



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

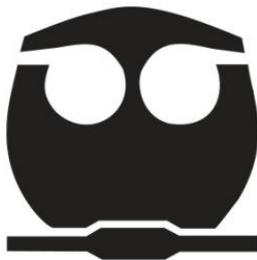
**INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
BIOQUÍMICA DE CARBOXILESTERASAS
DE *Aspergillus nidulans* PW1.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
*QUÍMICO DE ALIMENTOS***

PRESENTA

José Augusto Castro Rodríguez



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Bertha Reséndiz Vázquez

VOCAL: Jesús Fernando Montiel Aguirre

SECRETARIO: Carolina Peña Montes

1er. SUPLENTE: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Amelia María de Guadalupe Farrés González- Saravia

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. Carolina Peña Montes

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González – Saravia

SUSTENTANTE

José Augusto Castro Rodríguez

Este trabajo se presentó en el siguiente evento en la modalidad oral:

- **“Immobilization of carboxylesterases produced by *Aspergillus nidulans* in different supports to be used in biodiesel production”, 12th**

International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganism. June, 2013 in Cancún, Quintana Roo, México.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
Marco Teórico	3
1.Enzimas	4
1.1 Características generales de las enzimas	6
1.2 Actividad Enzimática	7
2. Hidrolasas	8
2.1 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos	8
2.2 Cutinasas	8
2.2.1 Características de las cutinasas	10
2.3 Carboxilesterasas	10
2.4 Proteasas	11
2.5 Estructura y mecanismo catalítico de las hidrolasas	13
2.6 Aplicaciones de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos	16
2.7 Género <i>Aspergillus</i> .	18
2.7.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	19
2.8 Inmovilización de enzimas	20
2.8.1 Métodos de inmovilización	21
2.8.1.1 Métodos por unión química	21
Unión covalente	21
Reticulado o entrecruzamiento	22
2.8.1.2 Métodos de inmovilización por retención física.	23
Atrapamiento	23
Inclusión de membranas	24
Adsorción	24
2.8.1.3 Consideraciones para la selección del proceso de inmovilización	26
2.8.2 Soportes	28
2.9 Antecedentes experimentales de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos de <i>Aspergillus nidulans</i> en el grupo de trabajo.	29
Justificación	31
Hipótesis	33

Objetivos	35
Desarrollo Experimental	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Reactivos y equipos	38
3. Microorganismo	40
3.1 Reactivación de <i>A. nidulans</i> PW1 y cosecha de esporas	40
3.2 Preparación del medio mínimo de cultivo	41
3.3 Medio optimizado para ANCUT1	42
3.4 Medio optimizado para PrtA	43
3.5 Medio optimizado para ANCUT2	45
3.6 Producción de NStcI recombinante	46
3.7 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína	49
3.7.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca	49
3.7.2 Cuantificación de proteína en microplaca	49
3.7.3 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca (con ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo)	50
3.8 Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida	51
3.8.1 Electroforesis	51
3.8.2 Zimogramas	51
3.8.3 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	52
3.9 Inmovilización	52
3.10 Caracterización del extracto crudo y el inmovilizado	57
3.10.1 pH óptimo	57
3.10.2 Estabilidad a pH	58
3.10.3 Temperatura óptima	58
3.10.4 Estabilidad térmica	59
3.10.5 Especificidad por sustrato	59
3.10.6 Estabilidad operacional (reuso del biocatalizador)	60
3.10.7 Estabilidad al almacenamiento	60
Resultados y Discusión	61
4.1 Producción de las enzimas	62

4.2 Inmovilización	64
4.3 Caracterización de ANCUT2	67
4.3.1 Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo	67
4.3.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los inmovilizados de ANCUT2	68
4.3.3 Evaluación de la estabilidad al pH de los biocatalizadores	70
4.3.4 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores, enzima libre e inmovilizada	70
4.3.5 Determinación de la estabilidad térmica de ANCUT2 libre e inmovilizada	71
4.3.6 Especificidad de sustrato	72
4.3.7 Reuso del biocatalizador	72
4.3.8 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución	73
4.4 Caracterización de ANCUT 1	74
4.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada	74
4.4.2 Evaluación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada	76
4.4.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores	76
4.4.4 Determinación de la estabilidad térmica de la enzima en solución e inmovilizada	77
4.4.5 Especificidad de sustrato	77
4.4.6 Reuso del biocatalizador	78
4.4.7 Estabilidad al almacenamiento de las enzimas inmovilizadas y en solución	78
4.5 Caracterización de NStCl	80
4.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada	80
4.5.2 Evaluación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada	81
4.5.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada	82
4.5.4 Determinación de la estabilidad térmica de la enzima en solución e inmovilizada	83
4.5.5 Especificidad de sustrato	83
4.5.6 Reuso del biocatalizador	83
4.5.7 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución	84
4.6 Caracterización de PrtA	85

4.6.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los inmovilizados de PrtA_	85
4.6.2 Evaluación de la estabilidad al pH de los biocatalizadores _____	86
4.6.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores _____	87
4.6.4 Determinación de la estabilidad térmica de PrtA libre e inmovilizada_____	87
4.6.5 Especificidad de sustrato _____	88
4.6.6 Reuso del biocatalizador _____	88
4.6.7 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución__	89
Conclusiones _____	95
PERSPECTIVAS _____	98
BIBLIOGRAFÍA _____	100
ANEXOS _____	109
ANEXO A: Gráficos de la caracterización bioquímica de los diferentes biocatalizadores estudiados. _____	110
ANEXO B: Cámara de Neubauer o Hematocímetro para conteo de esporas. _____	138
ANEXO C: Curva de calibración para cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford _____	139
ANEXO D: Curvas de calibración de p-nitrofenol para la cuantificación de actividad enzimática. _____	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas _____	5
Tabla 2. Producción de biodiesel _____	17
Tabla 3. Aplicaciones de hidrolasas en la industria _____	18
Tabla 4. Enzimas y metabolitos producidos por el género <i>Aspergillus</i> _____	19
Tabla 5. Agente acoplador para unión covalente _____	22
Tabla 6. Comparación de los métodos de inmovilización _____	27
Tabla 7. Clasificación de soportes _____	28
Tabla 8. Características de los soportes en estudio _____	29
Tabla 9. Reactivos y marcas _____	38
Tabla 10. Composición del medio mínimo para el crecimiento de <i>Aspergillus nidulans</i> PW1 _____	41
Tabla 11. Composición de solución de sales 20x _____	42
Tabla 12. Composición de solución de elementos traza 100x _____	42
Tabla 13. Composición del medio optimizado para ANCUT1 _____	43
Tabla 14. Composición del medio optimizado para PrtA _____	44
Tabla 15. Composición del medio optimizado para ANCUT2 _____	45
Tabla 16. Composición del medio YPD _____	46
Tabla 17. Composición del medio BMGY _____	47
Tabla 18. Composición del medio BMMY _____	48
Tabla 19. Rendimientos de la inmovilización de ésteres de hidrolasas de ácidos carboxílicos _____	64
Tabla 20. Eficiencia de la inmovilización (E%) y rendimiento de proteína (P%) de las carboxilesterasas de <i>A. nidulans</i> en diferentes soportes _____	65

Tabla 21. Carcaterización bioquímica de la ANCUT2 libre e inmovilizada	67
Tabla 22. Carcaterización bioquímica de la ANCUT1 libre e inmovilizada	74
Tabla 23. Carcaterización bioquímica de la NStcl libre e inmovilizada	80
Tabla 24. Carcaterización bioquímica de la PrtA libre e inmovilizada	85
Tabla 25. Enzimas inmovilizadas en Accurel MP 1000	90
Tabla 26. Enzimas inmovilizadas en Celite 545	91
Tabla 27. Enzimas inmovilizadas en Quitosano	92
Tabla 28. Enzimas inmovilizadas en Nylon 6	93
Tabla 29. Interacciones enzima-soporte	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig 1. Energía de activación y estado de transición _____	4
Fig 2. Unidad estructural de cutina _____	10
Fig 3. Reacción de hidrólisis de carboxilesterasas _____	11
Fig 4. Clases de proteasas y sus centros activos _____	12
Fig 5. Plegamiento de las α/β hidrolasas _____	14
Fig 6. Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas _____	15
Fig 7. Unión covalente. (A) residuo de aminoácido de la _____ enzima, (B) grupo funcional de unión al soporte, (C) soporte. (En) enzima	21
Fig 8. Inmovilización por entrecruzamiento. _____	22
Fig 9. Inmovilización por atrapamiento _____	23
Fig 10. Inmovilización por inclusión _____	24
Fig 11. Inmovilización por adsorción _____	25
Fig 12. Accurel MP1000 _____	53
Fig 13. Celite 545 _____	54
Fig 14. Nylon 6 _____	55
Fig 15. Esfera de quitosano precipitado a pH alcalino _____	56
Fig 16. Zimograma para la determinación de actividad de _____ esterasa usando como sustrato α -Naftil acetato y como revelador Fast red	62
Fig 17. Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la _____ ANCUT2 inmovilizada en Quitosano	69
Fig 18. Estabilidad térmica de la ANCUT2 inmovilizada en _____ Celite 545	71
Fig 19. Estabilidad al almacenamiento a 4°C y temperatura _____ ambiente de la ANCUT2 inmovilizada en Celite 545	73

Fig 20. Efecto del pH sobre la ANCUT1 inmovilizada en Celite 545 y Quitosano	75
Fig 21. Ciclos de reuso del biocatalizador	78
Fig 22. Almacenamiento del biocatalizador a 4°C y temperatura ambiente	79
Fig 23. Estabilidad al pH de la NStcl inmovilizada en Celite 545	82
Fig 24. Estabilidad al almacenamiento de la PrtA inmovilizada en Celite 545 a 4°C y a temperatura ambiente	89

INTRODUCCIÓN

Las enzimas, catalizadores de los sistemas biológicos, son moléculas de gran interés en la industria por sus diversas aplicaciones. Las características más destacadas son su poder catalítico y su especificidad. La catálisis tiene lugar en un centro específico del enzima llamado centro activo. Casi todas las enzimas conocidas son proteínas, aunque el descubrimiento de moléculas de ARN catalíticamente activo proporciona una evidencia concluyente de que esta molécula fue un biocatalizador primitivo en la evolución.

Las proteínas pueden llevar a cabo esta función debido a su capacidad para unirse específicamente a un gran número de moléculas. Utilizando el repertorio completo de fuerzas intermoleculares, las enzimas acercan los sustratos hasta lograr una orientación óptima, acción requerida para la generación o ruptura de enlaces químicos. Las enzimas catalizan las reacciones mediante la estabilización de los estados de transición, que son las especies químicas de más alta energía generada en una reacción. Con esta acción el catalizador determina cuál de las distintas reacciones químicas potenciales va a tener lugar.

Las enzimas tienen ventajas sobre los catalizadores químicos entre ellas se encuentran: capacidad de realizar una amplia gama de reacciones químicas tanto de síntesis como hidrólisis, alta especificidad, alto rendimiento de productos sin la generación de subproductos, actividad catalítica a diferentes valores de pH y temperatura. Por estas características la industria se ha interesado en su uso para diferentes aplicaciones dentro de los procesos, pero por las diferentes condiciones de los mismos las enzimas se vuelven inestables y pierden actividad por modificaciones estructurales, por lo que se busca una estrategia para estabilizarlas. Una de ellas es la inmovilización, que consiste en colocar la enzima en un soporte para formar una estructura insoluble que retiene la actividad catalítica y que permite reutilizar el biocatalizador. Existen diferentes técnicas de inmovilización, ya sea física o química.

El género *Aspergillus*, y en especial la especie *Aspergillus nidulans*, es capaz de producir hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos y proteasas con actividad promiscua de esterasa, capaces de llevar a cabo reacciones de hidrólisis y síntesis. Por lo tanto, se considera que los catalizadores biológicos presentes en el sobrenadante de cultivos de *Aspergillus nidulans* PW1 pueden generar biocatalizadores atractivos, por lo

que en el presente trabajo se planteó su inmovilización y caracterización para su eventual aplicación en biocatálisis.

Marco Teórico

1. Enzimas

Las enzimas son proteínas desarrolladas por las células de organismos vivos con la función específica de catalizar reacciones *in vivo*. De acuerdo a las condiciones de reacción, pueden catalizar una reacción en dos sentidos, por ejemplo, síntesis e hidrólisis en el caso de hidrolasas. También son capaces de catalizar *in vitro* reacciones en las que se emplean sustratos naturales o no naturales (Arroyo, 1995). Una parte importante en la síntesis e hidrólisis es que disminuyen la energía de activación que se requiere para llevar a cabo una reacción; esta actividad catalítica es específica (Fig 1).

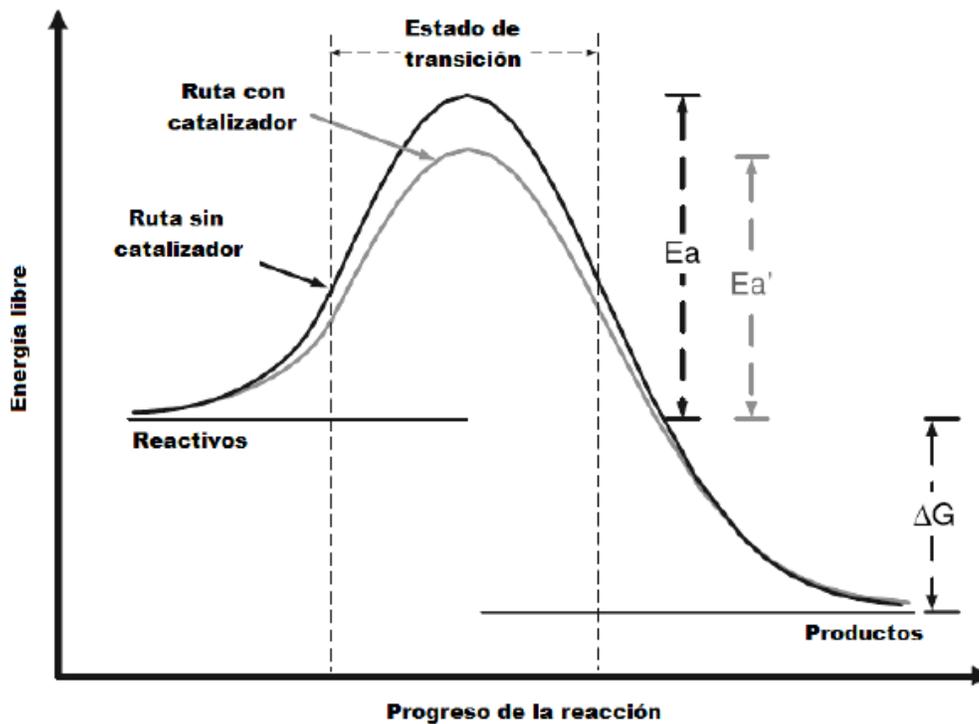


Figura 1. Energía de activación y estado de transición (Illanes,2008).

En esencia, catalizan las reacciones mediante la estabilización de los estados de transición, que son las especies de más alta energía en la reacción (Berg, *et al.*, 2007). De acuerdo con la reacción que catalizan, las enzimas se clasifican en:

Tabla 1. Clasificación internacional de las enzimas

1.OXIDO REDUCTASAS (Reacciones de óxido-reducción)	1.1 Actúan sobre alcoholes 1.2 Actúan sobre cetonas 1.3 Actúan sobre alquenos 1.4 Actúan sobre grupo amino 1.5 Actúan sobre grupo imino
2.TRANSFERASAS (Transferencia de grupos funcionales)	2.1 Grupos de un átomo de C 2.2 Grupos carbonilo 2.3 Grupos glucosilo 2.4 Grupos fosfato 2.5 Grupos que contienen S
3. HIDROLASAS (Reacciones de hidrólisis)	3.1 Ésteres 3.2 Enlaces glucosídicos 3.3 Enlaces peptídicos 3.4 Otros enlaces C-N 3.5 Anhídridos de ácido
4. LIASAS (Adición a dobles enlaces)	4.1 C=C 4.2 C=O 4.3 C=N
5. ISOMERASAS (Reacciones de isomerización)	5.1 Racemasas
6. LIGASAS (Formación de enlaces con escisión de ATP)	6.1 Entre átomos de C y O 6.2 Entre átomos de C y S 6.3 Entre átomos de C y N 6.4 Entre átomos de C y C

(López, 1996)

Debido a su naturaleza proteica, las enzimas son muy sensibles a los cambios que se producen en su entorno. La presencia de disolventes orgánicos, una concentración alta de sales, un pH o temperatura extrema, pueden provocar la

desnaturalización de la enzima, es decir, la pérdida de sus estructuras secundaria, terciaria y cuaternaria, por lo que la enzima pierde actividad al haber cambios en su conformación. (Arroyo, 1995).

1.1 Características generales de las enzimas

- Disminuyen la energía de activación, facilitando el inicio de una reacción, es decir, son agentes que afectan la velocidad de una reacción química, sin participar como reactantes y sin aparecer en los productos finales de la reacción.
- Se requieren en cantidades mínimas.
- Alta especificidad. Una enzima generalmente cataliza una sola reacción, aunque en casos raros es capaz de actuar sobre varias reacciones íntimamente relacionadas (promiscuidad enzimática). El grado de especificidad por el sustrato es, por lo general, muy alto.
- Pueden ser regulables (alostéricas).
- Su actividad catalítica puede estar influenciada por la concentración de sustratos, productos y otras especies químicas presentes en solución.
- Ciertas enzimas pueden requerir la presencia de cofactores ó coenzimas para que sean activas (Hicks, 2001).

Cada catalizador, así como también cada biocatalizador, pueden caracterizarse por tres dimensiones básicas, es decir, la actividad, selectividad y estabilidad.

La selectividad de los biocatalizadores es mucho mejor que la de catalizadores no biológicos, por lo que se han desarrollado para su aplicación de acuerdo a su enantio-, quimio- o regioselectividad.

Como la actividad es una medida necesaria en los protocolos experimentales, la actividad enzimática es estudiada y fácil de medir. En contraste con otros

catalizadores, la mayoría de las enzimas son sólo activas y estables en una temperatura y rango de pH muy limitado.

A diferencia de la actividad, la estabilidad de las enzimas a menudo se interpreta como estabilidad térmica, una temperatura más allá de la cual la enzima pierde actividad, aunque los inhibidores, oxígeno, un valor de pH inadecuado, u otros factores tales como el estrés mecánico o de cizalla, pueden influir decisivamente en la estabilidad. La estabilidad térmica de la proteína, a menudo empleada en la bioquímica de proteínas, se caracteriza por la temperatura de fusión, que es la temperatura a la que una proteína se encuentra en equilibrio entre las especies nativa (N) y desplegada (U), $N \leftrightarrow U$. La temperatura de fusión de una proteína está influenciada por una parte por su secuencia de aminoácidos, por el número de puentes disulfuro y los puentes salinos, así como por la concentración de sal añadida. La estabilidad a una cierta temperatura depende del tiempo de exposición a la misma para aplicaciones de procesos biocatalíticos, pero es más importante la estabilidad del proceso o de funcionamiento, que es la estabilidad a largo plazo en las condiciones específicas para cada proceso que se vaya a efectuar.

1.2 Actividad Enzimática

El valor de la actividad enzimática se reporta en unidades internacionales (IU) o sólo unidades (U).

1 unidad = 1 IU = 1U = 1 μ mol/min.

En muchos casos el valor de la actividad total de la enzima no da mucha información, en cambio si es referida a la masa del biocatalizador conocida como actividad específica (U/mg proteína) o la actividad basada en la unidades por volumen, actividad volumétrica (U/ml), es posible comparla con otros catalizadores (Bommarius y Riebel, 2004). Por otra parte, los datos de actividad no tienen sentido sin una especificación de las condiciones de ensayo en las cuales fue medida. Debido a que la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas

depende de la temperatura (T), de la concentración de sustrato [S], de la concentración de la enzima [E], 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 (Hicks, 2001).

Las enzimas hidrolíticas (lipasas, proteasas, esterasas, cutinasas, etc.) son las más empleadas en la industria. Estas enzimas son muy atractivas por sus características: bajo costo, amplia disponibilidad, especificidad de sustratos, actividad sin la necesidad de algún cofactor (Panda y Gowrishankar, 2005).

2. Hidrolasas

Las hidrolasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un enlace químico en presencia de agua, tal como C-O, C-N, C-C, C-P, O-P. Dentro de esta categoría se encuentran:

2.1 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos

Las hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (EC 3.1.1.X) son un grupo de hidrolasas, las cuales transforman los ésteres en diferentes moléculas. Dentro de este grupo se encuentran: carboxilesterasas (EC 3.1.1.1), cutinasas (EC 3.1.1.74), lipasas (EC 3.1.1.3), entre otras (Castro *et al.*, 2012).

2.2 Cutinasas

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son serín hidrolasas específicas que catalizan la hidrólisis del polímero cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. Son enzimas que unen las propiedades funcionales de las lipasas y las esterasas. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos de cadena larga unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (Taiz y Zeiger, 2002), la cual es un componente de la cutícula de las plantas brindando una eficiente barrera contra la desecación y ataques por patógenos. La

degradación enzimática de la red es el primer paso de invasión, debido a que algunos microorganismos la utilizan como única fuente de carbono (Egmond y De Vlieg, 2000; Carvalho, 1998). Está formada principalmente por ácidos grasos de 16 C y 18 C, con grupos hidroxilo o epóxidos situados en la parte media de la cadena o al final, en el lado opuesto al grupo carboxilo (Kolattukudy, 1981); aunque la composición específica varía dependiendo de la especie de la planta o fruto. Las plantas que tienen un crecimiento rápido producen una cutina que contiene principalmente ácidos grasos de 16C (dihidroxipalmítico), mientras que plantas que tienen un crecimiento lento presentan ácidos grasos de 16C y 18C (Fig 2). Las cutinasas no solo muestran una actividad hidrolítica hacia cutina sino también hacia ésteres solubles, triglicéridos insolubles, fibras sintéticas, plásticos entre otros. (Chen *et al.*, 2010). La cutinasa del patógeno de chícharo *Fusarium solani pisi* es la más investigada, incluyendo su identificación genética, clonación, expresión, caracterización, elucidación de su estructura y aplicaciones (Egmond y De Vlieg, 2000). Desde entonces se han purificado cutinasas de varios hongos patógenos. La masa molecular de estas enzimas está típicamente en un rango entre 21 y 60 kDa. La producción de cutinasas parece ser altamente regulada por las condiciones de crecimiento del microorganismo empleado. La cutinasa de *F. solanio pisi* es reprimida por glucosa e inducida por cutina o sus mayores constituyentes. El grupo hidroxilo en la posición ω en el ácido graso es el factor importante para inducir la actividad (Carvalho *et al.*, 1998).

