



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA

"REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CUTINASAS
EN *Aspergillus nidulans*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

LAURA MONTSERRAT SEGOVIANO REYES



MÉXICO, D.F.

2012



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: Arturo Navarro Ocaña

VOCAL: Amelia María de Guadalupe Farrés González- Saravia

SECRETARIO: Martha Giles Gómez

1er. SUPLENTE: Maricarmen Quirasco Baruch

2º SUPLENTE: Sandra Paola Sánchez Rodríguez

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 Farrés González – Saravia

Firma: _____

SUPERVISOR TÉCNICO: M. en C. Lelie Denise Castro Ochoa

Firma: _____

SUSTENTANTE: Laura Montserrat Segoviano Reyes

Firma: _____

Agradecimientos: Al proyecto PAPIIT IN2148092

Agradecimientos

En primer lugar agradezco a Dios por regalarme ésta vida llena de salud y al lado de una gran familia. Por las oportunidades que me ha dado para crecer y aprender, logrando así día con día cada uno de mis proyectos y metas, por dejarme concluir mis estudios profesionales y seguir planificando muchos más objetivos que aún quedan por cumplir.

Muchas gracias a mi querida y hermosa Universidad Nacional Autónoma de México en donde he pasado los mejores años de mi vida, en donde me formé como profesionista pasando por buenos y malos momentos pero que estoy segura que cada uno valió la pena vivirlos. Agradezco a todos mis profesores de la facultad por todas sus enseñanzas que fueron de suma importancia en mi formación académica, ya que sin ellos no lo hubiera logrado.

Dra. Amelia Farrés. Muchas gracias por haberme brindado tan valiosa oportunidad para llevar a cabo este proyecto de investigación, en el cual conté con todo su apoyo, paciencia, tolerancia y excelente voluntad en todo momento que requerí de su amplia experiencia y conocimiento profesional, para lograr una más de mis metas. No omito el hacer un gran reconocimiento por ser usted un ser humano de grandes valores y virtudes.

M. en C. Denise Castro. Gracias por guiarme, dirigirme y supervisarme durante la realización de mi investigación y por la disposición que tuviste al enseñarme técnicas de laboratorio para así lograr la culminación de este proyecto.

Dra. Carolina Peña. Agradezco enormemente tu comprensión, apoyo y confianza brindadas durante mi estancia en el laboratorio, por orientarme y enseñarme técnicas para llevar a cabo el trabajo experimental al transmitirme tus conocimientos para fortalecer mi aprendizaje y despejar todas las dudas que se me presentaban día con día.

Q.A. Israel García. Te agradezco por brindarme tu apoyo incondicional en los momentos que necesité de tu ayuda en el laboratorio obteniendo así consejos, aprendizaje y también algunos que otros regaños. Gracias por la amistad forjada en este tiempo, la convivencia, confianza y los buenos momentos vividos.

Agradezco a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio 312 con quienes pasé la mayor parte de mi tiempo durante mi estancia, compartiendo responsabilidades, preocupaciones y enseñanzas, integrando así un buen equipo de trabajo.

A mis padres Laura Reyes y Raúl Segoviano por creer en mí brindándome todo su apoyo incondicional, fomentando una formación humanística y profesional en mi vida, al transmitirme un cúmulo de información en cuanto a dudas e inquietudes profesionales se me fueron presentando durante mi trayectoria estudiantil, por enseñarme a salir siempre adelante haciéndome saber que en la vida no existe la palabra imposible y que el proyecto de planes, objetivos y metas siempre serán

alcanzados con diligencia, disposición y constancia. Así mismo agradezco por depositar toda su confianza en mí e inculcarme grandes valores para ser una persona de bien contando en todo momento con su guía y dirección. A ellos mi mayor admiración.

A mi hermana Grisel Segoviano que siempre ha estado ahí para darme apoyo y ánimos cuando más lo necesito, por ser un gran ejemplo de mujer que jamás se da por vencida y que lucha por lo que quiere, por ser responsable, inteligente y contar con maravillosos valores y cualidades que la hacen única. Por ser más que mi hermana mi amiga que siempre me escucha y está ahí para aconsejarme, por compartir momentos de tristeza y felicidad. Gracias por permitirme conocer a mis maravillosos sobrinos: Rebeca, Arturo, Aldo, Alma y a mi princesita Katya.

A mi hermano Miguel Ángel Segoviano quien es un ejemplo a seguir por su gran tenacidad, brillante inteligencia y su gran corazón, por contar con grandes valores, educación y moral, lo cual lo hace un hombre de éxito, trabajador y luchón que jamás deja nada inconcluso forjándose objetivo tras objetivo, siendo digno de mi admiración y respeto. Gracias hermano por ayudarme en todo momento, dándome seguridad y muchísimos ánimos para salir adelante siempre ante cualquier situación.

A mi abuelita Guadalupe Cervantes por ser parte importante en mi crecimiento, teniendo siempre una palabra alentadora y contar con ese buen sentido del humor que la caracteriza, por haber sido la pionera en desear que sus generaciones venideras tuvieran una mejor calidad de vida con estudios profesionales. Le agradezco infinitamente por ese gran amor, ejemplo de valores y por su inquebrantable voluntad para seguir y triunfar en la vida.

A mis abuelitos Bertha Rangel y Candelario Segoviano por ser dos personas excepcionales e importantes en mi vida, por ser un gran ejemplo a seguir de constante lucha diaria, ya que de ellos aprendí que todo se logra a través de esfuerzo, responsabilidad, disposición y voluntad. Gracias por darme consejos y ánimos siempre acompañados de una gran sonrisa.

No puedo dejar pasar por alto a mis entrañables amigos y confidentes quienes juntos hemos conocido lo que representa la verdadera amistad en las que los valores más valiosos prevalecen, como es el respeto, honestidad, lealtad, fidelidad, confianza, responsabilidad y el apoyo perenne en todo momento. Con ellos he compartido experiencias maravillosas en momentos de alegría en viajes, festejos, triunfos, éxitos, así como también en momentos de tristeza y de mayor dificultad en los que hemos sufrido pérdidas y fracasos, pero que pese a todo siempre salimos adelante con el aliento y apoyo incondicional de cada uno: Adry, Dani, Cris, Isis, Val, Eri, Ale, Dano, Uri, Pedro, Davo y Bubu. Gracias.

ÍNDICE GENERAL

I. Introducción

Resumen

II. Marco teórico

| | |
|---|-------|
| 2.1 Proteínas | 1 |
| 2.1.1 Niveles estructurales de las proteínas | 1-2 |
| 2.2 Enzimas | 3 |
| 2.2.1 Características generales de las enzimas | 3-4 |
| 2.2.2 Sitio activo | 4 |
| 2.3 Actividad enzimática | 4-5 |
| 2.3.1 Factores que afectan la actividad enzimática | 5 |
| 2.3.2 Unidades de actividad enzimática | 5 |
| 2.4 Regulación de enzimas | 5 |
| 2.4.1 Mecanismos regulatorios que controlan la concentración de enzimas | 6 |
| 2.5 Hongos | 7 |
| 2.5.1 Cultivo de hongos | 7 |
| 2.5.2 Medios de cultivo | 7-8 |
| 2.5.3 Fisiología y nutrición de los hongos | 8-10 |
| 2.6 Género <i>Aspergillus</i> | 10-12 |
| 2.6.1 <i>Aspergillus nidulans</i> | 13 |

III. Antecedentes

| | |
|--|-------|
| 3.1 Cutina | 14 |
| 3.2 Cutinasas | 15 |
| 3.3 Características de las cutinasas | 15-16 |
| 3.4 Aplicaciones de cutinasas | 17 |
| 3.5 Microorganismos productores de cutinasas | 17-19 |
| 3.6 Regulación de cutinasas | 19 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 3.7 | Cutinasas en <i>Aspergillus nidulans</i> | 20-24 |
| 3.8 | Efecto de nutrientes | 24 |
| IV. | Justificación | 25 |
| V. | Hipótesis | 26 |
| VI. | Objetivos | |
| 6.1 | Objetivo general | 27 |
| 6.2 | Objetivos particulares | 27 |
| VII. | Materiales y métodos | |
| | Estrategia experimental general | 28 |
| 7.1 | Medio mínimo y activación de la cepa | 29-31 |
| 7.2 | Conservación de la cepa | 31 |
| 7.3 | Reactivación del microorganismo | 31 |
| 7.4 | Cosecha de esporas | 32 |
| 7.4.1 | Conteo de esporas | 32-33 |
| 7.5 | Obtención de cutina | 33-34 |
| 7.6 | Producción de la enzima | 34-35 |
| 7.6.1 | Fuente de carbono | 35-36 |
| 7.6.2 | Fuente de nitrógeno | 36 |
| 7.7 | Métodos de actividad enzimática y proteína | 37-38 |
| 7.8 | Evaluación de perfil de proteína y zimogramas | 38-39 |
| 7.9 | Medición cualitativa de actividad | 40-41 |
| 7.10 | Precipitación de proteínas | 42 |
| 7.11 | Identificación de la proteína mediante espectrometría de masas | 42-43 |
| VIII. | Resultados | |
| 8.1 | Evaluación de las condiciones de cultivo | 44 |
| 8.1.1 | Velocidad de agitación | 44-45 |
| 8.1.2 | Efecto de la temperatura | 46-47 |
| 8.1.3 | Evaluación del inductor | 47-48 |

| | | |
|-------------|---|--------------|
| 8.2 | Análisis de efecto de nutrientes | 49 |
| 8.2.1 | Fuente de carbono | 49-51 |
| 8.2.2 | Evaluación electroforética de cutinasas | 51-53 |
| 8.2.3 | Fuente de nitrógeno | 54-56 |
| 8.2.4 | Determinación de cutinasas | 56-57 |
| 8.3 | Medio mínimo evaluado a mejores condiciones | 58-59 |
| 8.4 | Medio optimizado (enzima 28 KDa) | 59-62 |
| 8.4.1 | Evaluación electroforética cutinasa 28 KDa | 62-63 |
| 8.5 | Identificación por secuenciación | 63-64 |
| IX. | Discusión | 65-66 |
| X. | Conclusiones | 67-68 |
| | Perspectivas | 69 |
| XI. | Apéndice | 70-84 |
| XII. | Bibliografía | 85-92 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas | 2 |
| Figura 2. Formación del complejo enzima-sustrato | 4 |
| Figura 3. <i>Aspergillus nidulans</i> | 13 |
| Figura 4. Estructura de la cutina | 14 |
| Figura 5. Plegamiento α/β hidrolasa y triada catalítica | 16 |
| Figura 6. Cutinasa de 29 KDa inducida con aceite de oliva | 21 |
| Figura 7. Tinción con Coomassie y zimograma (enzima de 29 KDa) | 22 |
| Figura 8. Enzima de 21KDa empleando cutina como sustrato | 23 |
| Figura 9. Inductores | 23 |
| Figura 10. Perfil proteínico y zimograma (cutinasa de 21 y 28 KDa) | 24 |
| Figura 11. Diagrama experimental general | 28 |
| Figura 12. Obtención de cutina | 34 |
| Figura 13. Reacción de hidrólisis de p-Nitrofenil Laurato | 38 |
| Figura 14. Proceso de identificación de enzima | 41 |
| Figura 15. Perfil de proteínas y zimograma | 52 |
| Figura 16. Perfil de proteínas obtenidas con diferentes fuentes de carbono | 57 |
| Figura 17. Zimograma con diferentes fuentes de carbono | 57 |
| Figura 18. Determinación de actividad cualitativa en microplaca a enzima concentrada | 62 |
| Figura 19. Perfil de proteínas que muestra a la cutinasa de 28 KDa tras su concentración | 63 |

ÍNDICE DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Velocidad de agitación (200, 250 y 300 rpm) | 45 |
| Gráfico 2. Temperatura (25, 30 y 37 °C) | 46 |
| Gráfico 3. Concentración del inductor | 48 |
| Gráfico 4. F. de carbono (Glucosa, glicerol) | 50 |
| Gráfico 5. F. de carbono (Cutina, sacarosa, almidón y aceite de olivo) | 50 |
| Gráfico 5. F. de nitrógeno (NaNO ₃ , KNO ₃ , urea, NH ₄ NO ₃) | 54 |
| Gráfico 6. F. de nitrógeno ((NH ₄) ₂ SO ₄ , extracto de levadura, bactopectona) | 55 |
| Gráfico 8. Medio con glicerol, KNO ₃ , cutina | 59 |
| Gráfico 9. Enzima 28 KDa | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-------|
| Tabla 1. Enzimas y metabolitos producidos por <i>Aspergillus nidulans</i> | 12 |
| Tabla 2. Microorganismos productores de cutinasas | 18 |
| Tabla 3. Composición del medio mínimo para crecimiento de <i>A. nidulans</i> | 29 |
| Tabla 4. Composición de las sales 20x | 30 |
| Tabla 5. Composición elementos traza | 30 |
| Tabla 6. Requerimientos nutricionales de <i>A. nidulans</i> | 31 |
| Tabla 7. Composición final del medio mínimo para el crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> | 35 |
| Tabla 8. pH del extracto crudo | 53 |
| Tabla 9. Peso seco del micelio | 53 |
| Tabla 10. Composición del medio optimizado | 60 |
| Tabla 11. Reactivos y marcas | 71-72 |
| Tabla A1. 200rpm | 76 |
| Tabla A2. 250 rpm | 76 |
| Tabla A3. 300 rpm | 76 |
| Tabla A4. 25 °C | 77 |
| Tabla A5. 30 °C | 77 |
| Tabla A6. 37 °C | 77 |
| Tabla A7. Cutina 0.1% | 78 |
| Tabla A8. Cutina 0.2% | 78 |
| Tabla A9. Cutina 0.3% | 78 |
| Tabla A10. Cutina 0.4% | 79 |
| Tabla A11. Cutina 0.5% | 79 |

Índice

| | |
|---|----|
| Tabla A12. Cutina 0.2% | 79 |
| Tabla A13. Glucosa 0.1% | 80 |
| Tabla A14. Glucosa 1% | 80 |
| Tabla A15. Glicerol 0.1% | 80 |
| Tabla A16. Glicerol 1% | 80 |
| Tabla A17. Sacarosa 0.1% | 81 |
| Tabla A18. Almidón 0.1% | 81 |
| Tabla A19. Aceite de olivo 0.1% | 81 |
| Tabla A20. NaNO_3 | 82 |
| Tabla A21. KNO_3 | 82 |
| Tabla A22. NH_4NO_3 | 82 |
| Tabla A23. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 83 |
| Tabla A23. Urea | 83 |
| Tabla A25. Extracto de levadura | 83 |
| Tabla A26. Bacto peptona | 83 |
| Tabla A27. Medio mínimo (mejores condiciones) | 84 |
| Tabla A28. Medio optimizado | 84 |

I. INTRODUCCIÓN.

La cutinasa es una enzima que cataliza 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 potencialmente importantes para aplicaciones industriales (alimentos, oleoquímica, farmacéutica, detergentes y biodiesel).

Existen reportes de la producción de cutinasas por fuentes microbianas. Principalmente se han aislado de hongos, como *Fusarium solani*. En el grupo de trabajo se ha reportado la producción de dichas enzimas por *Aspergillus nidulans*, sin embargo, no hay mucha información sobre aspectos relacionados con su producción, regulación e identificación.

Se han obtenido e identificado mediante SDS-PAGE y secuenciación 2 cutinasas con pesos moleculares de 22 y 28 KDa, las cuales se inducen con cutina o aceite de olivo respectivamente. Ambas enzimas presentaron actividad de esterasa, ampliamente utilizada en biocatálisis. El objetivo del presente trabajo es evaluar las condiciones de cultivo que conducen a la mayor producción de cutinasas.

RESUMEN.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo y nutrientes sobre la regulación de la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*, utilizando como fuente de carbono e inductor cutina de manzana. Se evaluaron los parámetros de temperatura, velocidad de agitación y concentración de inductor, siendo los óptimos 37°C, 300 rpm y 0.2% de cutina, respectivamente. Una vez determinadas las condiciones de fermentación e inducción, se evaluó el efecto de nutrientes en medio mínimo variando las fuentes de nitrógeno y de carbono, con el objetivo de producir únicamente la cutinasa de 22 KDa. Se determinó que el glicerol al 0.1% actúa como mejor fuente de carbono adicional y la cutina actúa como inductor para la producción de dicha enzima. En cuanto a la fuente de nitrógeno, con nitrato de potasio se tuvo una mayor actividad de esterasa.

Se elaboró un medio específico para producir la cutinasa de 28 KDa con aceite de olivo como inductor. Se realizó electroforesis SDS-PAGE y se tiñó con azul de Coomassie para corroborar el peso molecular de la enzima. Se logró identificar a la proteína hipotética de *Aspergillus nidulans* AN.7541.2 mediante espectrometría de masas, obteniendo un peso molecular experimental de 26.5 KDa cercano al valor teórico, el cual es de 28 KDa.

II. MARCO TEÓRICO

Las cutinasas, objeto de estudio de este trabajo, son enzimas, de naturaleza proteica, por lo que inicialmente se describirán los conceptos más importantes a considerar en este trabajo. Es producida por un hongo filamentoso, *Aspergillus nidulans*, por lo que nos referiremos al mismo y a los factores que regulan la producción de enzimas fungales.

2.1 Proteínas.

Las proteínas cumplen una gran variedad de funciones en los organismos y, desde el punto de vista estructural, las proteínas se definen como cadenas polipeptídicas grandes, constituidas por aminoácidos, unidos entre sí por enlaces peptídicos. El estudio de la estructura de las proteínas incluye tanto la descripción de los aminoácidos como la del enlace peptídico, ya que ambos influyen en la estructura tridimensional y en la función específica de estas moléculas orgánicas. El tipo de aminoácido y la secuencia de los mismos en cada proteína son dos características contenidas en los genes de las células (Stryer, 2003).

2.1.2 Niveles estructurales de las proteínas.

Una de las características de las proteínas es que poseen estructuras tridimensionales bien definidas. Esta organización en el espacio, denominada conformación de la proteína, permite que cumpla una función biológica en el organismo y depende de la estructura primaria, conformada por la secuencia lineal de aminoácidos; la estructura secundaria se origina cuando los aminoácidos adquieren un orden regular y repetitivo en el espacio, que pueden ser la estructura hélice α , la hélice al azar y la lámina β plegada.

Las hélices a su vez se pliegan para formar una estructura compacta tridimensional denominada estructura terciaria, que se relaciona con la función biológica, porque le permite la interacción específica con otras moléculas. La estructura cuaternaria es la constituida por varias cadenas polipeptídicas unidas por fuerzas covalentes denominadas oligómeros (Stryer, 2003). Figura 1.

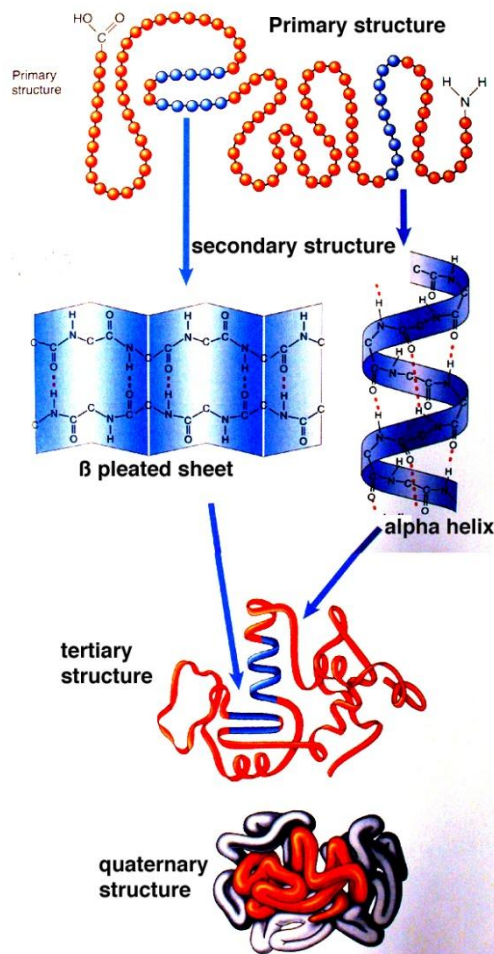


Figura 1. Niveles estructurales de las proteínas (Voet, 2004)

2.2 Enzimas

Las enzimas son proteínas que disminuyen la cantidad de energía que se requiere para llevar a cabo una reacción; esta actividad catalítica es específica. De acuerdo con la reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en transferasas, hidrolasas, isomerasas, (Hicks, 2001).

2.2.1 Características generales de las enzimas.

1. La mayoría de las enzimas están constituidas por más de 100 aminoácidos, los cuales confieren a la molécula una masa mayor de 10KDa y un diámetro de 25 Å.
2. Disminuyen la energía de activación, facilitando el inicio de una reacción, es decir, son catalizadores que pueden ser definidos, de acuerdo con Oswald, como agentes que afectan la velocidad de una reacción química, sin participar como reactantes y sin aparecer en los productos finales de la reacción.
3. Se requieren en cantidades mínimas.
4. Alta especificidad. Una enzima generalmente cataliza una sola reacción, aunque en casos raros es capaz de actuar sobre varias reacciones íntimamente relacionadas. El grado de especificidad por el sustrato es, por lo general, muy alto y en algunas ocasiones es virtualmente absoluto.
5. Pueden ser regulables (alostéricas).
6. Son sensibles de ser inhibidas al disminuir o abolir su actividad por medio de diversas sustancias.
7. Modifican la estructura química del sustrato, según el tipo de reacción que catalicen.
8. Las enzimas no alteran el equilibrio de las reacciones.

