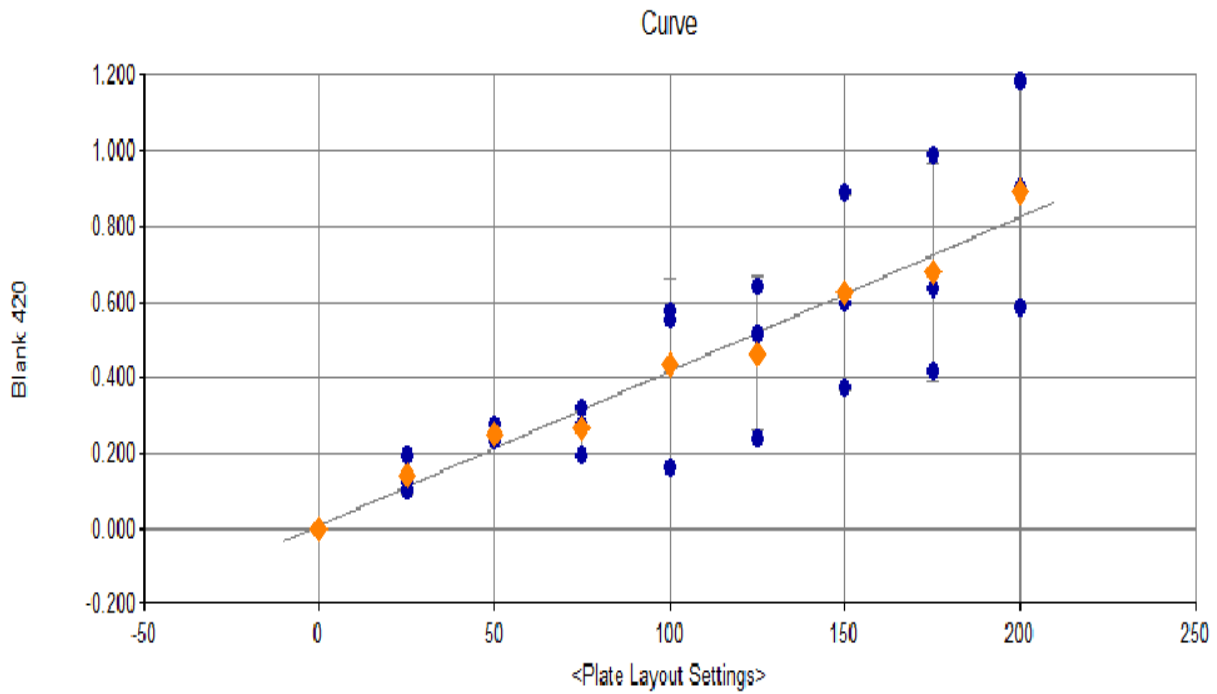


Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Bradford (BSA)	$Y=A*X+B$	0.0454	-0.0158	0.998



❖ **APÉNDICE D: Curvas de calibración de *p*-nitrofenol para la cuantificación de actividad enzimática.**

➤ Se utilizó como referencia *p*-nitrofenol de 25-200 μmol. Las lecturas se hicieron a 420 nm.



Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
<i>p</i> -Nitrofenol	$Y=A*X+B$	0.00409	0.00796	0.978