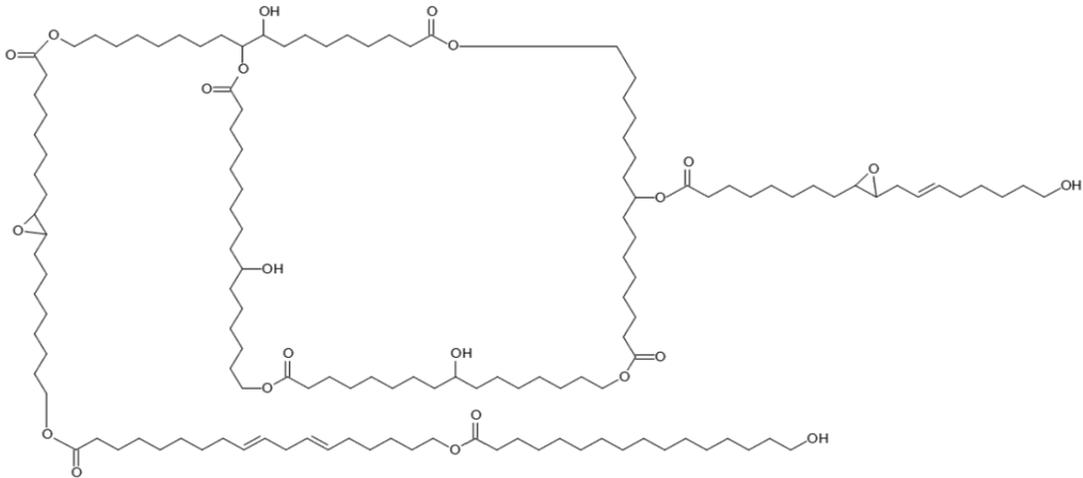


Figura 2. Unidad estructural de cutina.

2.2.1 Características de las cutinasas

Las cutinasas pertenecen a la familia de las serin hidrolasas con un plegamiento conocido como α/β hidrolasa, presentan la clásica triada catalítica compuesta por serina, histidina y un ácido carboxílico ya sea Aspártico o Glutámico, además de contar con el pentapéptido consenso Gly-His/Trp-Ser-X-Gly, y una cavidad oxianiónica preformada. El sitio catalítico de la cutinasa no está protegido por una tapa y no presenta actividad interfacial, siendo estas características particulares de las cutinasas (Borreguero *et al.* 1998; Carvalho, 2001; Egmond y De Vlieg, 2000).

2.3 Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas (EC 3.1.1.1) son enzimas que catalizan la hidrólisis de un éster carboxílico y se obtienen como subproductos un alcohol y un carboxilato (Fig 3). Representan un grupo diverso de hidrolasas que catalizan la ruptura y formación de enlaces ésteres. Estas enzimas muestran una alta regio- y estereoespecificidad, lo que las hace un atractivo biocatalizador para la producción de compuestos ópticamente puros en la síntesis de Química fina. Una de sus

principales características es que son enzimas que no requieren de cofactores para lograr su actividad, además que son estables y activas en solventes orgánicos. Son afines a ésteres solubles y triglicéridos de cadena corta, son menos enantioselectivas que las cutinasas y lipasas, no presentan activación interfacial (Peña, 2009; Bornschever T. Uwe, 2001).

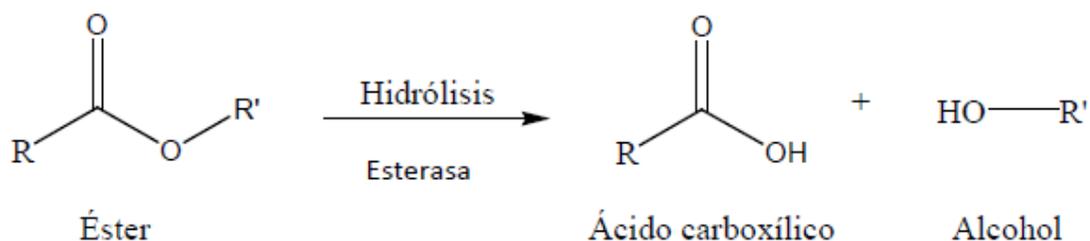


Figura 3. Reacción de hidrólisis de carboxilesterasas.

2.4 Proteasas

Las proteasas (EC 3.4) son enzimas cuya función principal es catalizar la ruptura del enlace amida en péptidos y proteínas. Sin embargo, algunas proteasas también catalizan la hidrólisis del enlace éster en ciertos sustratos (Berg *et al.*, 2007). Además, al igual que las carboxilesterasas, en medios no acuosos o de baja actividad de agua son capaces de realizar reacciones de síntesis como esterificación, transesterificación y aminólisis con alta regio- y estereoespecificidad de sustratos.

Estas enzimas pueden obtenerse de animales, plantas y microorganismos, siendo estos últimos las mejores fuentes para la producción de enzimas debido a su alto rendimiento de proteasas y su amplio rango de propiedades bioquímicas y catalíticas.

Los hongos son una fuente atractiva de proteasas debido a sus bajos requerimientos para su cultivo y manipulación genética. Los hongos filamentosos como *Aspergillus* crecen en medios que resultan económicos (Hernández *et al.*, 2011). Dentro de las proteasas se encuentran las proteasas alcalinas, que son una

clase de serin proteasas y son de considerable interés en vista de su actividad y estabilidad a pH alcalino. Estas últimas son un grupo de enzimas que se distingue por la reactividad de su residuo de serina, que lleva a cabo un mecanismo de reacción similar al de las lipasas, esterasas y cutinasas, lo cual indica una evolución a partir de un ancestro en común (Walsh y Wilcox; Guo y Ma, 2007).

No todas las proteasas utilizan a la serina como nucleófilo. Se han descubierto otras clases de proteínas que emplean tres opciones alternativas para la hidrólisis de enlaces peptídicos. Estas clases son: (1) cisteínproteasas, (2) aspartilproteasas y (3) metaloproteasas. En cada caso la estrategia consiste en generar un nucleófilo que ataca al grupo carbonilo del péptido. (Fig 4).

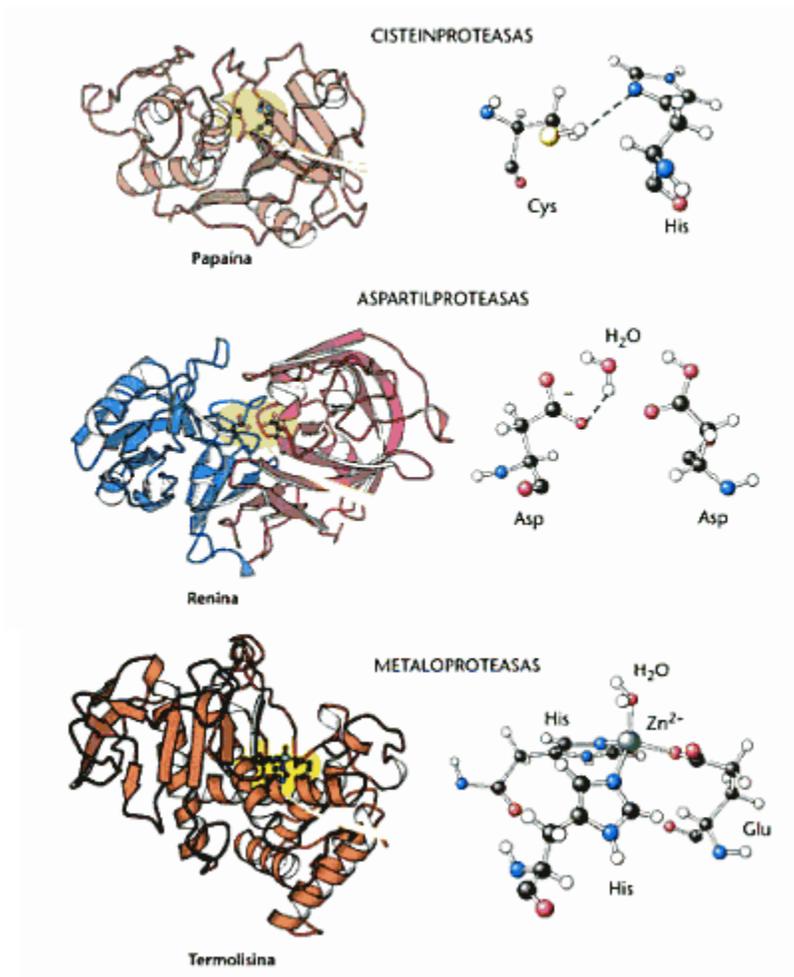


Figura 4. Clases de proteasas y sus centros activos (Berg *et al.*, 2007).

La estrategia utilizada por las cisteinproteasas es la más similar a las serinproteasas. En estas enzimas, un residuo de cisteína activado por un residuo de histidina, juega el papel de nucleófilo que ataca al enlace peptídico, de forma totalmente análoga a como lo hace el residuo de serina en las serinproteasas.

La siguiente clase comprende a las aspartilproteasas. La característica central de los sitios activos es una pareja de residuos de ácido aspártico que actúan juntos para favorecer el ataque de una molécula de agua al enlace peptídico. Uno de los residuos de ácido aspártico (en su forma desprotonada) activa a la molécula de agua desprotonándola. El otro residuo de ácido aspártico (en su forma protonada) polariza el carbonilo del enlace peptídico aumentando su susceptibilidad al ataque del nucleófilo.

En las metaloproteasas, el centro activo de estas enzimas contiene un ion metálico, casi siempre zinc, que activa una molécula de agua para actuar como nucleófilo y atacar el carbonilo del enlace peptídico (Berg *et al.*, 2007).

2.5 Estructura y mecanismo catalítico de las hidrolasas

Las lipasas, esterasas, cutinasas y serin proteasas son un tipo de enzimas que tienen como característica el plegamiento α/β presente en las hidrolasas. Este grupo de hidrolasas sirve como ejemplo de evolución divergente, donde proteínas con diferente función tienen una proteína ancestral en común (Peña, 2008). Las hidrolasas α/β tienen una estructura formada por ocho hojas β plegadas dispuestas paralelamente, a excepción de la β_2 , que se encuentra en sentido antiparalelo. De la hoja β_3 a la β_8 están conectadas por medio de α -hélices dispuestas en ambos lados (Fig 5).

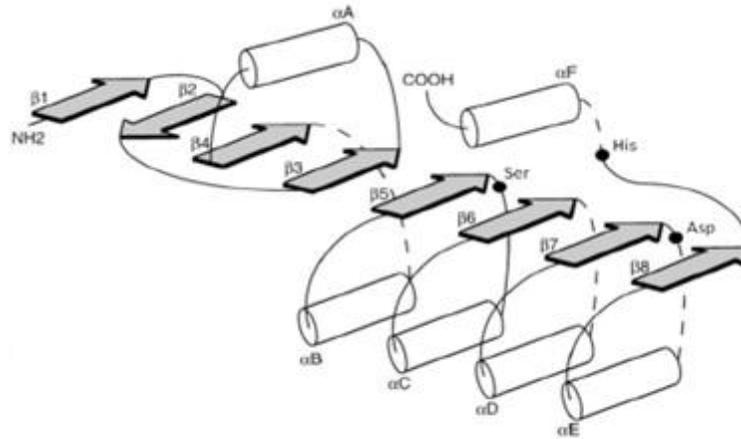


Figura 5. Plegamiento de las α/β hidrolasas (Jaeger y Reetz, 1998).

El sitio activo de estas hidrolasas α/β está formado por un residuo de serina (Ser), el cual es un aminoácido nucleófilico localizado en el extremo carboxílico de la hebra $\beta 5$, uno de histidina (His) que funciona como base general y un residuo ácido que puede ser glutámico (Glu) o aspártico (Asp), y en conjunto forman la triada catalítica. El residuo de serina está localizado en un pentapéptido altamente conservado (Gly-x-Ser-x-Gly) (Derewenda, 1993; Bornscheuer, 2001; Jaeger y Reetz, 1998; Schrag y Cygler, 1997).

El mecanismo de hidrólisis del sustrato consiste en el incremento del carácter nucleofílico de la serina por la transferencia de un protón del residuo de Histidina, conduciendo el ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible. Se forma un intermediario tetrahédrico, donde el átomo del oxígeno del carbonilo es cargado negativamente, y se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los grupos (R-NH) de la cadena principal. Estos residuos constituyen la cavidad oxianiónica que, en las carboxilesterasas, cutinasas y algunas lipasas es preformada. En seguida la histidina dona un protón al oxígeno del éster en el enlace en el cual se lleva a cabo la ruptura, se libera el alcohol y se forma un segundo intermediario con el ácido graso del sustrato que se encuentra esterificado a la serina (enzima

acilada). El siguiente paso es la reacción de desacetilación, en la que ocurre un ataque nucleofílico al átomo de carbono del carbonilo del intermediario covalente por parte de una molécula de agua, que provoca la ruptura del enlace éster entre la serina y el componente acilo y resulta en la liberación del producto y la regeneración de la enzima (Fig 6) (Jaeger *et al.*, 1999; Bornscheuer y Kazlauska, 2006).

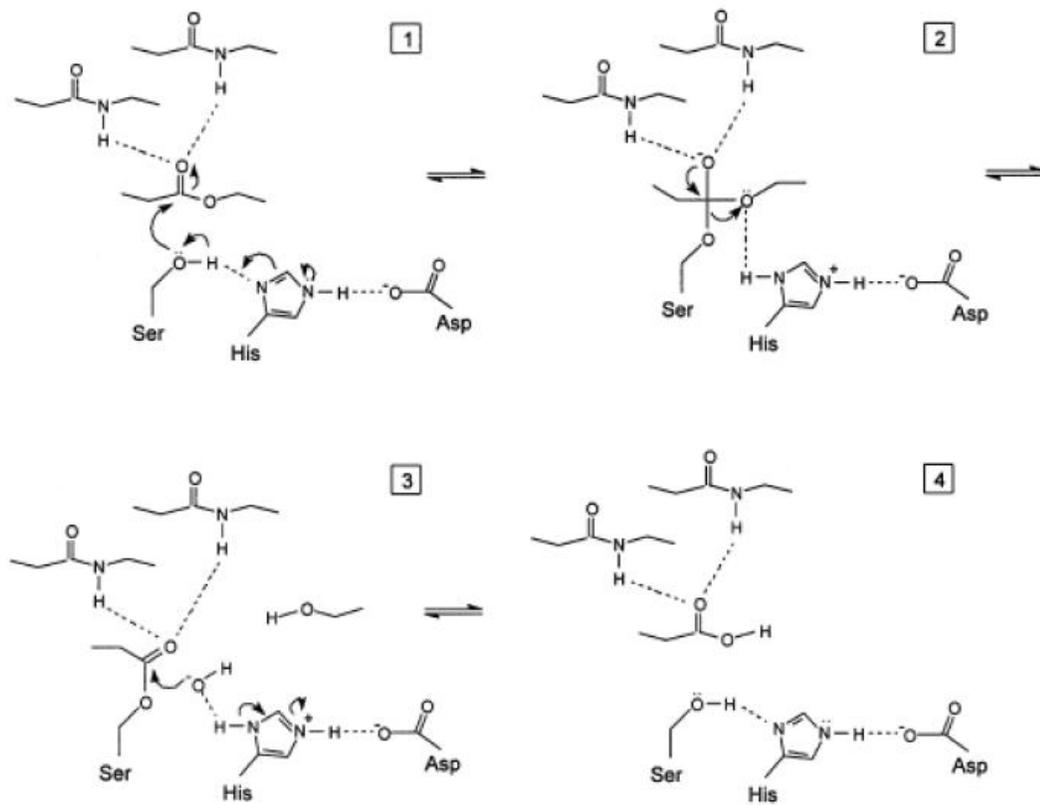


Figura 6. Mecanismo catalítico de las serín hidrolasas (Jaeger *et al.*, 1999).

2.6 Aplicaciones de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos

Cutinasas

Debido a la heterogeneidad de las estructuras que se encuentran en las esterificaciones de cutina, las cutinasas se han propuesto para uso en una amplia variedad de aplicaciones en diferentes procesos industriales (Carvalho *et al.*, 1998; Carvalho *et al.*, 1999; Fontes y Alves, 2009). Por ejemplo, han sido utilizadas como enzimas lipolíticas para la eliminación de grasa en la ropa sucia y en detergentes para lavavajilla, porque las cutinasas son activas tanto en ambientes acuosos como emulsionados (Flipsen *et al.*, 1997). Para el uso en la industria textil, específicamente en el algodón, han sido suficientemente probadas en combinación con pectin-lasas para mejorar la humectabilidad de tejidos de algodón en bruto (Degani *et al.*, 2002). Las cutinasas también se han aplicado en la modificación enzimática de la superficie de las fibras de poliéster (Halonen *et al.*, 2009).

En la industria alimentaria, las cutinasas se podrían utilizar para la apertura de la estructura de la pared celular en conjunto con otras enzimas que la degradan (por ejemplo, enzimas celulolíticas) o para facilitar la liberación de compuestos bioactivos, por ejemplo, de las cáscaras de vegetales o frutas del bosque. Por lo tanto, se podrían utilizar en la producción de derivados químicos de cutina a partir de los residuos de plantas en el procesamiento industrial de las frutas y vegetales. Otros usos potenciales incluyen la hidrólisis de la grasa de la leche en la industria láctea, aplicaciones en la industria oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel como una alternativa importante de combustibles (Tabla 2) (Carvalho *et al.*, 1999). Sin embargo, a pesar de su amplio potencial ninguna preparación de cutinasas se ha ofrecido para su uso a gran escala comercial hasta el momento (Halonen *et al.*, 2009).

Las carboxilesterasas se emplean a nivel industrial para el procesamiento de alimentos, bebidas, perfumería, degradación de materiales sintéticos (poliuretano, plásticos y poliésteres, síntesis de fármacos quirales, degradación de compuestos organofosforados (Peña, 2009; Bornschever T. Uwe, 2001).

Por otro lado las proteasas son enzimas usadas en muchos procesos y productos industriales incluyendo detergentes, panadería, cervecería, cárnicos, desproteización de camarón y cangrejo, fármacos, diagnósticos médicos, tratamiento de residuos, cuero y seda (Berg *et al.*, 2007; Bommarius, 2004). En la tabla 3 se muestran diversas aplicaciones de hidrolasas en la industria.

Tabla 2. Producción de biodiesel.

Enzima	Soporte	Condiciones	
Lipasa <i>Candida sp.</i>	Tela textil	45°C, Hexano	Chen <i>et al.</i> , 2008
Lipasa <i>Pseudomonas cepacia</i>	Resina de poliestireno	40°C, 200 rpm, 12h Metanol aceite 4:1	Li, 2010
Lipasa <i>Candida antártica</i>	Novozym 435	30°C, 150rpm, 20 ciclos, 3.5h	Samukawa <i>et al.</i> , 2000
Lipasa B <i>Candida antártica</i>	Novozym 435	37°C, 200rpm	Fedosov <i>et al.</i> , 2012
Lipasa <i>Candida rugosa</i>	Quitosano	35°C,30h y Metanol aceite 4:1	Xie, 2011
Lipasa <i>Burkholderia sp.</i>	Nanomaterial	40°C, 600rpm, 48h	Tran <i>et al.</i> , 2012
Lipasa <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Poliuretano	40°C,10 ciclos, Metanol aceite 6:1	Dizge, 2008
Lipasa <i>Candida sp</i>	Membrana textil	50°C, 24h	Tan <i>et al.</i> , 2010
Lipasa <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Poliresina	30°C, 10h, Metanol aceite 6:1	Kim <i>et al.</i> , 2012
Lipasa <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Matriz polimerica	25°C, 10 ciclos, 24h	Dizge <i>et al.</i> , 2008
Lipasa <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Olive pomace	25°C, 10 ciclos, 24h	Yüzel, 2010
Lipasa <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Copolimero de estireno-divinilbenceno	50°C, 10 ciclos, 24h	Dizge <i>et al.</i> , 2008
Lipasa <i>Burkholderia sp.</i>	Partículas magnéticas hidrofóbicas	30°C Metanol aceite 4:1	Liu <i>et al.</i> , 2012

Tabla 3. Aplicaciones de hidrolasas en la industria.

Enzima	Aplicación	Condiciones	
Cutinasa Proteasa	Detergentes	20 a 50°C y pH 8-11	Dutta <i>et al.</i> ,2008 Bommarius y Riebel, 2004
Cutinasa	Aguas residuales de la industria de lacteos	35 °C	Leal <i>et al.</i> ,2005
Cutinasa	Hidrolisis de mantequilla	25°C, pH 9	Horri <i>et al.</i> ,2009 (2)
Cutinasa esterasa	Síntesis de aquil esterés de cadena corta	35-40°C isooctano, Cadena corta	Dutta y Dasu, 2011 ;De Barros <i>et al.</i> ,2009
Cutinasa	ésteres de ácidos grasos de oligo-y polisacáridos		van den Broek y Beriu, 2012
Esterasa	Síntesis de esterés	45° 6C y 8C n-heptano	Alvarez y Barrati, 1999
Esterasa	Síntesis de sabor plátano	60-65°C pH 8	Torres <i>et al.</i> ,2008

2.7 Género *Aspergillus*.

El género *Aspergillus* se clasifica dentro de los ascomicetos, que han evolucionado hasta alcanzar una alta diversidad metabólica que involucra diferentes sistemas enzimáticos, lo que les permite sobrevivir en una amplia variedad de hábitats. Se aíslan comúnmente del suelo, de residuos vegetales y de ambientes aéreos cerrados. Las especies de *Aspergillus* tienen una diversidad de enzimas y ácidos orgánicos utilizados para obtener nutrientes, que se complementa con su capacidad de secretar numerosos metabolitos secundarios, son importantes en la señalización ecológica para percibir la disponibilidad de nutrientes y además son de interés para aplicaciones industriales (Tabla 4) (Goldman y Osmani, 2008).