9. Pueden ser capaces de intercambiar diferentes formas de energía (Hicks, 2001)

2.2.2 Sitio Activo.

El sustrato se une a una región específica de la enzima denominada sitio activo figura 2.

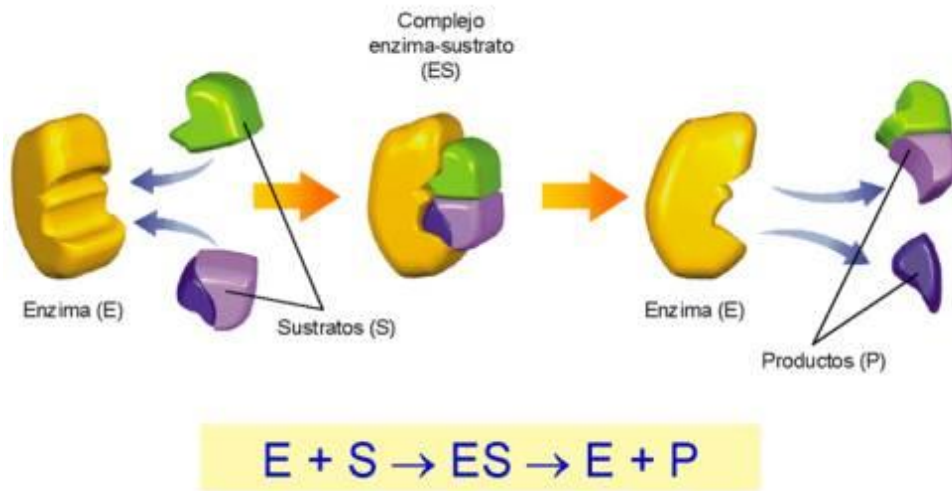


Figura 2. Formación del complejo enzima-sustrato (Voet, 2004).

2.3 Actividad Enzimática.

La actividad catalítica de una enzima relaciona la cantidad de sustrato que reacciona o de producto formado por minuto (o por segundo normalmente expresado en micromoles) con la cantidad total de proteína en la solución o en el líquido orgánico. Esto se denomina actividad específica, que es máxima cuando toda la proteína de la muestra es enzima. Como no es fácil medir la cantidad de enzima, a

menudo se expresa en términos de actividad específica del tejido o del líquido (Díaz, 1995; Hicks, 2001).

2.3.1 Factores que afectan la actividad enzimática.

Debido a que la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas dependen de la temperatura (T), de la concentración de sustrato [S] de la enzima, del pH y de otros factores, como los inhibidores y la condición de las muestras, es indispensable seguir exactamente todos los detalles del procedimiento para cuantificar la actividad enzimática (Díaz, 1995; Hicks, 2001)

2.3.2 Unidades de actividad enzimática.

En 1961, la Enzyme Commission (EC) propuso la unidad internacional de actividad enzimática (U), que se define como la cantidad de enzima que transforma $1\mu\text{mol}$ ($1\mu\text{mol} = 10^{-6}$) de sustrato por minuto en condiciones estándares de pH, temperatura y concentración de sustrato; en los casos en que una molécula de sustrato se transforma en varios productos esta unidad está en función de las moléculas de producto formadas (Díaz, 1995; Hicks, 2001).

2.4 Regulación de enzimas.

La regulación apropiada asegura que en un tiempo dado se formen únicamente las enzimas necesarias, en concentraciones adecuadas y que, una vez producidas, se modulen también sus actividades.

2.4.1 Mecanismos regulatorios que controlan la concentración de enzimas.

Inducción: La inducción puede definirse como el aumento específico en la concentración de una enzima como respuesta a la presencia de una sustancia química determinada (inductor). Generalmente el inductor es un sustrato del sistema enzimático, aunque en algunos casos puede ser el producto de la reacción, pero con frecuencia, existen análogos químicos relacionados con el inductor que estimulan también la formación (Sanchez y Farrés, 1987)

Represión catabólica: Este término fue acuñado en 1961 por Magasanik para describir el comportamiento de una célula incubada en presencia de más de una fuente de carbono. Las enzimas que toman parte en la utilización de los carbohidratos se podrían formar simultáneamente; sin embargo, solamente se produce un sistema de enzimas y una vez que una de las fuentes de carbono se ha consumido, se forma el sistema que permite la utilización de la siguiente. Las ventajas metabólicas de este efecto son prevenir el derroche de sustratos para la síntesis simultánea de varios sistemas enzimáticos, lo cual permite el aprovechamiento gradual de las fuentes de carbono existentes con base en la facilidad de su utilización.

La represión catabólica por carbono es un mecanismo bien conocido en muchos hongos y da lugar a la utilización de glucosa. El mecanismo de represión de glucosa ha sido estudiado en especies de *Aspergillus*, *Trichoderma* y en *Saccharomyces cerevisiae* (Sanchez y Demain, 2002).

2.5 Hongos.

Los hongos son células eucarióticas, carecen de clorofila y tienen una pared celular rígida; pueden ser unicelulares o multicelulares y microscópicos o macroscópicos. Se reproducen asexual o sexualmente. Al carecer de clorofila, deben nutrirse a expensas de materia orgánica. Se utilizan en la industria de fermentaciones para producir ácidos, alcoholes y otros muchos compuestos, y son origen de algunos antibióticos (Demain y Davies, 1999).

2.5.1 Cultivo de hongos.

Crece en condiciones aerobias sobre los medios bacteriológicos comunes a temperaturas de 20 a 30°C. Los mohos suelen crecer más lentamente que las bacterias y, por ese motivo, en los medios contaminados por bacterias, el crecimiento más rápido de éstas puede llegar a sofocar el de los mohos (Tortora, 2001).

2.5.2 Medios de cultivo.

Existen tres tipos generales de medios para el cultivo de hongos.

1. Medios naturales, como trozos o infusiones de frutas, hortalizas, granos de cereales, o tejidos animales. Estos medios varían mucho en su composición y debido a esto, no pueden reproducirse con exactitud.
2. Medios de cultivo preparados con peptonas, extractos vegetales, agar y otros compuestos de composición desconocida o variable.

3. Medios sintéticos o químicamente definidos (Tortora, 2001).

Casi todos los medios para cultivo y aislamiento de los hongos pueden utilizarse en formas líquidas o gelificadas por adición de agar.

2.5.3 Fisiología y nutrición de los hongos.

Los mohos están adaptados fisiológicamente a vivir en condiciones más severas que la mayor parte de los microorganismos. Pueden crecer, por ejemplo, sobre sustratos que contienen concentraciones de azúcares que las bacterias no toleran.

Soportan concentraciones de ácido relativamente altas. Pueden resistir desviaciones del pH de 2 a 9, aunque el pH óptimo para la mayoría de las especies se encuentra alrededor de 5.6.

Aunque necesitan humedad para su crecimiento y pueden obtener agua tanto de la atmosfera como del medio, los mohos sobreviven en ambientes deshidratados que serían inhibitorios para la mayor parte de las bacterias.

Casi todos los mohos son aerobios estrictos, y su crecimiento se estimula con una provisión abundante de oxígeno. Crecen sobre una amplia escala de temperaturas, aunque la óptima se encuentra entre los 22 y 30 °C (Tortora, 2001).

La glucosa es una fuente de carbono aprovechable prácticamente por todos los mohos. Muchas especies utilizan también otros azúcares, especialmente sacarosa y maltosa, así como compuestos orgánicos de carbono más complejos, como el almidón y la celulosa (Madigan, 2000).

El consumo de las fuentes de carbono por los hongos es importante ya que tienen la capacidad de utilizar una fuente de carbono en particular, la cual puede pasar a través de la membrana de la célula intacta o por hidrólisis externa, seguida por la entrada celular de todos o algunos de los productos de hidrólisis simple para llevar a cabo el metabolismo de carbohidratos (Madigan, 2000).

Los polioles son carbohidratos solubles en los hongos y sus funciones principales son como reserva de compuestos y moléculas osmorregulatorias.

Los hongos que crecen en una concentración elevada de azúcar o de sal, pueden sintetizar polioles como el glicerol, arabitol, eritritol y manitol y tales compuestos son la base de osmotolerancia, funcionando como solutos compatibles. Los solutos compatibles se definen en general como de bajo peso molecular, los compuestos neutros pueden acumularse a altas concentraciones intracelulares, sin causar la inhibición de las enzimas. El glicerol parece ser el efector osmótico más compatible en los hongos (Tortora, 2001).

Como fuente de nitrógeno, algunas especies pueden aprovechar el nitrógeno inorgánico, en forma de sales amónicas o nitratos, algunas requieren, y todas pueden utilizar sustratos nitrogenados orgánicos. En los medios de cultivo, el nitrógeno orgánico se proporciona muy a menudo como peptona.

Los hongos pueden usar un rango de compuestos nitrogenados. Con algunos sustratos se presenta un crecimiento mucho mejor que cuando se presentan solos, cuando se produce una mezcla compleja de compuestos nitrogenados, algunos compuestos son absorbidos antes que otros.

Necesitan para el crecimiento trazas de algunos elementos como hierro, zinc, cobre, magnesio y molibdeno (Tortora, 2001).

2.6 Género *Aspergillus*.

Los Aspergilos son hongos saprófitos capaces de utilizar una variedad enorme de sustancias como alimentos, gracias al gran número de enzimas que producen. Es difícil encontrar un material que contenga un poco de materia orgánica y un poco de humedad, sobre el que no puedan crecer los aspergilos. *Aspergillus niger* y otras especies se encuentran a menudo en alimentos no protegidos y provocan su descomposición. Al hacerlo, algunas especies producen sustancias tóxicas denominadas micotoxinas, la más importante de las cuales es la aflatoxina.

Aspergillus fumigatus, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, y otras especies son patógenos de los animales y de los seres humanos, a los que causan un grupo de enfermedades denominadas colectivamente aspergilosis (Meyer, 2011). Se ha demostrado que 8 especies son las causantes de este complejo de enfermedades, de las cuales *Aspergillus fumigatus* es responsable de casi todas las infecciones. Otras especies relacionadas con varios tipos de aspergilosis son *Aspergillus terreus*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* (Pelzcar, 1970).

Debido a sus numerosas actividades metabólicas y enzimáticas, los aspergilos se emplean en varios procesos industriales. Los ácidos cítrico y glucónico son fabricados comercialmente mediante el uso de *Aspergillus niger*. El ácido cítrico, base de la enorme industria de las bebidas no alcohólicas, solía manufacturarse a partir de jugo de limón hasta que se descubrió que *Aspergillus niger* lo producía a un costo

inferior, a partir de una solución de sacarosa. Otros muchos ácidos y otros varios productos químicos son producidos en cantidades grandes o pequeñas por representantes de este género. Existen preparados enzimáticos que se obtienen comercialmente con ayuda de estos hongos, y se han aislado varios antibióticos a partir de cultivos de *Aspergillus*, aunque ninguno ha podido igualar a la penicilina o a los productos de los actinomicetes por sus propiedades terapéuticas. (Meyer, 2011; Andersen 2011).

Tabla 1. Enzimas y metabolitos producidos por el género *Aspergillus*.

| Especie | Enzimas | Referencia |
|---------------------|--|--|
| <i>A. niger</i> | α -amilasas, lipasas, pectinasas, xilanasas, celulasas, catalasa, hemicelulasas, naringinasa, glicosidasas, tanasa, proteasas, peptidasas, glucosa oxidasa, fitasa, qumosina, ácido cítrico | Andersen <i>et al.</i> , 2011; Meyer, 2007 ; MacCabe <i>et al.</i> , 2002 ; Shanmugaprakash <i>et al.</i> , 2011; Aguilar, 2001. |
| <i>A. oryzae</i> | α -amilasa, xilanasas, lipasas, celulasa, pectinasa, β -glucosidasa, glucoamilasa, proteasas, fitasa, ácido kójico, ácido cítrico. | Biesebeke y Record 2008; Meyer, 2007; MacCabe <i>et al.</i> , 2002; Wortman, 2009. |
| <i>A. terreus</i> | Lipasa, ácido itacónico, celulasa, lovastatina | Singh, 2011. |
| <i>A. carneu</i> | Lipasa, amiloglucosidasa | Singh, 2011. |
| <i>A. awamori</i> | Lipasa | Singh, 2011. |
| <i>A. nidulans</i> | Cutinasa | García-Lepe <i>et al.</i> , 1997. |
| <i>A. flavus</i> | α -amilasa, Lipasa, aflatoxina | Berry, 1988; Corzo, 1999. |
| <i>A. fumigatus</i> | Proteinasa, celulasa, α -amilasa | Larcher, 1992. |

2.6.1 *Aspergillus nidulans*.

Es un hongo filamentoso compuesto de cadenas de células llamadas hifas, figura 3; especie que sirve de modelo de estudio en genética y biología celular, ya que está relacionado cercanamente a un amplio número de especies de *Aspergillus* de importancia industrial y médica como son: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus fumigatus*.

El estilo de vida saprofítico le permite ser capaz de utilizar un amplio rango de sustratos como fuente de nutrición. Además es un genero filogenéticamente relacionado con *Penicillium* y *Cephalosporium* que agrupan especies productoras de metabolitos secundarios y proteínas de gran valor comercial (Powell, Renwick y Peberdy, 1994).

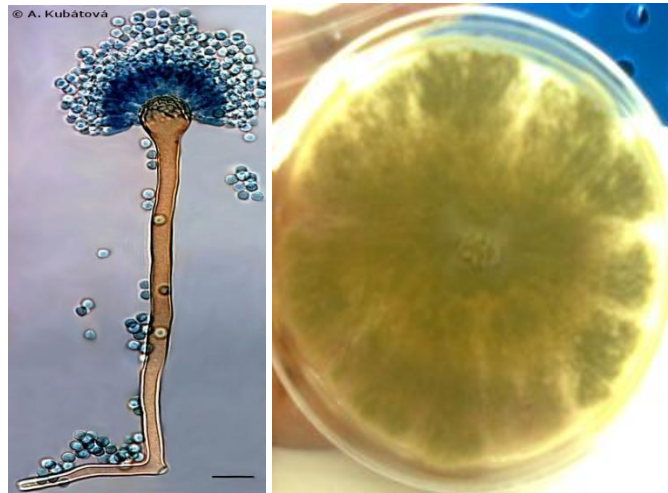


Figura 3. *Aspergillus nidulans*. Referencia:
<http://www.sci.muni.cz/mikrob/MiniAtlas/eme.htm>

III. ANTECEDENTES

3.1 Cutina.

La cutina es el constituyente principal de la cutícula, una estructura multicapa que cubre las paredes celulares externas, de la epidermis en las partes aéreas de todas las plantas herbáceas (Figura 4). La cutícula está compuesta por una parte superior de cera, una capa media gruesa que contiene cutina embebida en la cera y una capa inferior formada de cutina y cera, mezclada con pectinas, celulosa y otros carbohidratos de la pared celular (Taiz, 2006). La cutina consta de muchos ácidos grasos de cadena larga unidos entre sí por enlaces tipo éster, formando una red tridimensional rígida (Degani, 2006). La cutina está formada por ácidos grasos 16:0 y 18:1 con grupos hidroxilo o epóxido situados bien en la parte media de la cadena, o bien en el extremo opuesto del grupo carboxilo (Carvalho, 1998).

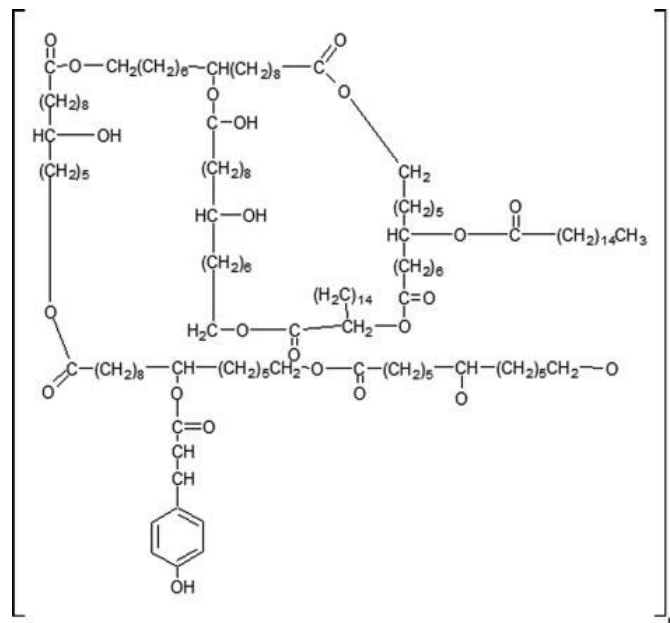


Figura 4. Estructura de la cutina (Chen, 2008)

3.2 Cutinasas

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son hidrolasas que degradan la cutina, el polímero cuticular de las plantas, el cual es un poliéster compuesto de hidróxidos y epóxidos de ácidos grasos de cadena larga (Purdy y Kolattukudy, 1975).

3.3 Características de las cutinasas.

La cutinasa es una enzima lipolítica extracelular de masa molecular pequeña. La más estudiada es la secretada por el hongo *Fusarium solani pisi*, la cual hidroliza triacilgliceroles tan eficientemente como las lipasas (Egmond, 2000).

Las cutinasas pertenecen a la familia de proteínas que presentan un plegamiento conocido como α/β hidrolasa, las cuales son los miembros más pequeños de la familia de serin hidrolasas. Sólo 5 láminas β (numeradas del 3 hasta el 7) y 4 hélices (marcadas como A, B, C y F) constituyen la proteína conteniendo la triada catalítica la cual está conformada por tres residuos: Ser, Hist y Asp, como se puede ver en la figura 5 (Egmond, 2000; Nardini, 1999).

Las cutinasas tienen la capacidad de hidrolizar sustratos monoméricos y muestran propiedades catalíticas comunes a carboxilesterasas y lipasas.

Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) son enzimas que hidrolizan ésteres en la interface entre el lípido y el agua, en un sistema heterogéneo (Corzo, 1999). Las lipasas contienen una tapa, la cual cubre el sitio activo de la enzima, desplazándose al contacto con la interfase (Jaeger, 1999).

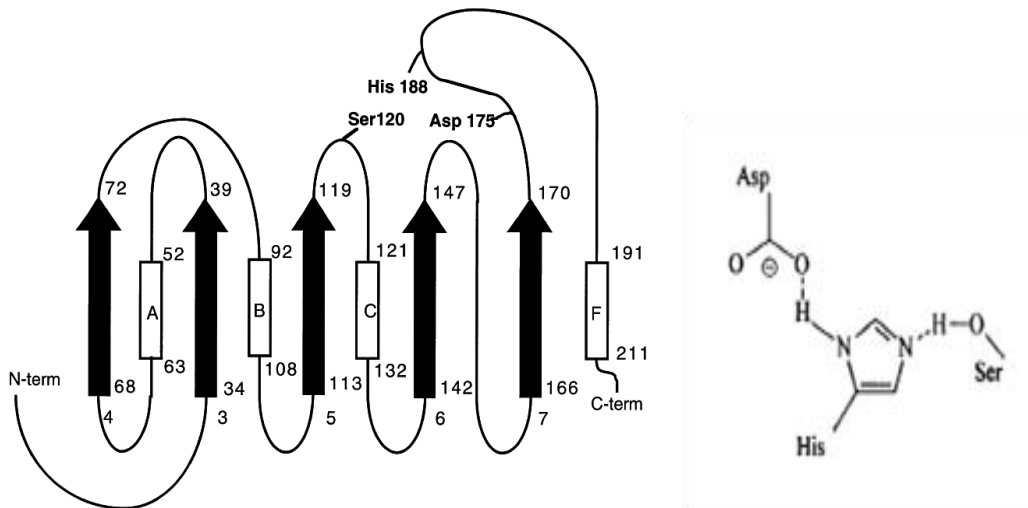


Figura 5. Plegamiento $\alpha\beta$ hidrolasa y triada catalítica. (Egmond Maarten, 2000).

Las lipasas y carboxilesterasas catalizan la hidrólisis de enlaces ester carboxílicos. Por muchos años la distinción entre lipasas y esterases ha sido basada en su especificidad por el sustrato y en su capacidad de hidrolizar ésteres en solución y emulsiones, respectivamente (Chahinian, 2002).

Las lipasas hidrolizan cadenas largas de triacilgliceroles tal como trioctanoína y trioleína, mientras que las carboxilesterasas son enzimas que actúan en soluciones de ácidos grasos de cadena corta tal como metilbutirato, etilbutirato y triacetina, los cuales no son hidrolizados eficientemente por las lipasas (Chahinian, 2002).

Las cutinasas hidrolizan eficientemente ácidos grasos de cadena corta como de cadena larga (Pocalyko, 1998). Por lo que además de la cutina también pueden hidrolizar ésteres solubles y triacilglicéridos, principales

sustratos de carboxilesterasas y lipasas respectivamente (Dutta, 2009; Creveld, 2001).