Las colonias de las especies de este género se desarrollan de forma rápida y presentan muchas tonalidades: blanquecinas, amarillentas, marrón-amarillentas, negruzcas, marrón-negruzcas o verdosas. Están formadas por densas agrupaciones de conidióforos sobre los que se encuentran las células conidiogénicas, que son las que originan las esporas asexuales o conidios (Peña, 2009).

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

Especie	Enzimas y metabólicos importantes
<i>A. niger</i>	Ácido cítrico, Ácido glucónico, α -galactosidasa, Pectinasa, Lipasa, Hemicelulasa, Catalasas, Lactasas, glucoamilasa, fosfodiesterasa, maltasa, invertasa, proteinasa
<i>A. oryzae</i>	Ácido kójico, α -amilasa, Lactasa, Proteasa Glucoamilasa, celulasa, lipasa, Pectinasa
<i>A. terreus</i>	Lovastatina, Ácido itacónico
<i>A. melleus</i>	Peptidasa
<i>A. parasiticus</i>	Micotoxinas (ocratoxina, patulina y fumigilina)
<i>A. flavus</i>	Toxinas carcinogénicas (aflatoxinas)
<i>A. nidulans</i>	Celulasa, proteinasa
<i>A. candidus</i>	Celulasa, lipasa
<i>A. ficuum</i>	Fitasa
<i>A. awamori</i>	α -amilasa, lipasa, proteínasa
<i>A. carneu</i>	Lipasa, amiloglucosidasa

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

2.7.1 *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Trichocomaceae, phylum Ascomycota. Este hongo presenta hifas septadas a través de las cuales se produce el intercambio de nutrientes. Produce tanto esporas asexuales (conidias) como sexuales (ascoesporas) (Jurgenson, 1990).

Tiene un crecimiento rápido como hongo filamentosos en medio sólido o líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales.

Este hongo es un organismo modelo en estudios de genética y biología celular, ya que está relacionado con un amplio número de especies de *Aspergillus* de importancia industrial y médica. Se cuenta con un mapa genético bien definido. Su genoma ha sido completamente secuenciado y tiene un tamaño de 28.5 Mb, organizado en 8 cromosomas (Peña, 2009).

Adicionalmente *Aspergillus nidulans* es un microorganismo saprofito que posee una gran capacidad para adaptarse y vivir en ambientes muy diversos tanto en el aspecto físico-químico como en el biológico. Esta extrema variabilidad de nichos se corresponde con la elevada versatilidad metabólica de este hongo filamentosos (Clement, et al.1999). Los medios de cultivo y condiciones para su crecimiento en el laboratorio son simples, las fuentes de carbono y nitrógeno son de bajo costo y la formulación del medio de cultivo es de fácil preparación, así como la temperatura de incubación (30-40°C).

2.8 Inmovilización de enzimas

La productividad de procesos enzimáticos es baja debido a las condiciones no favorables como temperaturas altas y pH ácido o alcalino, los cuales provocan la desnaturalización del biocatalizador, así que una ruta para mejorar el rendimiento enzimático es la inmovilización.

La inmovilización de una enzima consiste en su localización en una región definida de espacio generando una forma insoluble reteniendo su actividad catalítica y su posible reutilización (Sánchez, 1998; Arroyo, 1998).

2.8.1 Métodos de inmovilización

Existen dos métodos por los cuales se puede inmovilizar una enzima: la retención física y la unión covalente al soporte los cuales se pueden dividir en:

2.8.1.1 Métodos por unión química

Unión covalente

Este tipo de inmovilización involucra la formación de un enlace covalente entre el soporte y la enzima (Fig 7). Esta unión se establece mediante los grupos funcionales presentes en la superficie del soporte y los residuos de aminoácidos localizados en la parte externa de la enzima (Tabla 5). Para lograr una unión eficiente, el soporte y/o la enzima deben ser activados antes de la inmovilización.

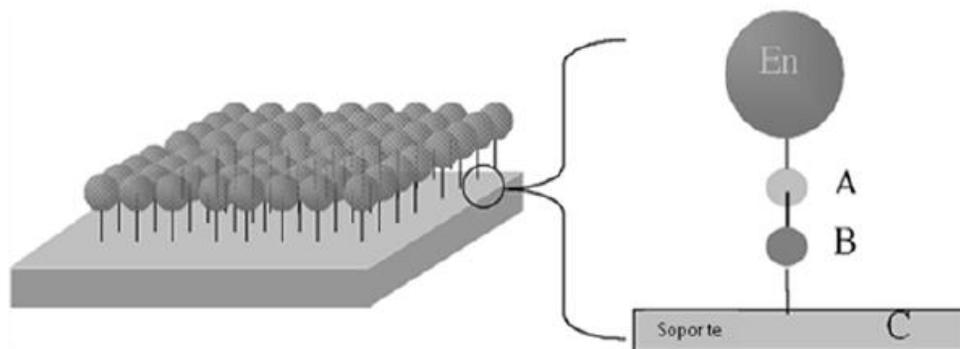


Figura 7. Unión covalente. (A) residuo de aminoácido de la enzima, (B) grupo funcional de unión al soporte, (C) soporte, (En) enzima (Cao, 2005).

Uno de los problemas más importantes es la pérdida de actividad por modificaciones químicas en algún aminoácido del sitio catalítico de la enzima, aunque también se pueden presentar una mayor estabilidad frente a pH y temperatura.

Tabla 5. Agente acoplador para unión covalente.

Grupo funcional del soporte	Soporte	Agente acoplador	Grupo reactivo de la proteína
Hidroxilo	Dextranos, celulosa	Bromuro de cianógeno	Amino
Carboxilo	Poliacrilamidas	Carbodiimidas	Amino
Amino	Cerámicas modificadas	Glutaraldehído de sodio	Amino
Aldehído	Aldehídos poliméricos	Reacción directa	Amino
Tiol	Polisacáridos modificados	Reacción directa	Cis-tiol

Reticulado o entrecruzamiento

El método involucra la unión de células o enzimas entre sí para formar una estructura tridimensional compleja. Puede ser efectuada en proteínas solubles (CLE), en cristales de enzimas (CLEC) o en agregados de proteínas (CLEA). Estos sistemas tienen la ventaja de que no está involucrada la presencia de un soporte, por lo tanto, la actividad específica del biocatalizador es alta (Fig 8).



Figura 8. Inmovilización por entrecruzamiento (Bickerstaff, 1997).

2.8.1.2 Métodos de inmovilización por retención física.

Atrapamiento

Es un método sencillo donde primero se debe dispersar en una disolución la enzima y después realizar un proceso de solidificación, con la finalidad de formar una barrera física, es decir, las enzimas quedan embebidas a una matriz formada física o químicamente. La matriz formada debe ser permeable a pequeñas moléculas de sustrato y producto (Fig 9).

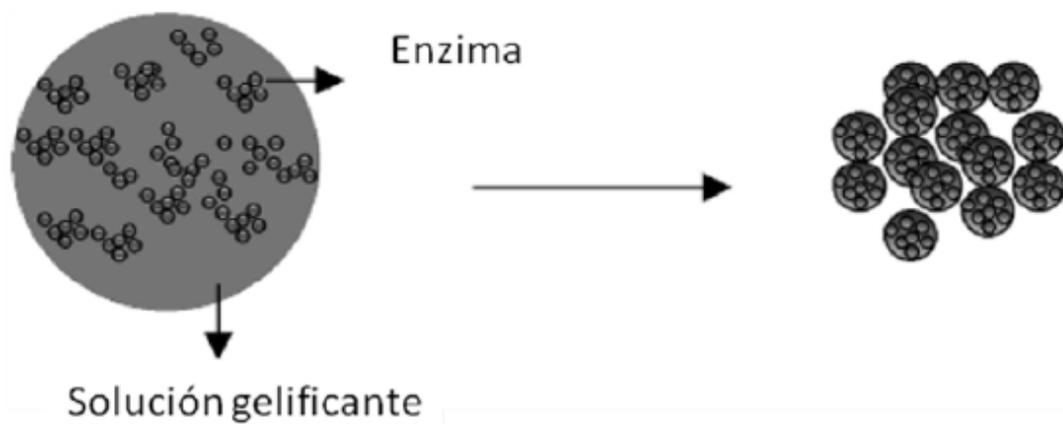


Figura 9. Inmovilización por atrapamiento (Bickerstaff, 1997).

Inclusión de membranas

El método consiste en la encapsulación de la enzima en solución, con la formación de una membrana de polímero semipermeable con un rango de diámetro entre 1 a 100 μm , la matriz a de permitir la retención de la enzima al mismo tiempo que la difusión de sustratos y productos. Las membranas son polímeros sintéticos o geles de origen natural (Fig 10).

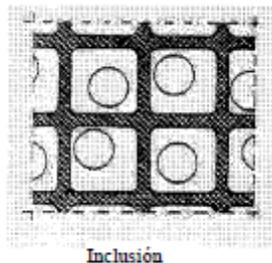


Figura 10. Inmovilización por inclusión. (Bickerstaff, 1997).

Adsorción

La adsorción de enzimas a un soporte fue uno de los primeros métodos de inmovilización. Es sencillo, económico e involucra interacciones reversibles entre las enzimas y el soporte. Las fuerzas que están presentes son en su mayoría electrostáticas, como interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals y puentes de hidrógeno (Fig. 11). Dichas interacciones son débiles comparadas a un enlace covalente, sin embargo se establecen en un número suficiente que permite la unión enzima-soporte. El problema principal es la reversibilidad del proceso, ya que cambios en condiciones de pH y temperatura pueden provocar el desplazamiento de la enzima hacia la fase soluble. En cambio en disolventes orgánicos, es el método más aconsejable puesto que no existe dicha reversibilidad (Sánchez, 1998; Arroyo, 1998).

Ventajas

- Ligero o nulo daño a la enzima
- Sencillo, económico y rápido
- No hay cambios químicos en el soporte

Desventajas

- Desprendimiento de la enzima
- Unión no específica al soporte
- Sobrecarga del soporte
- Impedimento estérico por el soporte.

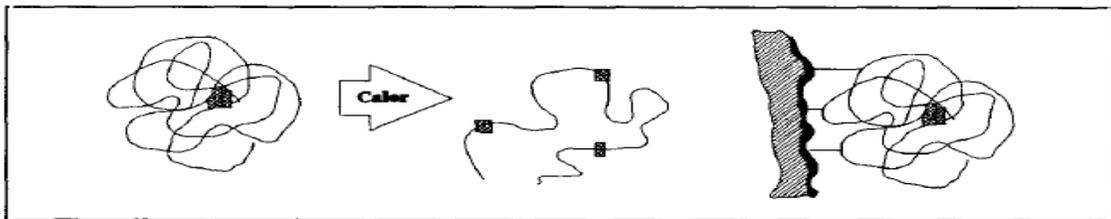


Figura 11. Inmovilización por adsorción. (Arroyo, 1998).

La adsorción de enzimas en superficies sólidas podría involucrar algunos cambios conformacionales en la molécula de la enzima debido a las interacciones presentes entre esta y el soporte. Usualmente la cantidad de enzima adsorbida es mayor en soportes hidrofóbicos que en soportes hidrofílicos.

En soportes hidrofílicos pueden presentar competencia con la enzima por el agua disponible, sin embargo, cuando la enzima y el soporte están completamente hidratados, entonces conduce a una alta concentración de agua en el ambiente de la enzima favoreciendo las reacciones de hidrólisis sobre las reacciones de síntesis.

2.8.1.3 Consideraciones para la selección del proceso de inmovilización

La inmovilización en ocasiones incrementa la termoestabilidad de la enzima a través de la interacción del soporte con la enzima lo que origina una estructura más rígida e insoluble. El soporte también atrapa agua en el microambiente de las moléculas de enzima, el cual es esencial para la estabilización y actividad del biocatalizador (Goncalves *et al.*, 1997). Las propiedades de la enzima inmovilizada están gobernadas por las interacciones enzima soporte, la interacción provee especificidad química, bioquímica, mecánica y propiedades cinéticas. Las propiedades bioquímicas de la enzima tales como su masa molecular, grupos funcionales y su pureza son importantes factores para la inmovilización.

Las características del material del soporte tienen influencia en las propiedades del inmovilizado. Uno de los más importantes es su estructura química que determinará la interacción con la proteína, si es poroso, el tamaño del poro y su distribución que puede limitar su unión, así un poro pequeño puede causar problemas de difusión limitada resultando en un cambio de la estructura y una posible inactivación del catalizador.

Otro punto que es importante de señalar son las propiedades mecánicas del soporte para su aplicación en un proceso. Cuando un inmovilizado es aplicado en un tanque de agitación este debe resistir la abrasión, en cambio si se hace en una columna, la resistencia al flujo será fundamental. Es por eso que se debe de dar una selección para el material del soporte de acuerdo a las características del proceso; estabilidad térmica, durabilidad química en el ambiente del reactor. El método y optimización de las condiciones de inmovilización son también cruciales para las propiedades del biocatalizador por lo que se deben escoger con cuidado (Miletic, 2011; Messing, 1975) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de los métodos de inmovilización.

Método	Inclusión membranas	atrapamiento	reticulado	adsorción	Unión covalente
Preparación	Intermedia	Difícil	Intermedia	Sencilla	Difícil
Fuerza de la unión	Débil	Media	Débil- media	Media	Fuerte
Actividad enzimática	Media-alta	Baja	Baja	Media-Alta	Alta
Regeneración del soporte	Posible	Imposible	Imposible	posible	Difícil
Costo	Medio-alto	Medio	Medio	Bajo	Alto
Estabilidad	Media	Alta	Alta	baja	Alta
Validez	General	General	Limitada	General	Limitada
Resistencia microbiana	Si	Si	si	No	No

(Arroyo, 1998).

Características mínimas de un biocatalizador

- ✓ Actividad enzimática alta (rendimiento)
- ✓ Estabilidad en las condiciones de reacción utilizadas (no pérdida de actividad)
- ✓ Regeneración (El lavado no debe afectar a la enzima)
- ✓ Uso repetitivo del biocatalizador
- ✓ No presentar problemas de transferencia de materia (soporte con alta superficie específica)
- ✓ Resistencia a la contaminación microbiana

- ✓ Costo bajo
- ✓ Disponible

2.8.2 Soportes

Los soportes empleados para la inmovilización de enzimas se pueden dividir en 2 grupos: inorgánico y orgánico (Tabla 7).

Tabla 7. Clasificación de soportes.

INORGÁNICOS	ORGÁNICOS
Caolinita	Celulosa
Silica coloidal	Agarosa
Partículas de vidrio	Almidón
Vidrio de poro controlado	Poliacrilamida
Alumina	Quitosano
Alumina de poro controlado	Nylon
Óxido de Níquel	Copolímeros orgánicos
Carbón	Colágeno

Los soportes orgánicos de fuente natural tienen la ventaja de poseer una mayor compatibilidad con la enzima y al ser un soporte hidrofílico sus interacciones son débiles. Los soportes inorgánicos ofrecen una mayor estabilidad que los soportes orgánicos, ya que estos son inertes a las condiciones de reacción tales como altas presiones y altas temperaturas.

Tabla 8. Características de los soportes en estudio.

Propiedad física	Accurel MP 1000	Celite 545	Nylon 6	Quitosano
Composición	Polipropileno	SiO ₂	Poliamida	Polisacárido
Naturaleza	Hidrofóbica	inorgánico	Hidrofóbico	Hidrofilico
Tamaño de poro (µm)	5-20	17	-	-
Tamaño de partícula (µm)	< 1500	0.1mm	3mm	-
Costo (\$)	4000	728	4399	Desechos
Union	Adsorción	Adsorción	Covalente	Adsorción
Estabilización	Hidrofóbica	Electrostática	Química	Iónica

Otra consideración en la selección de un soporte es su resistencia a la degradación por microorganismos, particularmente en el caso de su aplicación en un reactor continuo.

2.9 Antecedentes experimentales de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos de *Aspergillus nidulans* en el grupo de trabajo.

En estudios realizados en el grupo de trabajo se ha estudiado a *A. nidulans* para identificar su potencial de producción de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos, específicamente en la cepa *Aspergillus nidulans* PW1. A partir de un medio optimizado para la producción de carboxilesterasas, en el que se empleó aceite de olivo como inductores, se purificó e identificó por secuenciación de péptidos una cutinasa de aproximadamente 29 kDa (ANCUT2), así como una proteasa con actividad promiscua de esterasa de 37kDa (PrtA) (Peña *et al.*, 2007, Castro-Ochoa *et al.* 2012). Al adicionar al mismo medio optimizado cutícula o cutina como inductor, se identificó otra cutinasa de 22 kDa (ANCUT1) (Esqueda, 2012),

Por otra parte, también se estudió la actividad de esterasa intracelular, identificándose una carboxilestera de 35kDa (NStcl), la cual fue expresada en *Pichia pastoris*. La NStcl está involucrada en la síntesis de esterigmatocistina (ST). La esterigmatocistina es una molécula precursora de aflatoxinas. En esta ruta biosintética la esterasa NStcl convierte versiconal hemiacetal acetato (VHA) a versiconal (VHOH) y versiconol acetato (VOAc) a versiconol (VOH). Por lo que esta enzima puede presentar un potencial biocatalítico para llevar a cabo reacciones con sustratos cíclicos en los que puede mostrar enantioselectividad. (Peña, 2009).

Las características encontradas después de la caracterización de los diferentes biocatalizadores de *A. nidulans* estudiados (PrtA, ANCUT1, ANCUT2 y NStcl) mostraron su potencial aplicación en diversas reacciones de hidrólisis por lo que se decidió inmovilizar estas enzimas en un soporte hidrofóbico Accurel MP1000 (Vergara, 2008; Esquivel, 2010; Peña et al. 2009, Vega, 2013, Peña, 2013). También se han evaluado, reacciones de síntesis para algunos de estos biocatalizadores como: la transesterificación enantioselectiva del (R, S)-1-Feniletanol por NStcl (Mondragón, 2011), la esterificación regioselectiva del antioxidante 7-O-larolo de ácido kójico por ANCUT2 (Esquivel, 2011), la transesterificación de cumarato de metilo por ANCUT1 (Esqueda, 2012).

Justificación

- ▶ Se cuenta con una cepa de *Aspergillus nidulans* PW1 cuyos extractos enzimáticos utilizando los medios optimizados producen diferentes hidrolasas de ácidos carboxílicos dos cutinasas (ANCUT1 y ANCUT2), una proteasa (PrtA), así como con una esterasa NStcI recombinante expresada en *Pichia pastoris*. Todas ellas muestran propiedades interesantes para su aplicación industrial. Estos biocatalizadores han sido inmovilizados en Accurel MP1000 en el grupo de trabajo, pero al tratarse de una matriz de alto precio, se busca encontrar otro soporte de menor costo. Se desea explorar también la unión covalente como método de inmovilización con el objetivo de obtener catalizadores de alta estabilidad. Se evaluarán 4 diferentes soportes y de acuerdo a los resultados obtenidos se escogerá la matriz que presente mayor actividad y estabilidad operacional. El ensayo permitirá determinar el costo/beneficio de cada soporte con el biocatalizador, de forma que se puedan emplear en procesos continuos para llevar cabo reacciones de síntesis o hidrólisis en diferentes campos de aplicación.

Hipótesis

- ▶ Las enzimas ANCUT1, ANCUT2, PrtA producidas por *Aspergillus nidulans* PW1 y NStcl esterasa recombinante expresada en *Pichia pastoris*, se adsorberán en mayor cantidad en soportes porosos (Accurel MP1000 y Celite 545), lo que les conferirá una mayor estabilidad (pH, térmica, reuso y al almacenamiento), frente a la enzima libre.
- ▶ La unión covalente permitirá un incremento considerable en la posibilidad de reutilización del biocatalizador, brindando además de una mayor estabilidad en comparación con la enzima sin inmovilizar.

Objetivos

GENERAL:

- ▶ Realizar la inmovilización de la ANCUT1, ANCUT2, Prt A a partir de los extractos crudos de *Aspergillus nidulans* PW1 y NStc I recombinante expresada en *Pichia pastoris* sobre diferentes soportes (Accurel MP 1000, Celite 545, Nylon 6 y Quitosano) para su posterior caracterización.

ESPECÍFICOS:

- ▶ Producir las enzimas ANCUT1, ANCUT2, Prt A de *Aspergillus nidulans* y NStcI expresada en *Pichia pastoris* PW1 empleando los diferentes medios optimizados y condiciones de cultivo.
- ▶ Obtener un extracto crudo concentrado de ANCUT1, ANCUT2, Prt A de *Aspergillus nidulans* PW1 y NStcI expresada en *Pichia pastoris*.
- ▶ Establecer las condiciones de inmovilización de ANCUT1, ANCUT2, Prt A, NStc I en estudio.
- ▶ Caracterizar los catalizadores inmovilizados para conocer la estabilidad operacional de la relación enzima soporte.
- ▶ De acuerdo a los resultados obtenidos determinar qué soporte es el idóneo para cada enzima y ver la relación costo/beneficio.

Desarrollo Experimental

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos y equipos

Tabla 9. Reactivos y marcas.

Reactivo	Marca
Accurel MP1000	Membrana underlining performance
Acetona	Sigma-Aldrich
Acetato de sodio	Baker
Ácido acético glacial	Baker
Acrilamida	Bio-Rad
Agar	Difco
Alcohol etílico	Baker
Alcohol isopropílico	Baker
α -naftil acetato	Sigma-Aldrich
Arginina	Sigma-Aldrich
Azul de bromefenol	Bio-Rad
Peptona	Bacto
Biotina	Sigma-Aldrich
β -mercaptoetanol	Sigma-Aldrich
Bis-Acrilamida	Bio-Rad
CAPS	Sigma-Aldrich
Carbonato de sodio	Baker
Celite 545	Sigma-Aldrich
Cloruro de cobalto hexahidratado	Baker
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Baker
Cloruro de potasio	Baker
Dextrosa	Baker
Cloruro de sodio	Baker
Dimetil sulfóxido	Sigma-Aldrich
EDTA tetrasódico	Baker
Extracto de levadura	Bioxon Fluka
Fast Red TR	Sigma-Aldrich
Fosfato de potasio dibásico	Baker
Fosfato de potasio monobásico	Baker
Fosfato de sodio dibásico	Baker
Fosfato de sodio monobásico	Baker
Glicerol	Baker
Hidróxido de sodio	Baker
Marcador de bajo peso molecular	Bio-Rad
Metanol	Baker
Metionina	Research organics
Molibdato de amonio tetrahidratado	Baker
Nitrato de plata	Sigma-Aldrich
Nitrato de sodio	Baker
Nylon 6	Sigma-Aldrich
Oxalato de amonio	Baker

p-nitrofenil acetato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil butirato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil decanoato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil laurato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil miristato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil palmitato	Sigma-Aldrich
p-nitrofenil esterato	Sigma-Aldrich
Persulfato de amonio	Bio-Rad
Quitosano	-
Reactivo de Bradford	Bio-Rad
SDS	Bio-Rad
Silica gel	Baker
Sulfato cúprico	Baker
Sulfato de amonio	Baker
Sulfato de magnesio	Baker
Sulfato de magnesio heptahidratado	Merck
Sulfato de zinc heptahidratado	Baker
Sulfato ferroso heptahidratado	Baker
Temed	Bio-Rad
Tris base	Bio-Rad
Tritón X-100	Sigma-Aldrich
Tween 80	Cosmopolita
YNB	Sigma

Equipos

Amicón, equipo de ultrafiltración, Millipore
 Autoclave SM300 Yamamoto
 Balanza analítica Voyager
 Balanza granataria Adamson
 Campana de Microbiología de flujo laminar, ADLER
 Centrifuga Biofuge, Heraeus
 Centrifuga J2-MC Beckman
 Fuente de poder Modelo 164-5070 Bio Rad
 Cámara para electroforesis Miniprotean 2, Bio Rad
 Lector de microplacas Epoch Biotek

3. Microorganismo

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

Se utilizó la clona con el gen de la esterasa Nstcl insertado en el genoma de *Pichia pastoris* X-33.

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

Se prepararon 10 cajas Petri con medio mínimo de Käfer (1977), a las cuales se les añadieron 5 granos de sílica gel con esporas de *A. nidulans* PW1 y se incubaron durante cinco días a 37 °C. Para cosechar las esporas se agregaron 10 mL de Tween 80 estéril al 0.1% a cada una de las cajas Petri y se rasparon cuidadosamente con una asa micológica; las esporas se recuperaron en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Posteriormente se centrifugó el contenido del tubo durante 15 minutos a 10,000 rpm (Centrifuga Beckman, rotor J20), se desechó el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de agua destilada estéril para nuevamente centrifugar el contenido bajo las mismas condiciones. Este proceso se repitió dos veces y finalmente se resuspendieron las esporas en 5 mL de agua destilada estéril. Una vez obtenida la solución final, se realizó un conteo de esporas utilizando una cámara de Neubauer (Anexo B) para lo cual se tomaron 990 µL de agua desionizada y 10 µL de la solución de esporas en un tubo eppendorf de 1.5 mL, se homogenizó, se colocaron 10 µL en cada extremo de la cámara y se realizó el conteo para calcular la concentración y el volumen de solución de esporas a adicionar para futuras inoculaciones con 1×10^6 esporas/mL. Las esporas se almacenaron a 4°C.

Del conteo realizado a la solución tras la cosecha de esporas se determinó que contenía 1.42×10^9 esporas/mL. Se realizaron los cálculos para ajustar el volumen de solución para la inoculación, resultado de un volumen de 42 µL

necesarios para inocular 50 mL de medio con una concentración final de 1×10^6 esporas/mL.

3.2 Preparación del medio mínimo de cultivo

Se elaboró el medio mínimo de acuerdo a lo descrito por Käfer (1977); los componentes y sus concentraciones se muestran en la tabla 10.

Tabla 10. Composición del medio mínimo para el crecimiento de *Aspergillus nidulans* PW1 (Käfer, 1977).

Compuesto	Concentración	Solución stock
Sales 20x	50 mL/L	descrita en Tabla 11 y12
Elementos traza 100x	1 mL/L	Ref. Käfer, 1977
Glucosa	10 g	
Agar	12.5 g	
Requerimientos		
Arginina	5 mL/L	16.8 % m/v
Biotina	0.5 mL/L	0.05 %
Metionina	0.11 g/L	--

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

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

La composición de las soluciones de sales 20x y de elementos traza 100x se especifican en las tablas 11 y 12.

Tabla 11. Composición de solución de sales 20x (Käfer, 1977).

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

Tabla 12. Composición de solución de elementos traza 100x (Käfer, 1977).

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

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

3.3 Medio optimizado para ANCUT1

El medio mínimo utilizado originalmente se modificó de acuerdo a la optimización realizada por Esqueda (2012), cuya composición se muestra en la tabla 13.

Tabla 13. Composición del medio optimizado para ANCUT1.

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

Al medio de cultivo se le midió el pH para ajustarlo a pH de 6.5 con una solución de NaOH 1 M. Una vez alcanzado, se repartió en volúmenes de 50 mL en matraces de 250 mL, se adicionó la cutícula molida de manzana al medio como fuente inductora de la enzima, en una concentración de 200 mg por cada 50 mL de medio, se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C por 15 minutos. Al término de la esterilización se dejaron enfriar los matraces a temperatura ambiente antes de inocular el medio.

Cada uno de los matraces con 50 mL de medio se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de *Aspergillus nidulans* PW1. Las fermentaciones se realizaron a temperatura de 37 °C y 300 rpm por 48 horas en la incubadora (Innova 40, New Brunswick Scientific).

Pasado este tiempo se filtraron los matraces al vacío utilizando un papel filtro Whatman # 1 con el fin de separar el micelio. El extracto crudo se guardó para realizar las pruebas de actividad, de proteína y sus respectivos geles.

3.4 Medio optimizado para PrtA

El medio mínimo utilizado originalmente se modificó de acuerdo a la optimización realizada por (Peña *et al.*, 2007), la composición se muestra en la tabla 14

Tabla 14. Composición del medio optimizado para PrtA.

Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	2 mL/L
Extracto de levadura	5g/L
Arginina	5 mL/L
Biotina	0.5 mL/L
Metionina	110 mg/L
Almidón	15g/L
Aceite de olivo	5 mL/L

Al medio de cultivo se le midió el pH para ajustarlo a pH de 6.5 con una solución de NaOH 1 M. Se adicionó el aceite de olivo y se homogeneizó a 13500 rpm por 30 s con un homogeneizador Ultraturax T25 se adicionó el almidón y se repartió en volúmenes de 50 mL en matraces de 250 mL, se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C por 15 minutos. Al término de la esterilización se dejaron enfriar los matraces a temperatura ambiente antes de inocular el medio. Cada uno de los matraces con 50 mL de medio se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de *Aspergillus nidulans* PW1. Las fermentaciones se realizaron a temperatura de 37 °C y 300 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific) por 24 horas. Pasado este tiempo se filtraron los matraces al vacío utilizando un papel filtro Whatman # 1, se le determinó concentración proteína así como actividad enzimática (cualitativa y cuantitativamente, como se explica a continuación).

3.5 Medio optimizado para ANCUT2

El medio mínimo utilizado originalmente se modificó de acuerdo a la optimización realizada por (Castro *et al.*, 2012), cuya composición se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Composición del medio optimizado para ANCUT2.

Componente	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza	1 mL/L
Extracto de levadura	0.5%
Arginina	5 mL/L
Biotina	0.5 mL/L
Metionina	110 mg/L
Sacarosa	0.5%
Aceite de olivo	0.5%

Se inocularon los medios con 1×10^6 esporas y se incubó 24 h respectivamente. Al medio de cultivo se le midió el pH para ajustarlo a pH de 6.5 con una solución de NaOH 1 M. Se adicionó el aceite de olivo y se homogeneizó a 13500 rpm por 30 s con un homogeneizador Ultraturax T25 y se repartió en volúmenes de 50 mL en matraces de 250 mL, se esterilizó en autoclave (SM300, Yamamoto) a 121 °C por 15 minutos. Al término de la esterilización se dejaron enfriar los matraces a temperatura ambiente antes de inocular el medio.

Cada uno de los matraces con 50 mL de medio se inoculó con 1×10^6 esporas/mL de *Aspergillus nidulans* PW1. Las fermentaciones se realizaron a temperatura de 37 °C y 300 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific) por 24 horas.

Pasado este tiempo se filtraron los matraces al vacío utilizando un papel filtro Whatman # 1, se le determinó concentración proteínica así como actividad enzimática (cualitativa y cuantitativamente, como se explica a continuación).

3.6 Producción de NStcl recombinante

A. Reactivación del microorganismo

Para obtener la enzima NStcl recombinante se utilizó como sistema de expresión a *Pichia pastoris*. Se usó una cepa clonada previamente dentro del grupo de trabajo (Peña *et al.*, 2013), que se encontraba en glicerol a -70°C . Esta fue reactivada en medio YPD de acuerdo a lo descrito en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen) y, la tabla 16 muestra su composición.

Tabla 16. Composición del medio YPD.

Componente	Concentración
Extracto de levadura	1%
Peptona	2%
Dextrosa (glucosa)	2%

La glucosa se esterilizó por filtración y los demás componentes se esterilizaron con autoclave (SM300, Yamamoto) a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados, los componentes se mezclan en las cantidades necesarias para obtener la concentración indicada.

Se inocularon 200 μL de la cepa *Pichia pastoris* que se encontraba a -70°C en tubos de ensayo estériles con 5 mL de medio YPD estéril y se incubaron por 24 horas a 30°C y 300 rpm de agitación orbital en una incubadora New Brunswick Scientific.

B. Generación de biomasa

Se prepararon 500 mL de medio BMGY (Buffered Glycerol-complex medium), cuya composición se muestra en la tabla 17.

Tabla 17. Composición del medio BMGY.

Componente	Solución stock	Concentración
Extracto de levadura	-----	1 %
Peptona	-----	2 %
Buffer de fosfatos de potasio, pH 6.0	1 M	100 mM
YNB	10X (13.4 %)	1.34 %
Biotina	500X (0.02%)	$4 \cdot 10^{-5}$ %
Glicerol	10X (10%)	1 %

Según lo señalado en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizaron por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclaron en el orden descrito y en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada.

Se inocularon 200 μ L de las células de *Pichia pastoris* reactivadas por cada 100 mL de medio BMGY y se incubó a 30°C y 300 rpm de agitación orbital hasta alcanzar una D.O₆₀₀ \approx 2. Posteriormente se centrifugó el medio en tubos Falcon de 50 mL estériles a 4000 rpm, 10 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckman J2-MC, rotor JA10. Se recuperaron las células y se desechó el sobrenadante.

C. Expresión de la enzima

Se preparó 1 L de medio BMMY (Buffered Methanol-complex medium), cuya composición aparece en la tabla 18.

Tabla 18. Composición del medio BMMY.

Componente	Solución stock	Concentración
Extracto de levadura	-----	1 %
Peptona	-----	2 %
Buffer de fosfatos de potasio, pH 6.0	1 M	100 mM
YNB	10X (13.4 %)	1.34 %
Biotina	500X (0.02%)	4×10^{-5} %
Metanol	-----	1 %

Según lo señalado en el manual “EasySelect *Pichia* expression kit (Version G)” (Invitrogen).

El medio YNB (Yeast nitrogen base with ammonium sulfate without amino acids) y la biotina se esterilizaron por filtración y los demás componentes en autoclave a 121°C por 15 minutos. Una vez esterilizados todos los componentes se mezclaron en el orden descrito en las cantidades necesarias para obtener el medio en la concentración indicada.

Las células generadas en el medio BMGY se inocularon en matraces con 100 mL de medio BMMY, de tal modo que se alcanzó en cada matraz una $D.O_{600} \approx 1$. Una vez obtenida dicha densidad se agregó como inductor de la enzima metanol al 100 % y se incubó a 30 °C y 300 rpm de agitación orbital. A las 24 horas se volvió a adicionar metanol y se dejó en incubación otras 24 horas.

3.7 Métodos de determinación de actividad enzimática y proteína

3.7.1 Evaluación cualitativa de actividad enzimática en microplaca

Para evaluar de manera rápida la actividad de la enzima se realizaron ensayos en microplaca utilizando soluciones de α -naftil acetato como sustrato (*Solución A*) y Fast Red como revelador (*Solución B*). En un pozo de la microplaca se adicionaron 75 μ L de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 (buffer de trabajo), el cual sirvió de blanco. Se tomaron 75 μ L de muestra de extracto y se adicionaron a los pozos siguientes. Al blanco y muestras se le adicionaron 75 μ L de la solución de α -naftil acetato y se dejó incubar por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 75 μ L de la solución de Fast Red a cada pozo y se observó la aparición de un color marrón, cuya intensidad depende de que haya actividad esterasa en las muestras tomadas.

Preparación de las soluciones A y B:

- *Solución A:* Se pesaron 4 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 1 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7
- *Solución B:* Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 10 μ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.

Las enzimas con actividad de esterasa hidrolizan acetato de α -Naftilo liberando α -naftol, el cual reacciona con el Fast Red, que es una sal de diazolio, para formar un cromógeno de color rojo.

3.7.2 Cuantificación de proteína en microplaca

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford cuya sensibilidad es de 1-100 μ g (Bradford, 1977; Lee y Whiteley, 2006). El volumen final de

reacción fue de 200 μ L. Se colocaron en la microplaca 160 μ L de muestra, 40 μ L del reactivo de Bradford (Bio Rad) y un blanco con 160 μ L de agua destilada y 40 μ L de dicho reactivo todo se mezcló perfectamente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El color generado se cuantificó en el lector de microplacas Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, a una absorbancia de 595 nm. Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entrara en un rango confiable de una curva estándar, preparada con albúmina sérica (Anexo C).

3.7.3 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca (con ésteres de *p*-nitrofenilo)

- ▶ La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustratos ésteres de *p*-nitrofenilo. Se preparó un stock de ésteres de *p*-nitrofenilo 10 mM en etanol, de este stock se tomaron 100 μ L y se añadieron 900 μ L de etanol para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM, se adicionaron para el blanco 180 μ L de buffer de fosfatos 50 mM, pH 7 y 20 μ L de ésteres de *p*-nitrofenilo en etanol a una concentración 1 mM y para el caso de la muestra se colocaron 170 μ L del mismo buffer, 10 μ L de enzima y 20 μ L de sustrato. La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Nawani, 2006; Bornscheuer *et al.*, 2005).
- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5 mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25 mg de Quitosano. A cada soporte se le adicionó 900 μ L de su respectivo buffer 50 mM y 100 μ L de sustrato se llevó a cabo la reacción en agitación durante 15 min junto con un blanco y se colocó en la microplaca 200 μ L y se midió en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.
- ▶ Una unidad de actividad (U) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1 μ mol de sustrato por minuto. La cantidad de ésteres de *p*-nitrofenilo se interpoló en una curva patrón de *p*-NP (Anexo D).

3.8 Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida

3.8.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Se utilizó como detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, siguiendo la técnica descrita por (Laemmli, 1970), utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14%. Las muestras de extracto crudo se trataron previamente con un buffer de carga 4x con β -mercaptoetanol y se calentaron a 95 °C durante 5 minutos para desnaturizar a las proteínas. Como referencia se utilizó un marcador de bajo peso molecular (97 a 14 kDa de Bio Rad) y las muestras se cargaron en los carriles asignados previamente. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis (MiniProtean II y IV Bio Rad) inicialmente a 80 Volts después 30 minutos se subió a 120 Volts a 4 °C con buffer de corrida. Para observar el marcador de masa molecular el gel fue teñido con Coomassie.

3.8.2 Zimogramas

Para observar la actividad esterasa de las enzimas se realizaron geles de poliacrilamida con las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Para observar la actividad se prepararon zimogramas siguiendo la metodología planteada por (Karpushova, 2005). Una vez llevada a cabo la electroforesis el gel se incubó en una solución de buffer de fosfatos 50 mM pH 7 durante 30 min, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos 50 mM pH 7 con Tritón X-100 al 5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (*Solución A*) durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente y finalmente, sin desechar la solución A, se le agregó la solución de Fast Red (*Solución B*) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

Preparación de la soluciones A y B:

- ▶ *Solución A.* Se pesaron 10 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 2.5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.2
- ▶ *Solución B.* Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 10 μ L de Tritón X-100 y se llevaron a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos 50 mM a pH 7.

3.8.3 Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Para el gel a teñir con plata el extracto crudo se precipitó con ácido tricloroacético (TCA). A 1 mL de muestra se le adicionaron 100 μ L (1/10 volumen) de 100% TCA (p/v). Se dejó en hielo por un mínimo de 15 min. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se retiró y desechó. El pellet se lavó con 100 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, este paso se realizó dos veces más. El pellet se secó completamente (el tubo se dejó abierto en la campana durante 15 min).

3.9 Inmovilización

La inmovilización de la enzima se llevó a cabo por el método de adsorción usando tres diferentes soportes (Accurel MP 1000, Celite 545 y Quitosano) pretratado como se describe a continuación.

A. Pretratamiento de Accurel MP 1000

Se pesaron 1 g del soporte y se colocó en etanol absoluto, solución que se retiró y se adicionó una nueva de etanol al 50%; esta última solución se cambió por agua desionizada y cada una de las etapas mencionadas duró 30 minutos. Finalmente el agua desionizada se retiró por filtración al vacío y el soporte se secó en la estufa estática a 37°C durante 12hrs.

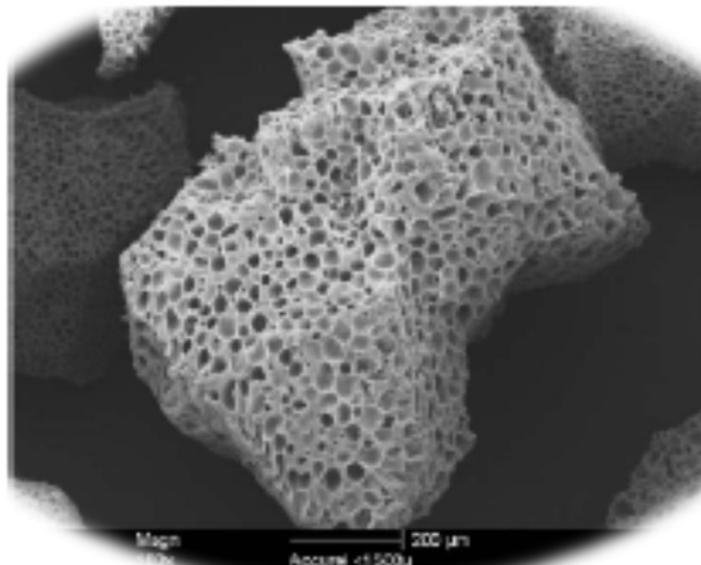


Fig 12. Accurel MP1000 (Sabbani *et al.*, 2008).

B. Pretratamiento de Celite 545

Se hizo una modificación a la metodología (Chang *et al.*, 2007). Se hizo un lavado del soporte con Acetona para quitar impurezas durante 30 min, se dejó sedimentar para su separación, el siguiente paso fue adicionarle buffer Tris-HCl pH 9.0 durante 30 min, pasado este tiempo se sedimenta y separa el soporte.



Fig 13. Celite 545.

C. Pretratamiento de Nylon 6

Se coloca el Nylon 6 en una solución de HCl 6N durante una hora, se filtra y se lava con agua destilada, se procede a quitar los restos del polímero generados por la reacción con el ácido, el siguiente paso a seguir es la activación del soporte mediante la aplicación de una solución de glutaraldehído 2.5% con buffer de fosfato de Sodio pH 7 por una hora, pasado este tiempo se retiró la solución de glutaraldehído y se lavo el soporte con agua destilada (Pahujani, 2007).



Fig 14. Nylon 6.

D. Pretratamiento de Quitosano

El quitosano en polvo fue completamente disuelto en ácido acético 2% y se calentó a 50°C por 15 min, esta solución fue extruida a través de una jeringa en una solución de NaOH con Etanol 26% (v/v) por 30 min. Al finalizar este tiempo se filtró el soporte y lavó con agua destilada (Chiou y Wu, 2003).

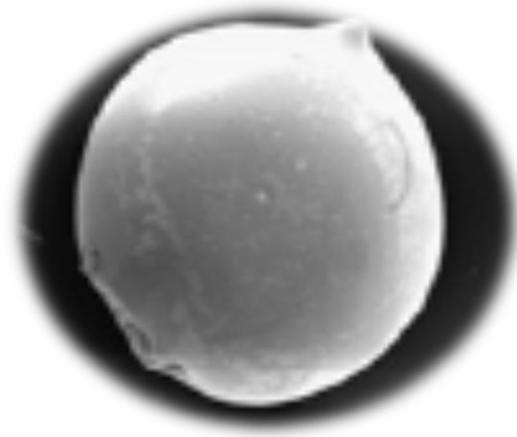


Fig 15. Esfera de quitosano precipitado a pH alcalino (Palla, 2010).