3.4 Aplicaciones de cutinasas.

La cutinasa es una enzima versátil la cual muestra varias propiedades interesantes para la aplicación de procesos industriales (Calado, 2002). Un preparado enzimático que contiene cutinasa ha sido desarrollado para aumentar el efecto farmacológico de los productos químicos agrícolas y también ha sido aplicado como enzima lipolítica para la eliminación de grasa en la ropa y en los detergentes para lavavajillas. La degradación de plásticos tal como la policrapolactona sintéticas de poliéster se ha logrado con cutinasa (Carvalho, 1999). Otros usos potenciales incluyen la hidrólisis de la grasa de la leche en la industria láctea, aplicaciones en la industria oleoquímica, en síntesis de triglicéridos estructurales, polimeros y surfactantes para productos de cuidado personal (Fontes, 2008). Otra aplicación interesante de las cutinasas es en la degradación de plásticos, producción de biodiesel, degradación insecticidas (Fontes, 2007; Dutta, 2009).

3.5 Microorganismos productores de cutinasas.

Existen reportes en la literatura acerca de la producción de cutinasas a partir de fuentes microbianas y de plantas. El principal problema de obtener cutinasas a partir de plantas es que el mantenimiento, el cultivo y el aislamiento de la enzima a gran escala es mucho más complicado que con los microorganismos. Los microorganismos productores de cutinasas incluyen hongos, bacterias y actinobacterias (Dutta, 2009).

Algunos de los microorganismos productores de cutinasas que han sido estudiados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Microorganismos productores de cutinasas.

| Fuente | Género | Especie | |
|---------------|--------------------------|---|--------------|
| Bacteria | <i>Streptomyces</i> | <i>Scabies</i> <i>acidiscabies</i> <i>badius</i> | |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> <i>mendocina</i> <i>aeruginosa</i> | |
| | <i>Thermomonospora</i> | <i>fusca</i> | |
| | <i>Thermoactinomyces</i> | <i>vulgaris</i> | |
| | <i>Botrytis</i> | <i>cineria</i> | |
| Hongos | <i>Fusarium</i> | <i>solani pisi</i> <i>oxysporium</i> <i>roseum culmorum</i> <i>roseum sambucinum</i> | |
| | <i>Colletotrichum</i> | <i>kahawae</i> <i>gloeosporioides</i> <i>capsici</i> | |
| | <i>Monilinia</i> | <i>fructicola</i> | |
| | <i>Venturia</i> | <i>inaequalis</i> | |
| | <i>Alternaria</i> | <i>brassicicola</i> | |
| | <i>Helminthosporium</i> | <i>sativum</i> | |
| | <i>Phytophthora</i> | <i>cactorum</i> | |
| | <i>Ulocladium</i> | <i>consortiale</i> | |
| | Plantas | <i>Tropaeolum</i> | <i>Majus</i> |

Dutta, 2009

La invasión de plantas por hongos fitopatógenos es posible gracias a la secreción de cutinasas extracelulares.

En 2005, Macedo y Pio aislaron 400 cepas de hongos provenientes del suelo y de plantas recolectadas en diferentes regiones de Brasil, y concluyeron que entre las cepas de hongos seleccionados el mejor productor de cutinasa fue identificado como *Fusarium oxysporum* (Fontes, 2008).

La producción de cutinasas es afectada por el tipo y concentración de fuentes de nitrógeno y carbono, temperatura, pH del medio y concentraciones de oxígeno disuelto. La cutina fue utilizada como una fuente de carbono o un inductor para el logro de altos niveles de rendimiento de cutinasa (Dutta, 2009).

3.6 Regulación de cutinasas.

Estas enzimas por lo general son inducidas por cutina o hidrolizado de ésta como fuente de carbono, e inhibidas por glucosa (Badenes, 2010). También se ve afectada la cantidad producida de cutinasas por la fuente y la concentración de cutina empleada (Kavlock, 2002).

En *Fusarium solani* se han evaluado las condiciones de cultivo variando temperatura y pH, aunque existen pocos reportes en la literatura. Así mismo, se han explorado varias fuentes de carbono como glúcidos, ácidos grasos, aceites, así como fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas como fuentes alternativas a la cutina como inductores de la producción de cutinasas (Kim, 2002). También se han empleado subproductos agrícolas, como cáscara de manzana y tomate, para la producción de cutinasas (Castro, comunicación personal).

3.7 Cutinasas en *Aspergillus nidulans*.

La producción de cutinasas en *A. nidulans* ha sido reportada por Garcia-Lepe (1997). Sin embargo, estos estudios no muestran aspectos sobre la regulación, purificación, caracterización o identificación de las enzimas producidas por este hongo.

En estudios realizados en el grupo de trabajo (Peña, 2002) observó la producción de actividad cutinolítica en la cepa PW1 de *Aspergillus nidulans*. Posteriormente se hizo una búsqueda de genes de cutinasas en el genoma de *A. nidulans* encontrando 4 genes que codifican para "cutinasas hipotéticas", estos son: AN5309.2, AN7541.2, AN7180.2 y AN2833.2.

A partir de un medio optimizado por Peña (2002), para la producción de carboxil ester hidrolasas, empleando aceite de olivo como inductor, (figura 6), se purificó e identificó por secuenciación de péptidos internos una proteína de aproximadamente 28 kDa que corresponde a la cutinasa producto del gen AN7541.2 (Castro, comunicación personal). La producción de esta enzima bajo diferentes fuentes de carbono y nitrógeno ha sido estudiada (Castro, *et al.* sometido).

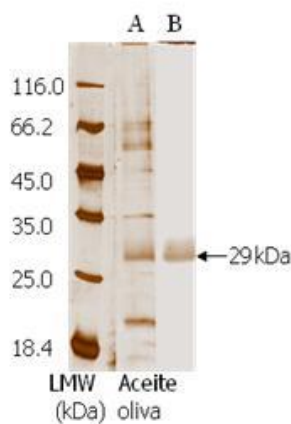


Figura 6. Cutinasa de 29KDa inducida con aceite de oliva A. Perfil electroforético de proteínas teñido con plata, B zimograma teñido con α -naftil acetato.

Así mismo se ha inmovilizado en soportes hidrofóbicos (Accurel P-1000) la esterasa proveniente del extracto crudo de *Aspergillus nidulus* PW1 (Figura 7) y se ha analizado su actividad en reacciones de hidrólisis y síntesis en biocatálisis en medios acuosos y solventes orgánicos (Vergara, 2010).

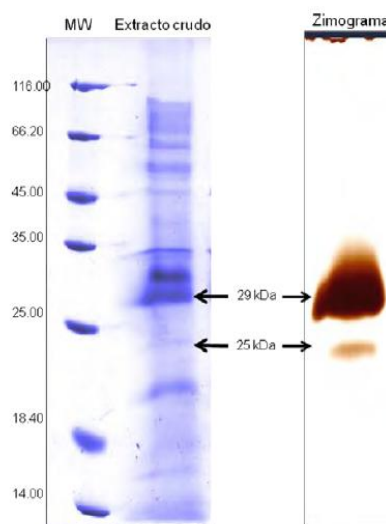


Figura 7. Tinción con Coomassie y zimograma de la enzima de 29 KDa con actividad de esterasa.

En estudios subsecuentes del grupo de trabajo, se observó que al emplear cutina como única fuente de carbono en medio mínimo en cultivos de *A. nidulans*, se produce una enzima que presenta actividad de esterasa (Figura 8). Al evaluar diferentes inductores de cutinasas como fueron cutina de manzana, cutícula (manzana, tomate, papa y manzana+glucosa 1%) (Figura 9) Se obtuvo que el mejor inductor de la enzima es la cutina. Se realizaron geles para determinar el peso de la proteína y su actividad teñidos con plata y zimograma respectivamente (Figura 10), y se determinó un peso molecular de 21 KDa. Al secuenciar la proteína y comparar con las secuencias reportadas en las bases de datos se encontró que corresponde a la cutinasa producto del gen AN5309.2 de *A. nidulans* (Castro, comunicación personal).

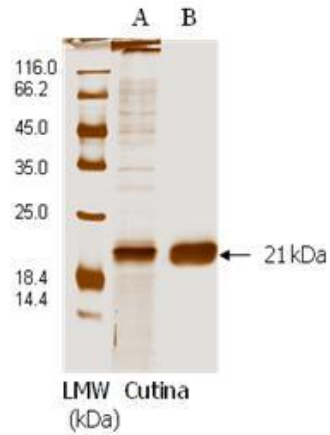


Figura 8. Enzima de 21KDa empleando cutina como sustrato. Perfil de proteínas. A. Tinción con plata, B. Zimograma

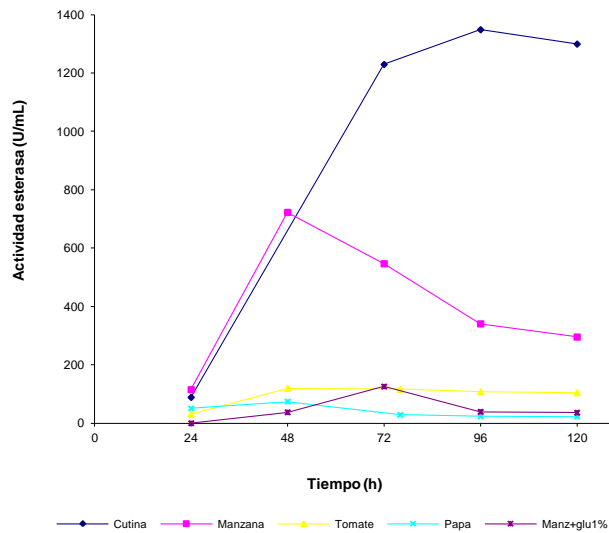


Figura 9. Inductores: cutina de manzana, cutícula (manzana, tomate, papa y manzana+glucosa 1%) Castro, comunicación personal.

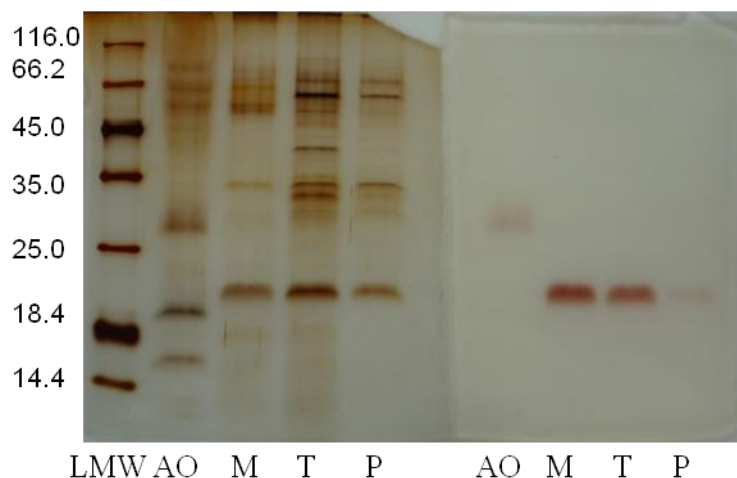


Figura 10. Perfil proteínico tinción con plata y zimograma (cutinasa de 21 KDa y 28 KDa). LMW (Marcador de bajo peso molecular), AO (Aceite de olivo), Cutina M (Manzana), T (Tomate), P (Papa). Castro, comunicación personal.

3.8 Efecto de nutrientes.

Se reportó por Dutta (2009), que la glucosa es un represor para la producción de cutinasas. Experimentos con derivados de ω -hidroxiácidos C_{16} indicaron que el grupo hidroxilo libre en la posición ω fue el factor más importante para la inducción de la actividad de cutinasa. Los alcoholes primarios n-alifáticos con 14 o más átomos de carbono han demostrado la inducción de la cutinasa, entre los cuales, el n- C_{16} se encontró que era el inductor más eficaz.

IV. JUSTIFICACIÓN

La cutinasa ha sido considerada como una enzima versátil, con numerosas propiedades interesantes para aplicaciones en productos y procesos industriales. Las reacciones de hidrólisis y de síntesis catalizadas por cutinasas tienen un uso potencial en la industria láctea para la hidrólisis de la grasa de la leche y detergentes, en la industria oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurados, polímeros y surfactantes y la síntesis de productos farmacéuticos y agroquímicos que contienen uno o más centros quirales. Algunos de estos procesos ya se aplican en la industria, mientras que otros están aún a nivel de investigación. La importancia que tiene la cutinasa para múltiples procesos industriales y el desconocimiento de su regulación permite plantear la realización de este proyecto y así investigar a fondo los parámetros que inciden sobre la producción de dichas enzimas, ya que no hay muchos reportes sobre el tema.

V. HIPÓTESIS

Si la cutina es el sustrato natural de las cutinasas, funcionará como inductor de las mismas y se verá favorecida la producción de la enzima de 22 KDa producida por *Aspergillus nidulans*.

VI. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general.

Estudiar el efecto de las condiciones de cultivo y nutrientes sobre la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*.

6.2 Objetivos particulares.

- Evaluar las condiciones de cultivo (velocidad de agitación y temperatura) sobre la producción de cutinasas en *A. nidulans*.
- Estudiar el efecto de la concentración de cutina (0.1-0.5%) sobre la producción de cutinasa
- Analizar el efecto de la adición de diferentes fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, almidón y glicerol) sobre la producción de cutinasas en *A. nidulans*.
- Analizar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno (nitrato de amonio, sulfato de amonio, urea, extracto de levadura y bacto peptona) sobre la producción de cutinasas en *A. nidulans*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

La estrategia experimental general que se desarrolló en ésta investigación se presenta en la figura 11.

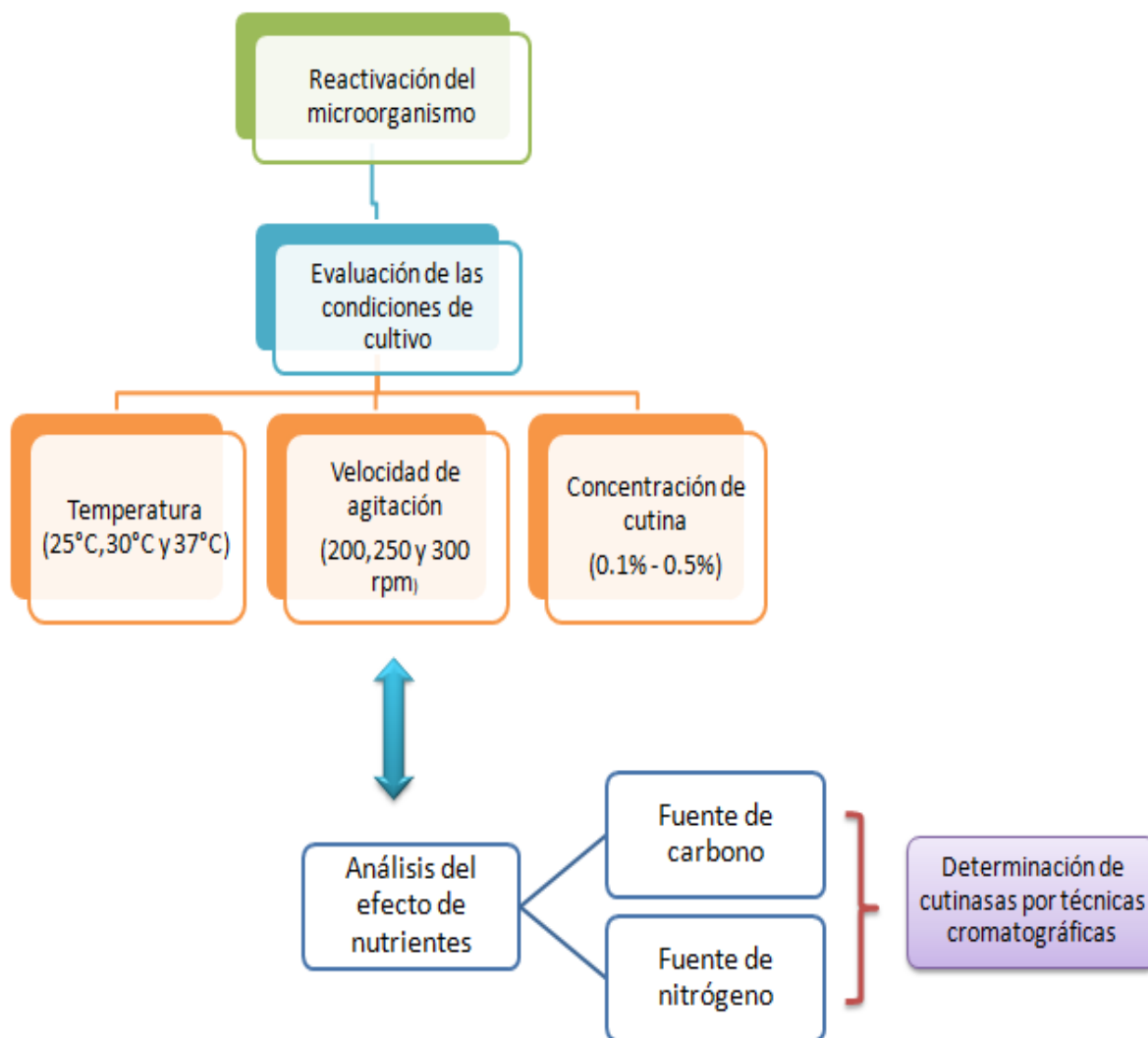


Figura 11. Diagrama experimental general

7.1 Medio mínimo y activación de la cepa.

Medio mínimo.

Se elaboró de acuerdo a la composición descrita por Käfer (1977). Las proporciones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Composición del medio mínimo para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* PW1 (Käfer, 1977)

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

*Composición en tabla 3

**Composición en tabla 4

Se ajustó el pH a 6.5 con una solución de NaOH 50% y se esterilizó a 121°C por 15 minutos. En la tabla 4 y 5 se muestra la composición de las soluciones de sales 20x y elementos traza 100x.

Tabla 4. Composición de las sales 20x (Käfer, 1977)

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

Tabla 5. Composición elementos traza 100x (Käfer, 1977)

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

Se adicionaron en el orden descrito cada una de las soluciones a un volumen de 80mL de agua destilada, disolviendo cada una perfectamente antes de agregar la siguiente. Se calentó la solución a ebullición y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se aforó a 100mL con agua destilada.

Para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* se le adicionaron al medio mínimo los requerimientos nutricionales de la cepa mostrados en la tabla 6.

Tabla 6. Requerimientos nutricionales de *A. nidulans* (Käfer, 1977)

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

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

7.2 Conservación de la cepa.

Se utilizó *Aspergillus nidulans* PW1, cepa auxótrofa a arginina. Las esporas de *A. nidulans* fueron cosechadas en placas de medio mínimo y resuspendidas en una solución de leche descremada al 5 % y se conservarán en sílica gel a 4°C (Vergara, 2010).

7.3 Reactivación del microorganismo.

El medio mínimo se vertió en cajas petri y el agar se dejó gelificar. Se sembraron de 2 a 3 granitos de sílica gel y se incubaron a 37°C durante 5 a 7 días.

7.4 Cosecha de esporas.

Sobre la caja petri de medio mínimo donde se sembraron los granos de sílica se adicionaron 10 mL de la solución de Tween 80 al 0.1%. Posteriormente se rasparon las esporas con una asa micológica y se recuperaron en un tubo desechable Falcon de 50 mL. Se centrifugaron las esporas durante 10 min a 8500 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R). El sobrenadante se desechó y se adicionaron 10 mL de agua destilada filtrada y esterilizada y se realizó otra centrifugación con las condiciones descritas anteriormente. Esta operación se repitió 2 veces y finalmente las esporas se resuspendieron en 5 mL de agua destilada. Se almacenaron a 4°C y se realizó un conteo de esporas en el microscopio con un hematocitómetro (Apéndice 11.1).

7.4.1 Conteo de esporas.

1. Se hizo una dilución de las esporas cosechadas 10 μ L de solución de esporas en 990 mL de agua destilada.
2. El conteo se realizó con la ayuda de una cámara de Neubauer. Para ello se colocó un cubreobjetos sobre la cámara, posteriormente en las ranuras de ésta se colocó aproximadamente una gota (10 μ L) de la dilución de esporas. Por capilaridad la solución llenó la cámara de Neubauer.
3. Se colocó la cámara de Neubauer en el microscopio y con el objetivo 10x se visualizó el cuadrículado de la cámara. Se pudieron ver las esporas muy pequeñas por lo que se cambió al objetivo 40x para realizar el conteo adecuadamente.
4. La cámara de Neubauer tiene varias cuadrículas (Apéndice 11.1) en el centro tiene un cuadrículado formado por 25 cuadros, cada uno de

estos cuadros tiene a su vez 16 cuadros chicos para llevar a cabo el conteo de esporas.

7.5 Obtención de cutina.

Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Walton y Kolattukudy (1972).

A 12 Kg de manzana Golden se le retiró la cáscara, la cutícula fue hervida en una solución acuosa de ácido oxálico y oxalato de amonio durante 20 min. La cutícula se lavó con agua destilada, se dejó secar en estufa a 50°C y se dejó toda la noche extrayendo en una mezcla cloroformo:metanol (1:1). Se filtró a vacío y se secó en estufa a 50°C durante 45 min. Se llevó a cabo una extracción con cloroformo en soxhlet. La cutícula se incubó en buffer de acetatos pH 4, pectinasa y celulasa a 28°C por 14 horas. Las hojuelas de cutina se recuperaron por filtración y se lavaron con agua destilada repetidas veces. Posteriormente se llevó a cabo nuevamente una extracción con cloroformo en Soxhlet por 6 horas y finalmente se secaron las hojuelas de cutina y se molieron (Figura 12.)

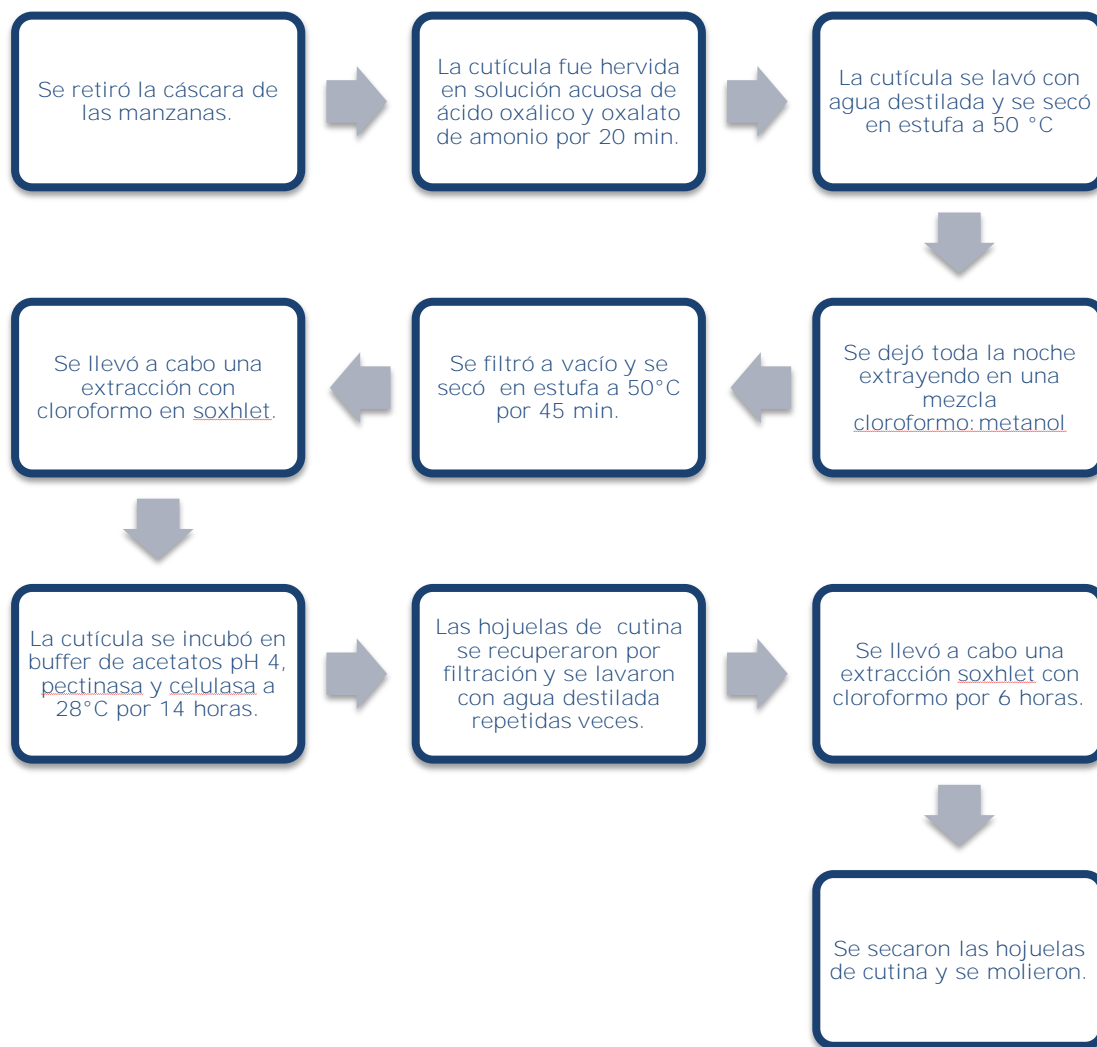


Figura 12. Obtención de cutina.

7.6 Producción de la enzima.

El medio mínimo se preparó de acuerdo al descrito por Käfer (1977) y se ajustó el pH a 6.5 utilizando cutina al 0.4% como fuente de carbono y sales 20x como fuente de nitrógeno. La composición final del medio se describe en la tabla 7.

Tabla 7. Composición final del medio mínimo para el crecimiento de *A. nidulans* (Käfer, 1977)

| Compuesto | Concentración/ L de medio |
|------------------|----------------------------------|
| Sales 20x | 50 mL |
| Elementos traza | 1 mL |
| Arginina | 5 mL |
| Biotina | 0.5 mL |
| Metionina | 0.011 g |
| Cutina | 4 g |

Las disoluciones de las sales 20x, los elementos trazas y los requerimientos nutricionales, se prepararon de acuerdo a lo descrito en las tablas 4, 5 y 6. Se adicionaron los compuestos en orden que se muestran en la tabla 7 y se esterilizó a 121°C durante 15 min.

Para la producción de la enzima se inocularon 1×10^6 esporas/mL de *Aspergillus nidulans* en 50 mL de medio mínimo empleando matraces Erlenmeyer de 250 mL. La fermentación se llevó a cabo por 144 horas a 37°C y 300 rpm de agitación orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific).

7.6.1 Fuente de Carbono.

Las diferentes fuentes fueron adicionadas al Medio Mínimo (Tabla 6) además de cutina (0.2%), fueron glucosa (0.1% y 1%), glicerol (0.1% y 1%), sacarosa (0.1%) almidón (0.1%) y aceite de olivo (0.1%). Cada una se esterilizó en forma independiente y se inoculó en matraces con

1x10⁶ esporas/mL de *Aspergillus nidulans*. La fermentación se siguió por 144 horas a 37°C y a 300 rpm en incubadora (New Brunswick Scientific Inova).

7.6.2 Fuente de nitrógeno.

Para llevar a cabo el análisis, se preparó Medio Mínimo (Tabla 7) sin agregar en la composición de las sales 20x nitrato de sodio para así poder evaluar cada uno de los compuestos nitrogenados y no se vieran afectados los resultados.

Se evaluaron como fuente de nitrógeno inorgánicas

- Nitrato de sodio (NaNO₃)
- Nitrato de potasio (KNO₃)
- Nitrato de amonio NH₄NO₃
- Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄
- Urea CO(NH₄)₂

Como fuente de nitrógeno orgánicas

- Extracto de levadura
- Bactopeptona

Cada uno de los compuestos se ajustó al 0.06% (300mg), se pesaron y se adicionaron al Medio Mínimo antes descrito; como fuente de carbono se utilizó cutina 0.2%, se esterilizó y se inocularon 1x10⁶ esporas/mL de *Aspergillus nidulans*.

7.7 Métodos de actividad enzimática y proteína.

La cuantificación de la concentración de proteína y de actividad enzimática se llevó a cabo en muestras de sobrenadante colectadas durante la fermentación a intervalos de 24 horas.

a) Cuantificación de proteína.

Se cuantificó la concentración de proteína soluble por el método de Bradford (1976) empleando como reactivo azul de comassie concentrado. El color generado se cuantificó espectrofotométricamente (Biomate 3) a una absorbancia de 595nm.

Se realizó una curva de calibración con un estándar de seroalbúmina bovina (BSA) utilizando concentraciones dentro de un intervalo de 2 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Apéndice 11.3).

b) Cuantificación de la actividad enzimática.

La actividad de esterasa se cuantificó por el método espectrofotométrico descrito por Nawani *et al.* (2006) utilizando como sustrato *p*-nitrofenil laurato (*p*-NPL). Se adicionaron 0.8mL de buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5, 0.1 mL de enzima y 0.1 mL 0.01 M de *p*-NPL en etanol. La reacción se llevó a cabo durante 5 min a temperatura ambiente. Después se agregaron 250 μL de la solución de Na_2CO_3 0.1 M para detener la reacción por precipitación del sustrato que no reaccionó. La mezcla se

centrifugó a 14000 rpm (Centrifuga Biofuge Primo R) a 4 °C durante 15 min y se midió la absorbancia a 420nm (Biomate 3).

Curva patrón *p*-nitrofenil laurato (Apéndice 11.2).

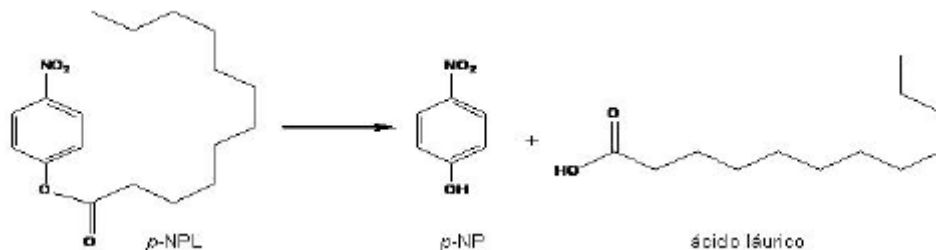


Figura 13. Reacción de hidrólisis de *p*-Nitrofenil Laurato

7.8 Evaluación de perfil de proteína y zimogramas.

Se realizaron geles de electroforesis con el fin de evaluar el perfil proteínico y la actividad enzimática del extracto crudo.

La electroforesis se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes, utilizando como detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), se emplearon también agentes reductores como es el β -mercaptoetanol, la forma en la que se lleva a cabo la Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida se describe en el Apéndice 11.4. El gel separador se hizo al 14% y el gel concentrador al 4%. Se utilizó marcador de bajo peso molecular que va de un rango de 14.4 KDa a 116 KDa (Fermentas). Se corrieron a 80 Volts las muestras hasta que el frente llegara al gel separador y una vez ahí se cambió el voltaje a 120 V en una cámara de electroforesis (Miniprotean II, Bio-Rad)

a) Tinción con plata.

El gel se tiñó con plata siguiendo el protocolo de Page Silver™ Staining Kit (Fermentas).

b) Zimogramas.

Se realizaron geles de poliacrilamida con las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Después de llevar a cabo la electroforesis el gel se incubó en una solución de buffer de fosfatos 0.5M pH 7.5 durante 30 min, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos 0.5M pH 7.5 con Tritón X-100 al 5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima.

El gel se dejó en solución de α -Naftil acetato (Solución A) durante 15 min en agitación, a temperatura ambiente y finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red TR (Solución B) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

Preparación:

- Solución A. Se pesaron 20 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 50 mL con buffer de fosfatos 0.05M a pH 7.5
- Solución B. Se pesaron 50 mg de Fast Red TR, se disolvió en Tritón X-100 al 0.1 % (50 μ L) y se llevaron a un volumen de 50 mL con buffer de fosfatos 0.05M a pH 7.5

7.9 Medición cualitativa de actividad (cromatoplaça).

- Solución A. Se pesaron 0.002g de α -Naftil acetato, se disolvieron en 0.5 mL de acetona y se llevaron a 1 mL con buffer de fosfatos 0.05M a pH 7.5
- Solución B. Se pesaron 0.005g de Fast Red TR, se disolvieron en 25 μ L de Tritón X-100 al 0.1% y se llevaron a un volumen de 1 mL con buffer de fosfatos 0.05M a pH 7.5

Para la identificación de la enzima de 28 KDa se siguió el proceso mostrado en la figura 14.

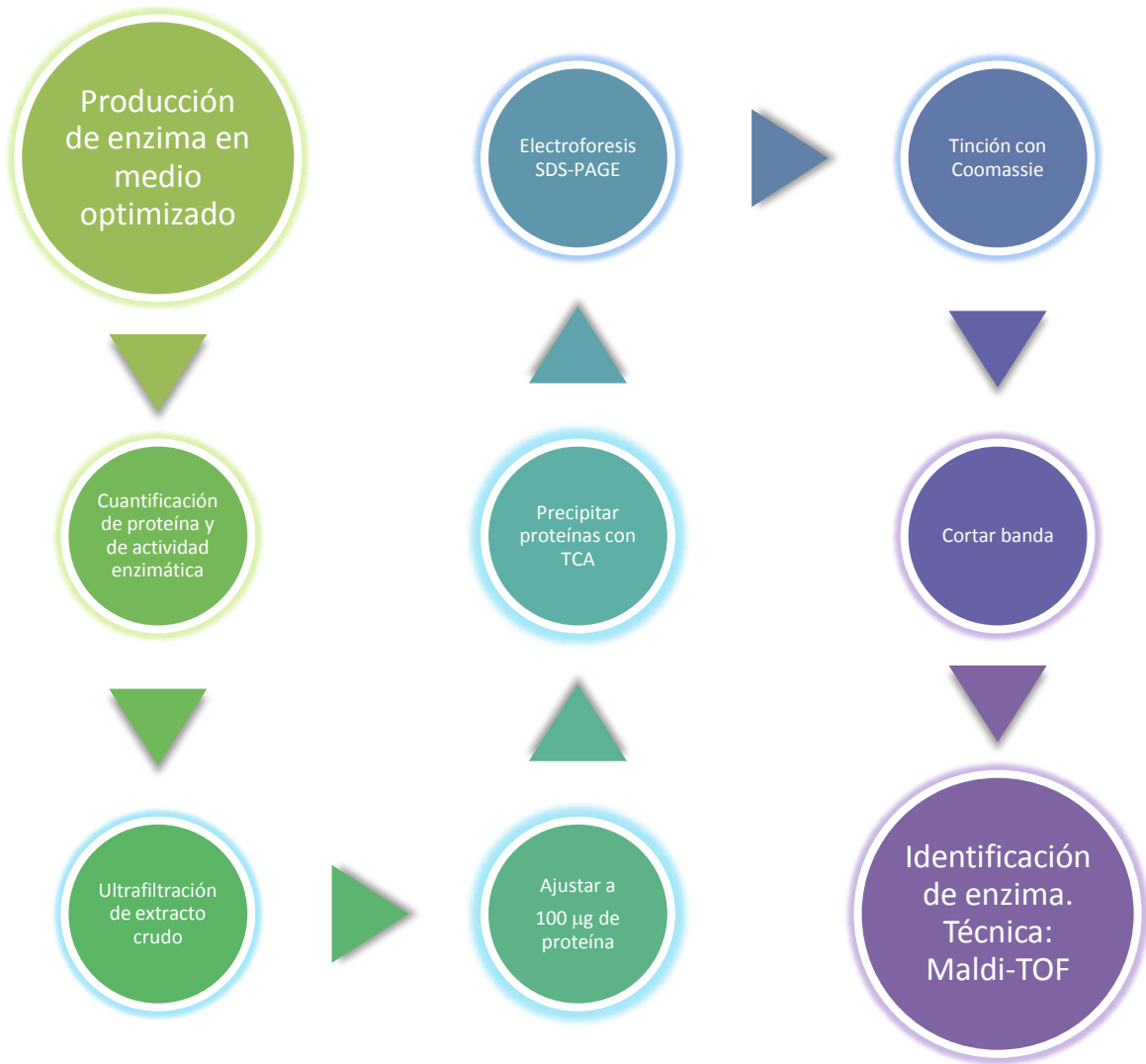


Figura 14. Proceso identificación de enzima.

7.10 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).

- a) A 1mL de muestra se le adicionaron 100 μ L (1/10 volumen) de 100% TCA (p/v) y se agitó por 15 segundos.
- b) Se dejó en hielo por un mínimo de 15 min.
- c) Se Centrifugó a 14,000 rpm por 10 min.
- d) El sobrenadante se retiró y desechó.
- e) El pellet se lavó con 100 μ 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.
- f) El pellet se resuspendió en 100 μ L de acetona y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min a 4 °C.
- g) Los lavados se repitieron 3 veces
- h) 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.
- i) Se resuspendió en buffer de carga con β -mercaptoetanol y SDS agitando vigorosamente.
- j) La muestra se calentó durante 5 min a 99°C para desnaturalizar a las proteínas.
- k) Se llevó a cabo el análisis SDS-PAGE.

7.11 Identificación de la proteína por espectrometría de masas (UNIDAD DE PROTEOMICA, IBT, UNAM).

La siguiente metodología fue llevada a cabo para la identificación de la enzima mediante espectrometría de masas:

La muestra fue digerida "in gel" con tripsina y los péptidos resultantes fueron aplicados en un sistema LC-MS constituido de un cromatógrafo líquido de micro-flujo Accela (Thermo-Fischer Co. San Jose, CA) con "splitter" (1/20) y un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo-Fisher Co.) con sistema de ionización tipo nano-electrospray (ESI). Para la fragmentación de los péptidos se utilizó los métodos de CID (Collision-Induced Dissociation) y HCD (High-energy Collision Dissociation), iones con carga 2^+ y 3^+ fueron seleccionados para este evento de fragmentación. Fueron desconsiderados los iones con carga superiores a 4^+ y de cargas indefinidas. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. Durante la captura automática de los datos fue utilizada la exclusión dinámica de iones, con un tiempo de exclusión de 60 segundos. Los datos espectrométricos fueron sometidos a la búsqueda contra la base de datos del NCBI nr a través del programa Matrix Science (Mascot Search Result).

VIII. RESULTADOS

Los hongos son capaces de producir una gran cantidad de compuestos bioquímicos como metabolitos primarios y enzimas, cuya producción está regulada tanto por las condiciones ambientales como nutricionales (Madigan, 2000). Para determinar cuáles son importantes en el caso de la cutinasa de *Aspergillus nidulans* se evaluaron en primera instancia diferentes parámetros fisicoquímicos para determinar las condiciones a las cuales hay una mayor producción de enzima, para posteriormente evaluar el efecto de los factores nutricionales.

8.1 Evaluación de las condiciones de cultivo.

Para analizar el efecto de las condiciones de cultivo y nutrientes sobre la producción de cutinasas en *A. nidulans*, se empleó como medio de cultivo base el medio mínimo (Tabla 7) y como fuente de carbono e inductor la cutina de manzana Golden. Al medio estéril se inocularon 1×10^6 esporas/mL.

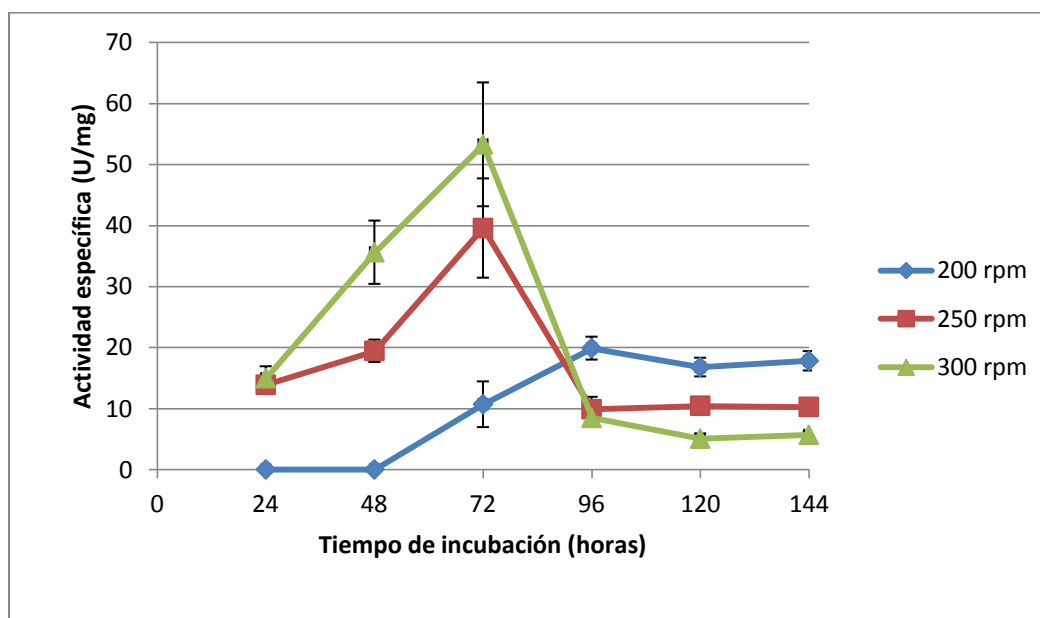
8.1.2 Velocidad de agitación.

Se llevó a cabo la fermentación para la producción de la enzima a 37°C y una concentración de 0.4% de cutina. Se varió la velocidad de agitación, las cuales fueron 200rpm, 250 rpm y 300rpm, durante 7 días.

Es importante evaluar la velocidad de agitación debido a que la mayoría de los hongos requieren oxígeno para su crecimiento y para llevar a cabo reacciones biosintéticas. Al evaluar las condiciones de fermentación a nivel matraz, variar la velocidad de agitación es una forma de modificar las condiciones de aireación. Los resultados se presentan en

el Gráfico 1 y se puede consultar información adicional en el Apéndice 11.5, tablas A1,A2 y A3.

Gráfico 1. Velocidad de agitación.