E. Proceso de adsorción

Las condiciones a las cuales se llevó a cabo la inmovilización fueron las establecidas previamente dentro del grupo de trabajo, pero modificando el tiempo y la agitación (24 h y 200 rpm en lugar de 150). El soporte pretratado se colocó en viales o tubos falcon para ponerse en contacto con el extracto enzimático y la agitación se llevó a cabo en una placa con agitación orbital (Lab-Line 3518 Instruments Inc.). Una vez concluido el tiempo indicado se filtró al vacío y el soporte con la enzima inmovilizada se lavó con 5 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7. El biocatalizador obtenido se secó en desecador por 24-48 horas a 4°C y posteriormente se almacenó en refrigeración.

F. Caracterización de la proteína no adherida

Al finalizar el proceso de inmovilización el sobrenadante se colectó y se le determinó, actividad de esterasa con α -NA y *p*-NPA, *p*-NPB y *p*-NPL según la metodología ya indicada y se cuantificó proteína por el método de Bradford.

3.10 Caracterización del extracto crudo y el inmovilizado

Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

3.10.1 pH óptimo

- ▶ Se prepararon buffers de pH de 5-11 los buffers utilizados fueron: para pH 5 acetatos 50 mM, para 6-7 fosfatos 50 mM, para 8 y 9 Tris-HCl 50 mM y para 10 y 11 CAPS 50 mM. La reacción se llevó a cabo adicionando en la microplaca un blanco de autohidrólisis el cual consistió en 180 μ L de buffer correspondiente a cada pH, 20 μ L de sustrato ésteres de *p*-nitrofenilo, para las muestras se colocaron 170 μ L de dichos buffer, 20 μ L de sustrato y 10 μ L de la enzima, también se realizó un control, esto se realizó por triplicado. La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.
- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5 mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25mg de Quitosano. A cada soporte se le adicionó 900 μ L de su respectivo buffer 50 mM y 100 μ L de sustrato se llevo a cabo la reacción en agitación durante 15 min junto con un blanco y se colocó en la microplaca 200 μ L y se midió en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.

3.10.2 Estabilidad a pH

- ▶ Se probó la estabilidad usando una microplaca a la cual se le adicionó 170 μL del buffer a evaluar (pH de 5-10) y 10 μL de la enzima, esto se incubó a 4 °C durante 1 h y 3 h. Pasado este tiempo se le adicionó 20 μL de ésteres de *p*-nitrofenilo conservando las mismas cantidades que se ocuparon para el ensayo de pH óptimo realizando un blanco de autohidrólisis y por triplicado. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada minuto, en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.
- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5 mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25 mg de Quitosano. A cada soporte se le adicionó 200 μL de su respectivo Buffer 50 mM, esto se incubó a 4 °C durante 1 h y 3 h. Pasado este tiempo se retiró el Buffer y se cambió por el Buffer con el que se observó el pH óptimo de reacción y se continuó con la metodología explicada en el ensayo para el pH óptimo.

3.10.3 Temperatura óptima

- ▶ Se probaron temperaturas en el rango de 30 °C a 80 °C, utilizando Buffer de óptimo de reacción, se incubó con la enzima pura a dichas temperaturas durante 3, 6, 9, 12 y 15 min, y se utilizaron las mismas cantidades que se ocuparon para los ensayos anteriores, corriendo a la par un blanco de autohidrólisis para cada condición. En cada intervalo tiempo se midió la absorbancia a 420 nm en espectrofotómetro Epoch (Biotek)
- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5 mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25 mg de Quitosano. Se probaron temperaturas en el rango de 30 °C a 80 °C, utilizando Buffer óptimo de reacción se incubó con el inmovilizado a dichas temperaturas durante 3, 6, 9, 12 y 15 min, y se utilizaron las mismas cantidades que se ocuparon para los ensayos anteriores, corriendo a la par un blanco de autohidrólisis para

cada condición. En cada intervalo tiempo se midió la absorbancia a 420 nm en espectrofotómetro Epoch (Biotek), la actividad enzimática fue determinada por triplicado.

3.10.4 Estabilidad térmica

- ▶ Se probó un rango de temperaturas de 30 a 80 °C; se permitió que el buffer de incubación alcanzara la temperatura a evaluar y a continuación se agregó la enzima en el extracto crudo. Se tomaron tres muestras de estabilidad: a los 15 min, a los 30 min y 1 hora de incubación. Se dejó a temperatura ambiente el biocatalizador y se prosiguió al ensayo enzimático conservando las mismas cantidades en microplaca que se ocuparon en los ensayos anteriores. La reacción se siguió durante 10 min tomando la lectura cada minuto, en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.
- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5 mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25 mg de Quitosano. Se probaron temperaturas en el rango de 30 °C a 80 °C, utilizando Buffer óptimo de reacción se incubó con el inmovilizado a dichas temperaturas durante 15,30 y 60 minutos pasado este tiempo se dejaba a temperatura ambiente y se llevaba a cabo la reacción de hidrólisis como se explica anteriormente y después se midió en el espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.

3.10.5 Especificidad por sustrato

- ▶ Para estas pruebas se prepararon soluciones de 1 mM de diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo en etanol, los cuales fueron: *p*-NPE (18C), *p*-NPP (16C), *p*-NPM (14C), *p*-NPL (12C), *p*-NPC (10C), *p*-NPB (4C) y *p*-NPA (2C). Se agregaron 170 µL de Buffer óptimo de reacción y se agregaron 10 µL de la enzima en el extracto crudo junto con 20 µL de los diferentes ésteres

de *p*-nitrofenilo. La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto, espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm.

- ▶ Para el caso de los inmovilizados se pesaron 5mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25mg de Quitosano. Se probó la especificidad de sustrato con los diferentes ésteres de *p*-nitrofenilo, utilizando Buffer óptimo de reacción 900 μ L y 100 μ L de sustrato (ésteres de *p*-nitrofenilo) realizando el ensayo como se detalló anteriormente.

3.10.6 Estabilidad operacional (reuso del biocatalizador)

Para este ensayo se pesaron 5mg de Accurel MP1000 y Celite 545, 3 pellets de Nylon 6 y 25mg de Quitosano de los inmovilizados. Se realizó la reacción de hidrólisis descrita anteriormente, se retiró el medio de reacción y se lavó con Buffer de trabajo hasta la pérdida de la coloración característica del *p*-nitrofenol, nuevamente se adicionaron 900 μ L de Buffer y 100 μ L de sustrato para iniciar una nueva reacción, se continuó con este procedimiento hasta que el catalizador perdiera su capacidad catalítica.

3.10.7 Estabilidad al almacenamiento

Los biocatalizadores fueron almacenados a 4°C y a temperatura ambiente tanto la enzima libre como inmovilizada, cada cierto periodo de tiempo se tomaba una muestra para evaluar su actividad enzimática como se realizó en los diferentes ensayos.

Resultados y Discusión

4.1 Producción de las enzimas

La producción de las hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (CEH) se llevó a cabo en los diferentes medios optimizados basados en la formulación descrita por (Käfer, 1977) y que se describieron previamente, Como ha sido estudiado por algunos investigadores, la producción de las enzimas está sujeta a mecanismo de regulación determinados por las condiciones nutricionales del medio de cultivo empleado, de esta manera se va a ver reflejado en la secreción de la enzima. Se concentraron los extractos crudos por ultrafiltración con una membrana de exclusión de 10kDa y a continuación se muestra el zimograma en el cual se observan las diferentes bandas con actividad de esterasa (Fig 16).

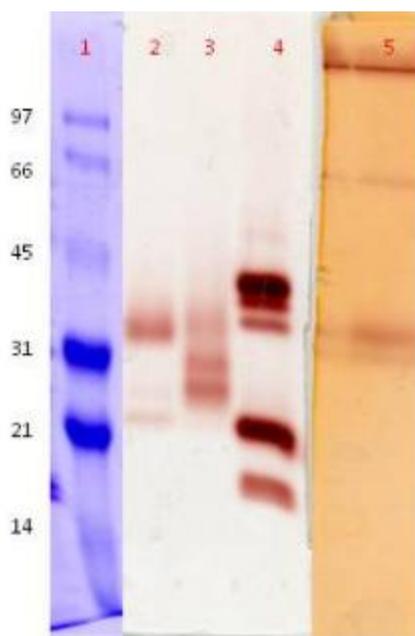


Figura 16. Zimograma para la determinación de actividad de esterasa en los diferentes extractos crudos usando como sustrato acetato de α -Naftilo y como revelador Fast red. 1: Marcador de masa molecular (Low range marker, Bio-Rad), 2-5: Extractos crudos de los medios optimizados para: PrtA de 37kDa (2), ANCUT2 29kDa (3), ANCUT1 21kDa (4) y NStcI 35kDa (5).

Al tratarse de un extracto crudo encontramos una mezcla de enzimas que tienen actividad de esterasa. En el caso del extracto crudo del medio optimizado para PrtA se observan en una menor concentración dos enzimas de aproximadamente

29 y 22 kDa, sin embargo la mayor parte de la actividad se observa para la PrtA (37 kDa), este resultado concuerda con lo obtenido anteriormente por el grupo de trabajo (Peña-Montes *et al.*, 2007). En el extracto crudo del medio optimizado de la ANCUT2 se observa una banda adicional de aprox. 26 kDa, la cual corresponde a un producto de hidrólisis de la misma ANCUT2 de acuerdo a lo obtenido anteriormente en el grupo de trabajo (Castro- Ochoa *et al.*, 2012). En el extracto crudo del medio optimizado diseñado para la producción de ANCUT1 en el zimograma se observaron diferentes bandas (6) con actividad aunque la enzima de interés se encontraba presente y con actividad intensa, este resultado fue contrario a lo obtenido por Esqueda, 2012 y Vega, 2013 quien solo observó la presencia de tres bandas con actividad (PrtA, ANCUT2 y ANCUT1) en el mismo medio, siendo la ANCUT1 la de mayor intensidad. Sin embargo, todas las fermentaciones realizadas durante esta investigación mostraron este perfil de proteínas con actividad de esterasa. Este resultado se atribuye al lote de cutícula de manzana empleada, ya que la composición de esta red varía dependiendo la temporada de cosecha, así como también el estado de maduración del fruto (Holloway, 1973; Chen *et al.*, 2010).

Para Nstcl, si se observa la producción de la enzima de interés en mayor cantidad y una banda de menor intensidad en aprox. 66 kDa que corresponde a un dímero de la Nstcl, lo cual ya se ha observado anteriormente (Peña- Montes; 2009).

Por lo tanto, es importante resaltar que no se descarta que en el caso de los extractos crudos de los medios para la producción de PrtA y de ANCUT1 que las demás enzimas que se encuentran en el medio extracelular tengan interacción con los distintos soportes.

4.2 Inmovilización

Se evaluaron diferentes soportes empleando 1g de Accurel MP 1000 y Nylon 6; 150mg de Celite 545 y Quitosano y la concentración de proteína que se muestra en la tabla 19. Se puso en contacto la solución con la enzima en pH 7 con el soporte y se incubaron a 4°C con una agitación de 200 rpm (agitador orbital por 24 h, y finalmente se determinó la actividad de esterasa de la enzima inmovilizada y el sobrenadante empleando p-NPL, p-NPA y p-NPB como sustratos. Paralelamente se cuantificó la concentración de proteína del sobrenadante. Las siguientes tablas 19 y 20 muestran los resultados obtenidos del proceso de inmovilización.

Tabla 19. Rendimientos de la inmovilización de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos.

Enzima	Soporte	Total Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U/mg de proteína)
NStcl	Accurel MP1000	4.00	3552.80	412.50
	Celite 545	1.39	957.21	180.63
	Quitosano	1.33	1009.78	495.92
	Nylon 6	3.87	2377.34	332.5
ANCUT2	Accurel MP1000	1.37	2669.93	1702.49
	Celite 545	0.39	222.00	356.82
	Quitosano	0.42	138.88	1505.99
	Nylon 6	1.39	1613.69	388.42
PrtA	Accurel MP1000	1.16	2441.08	2022.44
	Celite 545	0.40	570.05	209.49
	Quitosano	0.35	79.83	691.16
	Nylon 6	1.21	2850.37	180.37
ANCUT1	Accurel MP1000	1.13	799.67	2079.49
	Celite 545	0.42	321.15	399.88
	Quitosano	0.32	309.54	1727.15
	Nylon 6	1.25	570.82	2014.42

Tabla 20. Eficiencia de la inmovilización (E%) y rendimiento de proteína (P%) de las carboxilesterasas de *A. nidulans* en diferentes soportes.

Enzima	Soportes	P (%)	E (%)
NStcl	Accurel MP1000	42.48	81.94
	Celite 545	48.92	73.59
	Quitosano	47.05	77.63
	Nylon 6	40.95	54.83
ANCUT2	Accurel MP1000	68.26	88.35
	Celite 545	64.76	24.49
	Quitosano	69.93	15.32
	Nylon 6	69.22	53.40
PrtA	Accurel MP1000	58.51	76.33
	Celite 545	70.60	59.42
	Quitosano	61.88	8.32
	Nylon 6	61.23	89.13
ANCUT1	Accurel MP1000	59.66	40.95
	Celite 545	74.62	54.82
	Quitosano	55.58	52.84
	Nylon 6	65.8	29.23

E%: Fue calculada con la ecuación que a continuación se describe: $E(\%) = \left(\frac{U_e - U_i}{U_i} \right) \cdot 100$ donde U_e es el total de unidades de actividad que se emplearon para inmovilizar y U_i es el total de unidades de actividad en la solución después de inmovilizar.

P%: Fue calculada con la ecuación que a continuación se describe: $P(\%) = \left(\frac{P_e - P_i}{P_i} \right) \cdot 100$ donde P_e es el total de proteína que se empleó para inmovilizar y P_i es el total de proteína en la solución después de inmovilizar.

En este estudio se observa que la naturaleza del soporte influye en la cantidad de proteína adsorbida. Para la NStcl, ANCUT1 y PrtA el mayor rendimiento de adsorción se presenta en Celite 545. Este soporte es poroso, por lo que se encuentra una mayor área disponible para la interacción entre el soporte y la enzima. La ANCUT2 tuvo una mayor adsorción en el quitosano. Sin embargo, el hecho de que se tenga mayor proteína adsorbida no indica que la actividad se

manifiesta. La actividad específica que se muestra en la tabla 19 indica que la proteína es mas activa cuando está inmoviizada en el Accurel MP 1000, el cual es de naturaleza hidrofóbica, posiblemente porque los residuos hidrofóbicos de la enzima interaccionan con el soporte otorgándoles una conformación más estable, y esto se refleja en una mayor actividad. El efecto que tiene el pH sobre el proceso de inmovilización afecta la carga electrostática que se genera en la enzima, la cual se adsorbe en mayor proporción al soporte, ya que los efectos de repulsión se ven disminuidos debido a que la proteína está cerca de su punto isoeléctrico y por lo tanto la interacción de unión dependerá de la naturaleza del soporte en este caso hidrofóbicas (Goncalves *et al*, 1997).

4.3 Caracterización de ANCUT2

4.3.1 Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo

Tabla 21. Caracterización bioquímica de la ANCUT2 libre e inmovilizada en diferentes soportes.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)	Interacción
Accurel MP1000	9	7 a 10	40	30 a 60	Corta, media, larga	3	38 días 67% de AR	Hidrofóbica
Celite 545	9	6 a 11	40	30 a 60	Corta, media	5	90 días 100% de AR	Electrostática
Nylon	8	7 a 11	40	60 a 80	Corta	1	30 días 24% de AR	Covalente
Quitosano	8	6 a 10	30	30 a 70	Corta, media	2	21 días 100% de AR	Iónica
Libre	9	6 a 9	30	30 a 60	Corta, media			

AR: Actividad residua

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

4.3.2 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los inmovilizados de ANCUT2

La evaluación de la actividad de esterasa se realizó con valores de pH entre 5 y 11. En las condiciones de ensayo evaluadas, la cutinasa ANCUT2 en solución presentó una mayor actividad hidrolítica en un rango de pH de 8 a 9, con un pH óptimo de 9. Este dato es consistente con otros estudios en donde cutinasas de origen fúngico y bacteriano presentan su actividad máxima a pH alcalino (Trail y köller, 1990; Speranza *et al.*, 2011), mientras que inmovilizada para el caso de Accurel MP 1000 y Celite 545 presenta un pH óptimo de 9. En el caso del Nylon 6 y el Quitosano el pH de mayor actividad es 8 aunque los rangos de actividad difieren para los dos soportes. Este comportamiento puede deberse al hecho de que la molécula de quitosano es un copolímero compuesto de N-acetilglucosamina y N-glucosamina. Es un polímero policationico que tiene un grupo amino y 2 grupos hidroxilos en el residuo glucosídico. La presencia del grupo amino indica que el pH altera substancialmente el estado de carga y las propiedades del quitosano (Dash, 2011).

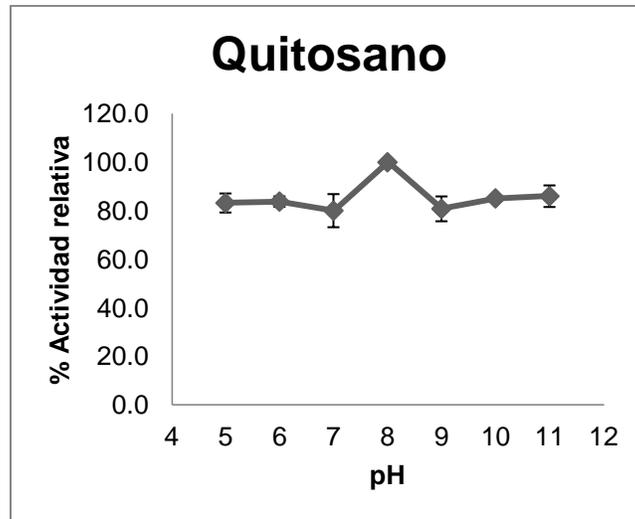


Figura 17. Efecto del pH sobre la actividad enzimática en la AN CUT2 inmovilizada en Quitosano.

El quitosano es insoluble en muchos solventes orgánicos y es soluble en soluciones ácidas diluidas debajo de pH 6, debido a la cuaternización de los grupos aminos, que tienen un pKa de 6.3 lo que hace al quitosano un polielectrolito catiónico en agua. De cierta manera pareciera que la interacción con la proteína permite al biocatalizador actuar como un buffer que le permite una actividad favorable en un amplio rango de pH.

Por otro lado el efecto del pH alcalino indica que la carga negativa favorece una mayor actividad enzimática, debido a que el sitio activo se encuentra desprotonado en estas condiciones, por lo que la triada catalítica y aminoácidos adyacentes llevan a cabo la reacción.

El efecto del pH en la actividad de una enzima, en solución o inmovilizada, es importante ya que las interacciones electrostáticas están determinadas por el valor de pH y la actividad se va a ver afectada por el estado de protonación de los residuos del sitio activo, por lo tanto éste es un factor clave (Goncalves *et al*, 1997; Huang *et al.*, 2007).

4.3.3 Evaluación de la estabilidad al pH de los biocatalizadores

Se evaluó la estabilidad al pH de la enzima en solución y la de los inmovilizados, incubándolos por 1 y 3 h a 4°C a valores de pH de 5 a 11. Se calculó la actividad de esterasa residual con p-NPL.

Los resultados mostraron que la ANCUT2 en solución se mantiene estable en un rango de pH 6 a 9, mientras que la enzima inmovilizada muestra estabilidad al pH en un rango 6 a 11, lo que indica que por el efecto de la interacción enzima-soporte la enzima adquiere una conformación rígida que impide la desnaturalización de la misma y, como resultado, no se ven afectada las propiedades catalíticas en comparación con el comportamiento de la enzima libre, lo que coincide con otros reportes para diferentes enzimas (Tang *et al.*, 2005).

4.3.4 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores, enzima libre e inmovilizada

La evaluación de la actividad a diferentes temperaturas consistió en llevar la reacción de hidrólisis del p-NPL en un rango de 30 a 80 °C, a pH óptimo de reacción. El efecto que tiene la temperatura en la actividad catalítica de la enzima en solución e inmovilizada en Quitosano es 30 °C, mientras en los otros soportes fue a 40 °C donde se presentó la mayor actividad enzimática. Se observa que a temperaturas mayores a 50 °C disminuye la actividad de esterasa tanto en solución como inmovilizada, con excepción del inmovilizado en Celite 545 que retiene su actividad a 80 °C, y conserva 50% de su actividad residual (Anexo A).

4.3.5 Determinación de la estabilidad térmica de ANCUT2 libre e inmovilizada

Se estudió la estabilidad térmica de las enzimas en solución e inmovilizada, incubando en un rango de temperatura de 30 a 80°C por 15, 30 y 60 min a pH óptimo. Posteriormente se calculó la actividad esterasa residual con p-NPL.

En la enzima en solución se observa una disminución en la actividad enzimática cuando se incuba a 60°C por 1 h; en cambio, la enzima inmovilizada se inactiva cuando la temperatura alcanza 70 °C, aunque en los casos del inmovilizado Celite 545 y en Nylon 6, la estabilidad térmica incrementa con respecto a la enzima en solución, esto significa que el proceso de inmovilización empleado (unión covalente) presentó una mejora en la conformación de la proteína al unirse al soporte otorgándole una estructura más rígida que evita la desnaturalización por calor (Hung *et al.*,2008). La diferencia observada en la estabilidad térmica entre los diferentes soportes probablemente está relacionado con la intensidad de las interacciones enzima soporte, tal es el caso de Celite 545 tiene una superficie con cristales de SiO₂, con múltiples puntos de adsorción, como la red de oxígeno con carga negativa que compensa los cationes del grupo silanol. Las posibles interacciones entre la matriz y la proteína son eficaces con una unión electrostática, hidrofóbica o por puente de hidrógeno (Serralha *et al.*, 2002).