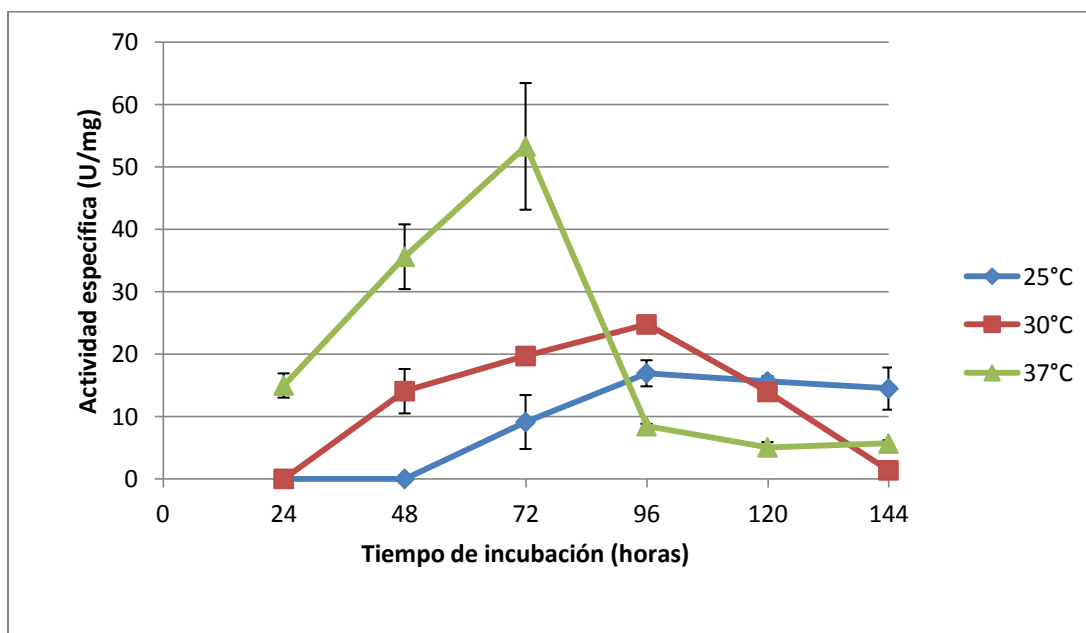
Velocidades evaluadas: (200, 250 y 300) rpm. Medio mínimo, Inductor y fuente de carbono: cutina

Se observó que con las velocidades de 250 rpm y 300 rpm a las 48 horas de fermentación se presenta una mayor actividad enzimática en comparación a 200 rpm, condición en la cual la enzima produce una actividad importante hasta las 96 horas de fermentación. El valor final que se alcanza es de 20 U/mg, mientras que a 300 rpm se obtuvo una mayor actividad específica, de 53.28 U/mg.

8.1.3 Efecto de la Temperatura.

Se llevaron a cabo 3 fermentaciones a 3 diferentes temperaturas a evaluar, las cuales fueron 25°C, 30°C y 37°C y se siguieron durante 7 días. Los resultados se presentan en el gráfico 2 y las tablas A4, A5 y A6 se muestran en el apéndice 11.5. Debido a que los hongos son microorganismos mesófilos, los cuales crecen en un rango de temperaturas entre 25°C-40°C, es importante determinar la temperatura óptima de *Aspergillus nidulans* en la cual se lleva a cabo la producción de enzima con actividad de esterasa.

Gráfico 2. Temperatura.



Temperaturas evaluadas: (25, 30 y 37) °C. Medio mínimo. Inductor y fuente de carbono: cutina

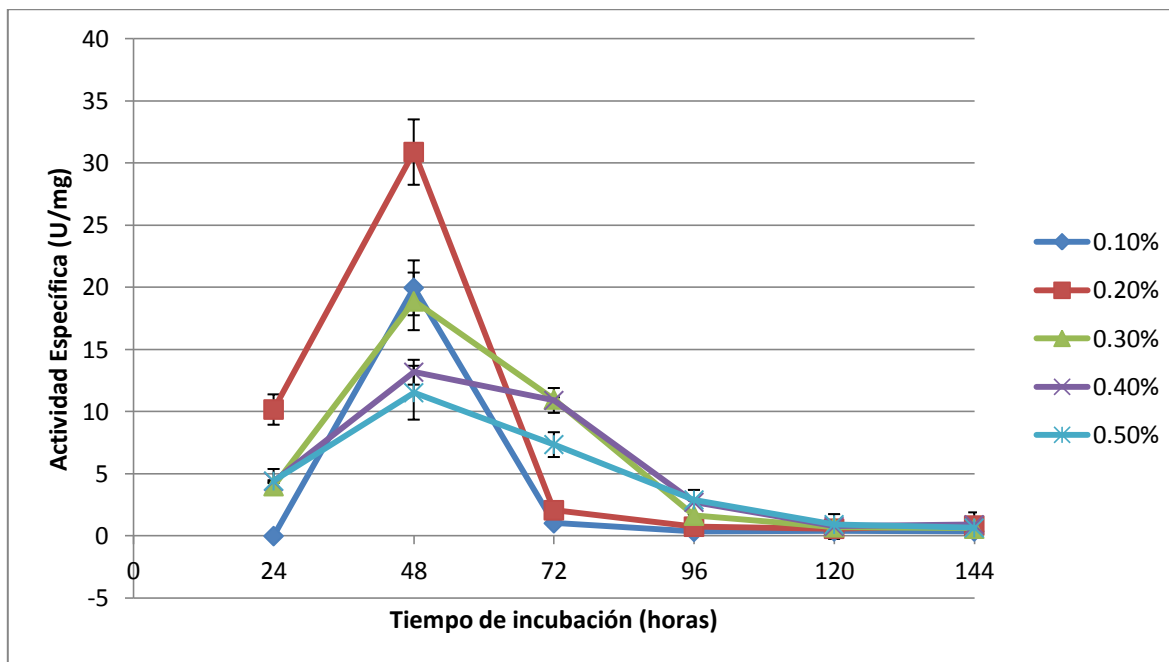
Como se observa en el gráfico 2, la temperatura a la cual hubo una mayor actividad fue a 37°C (53.28 U/mg), obteniendo así a las 72 horas de fermentación el máximo de actividad, mientras que a la temperatura de 25°C y 30°C la producción de enzima llegó a su máximo a las 96 horas y hay una baja actividad.

No se evaluaron temperaturas mayores debido a que pueden afectar a la actividad catalítica de las enzimas, así como al crecimiento de los microorganismos.

8.1.4 Evaluación del inductor a diferentes concentraciones.

Para analizar el efecto de la concentración del inductor, se utilizó cutina de manzana Golden, fuente que permite una fácil obtención de la misma, debido a que es el sustrato natural para la actividad de cutinasas. Se evaluaron concentraciones 0.1-0.5% (p/v) a las condiciones de cultivo que se seleccionaron anteriormente para el crecimiento y producción de enzima de *Aspergillus nidulans*, esto es, una velocidad de agitación de 300 rpm y temperatura de 37°C. Los resultados se presentan en el gráfico 3 y en las tablas A7 a A11 en el apéndice 11.5

Gráfico 3. Concentración de inductor.



Concentración de cutina evaluada: 0.1%-0.5%. Medio mínimo.

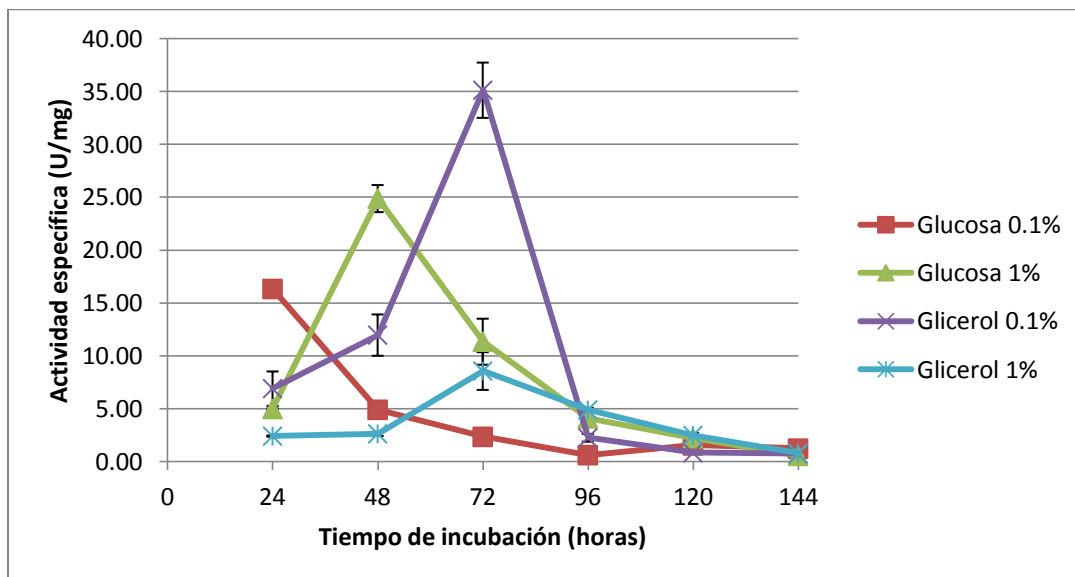
En el gráfico 3 se puede observar que la concentración que más favoreció a la producción de la enzima cutinasa fue 0.2%. Esto se observó a las 48 horas de fermentación, cuando la enzima alcanza una actividad de 30.89 U/mg. A las demás concentraciones evaluadas también hubo producción de la enzima a las 48 horas de fermentación, pero con una menor actividad. Se observó también que a mayor concentración de cutina la actividad enzimática va disminuyendo.

8.2 Análisis de efecto de nutrientes.

8.2.1 Fuente de Carbono.

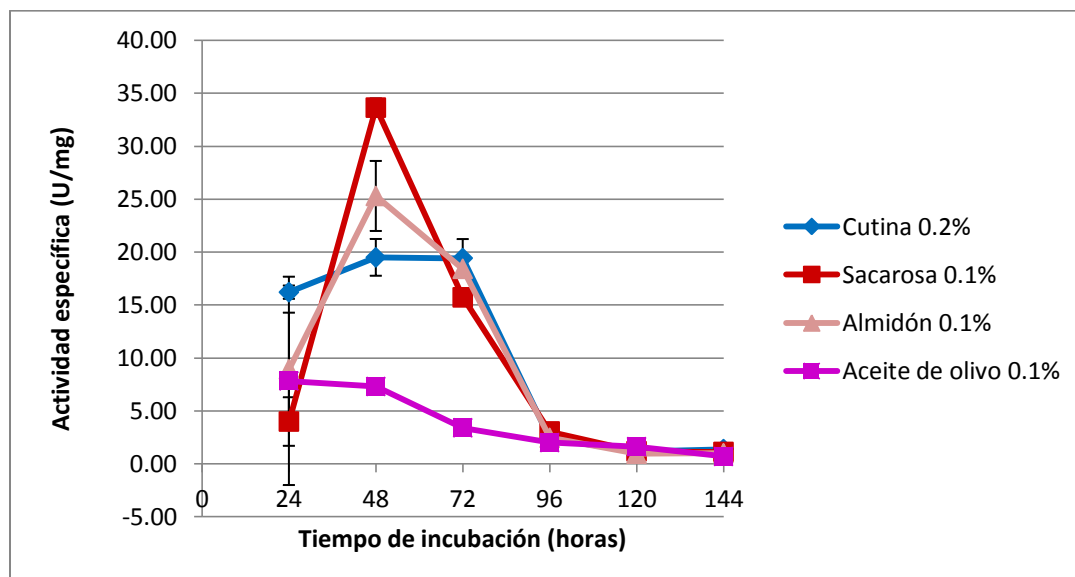
La fuente de carbono en una fermentación provee material necesario para la biosíntesis de diversos componentes celulares, tales como carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, etc., y su oxidación proporciona energía a la célula. Cada microorganismo posee maquinaria diferente y prefiere un tipo de fuente de carbono sobre otra (Sánchez y Demain, 2002). Por lo tanto, una vez establecidas las condiciones de cultivo a las cuales se obtuvo una mayor producción de cutinasas, se llevó a cabo el análisis del efecto de diferentes fuentes de carbono para así poder determinar cuál es la mejor para la producción de la enzima cutinolítica en *Aspergillus nidulans* y, así mismo, establecer si se presenta represión catabólica por parte de la glucosa. Los resultados se presentan en el Gráfico 4 y las tablas A12 a A19 se encuentran en el apéndice 11.5

Gráfico 4. Fuente de carbono.



Glucosa (0.1% y 1%), Glicerol (0.1% y 1%). Inductor y concentración

Gráfico 5. Fuente de carbono.



Cutina 0.2%, Sacarosa 0.1%, Almidón 0.1%, Aceite de olivo 0.1% Inductor y concentración

Con las fuentes de carbono adicionales a la cutina que se evaluaron, la que presentó una mayor actividad específica fue glicerol al 0.1%, con una actividad de 35.14 U/mg a las 72 horas de fermentación, seguida por sacarosa 0.1% con una actividad de 33.64 U/mg, presentada a las 48 horas de fermentación como se observa en el gráfico 4 y 5,. Esto indica que la productividad es más alta con el disacárido.

Con Glucosa al 0.1% se observó una represión en la producción de enzima, ya que a las 24 horas de fermentación la enzima tuvo una actividad de 16.35 U/mg, la cual fue su máximo y comenzó a disminuir al transcurrir las horas. Respecto a Glucosa al 1% se observó que a las 24 horas de fermentación la actividad enzimática fue muy baja (de 5 U/mg) y a las 48 horas de fermentación se observó un aumento en la actividad enzimática, la cual fue de 24.90 U/mg. Esto indicó que la síntesis de la enzima no ocurre hasta que no se consume la fuente de carbono, comportamiento característico de las fermentaciones sujetas a represión catabólica. La presencia de una fuente de carbono, tal como la glucosa, juega un papel importante en la activación del gen *creA*, el cual interviene en la represión catabólica del genero *Aspergillus* en especies como *A. nidulans* y *A. niger* (Ruijter, 1997; Esqueda, Segoviano y cols. 2011).

8.2.2 Evaluación electroforética de cutinasas.

Con el fin de determinar qué enzima se produce en cada condición, se procedió a determinar el perfil electroforético de las proteínas producidas en las diferentes condiciones de fermentación, y también se realizaron zimogramas de las mismas.

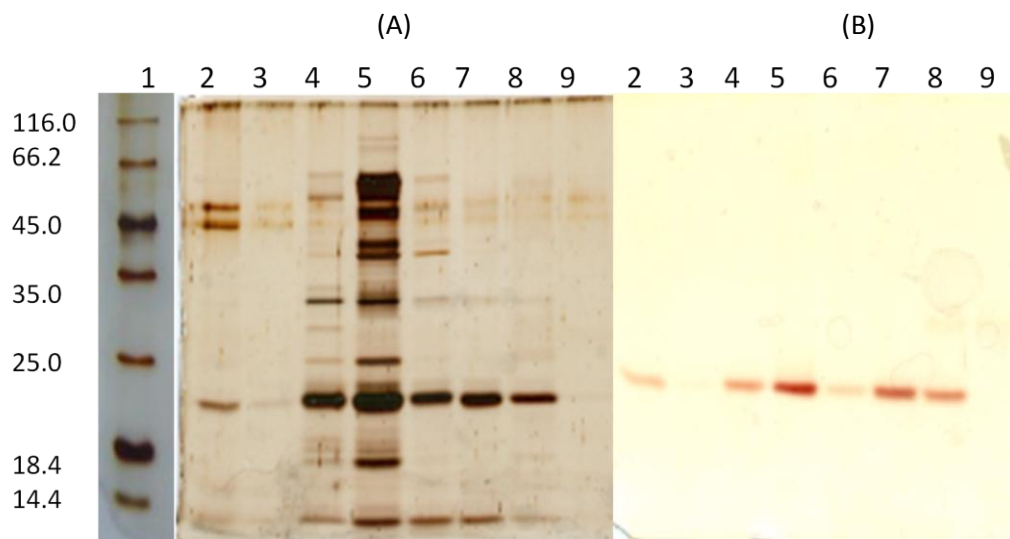


Figura 15. Perfil de proteínas teñido con plata (A), (B) Zimograma. 1. Marcador de bajo peso molecular (KDa), 2. Cutina 0.2% (48h), 3. Glucosa 0.1% (24h), 4. Glucosa 1% (48h), 5. Glicerol 0.1% (72h), 6. Glicerol 1% (72h), 7. Sacarosa 0.1% (48h), 8. Almidón 0.1% (48h), 9. Aceite de olivo 0.1% (24h)

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 14 % en condiciones desnaturalizantes. Se tiñó con plata uno de los geles para determinar el peso molecular de las enzimas producidas, y se detectó la presencia de la cutinasa de 22KDa. Al zimograma se le realizó una renaturalización y se tiñó con α -naftil acetato para comprobar que las enzimas de interés presentaban actividad. Se puede observar la represión catabólica por parte de la glucosa 0.1% en el carril 3, ya que la banda presente es muy tenue y en el zimograma no presentó actividad. Mientras que en el carril 5, proveniente del cultivo con glicerol 0.1%, se puede observar claramente en el zimograma la producción de la cutinasa de 22KDa.

Para descartar que los resultados obtenidos con glucosa como fuente de carbono adicional (gráfico 4) se debieran a efectos de acidificación del

medio de cultivo por el metabolismo de esta fuente de carbono o a un crecimiento alterado, se llevaron a cabo fermentaciones de 48 horas con glucosa 0.1% y 1% para determinar pH del extracto crudo y peso seco del micelio.

Tabla 8. pH extracto crudo.

| | Glucosa 0.1% | | Glucosa 1% | |
|----------------|--------------|------|------------|------|
| Fermentaciones | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| pH | 6.7 | 6.7 | 6.6 | 7.9 |

Tabla 9. Peso seco (micelio)

| Fermentación | # Papel filtro | Papel filtro Peso constante (mg) | | | | Papel filtro + micelio (mg) | micelio seco (mg) |
|--------------------|----------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|-------|-----------------------------|-------------------|
| | | Peso inicial (mg) | Estufa 50 °C (1 h) | Estufa 50 °C (2 h) | | | |
| Glucosa 0.1% (24h) | 1 | 220 | 217.2 | 217 | 284.1 | 67.1 | |
| Glucosa 0.1% (48h) | 2 | 212.5 | 209.8 | 209.6 | 271.3 | 61.7 | |
| Glucosa 1% (24 h) | 3 | 209.3 | 206.6 | 206.4 | 305.2 | 98.8 | |
| Glucosa 1% (48h) | 4 | 213.8 | 209.9 | 209.3 | 373.2 | 163.9 | |

En la fermentación con glucosa 0.1% el peso seco del micelio no presentó gran diferencia entre las 24 horas de fermentación y las 48 horas, debido a que la cantidad de glucosa fue insuficiente para el crecimiento. Mientras que en la que se llevó a cabo con glucosa al 1% el crecimiento fue mayor a las 24 horas y siguió en aumento a las 48 horas y el pH se volvió alcalino, probablemente por proteólisis.

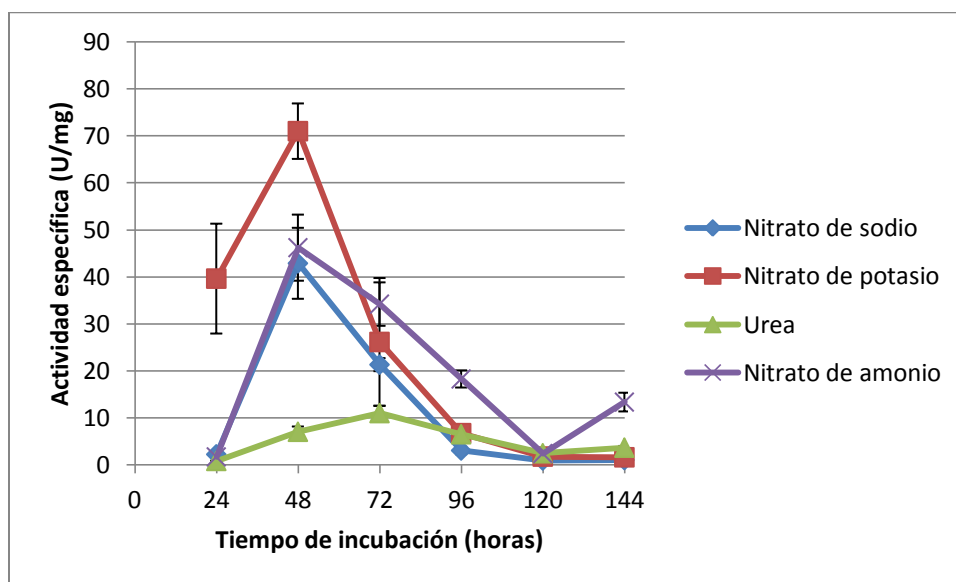
Estos resultados indican que la baja producción de enzima en estas condiciones no se debió a crecimiento insuficiente ni a inactivación por pH, sino al efecto de represión catabólica.

8.2.3 Fuente de Nitrógeno.

Los hongos requieren de una fuente de nitrógeno que proporciona materia prima para la producción de biomoléculas y además puede generar un cierto efecto específico a la célula, como puede ser un cambio en el pH o la estimulación o represión de una enzima deseada.

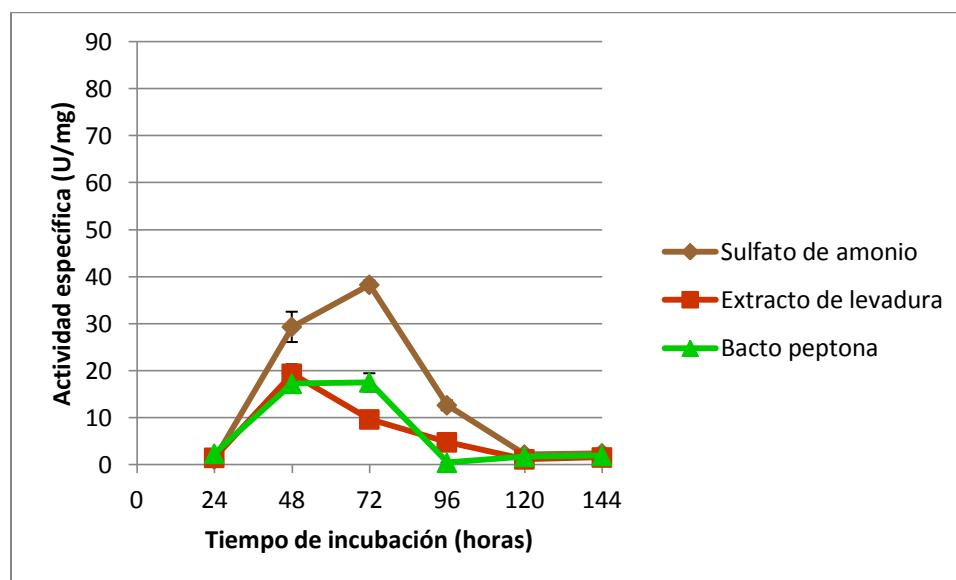
Existen diferentes fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas, las cuales según el microorganismo pueden ser utilizables como única fuente de nitrógeno. Los hongos crecen bien en mezclas de aminoácidos pero la efectividad de estos compuestos como única fuente de nitrógeno varía considerablemente (Sanchez y Demain, 2002). Los resultados se muestran en el gráfico 6 y en el apéndice 11.5 (tablas 20 a 26).

Gráfico 6. Fuente de nitrógeno.



NaNO_3 , KNO_3 , Urea, NH_4NO_3 . Medio mínimo, fuente de carbono e inductor cutina 0.2%.

Gráfico 7. Fuente de nitrógeno.



(NH₄)₃SO₄, Extracto de levadura, Bacto peptona. Medio mínimo, fuente de carbobo e inductor cutina 0.2%

De las fuentes de nitrógeno evaluadas la que resultó en una mayor producción de enzima fue nitrato de potasio obteniendo a las 48 horas de fermentación una actividad de 71 U/mg. Tanto con nitrato de sodio como con nitrato de amonio la mayor actividad enzimática se obtuvo a las 48 horas de fermentación, con valores muy cercanas (42.89 U/mg y 46.22 U/mg, respectivamente), por lo que ambas fuentes de nitrógeno pueden ser utilizadas para la producción de cutinasas.

Como se observa en el gráfico 6, con urea se produjo una actividad enzimática máxima de 11.03 U/mg a las 72 horas de fermentación, por lo que no es una fuente de nitrógeno que pueda servir para la producción de cutinasas.

En el gráfico 7 se aprecia que con sulfato de amonio la máxima actividad se presentó a las 72 horas de fermentación y alcanzó un valor de 38.30 U/mg, valor que se acerca a la cantidad producida con nitrato de potasio y de amonio, pero muestra menor productividad. Las fuentes de nitrógeno orgánicas evaluadas presentaron un comportamiento similar entre ellas, ya que ambas produjeron la enzima a las 48 horas de fermentación y los valores de actividad enzimática fueron muy cercanos, de 19.37 U/mg y 17.24 U/mg, respectivamente.

8. 2.4 Determinación de cutinasas presentes en el medio extracelular.

Para determinar si se producen todas las cutinasas codificadas en el genoma de *A. nidulans* o solamente una de ellas, se llevó a cabo el análisis del perfil electroforético por SDS-PAGE al 14%, al que se realizó una tinción con plata (figura 16) y su correspondiente zimograma (figura 17) del medio extracelular proveniente de las diferentes condiciones de cultivo. Los resultados se muestran a continuación.

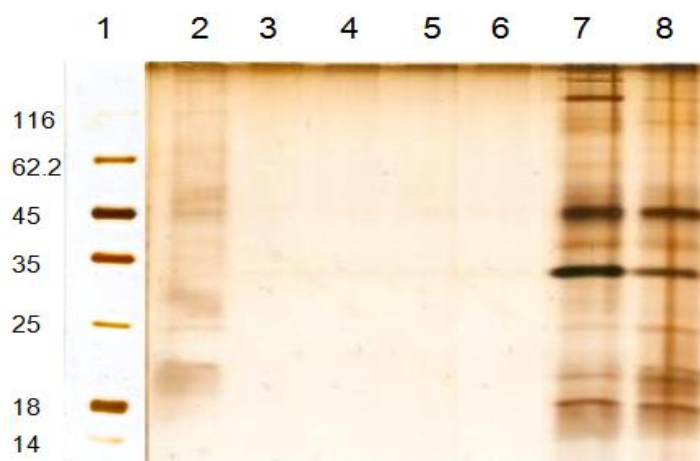


Figura 16. Perfil de proteínas de medio extracelular obtenido con diferentes fuentes de nitrógeno. Carriles: 1 Marcador de bajo peso molecular (KDa), 2. KNO_3 (48h), 3. Urea (72h), 4. NH_4NO_3 (48h), 5. $NaNO_3$ (48h), 6. $(NH_4)_2SO_4$ (72h), 7. Extracto de levadura (48h), 8. Bacto peptona (48h) Se empleó tinción de plata

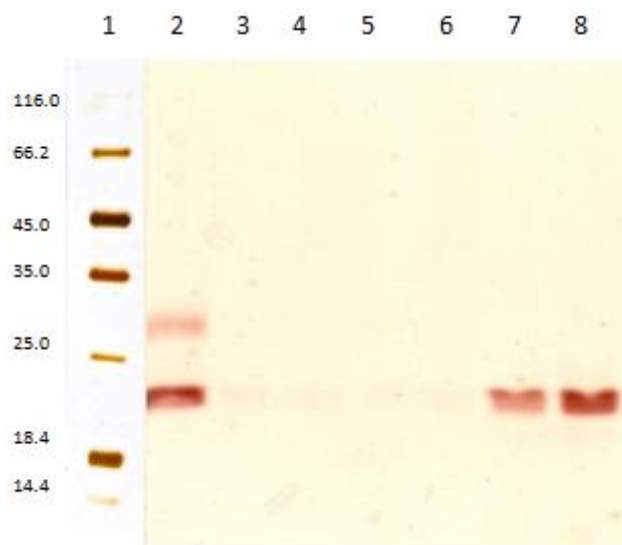


Figura 17. Zimograma de medio extracelular. Carriles: 1 Marcador de bajo peso molecular (KDa), 2. KNO_3 (48h), 3. Urea (72h), 4. NH_4NO_3 (48h), 5. $NaNO_3$ (48h), 6. $(NH_4)_2SO_4$ (72h), 7. Extracto de levadura (48h), 8. Bacto peptona (48h)

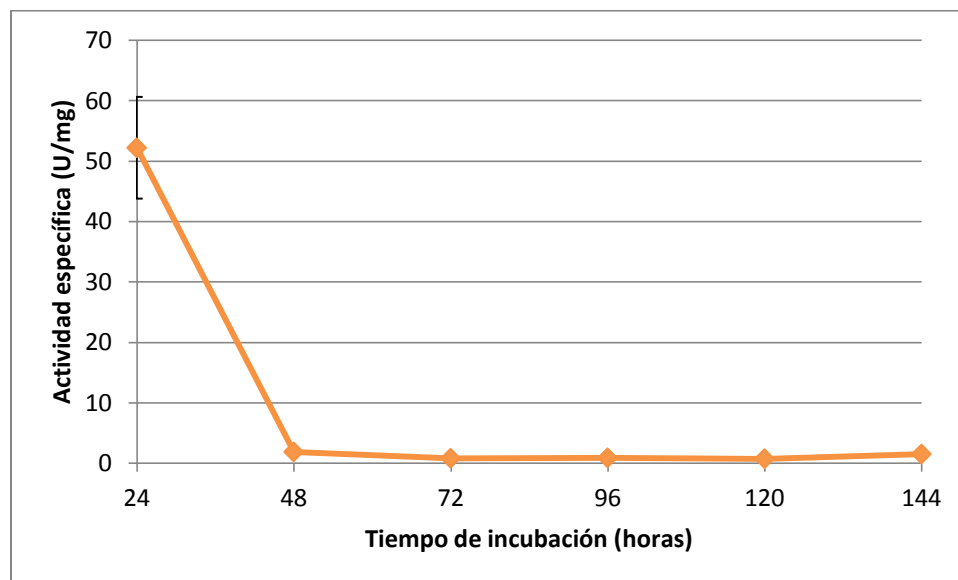
El zimograma se renaturalizó y se tiñó con α -naftil acetato para determinar qué bandas presentaban actividad de esterasa. Se pudo observar la presencia de una cutinasa de 22KDa y otra de 28KDa, cuando se cultivó *A. nidulans* en nitrato de potasio (KNO_3) como única fuente de nitrógeno. Cabe hacer notar que es la condición en la que se observó mayor actividad enzimática.

En los carriles 3 a 6 no se observan bandas de actividad ni de proteína, aunque la proteína se trató de ajustar e igualar en todos los carriles. Probablemente alguna sustancia en el medio de cultivo afectó en la cuantificación. Mientras que para las fuentes de nitrógeno orgánicas se observó claramente las bandas de proteína y actividad y se destaca que sólo se observa la de 22 KDa.

8.3 Medio diseñado con los ingredientes que produjeron los mejores resultados.

Una vez determinado tanto los parámetros fisicoquímicos como las fuentes nutricionales más adecuadas para la producción de cutinasas, se realizó una fermentación por 144 h a 37°C y 300 rpm utilizando medio mínimo con cutina 0.2%, glicerol 0.1% como fuente de carbono y nitrato de potasio 0.06% como fuente de nitrógeno para evaluar la producción de esterasas en *Aspergillus nidulans*. Los resultados se muestran en el apéndice 11.5 (tabla A27) y en el gráfico 8.

Gráfico 8. Producción de esterasa en medio que contiene las mejores fuentes de carbono, nitrógeno e inductor



Condiciones evaluadas: Glicerol 0.1%, KNO₃, cutina 0.2%

La máxima actividad enzimática se presentó a las 24 horas de fermentación, alcanzando un valor de 52.20 U/ μ g, que no es el valor más alto obtenido en todos los ensayos, puesto que el que se alcanzó con nitrato de potasio es mayor (70 unidades), del segundo día en adelante de fermentación la actividad enzimática disminuyó considerablemente. Si se compara la actividad cuando sólo se utiliza glicerol al 0.1 % (Gráfico 8) se puede decir que con la adición de KNO₃ como fuente de nitrógeno y glicerol 0.1% como fuente de carbono adicional a la cutina, se obtuvo una producción de enzima en menor tiempo. La productividad se incrementa (alcanza el valor máximo, 2.17 U/h). Se puede afirmar que la actividad enzimática se ve reprimida con glicerol, con respecto a la fermentación con nitrato de potasio y cutina, donde se alcanzaban 71 U/mg. Cabe mencionar que en estas

condiciones se producen 2 cutinasas, como se aprecia en la figura 17, lo que probablemente conduce al incremento de la actividad enzimática.

8.4 Medio optimizado para producir enzima de 28 KDa.

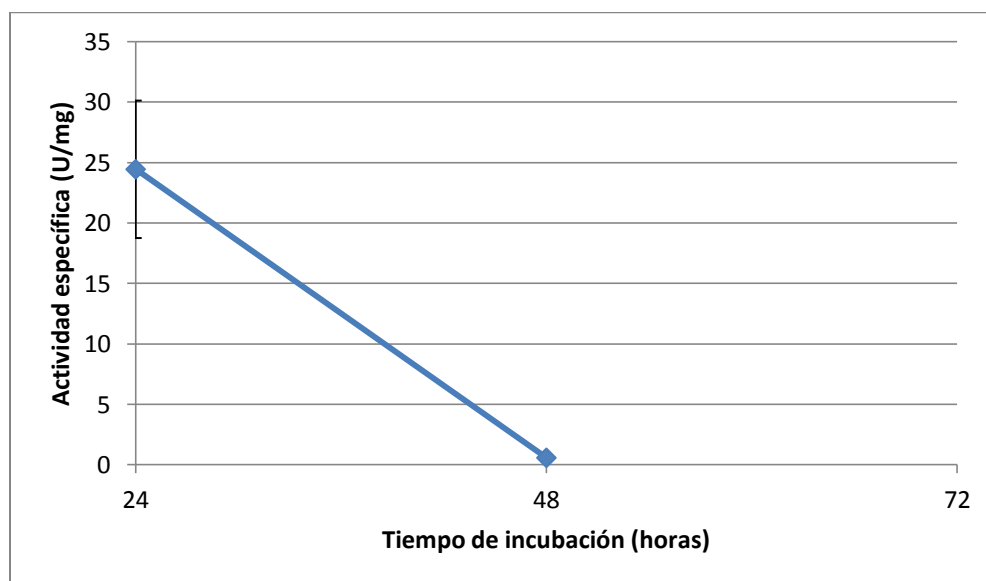
Se elaboró nuevamente el medio con cutina 0.2% y KNO_3 , en el cual se obtuvieron las 2 cutinasas (22 y 28 KDa), para tener material para identificar a la enzima de 28 KDa por medio de espectrometría de masas pero no se pudo producir dicha enzima. Con el fin de determinar si la banda de 28 KDa que presentó actividad de esterasa corresponde realmente a una cutinasa se procedió a cultivar el microorganismo en el medio descrito en la tabla 10, utilizando como fuente de carbono Sacarosa 0.5%; como fuente de nitrógeno, Extracto de levadura 0.5% y aceite de olivo 0.5% como inductor, medio en el que ha sido reportada su producción (Castro-Ochoa *et al.* Sometido). Los resultados se muestran en el gráfico 9 y en la tabla A28 en el apéndice 11.5.

Tabla. 10 Composición del medio optimizado.

| Compuesto | Concentración/ 50mL de medio |
|----------------------|-------------------------------------|
| Sales 20x | 2.5 mL |
| Elementos traza | 50 μL |
| Extracto de levadura | 250 mg |
| Arginina | 250 μL |
| Biotina | 25 μL |
| Metionina | 0.55 mg |
| Sacarosa | 250 mg |
| Aceite de olivo | 250 μL |

El medio se esterilizó a 121°C por 15 min y se inocularon 1×10^6 esporas/mL. La fermentación se llevó a cabo por 48 horas a 37°C y agitación orbital de 300 rpm.

Gráfico 9. Producción de enzima 28 KDa en medio con sacarosa como fuente de carbono y aceite de olivo como inductor.



Medio optimizado con sacarosa 0.5%, extracto de levadura 0.5% y aceite de olivo 0.5%

El extracto crudo obtenido a las 24 horas se ultrafiltró en una celda con agitación (Amicon) con una membrana con un límite de exclusión de 10 KDa. Para corroborar que toda la proteína se había concentrado correctamente, se realizó un ensayo de actividad cualitativa con α -naftilacetato en microplacas, tanto al sobrenadante como al concentrado, como se muestra en la siguiente figura.

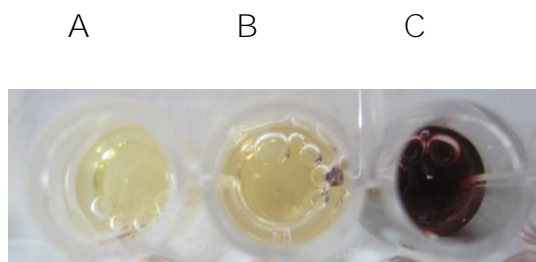


Figura 18. Determinación cualitativa de actividad de esterasa en sobrenadante y concentrado A: Blanco. Buffer de fosfatos 0.05 M pH 7.5, B: Sobrenadante (50 μ L), C: Concentrado (5 μ L).

Una vez concentrada la proteína se cuantificó la proteína del extracto para así poder ajustar a 100 mg de proteína para llevar a cabo la precipitación con TCA y poder determinar si la proteína producida corresponde a la cutinasa de 28 kDa mediante un análisis en un gel SDS-PAGE al 14%. La muestra se corrió a 120 V y se tiñó con azul de Coomassie.

8.4.1 Evaluación electroforética de la presencia de la cutinasa 28 KDa.

Como se puede apreciar, a pesar del procedimiento de concentración se observa una banda muy tenue, correspondiente a la enzima de 28 KDa. Sin embargo, se cortó y se mandó a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología para confirmar que es una cutinasa.

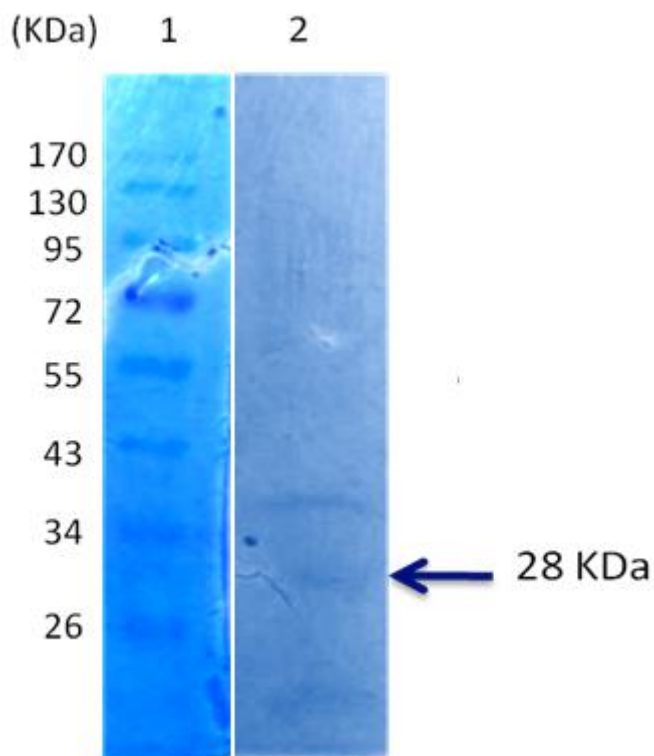


Figura 19. Perfil de proteínas de muestra concentrada. Carriles: 1. Marcador de bajo peso molecular (KDa) 2. Enzima concentrada 100 μ g (28KDa) Tinción con azul de Coomassie.

8.5 Identificación por secuenciación.

Los resultados mostrados a continuación muestran que la secuencia obtenida corresponde a la cutinasa hipotética AN7541.2 [*Aspergillus nidulans* FGSC A4], con un peso molecular teórico de 28 KDa y uno experimental de 26.5KDa, con un punto isoeléctrico de 5.34.

1 MHFKLLSLAA LAGLSVASPL NLDERQHAVG SSSGNDLRDG
DCKPVTFFFA

51 RASTEPGLLG MSTGPAVCND LK**ADASLGGV ACQGVGPKYT**
AGLAENALPQ

101 **GTSSAINEA KElfELAASK** CPDTRIVAGG YSQGTAVMHG
AIPDLSDEIK

151 DK**IAGVVLFG DTRNKQDGGQ IK**NFPKDKIK IYCATGDLVC
DGTLVVTA AH

201 FTYVANTGEA SKWLEQQLAS MPASTSTSSS SSSSSSAPAS
QTSQSSGLSS

251 WFSGLGN

En rojo se muestran los péptidos identificados LC-MS Malditof-TOF

Por comunicación personal con Katia Esqueda (estudiante de maestría, lab-312 conjunto E) se identificó la cutinasa de 22 KDa perteneciente al genoma de *A. nidulans*. (Esqueda, Segoviano y cols., 2011)

IX. DISCUSIÓN

En la presente investigación se determinó la capacidad que tiene *Aspergillus nidulans* para sintetizar enzimas hidrolíticas tipo cutinasas utilizando como fuente de carbono e inductor cutina de manzana. Se logró inducir una cutinasa de 22KDa cuando se emplearon fuentes orgánicas de nitrógeno, y una de 28 y otra de 22 kDa en las otras condiciones. Se ha reportado la producción de cutinasas empleando diferentes microorganismos como *Fusarium oxysporum* (Fontes y Alves, 2007) y *Thermomonospora fusca* ATCC27730 (Fett, 1999) ambas en medios de cultivo con cutina.

Las cutinasas también son inducidas por la presencia de monómeros de cutina en el medio de cultivo, como es en el caso de *Fusarium solani f. sp. pisi*. (Lin y Kolattukudy, 1977).

Para identificar otros factores que influyen en la regulación de la producción de estas enzimas, se evaluaron diferentes fuentes de carbono y se obtuvo que con glicerol se llevó a cabo una mayor producción de cutinasas. Se observó que la adición de glucosa al medio de cultivo con *Aspergillus nidulans* reprime la producción de cutinasas, mismo efecto que se reportó en la producción de cutinasas por *Fusarium oxysporum* (Fontes y Alves, 2007) al encontrar que la glucosa afecta a la actividad cutinolítica negativamente. Este resultado también coincide con otra publicación en la cual la presencia de glucosa en el medio de cultivo tiene un efecto negativo para la producción de cutinasas en *Thermomonospora fusca* (Fett, 1999) y se reportó también para *Fusarium solani* que la glucosa inhibe la producción de cutinasas (Lin y Kolattukudy, 1977). Sin embargo, existen investigaciones sobre la

cutinasa de *Colletotrichum lindemuthianum* con la cual la presencia de glucosa favorece la producción de la enzima (Rispoli, 2007).

Para *Aspergillus nidulans* la mejor fuente de nitrógeno para la producción de cutinasas fue nitrato de potasio, mientras que para microorganismos como *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum lindemuthianum* el extracto de levadura es la fuente de nitrógeno con la cual se han obtenido mejores resultados sobre la producción de la enzima (Rispoli, 2007; Fontes y Alves, 2007).

En reportes de *Fusarium solani* la producción de cutinasas es inducida por aceite de linaza siendo mayor que al utilizar sólo cutina. También la adición de ácidos grasos, como palmitico, esteárico y oleico, favorece la producción de cutinasas (Fontes y Alves, 2007).

En el caso de la adición de aceite de olivo para la producción de cutinasas de *Aspergillus nidulans* se obtuvo que éste es un buen inductor en la producción de la cutinasa de 28 KDa, la cual no es inducida cuando se emplea cutina como única fuente de carbono.