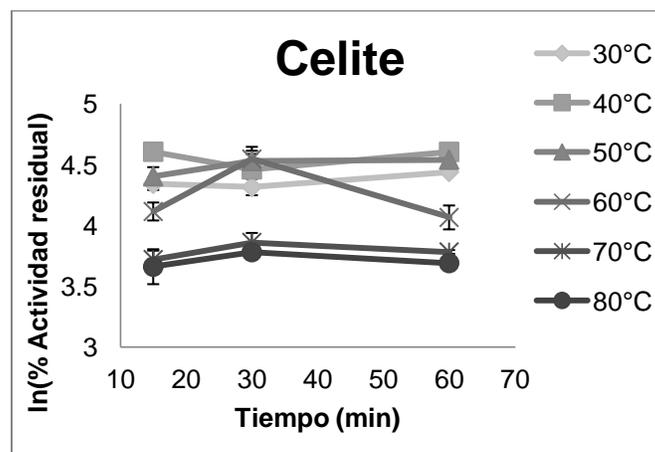


Figura 18. Estabilidad térmica de la ANCUT2 inmovilizada en Celite 545.

4.3.6 Especificidad de sustrato

Se evaluó la reacción de hidrólisis de la enzima en solución e inmovilizada, sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena a pH óptimo. Se observa que hay una mayor afinidad hacia sustratos de cadena corta y media para la enzima en solución. Este mismo comportamiento se observa para la enzima inmovilizada en Nylon 6, en cambio para el resto de los inmovilizados hay una especificidad mayor hacia ésteres de cadena larga.

4.3.7 Reuso del biocatalizador

Se evaluó la posibilidad del reuso del biocatalizador llevando a cabo la reacción de hidrólisis del *p*-NPL a pH óptimo, realizándose lavados del inmovilizado entre cada reacción con el mismo buffer de trabajo.

Los biocatalizadores presentan una baja estabilidad operacional. Este fenómeno pudiera deberse a que se presentó una inhibición por presencia de producto dentro de la matriz, ya que los lavados se suspendieron al desaparecer la tonalidad característica del *p*-Nitrofenol, lo cual no garantiza la ausencia del producto y sustrato dentro del microambiente del soporte-enzima o que se presentara desorción de la proteína adsorbida por lo que se tendrían que hacer ensayos que permitieran determinar la causa de este problema, pero en el caso de la unión covalente el biocatalizador solo permite un ciclo de reuso lo que implica un cambio en la metodología para inmovilizar ya que esta propiedad es primordial para la reducción de costos en el proceso (Humar y Kanwar, 2010; Ahmed y Husain, 2011) reportan 6 y 7 ciclos de reuso en el caso de Celite 545 pero la inmovilización se realizó por unión covalente, con disminución de la actividad respecto a la primer lectura de actividad, lo que indica que los 5 ciclos realizados por el biocatalizador pueden ser mejorados empleando este procedimiento.

4.3.8 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución

La enzima en solución y la enzima inmovilizada fueron almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente, y se llevó a cabo la reacción de hidrólisis del p-NPL al pH óptimo establecido previamente.

La enzima libre mantiene el 100% de su actividad a 4°C por 21 días y después de este tiempo disminuye su actividad a 20% por 71 días. En la enzima inmovilizada almacenada a 4°C resalta su gran estabilidad en Celite 545, donde conserva 100% de su actividad por 90 días de almacenamiento. Cabe resaltar que no se presentó crecimiento de microorganismos en ninguna de las matrices, tanto a 4°C como a temperatura ambiente. El almacenamiento a 4°C es más favorable ya que se mantiene un control de la temperatura aunque en Nylon 6 la interacción enzima-soporte produce un biocatalizador estable a temperatura ambiente. (Ahmed y Husain, 2011), Se evaluó el almacenamiento por 60 días a 4°C y se conservó con 78% de actividad residual. Se puede afirmar que Celite 545 ofrece la mayor estabilidad al almacenamiento.

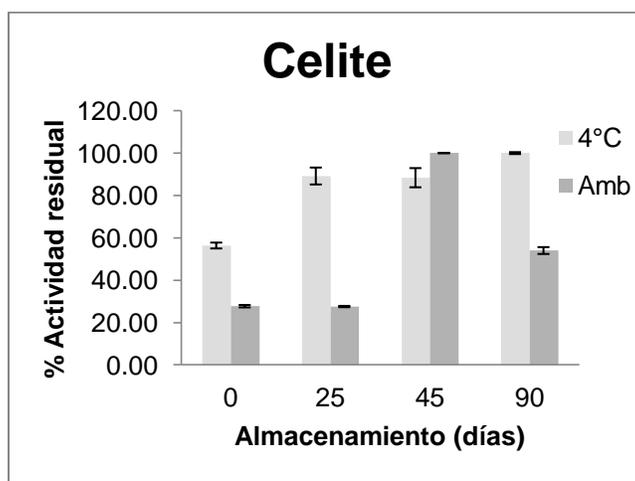


Figura19. Estabilidad al almacenamiento a 4°C y temperatura ambiente de la AN CUT2 inmovilizada en Celite 545.

4.4 Caracterización de ANCUT 1

4.4.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada

Tabla 22. Caracterización bioquímica de la ANCUT1 libre e inmovilizada.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)	Interacción
Accurel MP1000	10	5 a 11	60	30 a 80	Corta, media y Larga	9	38 días 47% de AR	Hidrofóbica
Celite 545	6 y 11	7 a 9	30-40	30 a 40	Corta y larga	2	81 días 57% de AR	Electrostática
Nylon	8	7 a 10	60	30 A 70	Corta y media	3	30 días 15% de AR	Covalente
Quitosano	6 y 9	7 a 9	30	30 a 50	Corta y media	2	21 días 100% de AR	Iónica
Libre	8 a 10	6 a 10	30	30 a 70	Corta y media			

AR: Actividad residual

Todos los experimentos se realizaron por triplicado

La evaluación de la actividad de esterasa de ANCUT1 se realizó a valores de pH entre 5 y 11 y se determinó mediante la hidrólisis de p-NPB. Se observó que las enzimas en el extracto crudo son más activas en rango de pH de 8-10. En el zimograma se observan varias bandas con actividad. La enzima inmovilizada presenta un comportamiento diferente en cada soporte: en Accurel el pH óptimo es de 10 y para Nylon 6 es de 8, mientras que en Celite 545 y Quitosano conserva actividad en el rango de pH evaluado y presenta 2 picos de actividad, a 6 y 11 en el caso del primero y a 6 y 9 en el segundo. Esto sugeriría que se adsorbieron posiblemente todas las proteínas con actividad de esterasa en estas matrices. Se debe corroborar realizando un zimograma de la desorción de estas enzimas.

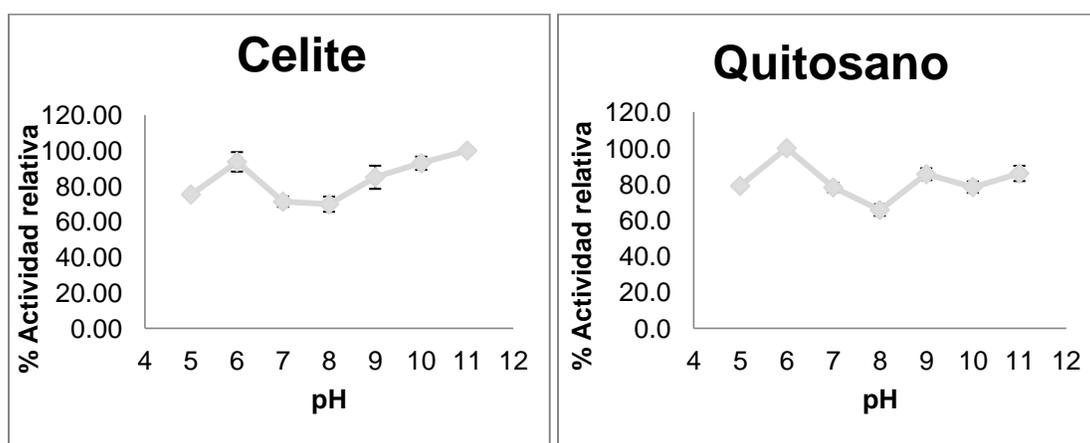


Figura 20. Efecto del pH sobre la ANCUT1 inmovilizada en Celite 545 y Quitosano.

Al ser el quitosano un soporte policatiónico la actividad se desplazó a pH ácido, debido a que el pI es de 5.4 y por lo tanto hubo un desplazamiento del pH óptimo, aunque algo parecido sucedió con la inmovilización en Celite 545 y coincide con lo reportado por otros autores (Chiou Shao Hua, 2003).

4.4.2 Evaluación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada

Se evaluó la estabilidad al pH de las enzimas en solución y los inmovilizados, incubándolos por 1 y 3 h a 4 °C a valores de pH de 5 a 11, se calculó la actividad de esterasa residual con p-NPB. Los resultados muestran que las proteínas presentes no son estables a pH 5 por 3 h. El comportamiento en los inmovilizados se modifica en el Accurel MP 1000, en donde la actividad es estable en un rango de pH 5 a 11, mientras que para Nylon 6, Celite y Quitosano de 7 a 10. Estos resultados significan que la inmovilización provee a la enzima de una mayor estabilidad frente al pH, posiblemente por un cambio conformacional generado en la molécula de las enzimas por la unión a los soportes (Kuo *et al.*, 2011).

4.4.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores

Las enzimas en el extracto crudo muestran una actividad a 30°C con el 100% de actividad relativa y 50% de su actividad residual a 80°C. El comportamiento observado es debido a que hay múltiples proteínas con actividad de esterasa. En cambio para las enzimas inmovilizadas en Accurel MP 1000 y Nylon 6 se presentó un máximo de actividad a 60 °C, en Quitosano a 30°C y en Celite 545 fue entre 30 y 40°C (ver gráfico en apéndice). Otros autores han mostrado que la actividad de la enzima inmovilizada es mayor que la enzima libre debido a la interacción con el soporte (Serralha *et al.*, 2002; Romo *et al.*, 2012; Bayramoğlu *et al.*, 2001; Yi *et al.*, 2008; Kolling *et al.*, 2010).

4.4.4 Determinación de la estabilidad térmica de la enzima en solución e inmovilizada

Se estudió la estabilidad térmica de las enzimas en solución y de las enzimas inmovilizadas, incubando en un rango de temperatura de 30 a 80 °C por 15, 30 y 60 min a pH óptimo. Posteriormente se calculó la actividad esterasa residual con p-NPB.

El efecto de la estabilidad térmica que se observa en las enzimas en solución es una pérdida de actividad a 70 °C por 1 h, por otro lado, las enzimas inmovilizadas para Accurel MP 1000 una estabilidad de 30 a 80 °C por 1 h, Nylon 6 de 30 a 70°C y para Quitosano y Celite 545 se presentaron los valores mas bajos, pues son estables de 30 a 50 °C .Un importante parámetro ha sido la estabilidad térmica para una aplicación industrial y se observó que la inmovilización en polipropileno fue la mejor en este sentido, debido a que las enzimas inmovilizadas en soportes hidrofóbicos presentan una mayor estabilidad térmica en comparación con la enzima libre. La inmovilización podría causar una estructura de la enzima más rígida, restringiendo un cambio conformacional que impacte en la pérdida de actividad catalítica. La inmovilización por adsorción parece que juega un papel importante en la estabilización de la estructura de la proteína y resistencia a la desnaturalización (Kolling *et al.*, 2010).

4.4.5 Especificidad de sustrato

Se evaluó la reacción de hidrólisis de la enzima en solución e inmovilizada, sobre ésteres de p-nitrofenilo con diferente largo de cadena a pH óptimo. Se observó que las enzimas en solución actúan sobre ésteres de p-nitrofenilo de cadena corta, media y larga. Comportamiento similar se tiene en los inmovilizados, con excepción de Quitosano, que presenta mayor afinidad por sustratos de cadena corta y media. El hecho de que tenga especificidad para sustratos de cadena larga impacta directamente en la aplicación para la producción de biodiesel.

4.4.6 Reuso del biocatalizador

Se evaluó el reuso del biocatalizador llevando a cabo la reacción de hidrolisis del p-NPB a pH óptimo, realizándose lavados del inmovilizado entre cada reacción con el mismo buffer de trabajo.

Se presentó en el Accurel MP 1000 una mayor estabilidad operacional, ya que se logró llevar a cabo hasta 9 ciclos de reuso y se retuvo 50% de actividad, lo que indica que la estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas se favorece cuando se logran interacciones hidrofóbicas entre el soporte y las enzimas. Otros investigadores reportas entre 3 y 15 ciclos de reuso de los biocatalizadores (Belhaj-Ben Romdhane *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2005).

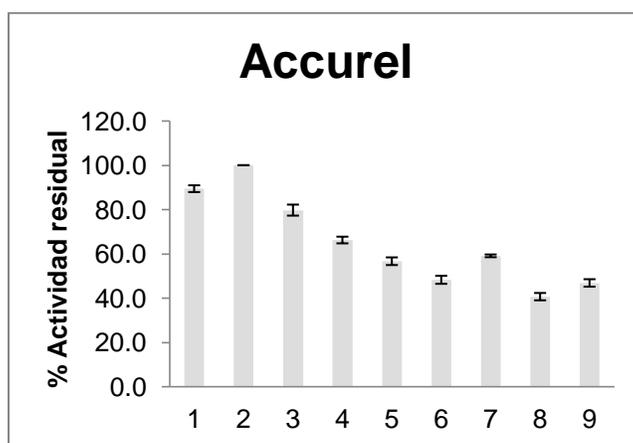


Figura21. Ciclos de reuso del biocatalizador.

4.4.7 Estabilidad al almacenamiento de las enzimas inmovilizadas y en solución

Las enzimas en solución e inmovilizadas fueron almacenadas a 4 °C y a temperatura ambiente. Se determinó actividad tras diferentes tiempos de almacenamiento a pH óptimo, evaluando la reacción de hidrólisis del p-NPB.

La enzima libre mantiene el 100% de su actividad a 4 °C por 32 días. Después de este tiempo pierde su actividad hasta 40% por 89 días. En cambio la enzima

inmovilizada en Celite 545 y almacenada a 4 °C mantiene el 57% de su actividad por 81 días.

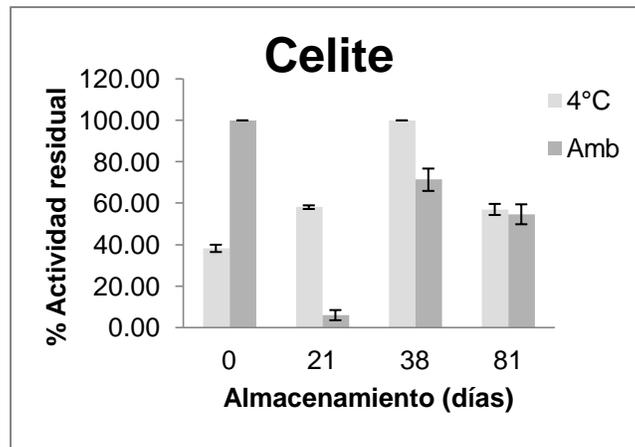


Figura 22. Almacenamiento del biocatalizador a 4°C y temperatura ambiente.

4.5 Caracterización de NStcl

4.5.1 Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada

Tabla 23. Caracterización bioquímica de la NStcl libre e inmovilizada.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C	Interacción
Accurel MP1000	11	7 a 9	30	30 a 60	corta	5	38 días 100% de AR	Hidrofóbica
Celite 545	9	5 a 9	50	30 a 70	corta	3	38 días 100% de AR	Electrostática
Nylon	11	5 a 10	50	30 a 60	corta	3	13 días 100% de AR	Covalente
Quitosano	8	5 a 11	70	30 a 70	corta	3	81 días 84% de AR	Iónica
Libre	9	7 a 10	40	30 a 40	Corta			

AR: Actividad residua

Todos los experimentos se realizaron por triplicado

La evaluación de la actividad de esterasa a diferentes valores de pH para la enzima en solución y la enzima inmovilizada se realizó con valores de pH entre 5 y 11 y la actividad de esterasa se evaluó con la hidrólisis de p-NPA y p-NPB.

Se realizó la evaluación del efecto del pH sobre la actividad hidrolítica de una esterasa recombinante NStcI en el extracto crudo resultando una máxima actividad a pH 9, mientras que inmovilizada para Accurel MP 1000 y nylon 6 un máximo a pH 11 confiriéndole un efecto protector que no inactiva a la enzima a este pH alcalino. Para el caso de Celite 545 y Quitosano se tiene una máxima actividad a pH 9 y 8, respectivamente.

4.5.2 Evaluación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada

Se evaluó la estabilidad al pH de la enzima en solución y los inmovilizados, incubándolos por 1 y 3h a 4 °C a valores de pH de 5 a 11, se calculó la actividad de esterases residual con p-NPA.

La estabilidad al pH de la enzima libre muestra que su actividad se ve disminuida cuando está en contacto a pH menor a 7 y una inactivación a pH ácido, siendo estable en un rango de pH de 7 a 10. La enzima inmovilizada en los diferentes soportes tiene una mayor estabilidad frente a una concentración mayor de protones con Quitosano, Celite 545 y Nylon 6. En Accurel MP 1000 es mayor en pH ligeramente alcalino. El hecho de que la interacción con el quitosano sea estable en todo el rango evaluado se podría explicar porque probablemente la flexibilidad de la enzima se modificó al interactuar con el soporte, brindándole una conformación rígida que la protege a desnaturalización por pH (Tang *et al.*, 2006; Belhaj-Ben Romdhane *et al.*, 2010; Yi *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2003). Podemos concluir que el quitosano como matriz tiene una especial importancia para inmovilizar ya que estabiliza a la enzima en diferentes rangos de pH.

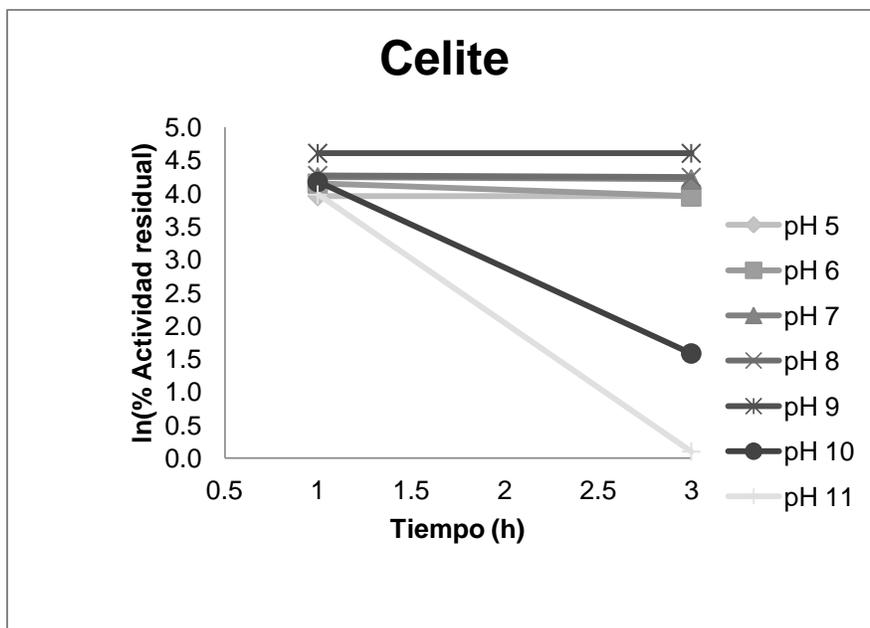


Figura 23. Estabilidad al pH de la NSTcl inmovilizada en Celite 545.

4.5.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada

La evaluación de la actividad a diferentes temperaturas consistió en llevar la reacción de hidrólisis del p-NPA en un rango de 30 a 80 °C como se muestra en la a pH 9.

El efecto que ejerce la temperatura en la enzima libre se observa en la medición de la actividad de esterasa con un máximo a 40 °C. Para la enzima inmovilizada en Accurel MP 1000 es de 30 °C y se inactiva a 70 °C. Se presentó una mayor actividad en 50 °C para Nylon 6 y Celite 545, mientras que en Quitosano fue de 70 °C (Belhaj-Ben Romdhane *et al.*, 2010 y Tang *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2003) encontraron que la enzima inmovilizada en quitosano incrementa su actividad en un amplio rango de temperatura respecto a la enzima en solución.

4.5.4 Determinación de la estabilidad térmica de la enzima en solución e inmovilizada

Se estudió la estabilidad térmica de la enzima en solución y de la enzima inmovilizada, incubando en un rango de temperatura de 30 a 80°C por 15, 30 y 60 min a pH 9. Posteriormente se calculó la actividad esterasa residual con p-NPA.

El efecto de térmico en la enzima en solución es una disminución de la actividad catalítica a 40 °C por 1 h de incubación, mientras que inmovilizada la inactivación se presenta a 70 °C para Accurel MP 1000 y Nylon 6, en cambio para Celite 545 y Quitosano se observa que a 80 °C hay una disminución de la actividad enzimática, lo que indica que el proceso de inmovilización favorece la estabilidad térmica de la enzima (Belhaj-Ben Romdhane *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2006; Yi *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2005). Una mejor estabilidad térmica de la enzima inmovilizada extenderá la potencial aplicación de la carboxilesterasa como un biocatalizador.

4.5.5 Especificidad de sustrato

Se evaluó la reacción de hidrólisis de la enzima en solución e inmovilizada, sobre ésteres de *p*-nitrofenilo con diferente largo de cadena a pH óptimo.

Tanto la enzima libre como inmovilizada tienen afinidad hacia sustratos de cadena corta comportamiento que está presente en las esterases (Uchida, 2003; Krebsfänger *et al.*, 1998).

4.5.6 Reuso del biocatalizador

Se evaluó el potencia del reuso del biocatalizador llevando a cabo la reacción de hidrólisis del p-NPA y p-NPB a pH 9, realizándose lavados del inmovilizado entre cada reacción con el mismo buffer de trabajo.

Los biocatalizadores presentan una baja estabilidad operacional. Este fenómeno pudiera deberse a que se presentó una inhibición por presencia de producto dentro de la matriz, ya que los lavados se suspendieron al desaparecer la tonalidad característica del p-Nitrofenol, lo cual no garantiza la ausencia del producto y sustrato dentro del microambiente del soporte-enzima. Caso contrario se presentó con el Accurel MP 1000 ya que logra realizar hasta 5 ciclos de reuso evaluados con 20% de actividad lo que indica que la estabilidad operacional de las enzimas inmovilizadas se ve favorecida cuando se logran interacciones hidrofóbicas entre el soporte y las enzimas. Sin embargo, se presenta pérdida de actividad entre cada ciclo de reacción de hidrólisis. Esto concuerda con lo reportado por (Silveira *et al.*, 2012) para una queratina, 7 y 10 ciclos son los que reportan (Palla *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2007) para una lipasa y una carboxilesterasa recombinante con 6 ciclos de reuso (Kolling *et al.*, 2008).

4.5.7 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución

Las enzimas en solución e inmovilizadas fueron almacenadas a 4 °C y a temperatura ambiente y en cada evaluación se llevó a cabo a pH 9 la reacción de hidrólisis del p-NPA

La enzima libre mantiene el 70% de su actividad a 4 °C y temperatura ambiente por 141 días aunque en los dos casos el aroma que se percibe es diferente al inicial, no se descarta contaminación del medio que aún es rico en nutrientes. En cambio las enzimas inmovilizadas se mantienen estables en Quitosano con un 84% de actividad residual en 81 días, lo que indica que el Quitosano es una opción viable con un costo nulo debido a que se obtiene de residuos. Otros autores reportan que diferentes esterasas son estables por 30 días a 4 °C con 56% de actividad residual (Huang *et al.*, 2007), por otro lado (Yi *et al.*, 2008) reporta una estabilidad al almacenamiento por 21 días con 94% de actividad, (Hung *et al.*, 2003) reporta que por 7 días de almacenamiento a 25 °C retiene 67% de su actividad en cambio la NStcl es estable por 38 días reteniendo 60% de su actividad.

4.6 Caracterización de PrtA

4.6.1 Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los inmovilizados de PrtA

Tabla 24. Caracterización bioquímica de la PrtA libre e inmovilizada.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)	Interacción
Accurel MP1000	10	8 a 11	50	40 a 70	Corta	1	38 días 69% de AR	Hidrofóbica
Celite 545	10	6 a 11	60	30 a 70	Corta y media	1	81 días 87% de AR	Electrostática
Nylon	9	7 a 9	70	30 a 70	Media	1	30 días 70% de AR	Covalente
Quitosano	9	7 a 10	30	30 a 70	Media	1	81 días 30% de AR	Iónica
Libre	10	7 a 11	30	30 a 50	Corta			

AR: Actividad residual

Todos los experimentos se realizaron por triplicado

La evaluación de la actividad de esterasa a diferentes valores de pH para la enzima en solución y la enzima inmovilizada, se realizó con valores de pH entre 5 y 11. La actividad enzimática se midió con la hidrólisis de p-NPL.

La proteasa extracelular de *Aspegillus nidulans* PrtA en el extracto crudo presentó una mayor actividad de esterasa a pH 10 lo que corrobora de que se está trabajando con un alcalinproteasa con valor similar de pH óptimo alcalino al encontrado por (Hajji *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2011). Por otro lado, los inmovilizados conservan un pH alcalino en Accurel MP 1000 y Celite 545 tienen su mayor actividad a pH 10, mientras que Quitosano y Nylon 6 su mayor actividad es a pH 9. Accurel MP 1000 es el único inmovilizado que pierde actividad por debajo de pH 7.

4.6.2 Evaluación de la estabilidad al pH de los biocatalizadores

Se evaluó la estabilidad al pH de la enzima en solución y los inmovilizados, incubándolos por 1 y 3 h a 4 °C a valores de pH de 5 a 11, se calculó la actividad de esterasa residual con la medición de la hidrólisis del p-NPL a una absorbancia de 420nm.

El extracto crudo de PrtA es estable a pH alcalino por 3 h y el mismo comportamiento se observa en los inmovilizados. La inmovilización en Celite 545 brinda un incremento en la estabilidad al pH, cuando es mayor la concentración de H⁺. La estabilidad de varias enzimas puede ser mejorada cuando se emplean soportes inorgánicos en lugar de polímeros orgánicos debido a la naturaleza del soporte (Durgun y Akkus, 2005).

4.6.3 Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores

La evaluación de la actividad a diferentes temperaturas consistió en llevar la reacción de hidrólisis del p-NPL en un rango de 30 a 80°C a pH 9.

La actividad de esterasa de la PrtA en el extracto crudo presenta un máximo entre 30 y 40°C. Cuando es inmovilizada en Quitosano es de 30°C, en Accurel MP 1000 50°C y Celite 545 incrementa a 60°C y en Nylon es donde se nota su mayor incremento, hasta 70°C. Las proteasas termoestables son de gran interés en bioingeniería y biotecnología (Hajji *et al.*, 2007) la inmovilización ofrece un incremento en la actividad enzimática comparándose con la enzima libre (Wang *et al.*, 2006; Abdel *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2004).

4.6.4 Determinación de la estabilidad térmica de PrtA libre e inmovilizada

Se estudió la estabilidad térmica de la enzima en solución y de la enzima inmovilizada, incubando en un rango de temperatura de 30 a 80 °C por 15, 30 y 60 min a pH 9. Posteriormente se calculó la actividad esterasa residual con la reacción de hidrólisis del p-NPL.

La PrtA en el extracto crudo presenta una mayor estabilidad de 30 a 50 °C por lo que se confirma su termoestabilidad que se refleja en la actividad de esterasa en el extracto crudo. Mientras que inmovilizada en todos los soportes presentan una estabilidad en el rango de 30 a 70 °C con una eventual inactivación a 80 °C. La inmovilización le confiere una estabilidad térmica a la enzima (Durgun y Akkus, 2005; Abdel *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2004; Amaya *et al.*, 2005).

4.6.5 Especificidad de sustrato

Se evaluó la reacción de hidrólisis de la enzima en solución e inmovilizada, sobre ésteres de p-nitrofenilo con diferente largo de cadena a pH 9.

PrtA libre e inmovilizada presenta afinidad por sustratos de cadena corta, media y en menor proporción a cadena larga. La variación en los valores de actividad residual indica problemas de difusión por efecto de la matriz.

4.6.6 Reuso del biocatalizador

Se evaluó el reuso del biocatalizador llevando a cabo la reacción de hidrólisis del p-NPL a pH 9, realizándose lavados del inmovilizado entre cada reacción con el mismo buffer de trabajo.

La estabilidad operacional en un biocatalizador es una de las características más llamativas, la inmovilización de PrtA en estas matrices y con las metodologías empleadas no resulta favorable para el reuso en reacciones de hidrólisis. Cabe señalar que pudiera presentarse una inactivación por inhibición o por desorción de la proteína unida al soporte. Durgun y Akkus (2005), así como Xi *et al.*, (2004) emplearon soportes similares y realizaron de 4 a 5 ciclos de reuso con proteasas, la diferencia pudiera deberse a que se determina su actividad como esterasa. Se esperaría que la inmovilización por unión covalente confiriera una estabilidad operacional alta, como lo reportan Pahujani *et al.*, (2007) con 13 ciclos de reuso, sin embargo, la concentración de glutaraldehído puede ser una causa de este comportamiento. El glutaraldehído es un agente entrecruzante usado para acoplar componentes con grupo amino, puede ser tóxico y causar la desnaturalización de la enzima inmovilizada (Belhaj-Ben Romdhane *et al.*, 2010; Isgrove *et al.*, 2001).

4.6.7 Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución

La enzima en solución y la enzima inmovilizada fueron almacenadas a 4°C y a temperatura ambiente. Cada evaluación se llevó a cabo a pH 9 y se hizo la reacción de hidrólisis del p-NPL.

La actividad de la enzima libre mantiene el 100% de su actividad a 4°C por 64 días después de este tiempo se inactiva. En cambio la enzima inmovilizada almacenada a 4°C mantiene el 87% de su actividad por 81 días únicamente en Celite 545 y Quitosano 30% respectivamente. La estabilidad al almacenamiento se ve favorecida por una temperatura controlada como lo es a 4 °C, en la literatura se reporta que las proteasas inmovilizadas pueden alcanzar una estabilidad al almacenamiento de 30 a 180 días con 100 a 50% de su actividad (Durgun y Akkus, 2005; Abdel *et al.*, 1997; Xi *et al.*, 2004).

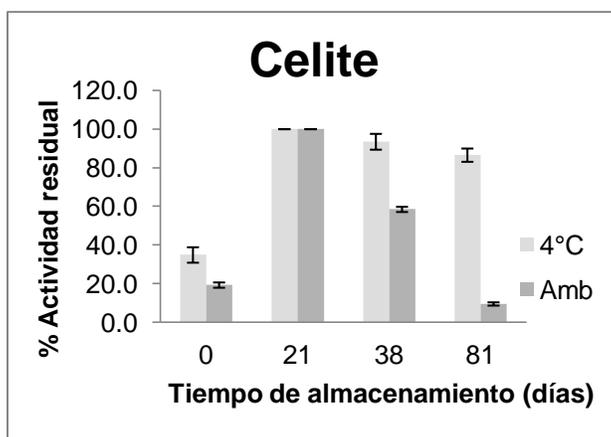


Figura 24. Estabilidad al almacenamiento de la PrtA inmovilizada en Celite 545 a 4°C y temperatura ambiente.

Tabla 25. Enzimas inmovilizadas en Accurel MP 1000.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)
NStcl	11	7 a 9	30	30 a 60	Corta	5	38 días 100% de AR
ANCUT1	10	5-11	60	30 a 80	Corta y media, larga	9	38 días 47% de AR
ANCUT2	7 a 9	7 a 10	40	30 a 60	Corta, media y larga	3	38 días 67% de AR
PrtA	10	8 a 11	50	40 a 70	Corta	1	38 días 69% de AR

AR: Actividad residual

El Accurel MP 1000 le confiere una mayor estabilidad al pH y temperatura a las enzimas en estudio comparándose con la enzima libre, con 9 ciclos de reuso a la interacción con la enzima ANCUT 1, este soporte brinda una estabilidad al almacenamiento por 38 días a 4°C.

Tabla 26. Enzimas inmovilizadas en Celite 545.

Celite 545

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)
NStcl	9	5 a 9	50	30 a 70	Corta	3	38 días 100% de AR
ANCUT1	6 y 11	7-9	30-40	30 a 40	Corta y larga	2	81 días 57% de AR
ANCUT2	9	6 a 11	40	30 a 60	Corta y media	5	90 días 100% de AR
PrtA	10	6 a 11	60	30 a 70	Corta y media	1	81 días 87% de AR

AR: Actividad residual

Celite 545 brinda una mayor estabilidad térmica a los biocatalizadores, con excepción de la ANCUT1. Se pueden realizar 5 ciclos de reuso con ANCUT2 y puede almacenarse a 4°C por 81 días, con excepción de la inmovilización con NStcl.

Tabla 27. Enzimas inmovilizadas en Quitosano.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)
NStcl	8	5 a 11	70	30 a 70	Corta	3	81 días 84% de AR
ANCUT1	6 y 9	7 a 9	30	30 a 50	Corta y media	2	21 días 100% de AR
ANCUT2	8	6 a 10	30	30 a 70	Corta media	2	21 días 100% de AR
PrtA	9	7 a 10	30	30 a 70	Media	1	81 días 30% de AR

AR: Actividad residual

El Quitosano permite obtener biocatalizadores que pueden trabajar en un rango de pH de 6 a 11 y con una mayor estabilidad térmica, capaz de llevar 3 ciclos de hidrólisis consecutivos solamente con NStcl y ser estable al almacenamiento por 81 días con esta enzima.

Tabla 28. Enzimas inmovilizadas en Nylon 6.

Soporte	pH óptimo	Estabilidad al pH	Temperatura óptima (°C)	Estabilidad térmica (°C)	Sustratos	# Ciclos de reuso	Almacenamiento 4°C (días)
NStcl	11	5 a 10	50	30 a 60	Corta	3	13 días 100% de AR
ANCUT1	8	7 a 10	60	30 A 70	Corta y media	3	30 días 15% de AR
ANCUT2	8	7 a 11	40	60 a 80	corta	1	30 días 24% de AR
PrtA	9	7 a 9	70	30 a 70	media	1	30 días 70% de AR

AR: Actividad residual

La inmovilización con Nylon 6 con los diferentes biocatalizadores permite una mayor estabilidad al pH, térmica, con 3 ciclos de reuso en la interacción con NStcl y ANCUT1, con baja estabilidad al almacenamiento. Esta matriz provoca dificultades técnicas para su empleo porque no es homogéneo el tamaño de partícula, por lo que se sugiere otra metodología.

Recapitulando de los datos obtenidos el mejor soporte para cada enzima es el siguiente:

Tabla 29. Interacciones enzima-soporte.

Enzima	Soporte
ANCUT 1	Accurel MP 1000
ANCUT 2	Celite 545
NStcl	Quitosano
PrtA	Celite 545

De acuerdo a los resultados obtenidos con la caracterización bioquímica la especificidad de sustrato y su estabilidad térmica los biocatalizadores generados podrían llevar a cabo las reacciones propuestas en la tablas 2 y 3.

Conclusiones

- Se obtuvieron extractos crudos que contenían únicamente las enzimas ANCUT2, NStcl. En el caso de los extractos crudos diseñados para la producción de Prt A y ANCUT1 se obtuvieron varias esterasas detectadas en el zimograma con actividad intensa de la enzima de interés.
- Se logró inmovilizar una mayor cantidad de enzima con actividad de esterasa en Accurel MP 1000 (ANCUT2 1702 U/mg de proteína, PrtA 2022 U/mg de proteína y ANCUT1 2079 U/mg de proteína) y en Quitosano (NStcl 495 U/mg de proteína).
- Para ANCUT2 se obtuvo un incremento en la estabilidad al pH en todos los soportes y mayor estabilidad térmica respecto a la enzima en solución, presenta 5 ciclos de reuso en Celite 545 con 20% de actividad residual, Celite 545 por 90 días con 100% de actividad residual, siendo esta matriz la más compatible con la proteína.
- La ANCUT1 inmovilizada en Celite 545 y Quitosano ofrece una mayor estabilidad en todo el rango de pH evaluado, en tanto que el Accurel MP 1000 confiere una mayor estabilidad térmica a la enzima y presenta 9 ciclos continuos de reuso. Hay una mayor estabilidad al almacenamiento en Celite 545, pero se recomienda su inmovilización en Accurel MP 1000.
- NStcl presenta un incremento en la estabilidad al pH en Quitosano y Accurel MP 1000, se tiene un incremento en la estabilidad térmica en todas las matrices con un efecto más marcado en Quitosano y Celite, 5 ciclos de reuso en Accurel MP 1000, es más estable al almacenamiento en

Quitosano por 81 días. Teniendo la interacción más favorable con Quitosano.

- PrtA con actividad de esterasa se incremento la estabilidad al pH en todas las matrices en el rango de pH 5-11 por 3 h de incubación, se mejoró la estabilidad térmica con respecto a la enzima libre, la estabilidad operacional de la PrtA no se ve favorecida en los soportes empleados, mayor estabilidad al almacenamiento en Celite 545 por 81 días, este soporte ofrece una gran estabilidad al almacenamiento.
- Los biocatalizadores presentan afinidad hacia ésteres de *p*-Nitrofenilo de cadena corta, media y larga con gran utilidad para reacciones de síntesis como transesterificación y esterificación.
- De acuerdo a los resultados obtenidos las enzimas en términos generales son más estables en Accurel MP1000- ANCUT1, Quitosano-NStcl y Celite 545 ANCUT2 y PrtA, sólo Nylon 6 no es un soporte factible para su inmovilización por dificultades técnicas que se presentaron.
- En ninguno de los biocatalizadores generados se observó crecimiento de microorganismos durante la evaluación de la estabilidad al almacenamiento a 4°C y a temperatura ambiente.
- Las propiedades de los biocatalizadores obtenidos sugieren que pueden ser útiles para una eventual aplicación industrial.
- Se obtuvieron más opciones para inmovilizar, los soportes empleados permiten obtener biocatalizadores de bajo costo.

PERSPECTIVAS

- ▶ Evaluar la estabilidad frente a diversos solventes empleados para la síntesis de compuestos de interés en la industria de alimentos.
- ▶ Probar la reacción de hidrolisis a una escala mayor para evaluar los ciclos de reuso del biocatalizador.
- ▶ Optimizar la inmovilización por unión covalente probando diferentes concentraciones de glutaraldehído y tamaño de partícula del Nylon 6.
- ▶ Aplicar los biocatalizadores en síntesis de compuestos de interés en la industria de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Naby Mohamed A., *et al.* Production and immobilization of alkaline protease from *Bacillus mycoides*. *Bioresource Technology*, pp. 205-210.1997.
- Ahmed Ansari Shakeel y Husain Qayyum. Lactose hydrolysis from milk/whey in batch and continuous processes by concanavalin A-Celite 545 immobilized *Aspergillus oryzae* β galactosidasa. *Food and Bioproducts Processing*, pp. 351-359. 2011.
- Alvarez Macarie Elisa y Jacques Baratti. Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp.377-383. 2011.
- Amaya Delgado L., *et al.*Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chemistry*, pp. 299-303. 2005.
- Arroyo Sánchez, Miguel. Síntesis de ácidos 2-aril-propiónicos homoquirales mediante esterificación enantioselectiva catalizada por lipasas inmovilizadas. Tesis de España, pp.13-182. 1995.
- Arroyo, Miguel. Inmobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica*. pp. 3-10. 1998.
- Bayramoğlu Gülay, *et al.* Covalent immobilization of lipase onto hydrophobic group incorporated poly(2-hydroxyethyl methacrylate) based hydrophilic membrane matrix. *Journal of Food Engineering*, pp. 367-373. 2001.
- Belhaj-Ben Romdhane Ines, *et al.* Esterification activity and stability of *Talaromyces thermophilus* lipase immobilized onto chitosan. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 230-239. 2010.
- Bennett JW. An overview of the genus *Aspergillus*. In: *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Caister Academic Press. Pp. 1-17. 2010.
- Berg JM, Tymoczko JL & Stryer L. *Bioquímica*. 5^{ta}. Ed. Reverté S.A., México. 2003 pp 78-86..
- Berka RM, Dunn-Coleman N & Ward M. Industrial enzymes from *Aspergillus* species. In: *Aspergillus Biology and Industrial Applications*.pp.152-202. 1992.
- Bermúdez García Eva Patricia. Bases moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinólico de *Aspergillus nidulans*. Tesis UNAM. 2013.
- Bickerstaff G.F. Immobilization of enzymes and cells. Vol1. Human Press inc. 1997.
- Bommarius, Andrea S. y Riebel, Bettina R. *Biocatalysis Fundamentals and Applications*. Wiley-VCH. pp. 19-39. 2004.
- Bornscheuer UT, Rodríguez OG, Hidalgo A, Gollin A, Lyon J, Hitchman TS & Weiner DP. Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. *J Mol Catal B: Enzymatic*. 2005.
- Bornscheuer Uwe T. Microbial carboxylesterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 73-81. 2001

- Bornscheuer UT & Kazlauskas RJ. Hydrolases in organic synthesis: Regio and Stereoselective Biotransformations. 2^o ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim. pp. 61-74. 2006.
- Borreguero *et al.* Enantioselectivity properties of *Fusarium solani pisi* cutinase on transesterification of acyclic diols: activity and stability evaluation: Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, pp. 613-621. 2001.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. pp. 248-254. 1977.
- Cao Linqiu. Carrier-bound immobilized Enzymes: principles, applications and design. pp. 1-4, 53-60. 2005.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. Biotechnol Bioeng. pp. 17-34. 1999.
- Carvalho CML, Aires-Barros MR & Cabral JMS. Cutinase structure, function and biocatalytic applications. Electron J Biotechnol. pp. 161-170. 1998.
- Castro Ochoa, Lelie Denise. Estudio de la producción de actividad Carboxilesterasa en *Aspergillus nidulans*. Tesis 2012.
- Castro-Ochoa Lelie Denise. *et al.* ANCUT2, an extracellular cutinase from *Aspergillus nidulans* induced by olive oil. Appl Biochem Biotechnol. vol 166. pp 1275-1290. 2012.
- Chang, Shuo Fen, *et al.* Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. Applied Clay Science, pp. 67-73. 2007.
- Chen S, Su L, Billig S, Zimmermann W, Chen J & Wu J. Biochemical characterization of the cutinases from *Thermobifida fusca*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. pp 121-127. 2010.
- Chen, Yingming *et al.* Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor. Energy Conversion and Management, pp.668-673. 2007.
- Chiou, Shao-Hua y Wu, Wen-Teng. Immobilization of *Candida rugosa* on chitosan with activation of the hydroxyl groups. Biomaterials, pp. 197-204. 2003.
- Clement, Darrent *et al.* The genetical control of osmotolerance in fungi: a mutation analysis in the acomycete *Aspergillus nidulans*. Mycologist Vol 13, Part 2, pp. 79-82 1999.
- Cygler, Miroslaw y Schrag, Joseph D. Understanding interfacial properties of lipases. Methods in Enzymology. Vol 284, pp.3-25. 1997.
- Dash. M, *et al.* Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. Progress in Polymer Science, pp. 981-1014. 2011.
- De Barros DPC, Fonseca LP, Fernandes P, Cabral JMS & Mojovic L. Biosynthesis of ethyl caproate and other short ethyl esters catalyzed by cutinase in organic solvent. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, pp.178-185. 2009.