X. CONCLUSIONES

Las condiciones de cultivo que llevan a la mayor producción de cutinasa de 22 KDa, correspondiente a la reportada en el genoma con ANID5309.1 son:

- Temperatura: 37°C
- Agitación: 300 rpm

La cutina actúa como inductor para la producción de cutinasas y la concentración óptima es de 0.2%.

La fuente de carbono adicional más eficiente para el metabolismo de *Aspergillus nidulans* y con la cual se presenta una mayor actividad enzimática fue el glicerol al 0.1%. Se determinó que la glucosa reprime catabólicamente la producción de cutinasas.

La fuente de nitrógeno con la que se presentó una mayor producción de cutinasas fue con nitrato de potasio, obteniendo una actividad enzimática de 71 U/mg al segundo día de fermentación.

Se lograron producir dos cutinasas una de 22 KDa utilizando como inductor cutina y otra de 28 KDa utilizando como inductor aceite de olivo.

Se identificó la cutinasa de 28 kDa de *Aspergillus nidulans* como la reportada en el genoma con la clave AN7541.2

Perspectivas

- ✓ Investigar la mejor combinación entre la fuente de carbono y nitrógeno para alcanzar la máxima producción y productividad de cutinasas.

- ✓ Llevar a cabo la purificación y caracterización de la cutinasa de 22 KDa.

- ✓ Evaluar si la cutinasa puede ser utilizada para realizar reacciones de biocatálisis.

- ✓ Evaluar la capacidad de la cutinasa de llevar a cabo reacciones de hidrólisis de *p*-nitrofenil ésteres con diferente largo de cadena para determinar la especificidad por sustrato.

XI. APÉNDICE

11.1 Cámara de Neubauer para conteo de esporas.

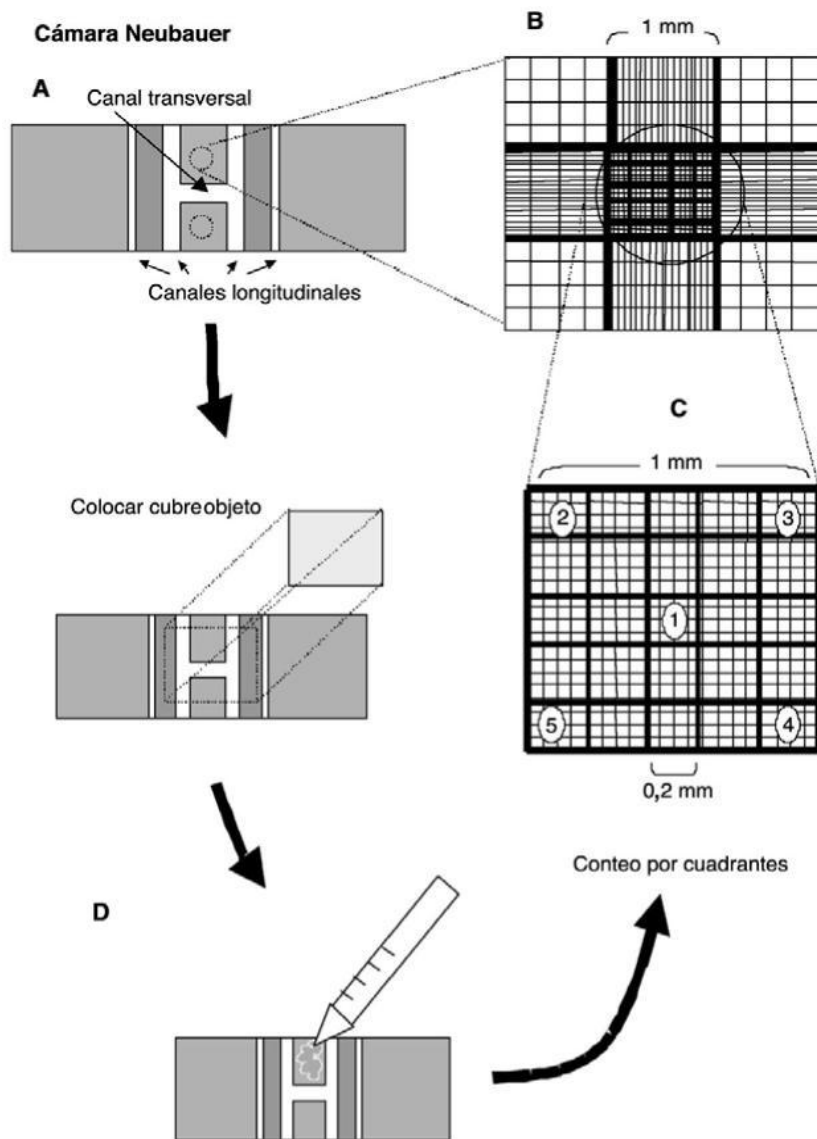


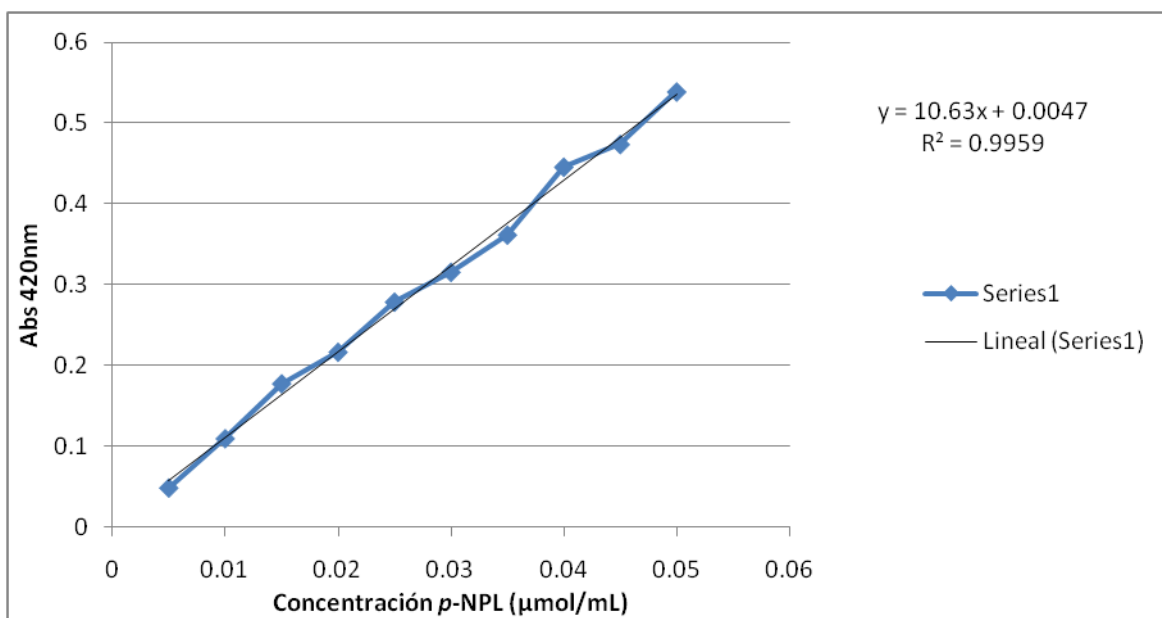
Tabla 11. Reactivos y marcas.

| Reactivos | Marcas |
|-----------------------------------|---------------|
| Acetona | Tecsiquim |
| Aceite de olivo | Sigma |
| Acetato de sodio trihidratado | Baker |
| Acido oxálico | Baker |
| Acrilamina/Bisacrilamida | Bio-Rad |
| Agar | Oxoid |
| Alcohol etílico | Tecsiquim |
| Almidón | Baker |
| Arginina | Sigma |
| Azul de Coomassie R-250 | Bio-Rad |
| Bactopeptona | Difco |
| Biotina | Sigma |
| Bradford | Bio-Rad |
| Carbonato de sodio | Baker |
| Cloroformo | Tecsiquim |
| Cloruro de cobalto pentahidratado | Baker |
| Cloruro de manganeso | Baker |
| Cloruro de potasio | Baker |
| EDTA tetrasódico | Baker |
| Extracto de levadura | Fluka |
| Fast red TR | Sigma |
| Fosfato de potasio monobásico | Baker |
| Fosfato de potasio dibásico | Baker |
| Glicerol anhidro | Baker |
| Glucosa | Baker |
| Hidróxido de sodio | Baker |

| | |
|--|-------------------|
| Kit de tinción de plata | Fermentas |
| Marcador de peso molecular de bajo rango | Fermentas |
| Membrana límite d extracción 10KDa | Milipore |
| Metanol | Tecsiquim |
| Metionina | Research organics |
| α -Naftil acetato | Sigma |
| Nitrato de sodio | Reasol |
| <i>p</i> -Nitrofenil Laurato | Research organics |
| Oxalato de amonio | Baker |
| Reactivos de electroforesis | Bio-Rad |
| SDS | Bio-Rad |
| Sulfato de amonio | Baker |
| Sulfato ferroso heptahidratado | Baker |
| Sulfato de magnesio | Baker |
| Triton X-100 | Sigma |
| Tween 80 | Cosmopolita |

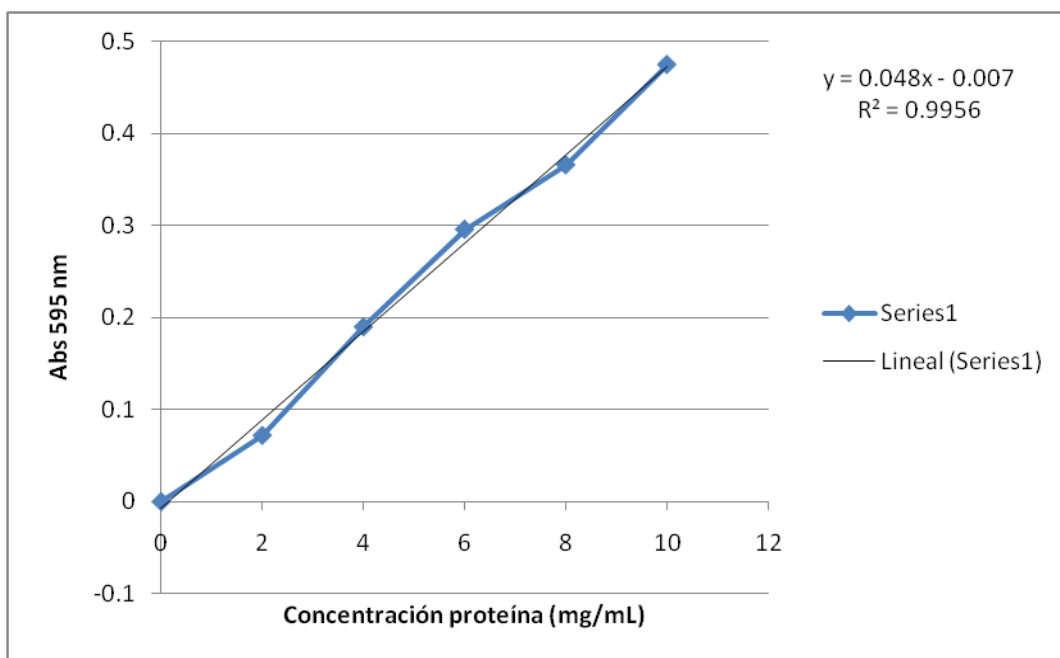
11.2 Curva Patron *p*-Nitrofenil Laurato para la determinación de actividad de esterasa.

| $\mu\text{mol/mL } p\text{-NPL}$ | Abs 420 |
|----------------------------------|---------|
| 0.005 | 0.049 |
| 0.01 | 0.11 |
| 0.015 | 0.178 |
| 0.02 | 0.217 |
| 0.025 | 0.279 |
| 0.03 | 0.316 |
| 0.035 | 0.362 |
| 0.04 | 0.446 |
| 0.045 | 0.474 |
| 0.05 | 0.539 |

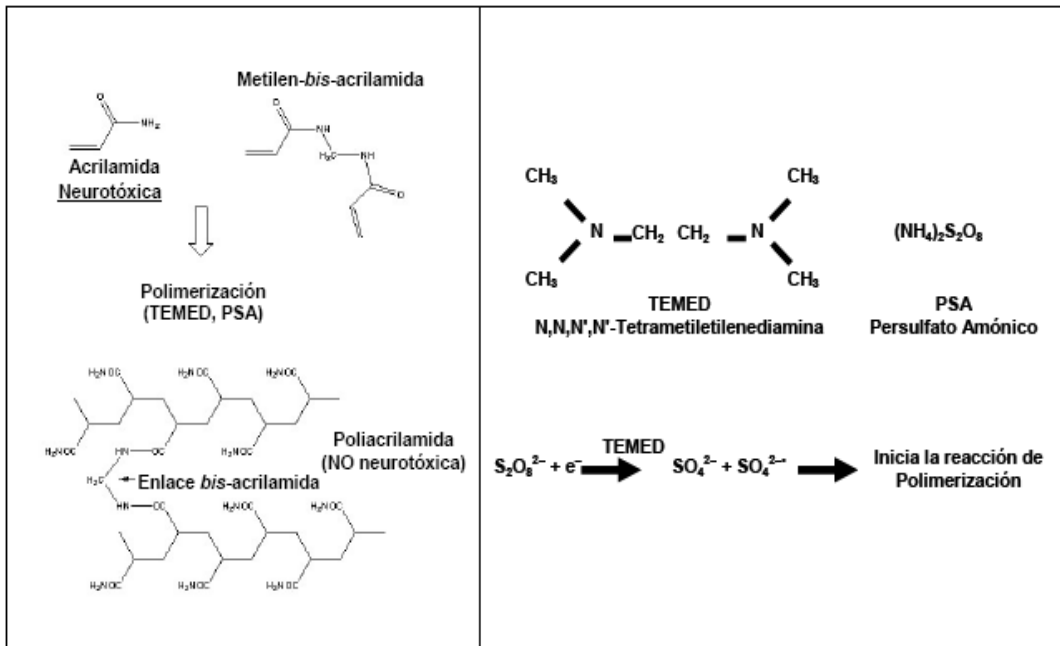


11.3 Curva patrón Bradford para cuantificar la concentración de proteína.

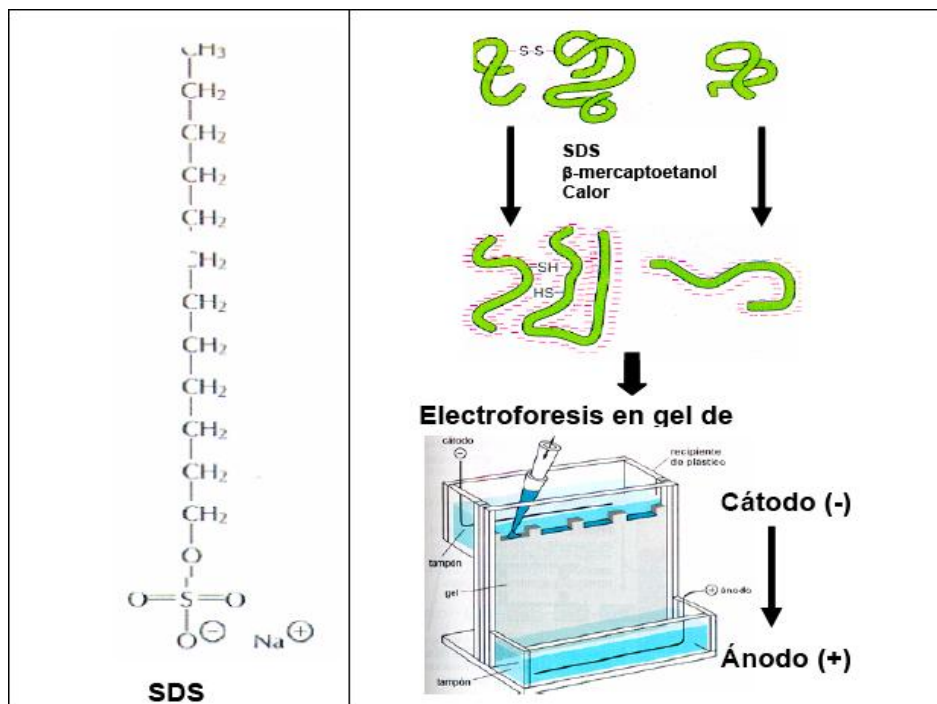
| μg/mL BSA | Abs |
|-----------|-------|
| 0 | 0 |
| 2 | 0.072 |
| 4 | 0.19 |
| 6 | 0.296 |
| 8 | 0.366 |
| 10 | 0.475 |



11.4 Reacción de polimerización de la acrilamida.



Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida.



11.5 Tablas.

Parámetros fisicoquímicos.

Unidades:

Proteína: µg/mL

Actividad de esterasa: U/mL

Actividad específica: U/mg

- Velocidad de agitación.

Tabla A1. 200 rpm

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|-----|
| 1 | 4.70 | 0.14 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 9.87 | 1.52 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 22.47 | 1.39 | 240.12 | 84.23 | 10.7 | 3.7 |
| 4 | 36.07 | 2.07 | 717.12 | 67.76 | 19.9 | 1.9 |
| 5 | 42.55 | 2.34 | 713.89 | 65.10 | 16.8 | 1.5 |
| 7 | 61.06 | 4.30 | 1087.31 | 96.95 | 17.8 | 1.6 |

Tabla A2. 250 rpm

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|--------|-----------------|------|
| 1 | 4.04 | 0.30 | 56.12 | 3.49 | 13.89 | 0.86 |
| 2 | 12.13 | 1.21 | 235.94 | 22.27 | 19.45 | 1.84 |
| 3 | 37.95 | 5.65 | 1501.60 | 308.86 | 39.57 | 8.14 |
| 4 | 60.19 | 5.29 | 594.73 | 122.06 | 9.88 | 2.03 |
| 5 | 79.98 | 8.74 | 835.47 | 45.71 | 10.45 | 0.57 |
| 7 | 116.61 | 11.15 | 1196.24 | 107.54 | 10.26 | 0.92 |

Tabla A3. 300 rpm

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|--------|-----------------|-------|
| 1 | 3.80 | 0.11 | 56.88 | 7.39 | 14.96 | 1.94 |
| 2 | 12.45 | 0.51 | 443.37 | 64.60 | 35.60 | 5.19 |
| 3 | 38.67 | 2.39 | 2060.40 | 392.40 | 53.28 | 10.15 |
| 4 | 71.31 | 3.59 | 603.10 | 25.17 | 8.46 | 0.35 |
| 5 | 93.91 | 2.07 | 474.92 | 77.61 | 5.06 | 0.83 |
| 7 | 133.58 | 22.14 | 757.67 | 70.64 | 5.67 | 0.53 |

- Temperatura

Tabla A4. 25°C

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|--------|-----------------|------|
| 1 | 2.99 | 0.54 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 4.38 | 0.67 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 4.36 | 0.50 | 39.74 | 18.83 | 9.12 | 4.32 |
| 4 | 14.35 | 3.05 | 242.76 | 30.02 | 16.92 | 2.09 |
| 5 | 22.72 | 4.23 | 354.70 | 18.96 | 15.61 | 0.83 |
| 7 | 58.39 | 10.86 | 844.87 | 197.64 | 14.47 | 3.38 |

Tabla A5. 30°C

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 3.63 | 0.22 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 5.16 | 0.75 | 72.49 | 18.34 | 14.06 | 3.56 |
| 3 | 15.42 | 2.16 | 303.48 | 17.98 | 19.68 | 1.17 |
| 4 | 25.17 | 2.08 | 622.86 | 33.14 | 24.75 | 1.32 |
| 5 | 32.06 | 2.50 | 446.43 | 42.12 | 13.93 | 1.31 |
| 7 | 77.21 | 0.71 | 105.76 | 11.89 | 1.37 | 0.15 |

Tabla A6. 37°C

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|--------|-----------------|-------|
| 1 | 3.80 | 0.11 | 56.88 | 7.39 | 14.96 | 1.94 |
| 2 | 12.45 | 0.51 | 443.37 | 64.60 | 35.60 | 5.19 |
| 3 | 38.67 | 2.39 | 2060.40 | 392.40 | 53.28 | 10.15 |
| 4 | 71.31 | 3.59 | 603.10 | 25.17 | 8.46 | 0.35 |
| 5 | 93.91 | 2.07 | 474.92 | 77.61 | 5.06 | 0.83 |
| 7 | 133.58 | 22.14 | 757.67 | 70.64 | 5.67 | 0.53 |

- Diferentes concentraciones de inductor.

Tabla A7. Cutina 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|------|-----------------|------|
| 1 | 0.00 | 0.24 | 6.78 | 1.13 | 0 | 0 |
| 2 | 8.92 | 1.57 | 188.45 | 8.87 | 19.97 | 2.21 |
| 3 | 27.77 | 1.08 | 28.70 | 7.16 | 1.0 | 0.3 |
| 4 | 41.93 | 1.32 | 14.56 | 2.09 | 0.3 | 0.0 |
| 5 | 49.26 | 3.68 | 18.96 | 0.82 | 0.4 | 0.0 |
| 7 | 59.13 | 5.33 | 22.30 | 2.11 | 0.4 | 0.0 |

Tabla A8. Cutina 0.2%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 1.18 | 0.95 | 12.02 | 1.44 | 10.18 | 1.22 |
| 2 | 11.19 | 0.76 | 345.77 | 29.43 | 30.89 | 2.63 |
| 3 | 29.06 | 1.55 | 151.03 | 25.49 | 2.08 | 0.35 |
| 4 | 43.68 | 4.24 | 33.06 | 0.80 | 0.76 | 0.02 |
| 5 | 64.94 | 2.12 | 38.51 | 1.39 | 0.59 | 0.02 |
| 7 | 84.32 | 2.45 | 71.36 | 8.20 | 0.85 | 0.10 |

Tabla A9. Cutina 0.3%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 4.44 | 3.51 | 17.85 | 1.11 | 4.02 | 0.25 |
| 2 | 12.41 | 0.45 | 234.29 | 28.73 | 18.88 | 2.32 |
| 3 | 33.84 | 4.83 | 371.87 | 5.80 | 10.99 | 0.17 |
| 4 | 31.60 | 10.92 | 52.10 | 4.12 | 1.65 | 0.13 |
| 5 | 68.91 | 5.45 | 49.11 | 6.95 | 0.71 | 0.10 |
| 7 | 100.18 | 2.07 | 60.32 | 6.71 | 0.60 | 0.07 |

Tabla A10. Cutina 0.4%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 5.33 | 0.64 | 23.45 | 1.31 | 4.40 | 0.24 |
| 2 | 13.22 | 0.96 | 174.32 | 10.64 | 13.18 | 0.80 |
| 3 | 32.03 | 2.49 | 348.59 | 29.10 | 10.91 | 0.93 |
| 4 | 21.26 | 4.04 | 57.81 | 4.96 | 2.72 | 0.23 |
| 5 | 49.54 | 4.12 | 38.23 | 1.96 | 0.77 | 0.04 |
| 7 | 94.74 | 5.53 | 86.38 | 6.73 | 0.91 | 0.07 |

Tabla A11. Cutina 0.5%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|--------|---------------|--------|-----------------|-------|
| 1 | 7.823 | 2.271 | 34.647 | 0.538 | 4.429 | 0.069 |
| 2 | 11.055 | 0.947 | 127.516 | 23.939 | 11.535 | 2.166 |
| 3 | 29.557 | 2.058 | 217.592 | 29.520 | 7.362 | 0.999 |
| 4 | 24.308 | 5.824 | 70.753 | 1.046 | 2.911 | 0.043 |
| 5 | 39.483 | 1.869 | 36.510 | 4.194 | 0.925 | 0.106 |
| 7 | 88.469 | 14.104 | 58.156 | 6.055 | 0.657 | 0.068 |

- Fuente de carbono.

Tabla A12. Cutina 0.2%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 2.38 | 0.19 | 38.57 | 1.49 | 16.21 | 0.63 |
| 2 | 11.10 | 0.07 | 216.42 | 19.29 | 19.50 | 1.74 |
| 3 | 27.34 | 0.09 | 531.14 | 49.21 | 19.4 | 1.8 |
| 4 | 38.84 | 1.60 | 92.00 | 5.62 | 2.4 | 0.1 |
| 5 | 65.13 | 1.28 | 74.93 | 3.62 | 1.2 | 0.1 |
| 7 | 88.65 | 2.28 | 123.14 | 1.90 | 1.4 | 0.0 |

Tabla A13. Glucosa 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 4.46 | 0.34 | 72.99 | 3.19 | 16.35 | 0.71 |
| 2 | 23.99 | 0.76 | 118.09 | 3.27 | 4.92 | 0.14 |
| 3 | 37.27 | 0.41 | 88.13 | 1.85 | 2.4 | 0.0 |
| 4 | 81.18 | 2.98 | 51.67 | 3.34 | 0.6 | 0.0 |
| 5 | 96.77 | 2.67 | 150.24 | 15.16 | 1.6 | 0.2 |
| 7 | 113.84 | 3.20 | 142.24 | 19.91 | 1.2 | 0.2 |

Tabla A14. Glucosa 1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 5.14 | 0.32 | 25.71 | 0.31 | 5.00 | 0.06 |
| 2 | 16.97 | 0.76 | 422.58 | 21.73 | 24.90 | 1.28 |
| 3 | 41.25 | 4.76 | 468.67 | 89.75 | 11.4 | 2.2 |
| 4 | 100.44 | 2.45 | 413.17 | 9.47 | 4.1 | 0.1 |
| 5 | 141.14 | 5.12 | 315.90 | 35.21 | 2.2 | 0.2 |
| 7 | 195.66 | 3.48 | 110.68 | 12.29 | 0.6 | 0.1 |

Tabla A15. Glicerol 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 5.24 | 0.32 | 36.27 | 8.53 | 6.92 | 1.63 |
| 2 | 27.48 | 0.71 | 329.35 | 53.69 | 11.99 | 1.95 |
| 3 | 24.45 | 3.94 | 859.08 | 63.93 | 35.14 | 2.62 |
| 4 | 49.31 | 2.73 | 112.15 | 17.90 | 2.27 | 0.36 |
| 5 | 107.38 | 9.64 | 91.67 | 3.11 | 0.85 | 0.03 |
| 7 | 129.06 | 1.39 | 97.08 | 6.70 | 0.75 | 0.05 |

Tabla A16. Glicerol 1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 7.66 | 0.28 | 18.65 | 0.43 | 2.44 | 0.06 |
| 2 | 15.81 | 0.70 | 41.88 | 3.07 | 2.65 | 0.19 |
| 3 | 48.99 | 0.25 | 420.70 | 87.36 | 8.6 | 1.8 |
| 4 | 108.55 | 0.77 | 533.58 | 19.55 | 4.9 | 0.2 |
| 5 | 156.00 | 6.81 | 390.59 | 33.87 | 2.5 | 0.2 |
| 7 | 196.77 | 4.47 | 158.09 | 8.80 | 0.8 | 0.0 |

Tabla A17. Sacarosa 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 7.36 | 0.13 | 29.39 | 16.89 | 3.99 | 2.29 |
| 2 | 8.56 | 4.31 | 287.96 | 7.43 | 33.64 | 0.87 |
| 3 | 17.30 | 1.31 | 271.92 | 7.18 | 15.72 | 0.42 |
| 4 | 60.38 | 22.67 | 184.48 | 2.93 | 3.06 | 0.05 |
| 5 | 102.03 | 23.47 | 121.29 | 5.54 | 1.19 | 0.05 |
| 7 | 157.29 | 6.54 | 175.93 | 5.33 | 1.12 | 0.03 |

Tabla A18. Almidón 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 3.69 | 0.06 | 32.94 | 19.71 | 8.93 | 5.34 |
| 2 | 20.31 | 0.62 | 513.73 | 67.16 | 25.29 | 3.31 |
| 3 | 12.73 | 4.06 | 234.43 | 4.73 | 18.41 | 0.37 |
| 4 | 36.39 | 18.18 | 89.29 | 2.56 | 2.45 | 0.07 |
| 5 | 83.39 | 21.33 | 79.66 | 1.61 | 0.96 | 0.02 |
| 7 | 125.37 | 3.02 | 125.42 | 2.51 | 1.00 | 0.02 |

Tabla A19. Aceite de olivo 0.1%

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|-------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 1.68 | 0.16 | 13.15 | 16.52 | 7.83 | 9.84 |
| 2 | 20.31 | 0.39 | 148.31 | 4.24 | 7.30 | 0.21 |
| 3 | 40.66 | 0.64 | 138.50 | 17.68 | 3.41 | 0.43 |
| 4 | 45.20 | 10.79 | 90.69 | 2.62 | 2.01 | 0.06 |
| 5 | 38.75 | 6.09 | 62.85 | 3.25 | 1.62 | 0.08 |
| 7 | 130.72 | 6.29 | 90.84 | 5.07 | 0.69 | 0.04 |

- Fuente de Nitrógeno.

Tabla A20. NaNO₃

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 3.61 | 0.50 | 8.10 | 2.42 | 2.24 | 0.67 |
| 2 | 6.81 | 0.24 | 292.14 | 51.44 | 42.89 | 7.55 |
| 3 | 16.14 | 0.71 | 344.40 | 22.44 | 21.3 | 1.4 |
| 4 | 32.01 | 1.14 | 98.34 | 25.50 | 3.1 | 0.8 |
| 5 | 48.06 | 2.18 | 45.46 | 5.01 | 0.9 | 0.1 |
| 7 | 63.10 | 2.49 | 64.77 | 3.51 | 1.0 | 0.1 |

Tabla A21. KNO₃

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|--------|-----------------|-------|
| 1 | 9.19 | 0.15 | 364.16 | 107.37 | 39.63 | 11.69 |
| 2 | 15.44 | 0.39 | 1096.05 | 91.10 | 71.00 | 5.90 |
| 3 | 30.26 | 1.67 | 791.35 | 411.66 | 26.15 | 13.60 |
| 4 | 37.82 | 0.46 | 255.50 | 33.43 | 6.76 | 0.88 |
| 5 | 50.65 | 1.46 | 89.86 | 5.84 | 1.77 | 0.12 |
| 7 | 88.19 | 0.21 | 143.27 | 2.05 | 1.62 | 0.02 |

Tabla A22. NH₄NO₃

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 3.80 | 0.21 | 6.50 | 0.57 | 1.71 | 0.15 |
| 2 | 3.00 | 0.24 | 138.57 | 21.08 | 46.22 | 7.03 |
| 3 | 3.06 | 0.09 | 104.61 | 14.13 | 34.21 | 4.62 |
| 4 | 3.34 | 1.07 | 61.07 | 6.09 | 18.29 | 1.82 |
| 5 | 1.88 | 0.07 | 4.54 | 0.72 | 2.42 | 0.39 |
| 7 | 1.75 | 0.43 | 23.43 | 3.49 | 13.37 | 1.99 |

Tabla A23. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 4.70 | 0.39 | 5.48 | 0.08 | 1.17 | 0.02 |
| 2 | 3.02 | 0.21 | 88.69 | 9.74 | 29.35 | 3.22 |
| 3 | 3.32 | 0.03 | 127.19 | 3.09 | 38.30 | 0.93 |
| 4 | 8.21 | 0.34 | 104.06 | 8.62 | 12.67 | 1.05 |
| 5 | 15.41 | 0.37 | 33.68 | 15.28 | 2.19 | 0.99 |
| 7 | 24.56 | 0.12 | 59.98 | 4.46 | 2.44 | 0.18 |

Tabla A24. Urea

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 8.26 | 0.20 | 7.06 | 0.37 | 0.86 | 0.04 |
| 2 | 8.44 | 0.41 | 59.52 | 9.43 | 7.05 | 1.12 |
| 3 | 10.41 | 0.60 | 114.80 | 16.37 | 11.03 | 1.57 |
| 4 | 12.55 | 0.41 | 81.96 | 15.18 | 6.53 | 1.21 |
| 5 | 17.80 | 0.64 | 44.30 | 9.28 | 2.49 | 0.52 |
| 7 | 25.51 | 1.59 | 93.94 | 8.93 | 3.68 | 0.35 |

Tabla A25. Extracto de levadura

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 20.44 | 1.15 | 30.63 | 5.52 | 1.50 | 0.27 |
| 2 | 36.53 | 6.71 | 707.53 | 74.11 | 19.37 | 2.03 |
| 3 | 74.08 | 1.36 | 716.09 | 45.47 | 9.67 | 0.61 |
| 4 | 89.90 | 0.70 | 430.95 | 42.64 | 4.79 | 0.47 |
| 5 | 98.34 | 2.98 | 115.52 | 53.89 | 1.17 | 0.55 |
| 7 | 98.06 | 3.28 | 154.00 | 15.99 | 1.57 | 0.16 |

Tabla A26. Bactopeptona

| Tiempo (días) | Proteína | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|----------|------|---------------|--------|-----------------|------|
| 1 | 16.18 | 0.45 | 38.22 | 1.85 | 2.36 | 0.11 |
| 2 | 35.89 | 1.70 | 618.63 | 30.16 | 17.24 | 0.84 |
| 3 | 58.21 | 1.07 | 1020.88 | 113.68 | 17.54 | 1.95 |
| 4 | 615.77 | 9.81 | 267.73 | 46.54 | 0.43 | 0.08 |
| 5 | 83.03 | 0.21 | 141.63 | 3.47 | 1.71 | 0.04 |
| 7 | 84.50 | 2.26 | 161.99 | 10.78 | 1.92 | 0.13 |

- Medio mínimo (Mejores condiciones)

Tabla A27.

| Tiempo (días) | Proteína (µg/mL) | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|------------------|------|---------------|-------|-----------------|------|
| 1 | 5.48 | 0.63 | 286.03 | 46.11 | 52.20 | 8.41 |
| 2 | 32.70 | 0.70 | 61.49 | 9.88 | 1.88 | 0.30 |
| 3 | 67.53 | 3.47 | 56.04 | 7.70 | 0.8 | 0.1 |
| 4 | 84.59 | 2.88 | 75.62 | 5.25 | 0.9 | 0.1 |
| 5 | 59.59 | 1.21 | 45.16 | 1.44 | 0.8 | 0.0 |
| 7 | 101.75 | 1.74 | 155.05 | 5.75 | 1.5 | 0.1 |

- Medio optimizado (cutinasa 28 KDa)

Tabla A28.

| Tiempo (días) | Proteína (µg/mL) | DS | Act. Esterasa | DS | Act. Específica | DS |
|---------------|------------------|-------|---------------|--------|-----------------|------|
| 1 | 35.09 | 0.57 | 858.14 | 199.50 | 24.45 | 5.69 |
| 2 | 127.21 | 12.21 | 74.47 | 2.28 | 0.59 | 0.02 |

XII. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar C. N. *et al.* (2001) Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. *Process Biochemistry* **36**: 565-570

Andersen *et al.* (2011) Comparative genomics of citric-acid-producing *Aspergillus niger* ATCC 1015 versus enzyme-producing CBS 513.88. *Genome Research* **21**: 885-897

Badenes, S.M., Lemos, F. y Cabral, J.M.S. (2010) Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnology Letters* **32**, 399–403

Berry D. R. *Physiology of industrial fungi.* (1988) Blackwell Scientific Publications. London.

Biesebeke R. y Record E. (2008). *Scientific Advances with Aspergillus Species that Are Used for Food and Biotech Applications.* *Microbes and Environments* **3**: 177-181.

Bradford, M (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248-254.

Calado, C. y Taipa A. (2002). Optimisation of culture conditions and characterisation of cutinase produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology **31**: 161-170.

Carvalho C. M., Aires-Barros, M. R., Cabral, J. M. (1998) Cutinase Structure, function and biocatalytic applications. Electronical Journal of Biotechnology **1(3)**, 28-29.

Castro, *et al.*, (2012) AN CUT2, An extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. Applied Biochemistry and Biotechnology. Sometido.

Chahinian, H. y Nini, L. (2002) Distinction between esterases and lipases: A kinetic study of vinyl esters and TAG. Lipids **37**, 653-662.

Chen, S. y Tong, X. (2008) Identification and characterization of bacterial cutinase. The Journal of Biological Chemistry **283**, 25854-25862.

Chen, S. y Liu, Z. (2011) Study on Improvement of Extracellular Production of Recombinant *Thermobifida fusca* Cutinase by *Escherichia coli*. Biochemistry Biotechnology **165**, 666-675.

Constantine A. J. Introducción a la Micología. (1985) Ediciones Omega. Barcelona.

Corzo G. y Revah S. (1999) Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bioresource Technology **70**: 173-180.

Creveld, L. D. *et al.* (2001) DSC studies of *Fusarium solani pisi* cutinase: consequences for stability in the presence of surfactants. Biophysical Chemistry **92**, 65-75.

Degani, O. Hussein, S., Hepstein, S. y Dosoretz, C. (2006) Synthesis and characterization of a new cutinase substrate, 4-nitrophenyl (16-methyl sulfone ester) hexadecanoate. Journal of Biotechnology **121**: 346-350.

Demain A. y Davies J. E. (1999) Manual of industrial microbiology and biotechnology, second edition. ASM PRES. Washinton D.C.

Diaz Zagoya J C., (1995) Bioquímica. Editorial Interamericana McGraw-Hil. México D.F.

Dutta, K., Sen, S. y Dasu, V..(2009) Production, characterization and applications of microbial cutinases. Process Biochemistry. **44** 127-134.

Egmond, M. R. (2000) *Fusarium solani pisi* cutinase. Biochimie **82**, 1015-1021

Esqueda, K., Segoviano, L., Peña Montes, C., Navarro. Ocaña, A y Farrés, A (2011) Identificación de una nueva cutinasa ANID5309.1 de *Aspergillus nidulans* y factores que afectan su producción. Congreso Nacional de Bioquímica y Bioingeniería. Querétaro, Juriquilla.

Fett W.F. *et al.* (1999) Production of cutinase by *Thermomonospora fusca* ATCC 27730. Journal of Applied Microbiology **86**: 561-568.

Flipsen J.A.C., van der Hijden, H.T.W.M., y Verheij, H.M. (1996). Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterisation of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop densitometer as a tool to lipase kinetics. *Chemistry and Physics of Lipids* **84**, 105-115

Fontes P. y Alves M. (2005) A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology* **36**:388-394.

Fontes, T. Alves, G. (2007) Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme and Microbiology Technology* **41** 613-619.

García-Lepe R., Nuero O.M., Reyes F., Santamaría F. (1997) Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*. **25**: 127 – 130.

Hicks J.J. (2001) *Bioquímica*. Editorial McGraw-Hill. México.

Jaeger K.E. y Dijkstra B. W., (1999) Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews. Microbiology* **53**, 315-351

Käfer E., Hill T.W. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace elements and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter*. **48**: 20-21.

Kavlock, R. *et al.* (2002) NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive

and developmental toxicity of di-*it* n-hexyl phthalate. *Reproductive Toxicology* **16**, 709–719.

Kolattukudy *et al.* (1991) Cutinase cleaning compositions. US patent 4,981,611.

Larcher G. *et al.* (1992). Purification and characterization of a fibrinogenolytic serine proteinase from *Aspergillus fumigates* culture filtrate. *Federation of European Biochemical Societies* **1**. 65-69.

Lehninger A. L. (1993) *Principles of Biochemistry*. 2a Ed. Worth Publishers Inc. New York.

Lin T.S., Kolattukudy P.E. (1977) Induction of a biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *Journal of Bacteriology* **133**, 942-951

MacCabe A. P. *et al.* (2002). Improving extracellular production of food-use enzymes from *Aspergillus nidulans*. *Journal of Biotechnology* **96**: 43-54.

Madigan, M.T, Martinko, J. M. and Parker, J., (2000) *Brock Biology of microorganisms*, 9th edition, New Jersey, Prentice Hall.

Meyer V. (2008). Genetic of engineering of filamentous fungi- Progress, obstacles and future trends. *Biotechnology advances*. **26**: 177-185.

Meyer V. *et al.* (2011). *Aspergillus* as a multi-purpose cell factory: current status and perspectives. *Biotechnology Letters* **33**: 469-476

Nardini M. y Bauke, D. (1999) α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* **9**: 732-737

Nawani, N., Singh, R. y Kaur, J., (2006). Immobilization and stability Studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp. The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*. **9 (5)**, 559-565

Pelzcar. 1970 Jr. *Microbiología*. Editorial Mc Graw Hill. México.

Peña-Montes, C., Gonzalez, A., Castro-Ochoa, D. y Farrés, A. (2008). Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **78(4)**, 603-612

Pocalyko D. J. y Tallman, M. (1998) Effects of amphipaths on the activity and stability of *Fusarium solani pisi* cutinase Enzyme and *Microbial Technology* **22**: 647-651.

Powell, K.A; Renwick, A. y Peberdy, J.F. 1994. *The genus Aspergillus: from taxonomy and genetics to industrial application*. Ed. Plenum Press.

Purdy, R.E. y Kolattukudy, P.E. (1975). Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens, purification, amino acid composition, and molecular

weight of two isozymes of cutinase and nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi*. Biochemistry **14(13)**, 2824-2831

Rispoli, F. y Shan, V. (2008) Optimization of the media ingredients for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum* using mixture design experiments. Biotechnology Progress **24**, 648-654

Rispoli F. y Shah, V. (2007) Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology **34**: 349-355

Ruijter G. y Visser, J. (1997) Carbon repression in Aspergilli. Microbiology Letters **151**: 103-114.

Sánchez S. y Farrés A. (1987) Regulación de enzimas microbianas. En: López Agustin y Quintero Rodolfo (Eds.). Tecnología enzimática. Aplicaciones en alimentos y medicina. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF.

Sanchez S. y Demain, A. (2002) Metabolic Regulation of fermentation processes. Enzyme and Microbial Technology **31** 895-906.

Shanmugaprakash M. *et al.* (2011). Solid-state fermentation for the production of debittering enzyme naringinase using *Aspergillus niger* MTCC 1344. Eng. Life Sci. **3**: 322-325.

Singh A. K. y Mukhopadhyay M. (2011). Overview of Fungal Lipase: A Review. Applied Biochemistry and Biotechnology.

Stryer L. Berg J, Tymoczko J. (2003) "Bioquímica" Ed. Reverte, 5º edición.

Taiz, L. y Zeiger, E. Fisiología Vegetal. 2006 Volumen 1. Editorial. Universitat Jaume I.

Tortora, G. J., Funke, B. R. and Case, C. L., (2001) Microbiology an Introduction, 7th edition, USA., Addison Wesley Logman.

Vergara, B. (2010) Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de maestria. UNAM.

Voet. (2004) Biochemistry. New York, Wiley

Walton y Kolattukudy (1972) Determination of the structures of cutine monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. Biochemistry **11**: 1885-1896.

Wortman J.R. y Gilsenan J.M. (2009) The 2008 update of the *Aspergillus nidulans* genome annotation: A community effort. Fungal Genetics and Biology **46**, S2-S13