- Degani O, Gepstein S & Dosoretz CG. Potential use of cutinase in enzymatic scouring of cotton fiber cuticle. *Appl Biochem Biotechnol*, pp. 277-289. 2002.
- Derewenda, U; *et al.* News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem Sci*. pp. 20-25. 1993.
- Dizge, Nadir *et al.* Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. *Biochemical Engineering Journal*, pp. 220-225. 2008.
- Dizge, Nadir *et al.* Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oil by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. *Bioresource Technology*, pp. 1983-1991. 2008.
- Dizge, Nadir y Keskiner Büllent. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. *Biomass and Bioenergy*, pp.1274-1278. 2008.
- Durgun Altun, Gamze y Akkus Cetinus, Senay. Immobilization of pepsin on chitosan beads. *Food Chemistry*, pp. 964-971. 2005.
- Dutta K, Sen S & Veeranki VD. Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*. pp. 127-134. 2009
- Dutta, Kasturi y Dasu, Veeranki Venkata. Synthesis of short chain alkyl esters using from *Burkholderia cepacia* NRRL B2320. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 150-156. 2011.
- Egmond Maarten y De Vlieg Jacob. *Fusarium solani pisi* cutinase. *Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire*. pp. 1015-1020. 2000.
- Esqueda-Domínguez KL. Producción, Identificación y Caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, UNAM. 2012
- Esquivel-Bautista R. Producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico por carboxilesterasas. Tesis Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 2011.
- Fedosow, Serger N. *et al.* Kinect model of biodiesel production using immobilized lipase *Candida Antarctica* lipase B. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 156-168 2012.
- Flipsen JAC, Appel ACM, van der Hijden HTMW & Verrips CT. Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in sequential laundry wash process. *Enz Microb Technol*. Vol. 23. pp.274-280. 1997.
- Fontes Tatiana y Alves Gabriela. Cutinases: properties and industrial applications. *Advances in Applied Microbiology*. Vol.66, pp. 77-95. 2009.
- Goldman GH & Osmani SA. *The Aspergilli: Genomics, Medical Aspects, Biotechnology and Research Methods*. CRC Press. 2008.
- Gonçalves A.P.V *et al.* Effect of the immobilization support on the hydrolytic activity of a cutinase from *Fusarium solani pisi*, *Enzyme and Microbial Technology*, pp. 93-99. 1997

- Gonçalves APV, Lopes JM, Lemos F, Prazeres DMF, Cabral JMS & Aires-Barros MR. On the importance of the support material for the hydrolysis of triglycerides with a recombinant cutinase. Proceedings of the III Congreso Ibérico de Biotecnología. Valladolid, Spain. pp. 217-220. 1996.
- Guo, Ji-Ping y Ma Ying. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. Protein Expression and Purification. pp. 301-307. 2007.
- Hajji Mohamed, *et al.* Purification and characterization of an alkaline serine-protease produced by a new isolated *Aspergillus clavatus* ES1. Process Biochemistry, pp. 791-797. 2007.
- Halonen P, Reinikainen T, Nyssölä A & Buchert J. A high throughput profiling method for cutinolytic esterases. Enz Microb Technol. Vol. 44, pp. 3994-399. 2009.
- Hernández Martínez, R *et al.* Purificación and characterization of a thermodynamic stable serine protease from *Aspergillus fumigatus*. Process Biochemistry, pp. 2001-2006. 2011.
- Hicks J.J. Bioquímica. Editorial McGraw-Hill. México. 2001.
- Horii, Ken *et al.* Fatty acid production from butter using novel cutinase- displaying yeast. Enzyme and Microbial Technology, pp. 194-198. 2009.
- Huang Xiao Jun, *et al.* Preparation and characterization of stable chitosan nanofibrous membrane for lipase immobilization. European Polymen Journal, pp. 3710-3718. 2007.
- Hung liu, Chien, *et al.* Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. Journal of the Taiwan institute of chemical engineers. 2008.
- Hung, Tien-Chieh, *et al.* Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, pp. 69-78. 2003.
- Illanes, A. Enzyme Biocatalysis: Principles and Application. Springer Verlag New York Inc. pp. 1-169. 2008.
- Isgrove, F.H., *et al.* Enzyme immobilization on nylon-optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. Enzyme and Microbial Technology, pp. 225-232. 2001.
- Jaeger KE, Dijkstra BW & Reetz MT. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures and biotechnological applications of lipases. Annu Rev Microbiol. pp. 315-351. 1999.
- Jurgenson, James E. y Champe, Sewell P. The sexual and asexual spores of *Aspergillus nidulans* contain partially overlapping sets of mRNAs. Experimental Mycology 14, pp.89-93. 1990.
- Käfer E. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and chromosomal aberrations. Adv Genet. Pp. 33-131. 1977
- Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S & Schmid RD. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of novel esterases from *Bacillus* sp.

associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. Appl Microbiol Biotechnol. pp. 59-69. 2005.

- Kim Sang Hyeon *et al.* Biodiesel production using cross-linked *Staphylococcus haemolyticus* lipase immobilized on solid polymeric carriers. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, pp. 10-16 2012.
- Kolattukudy P.E, Purdy R.E y Maiti B. Cutinases from Fungi and Pollen. Methods in Enzymology. Vol 71. pp. 652-663. 1981.
- Kolling, Deise Juliana, *et al.* immobilization of a recombinant esterase from *Lactobacillus plantarum* on polypropylene Accurel MP1000. Appl Biochem Biotechnol, pp. 1-9. 2010.
- Krebsfänger K. Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. Enzyme and microbial Technology. Vol 22, pp. 646-651. 1998.
- Kumar, Ashok y Kanwar, Shamsher S. Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using celite-immobilized lipase. Bioresource Technology, pp. 2162-2167. 2010.
- Kuo Chia-Hung *et al.* Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. Carbohydrate Polymers, pp. 2538-2545. 2011.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. Vol. 227. pp. 680-685. 1970.
- Leal, Márcia C.M.R. *et al.* Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. Proces Biochemistry, pp.1173-1178. 2005.
- Lee D & Whiteley C. Enzyme technology and biological remediation. Enz Microb Technol. pp. 291-316. 2006.
- Li Jin, *et al.* Chitosaneous Hydrogel Beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers. Journal of Applied Polymer Science, vol 101, pp. 3743-3750. 2005.
- Li, Qin y Yan Yunjun. Production of biodiesel catalyzed by immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase from *Sapium sebiferum* oil in micro-aqueous phase. Applied Energy, pp.3148-3154. 2010.
- Liu, Chien-Hung *et al.* Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burholderia* lipase immobilized on Hydrophobic magnetic particles. Applied Energy, pp. 41-46. 2012.
- López-Belmonte Coba, Ma Trinidad. Estudio de la actividad y enantioselectividad de derivados de la lipasa de *Rhizomocur miehei*. Tesis de España, pp. 7-351. 1996.
- Messing, Ralph A. Immobilized enzymes for industrial reactors. Academic press. 1975.
- Miletić Nemanja. *et al.* Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: possibilities, advantages, applications. Biosource Technology, 126-134. 2011.
- Mondragón Tintor, María Elena. Transesterificación enantioselectiva catalizada por la esterasa StcI recombinante e inmovilizada de *Aspergillus nidulans*. Tesis UNAM. 2011.

- Nawani N, Singh R & Kaur J. Immobilization and stability Studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp. The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol*.pp. 559-565. 2006.
- Pahujani Shweta, *et a.*, Glutaldehyde activation of polymer Nylon-6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Biosource Technology*, pp. 2566-2570. 2007.
- Palla, Camila A., *et al.* Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, pp. 199-207. 2010.
- Panda, T. y Gowrishankar, B. S. Production and applications of esterases. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2005.
- Peña Montes, Carolina, *et al.* Immobilization and Biochemical Properties of the Enantioselective Recombinant NStcl Esterase of *Aspergillus nidulans*. *Hindawi Enzyme Research*, pp. 1-12. 2013.
- Peña Montes, Carolina. Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa Stcl involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillusnidulans*.2009
- Peña-Montes C, *et al.* Differences in biocatalytic behavior between two variants of Stcl esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 225-234-. 2009.
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD & Farrés A. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*.pp. 603-612. 2008.
- Peña-Montes C, González A, Castro-Ochoa LD & Farrés A. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007.
- Romo Sheila, *et al.*Inmovilización de Celulasa sobre una matriz de quitina-quitosana. *Revista Cubana de Química*, pp. 57-63. 2012.
- Sabbani, Sunil, *et al.* The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilizing support material Accurel. *Jorunal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 1-9. 2006.
- Samukawa, Taichi. Pretreatment of immobilized *Candida Antarctica* lipase for biodiesel fuel production from plant oil. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, pp.180-183. 2000.
- Sánchez Ferrer, Antonio. Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis. Universidad Autónoma de Barcelona.pp. 3-180. 1998.
- Segoviano-Reyes LM. Regulación de la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans*. Tesis Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. 2011.
- Serralha F.N., *et al.* Stability of recombinant cutinase immobilized on zeolites. *Enzyme and Microbial Technology*, pp.29-34. 2002.

- Silveira, Silvana T., *et al.* Immobilization of keratinolytic metalloprotease from *Chryseobacterium sp.* strain kr6 on glutaraldehyde-activated chitosan. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, pp. 818-825. 2012.
- Speranza P, de Oliveira P & Alves MG. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium sp.* *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. pp. 181-186. 2011.
- Taiz L & Zeiger E. *Plant Physiology*. 3rd Edition. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA. Pp. 690. 2002.
- Tan, Tianwei *et al.* Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances*, pp. 628-634. 2010.
- Tang Zhen Xing, *et al.* Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nanoparticles. *Materials Letters*, pp. 37-40. 2006.
- Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. Vol. 2. pp. 517-526. 2003.
- Torres Sebastián *et al.* Enzymatic Synthesis of banana flavor (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis*. S.86 esterase. *Food Research International*, pp.454-460. 2008.
- Trail F y Köller W. Diversity of cutinase from plant pathogenic fungi: Cloning and characterization of cutinases gene from *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. pp. 495-507. 1994.
- Tran, Dang-Thuan *et al.* Enzymatic transesterification of microalgal oil from *Chlorella vulgaris ES-P3* for biodiesel synthesis using immobilized *Burkholderia* lipase. *Bioresource Technology*, pp. 119-127. 2012.
- Uchida Hiroyuki, *et al.* Purification and properties of an esterase from *Aspergillus nomius* HS-1 degrading ethylene glycol dibenzoate. *FEMS Microbiology Letters*, pp. 123-127. 2003.
- Van den Broek, Lambertus A.M. y Boeriu G. Carmen. Enzymatic synthesis of oligo- and polysaccharide fatty acid esters. *Carbohydrate Polymers*, pp. 1-8. 2012.
- Vega Pérez, Fernanda Pamela. Purificación y caracterización de la cutinasa ancut1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis. 2013
- Walsh, K.A. y Wilcox, P.E. Serine protease. *Serine Protease.*, pp. 31-41.
- Wang Zhen Gang, *et al.* Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on electrospun polysulfone nanofibrous membranes by adsorption. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 45-51. 2006.
- Xi Fenga, *et al.* Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead. *Process biochemistry*, pp. 2833-2840. 2004.
- Xie, Wenlei y Wang Jianlong. Immobilized lipasae on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. *Biomass and Bioenergy*, pp. 373-380. 2011.

- Yi Song Se, *et al.* Amino acid modified chitosan beads: improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, pp. 123-129. 2008.
- Yücel, Yasin. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. *Bioresource Technology*, pp. 3977-3980. 2010.

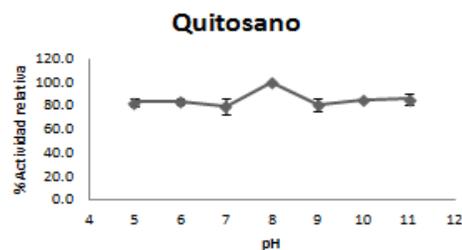
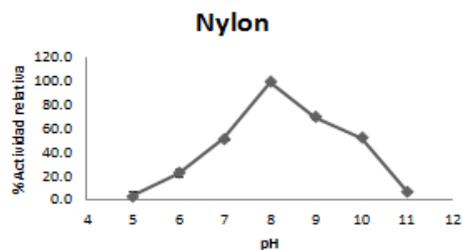
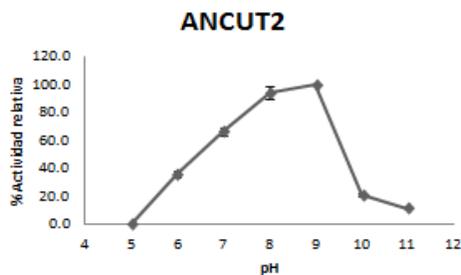
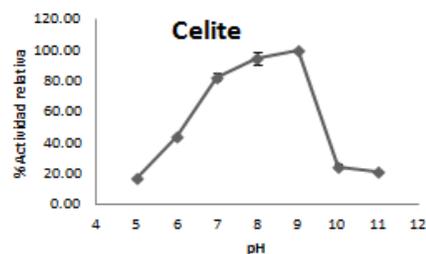
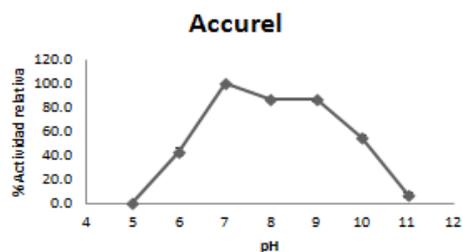
ANEXOS

ANEXO A: Gráficos de la caracterización bioquímica de los diferentes biocatalizadores estudiados.

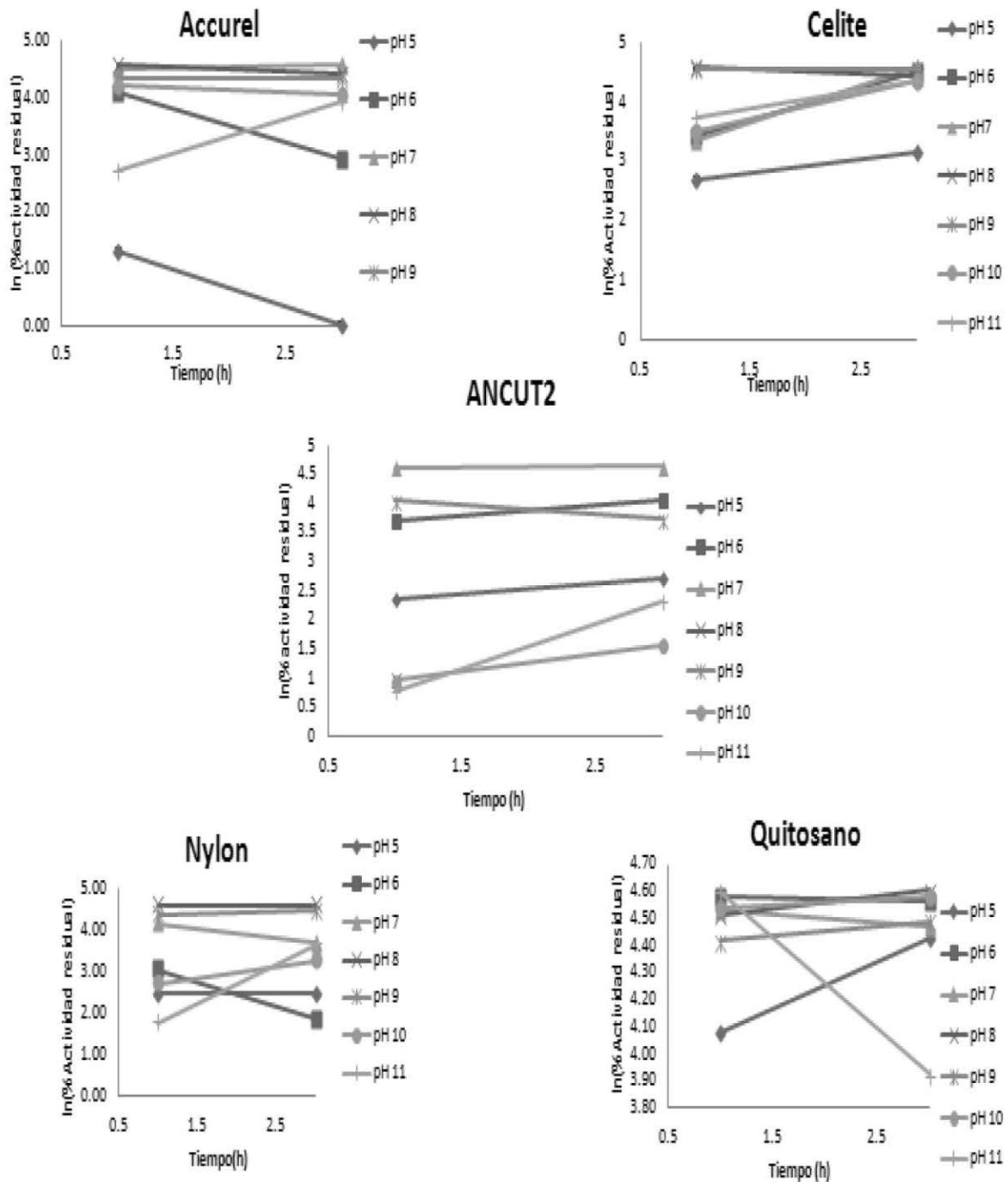
En este anexo se muestran todos los gráficos obtenidos a partir de la caracterización bioquímica realizada a los diferentes biocatalizadores generados con las diferentes enzimas empleadas, el detalle de la metodología seguida en cada caracterización se encuentra en la sección correspondiente, consultar índice para más detalles.

Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo.

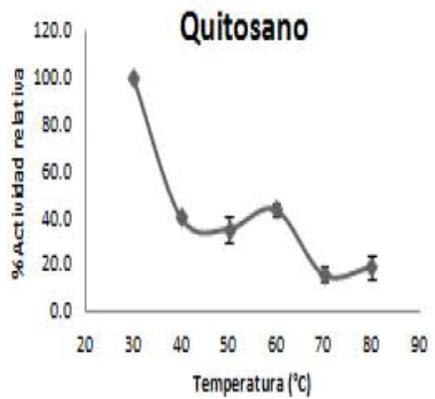
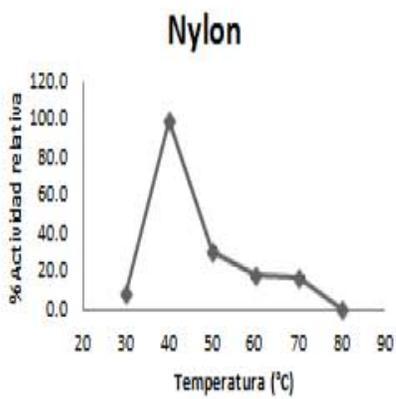
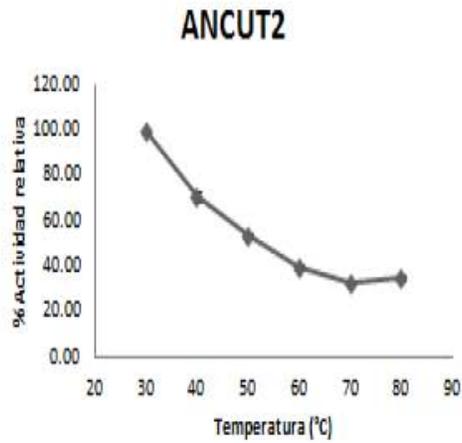
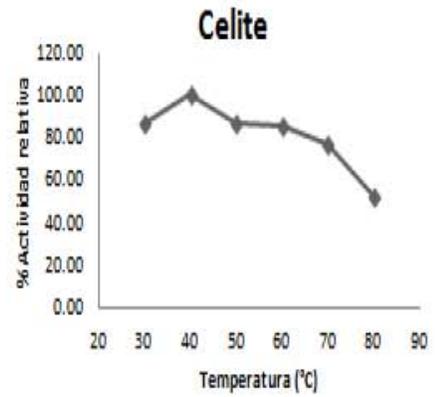
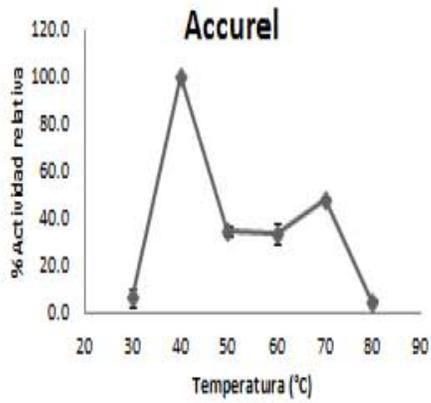
Efecto del pH sobre la actividad enzimática de los inmovilizados de ANCUT2 y la enzima en solución.



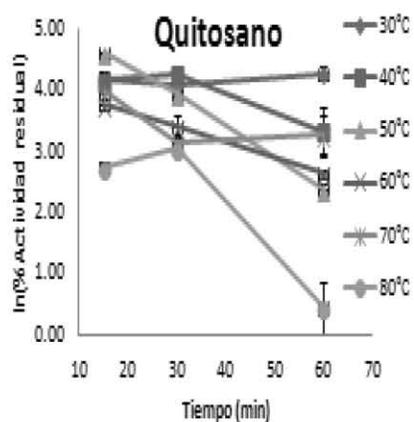
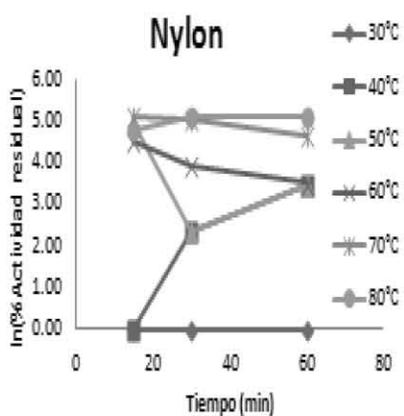
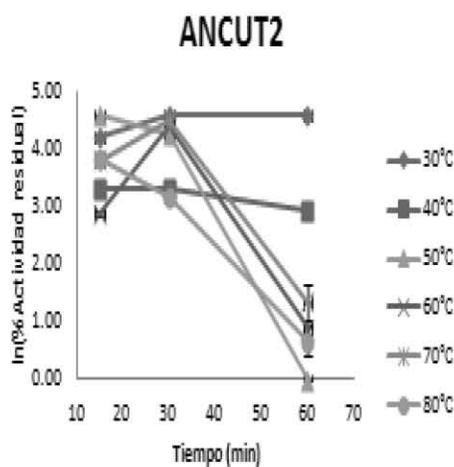
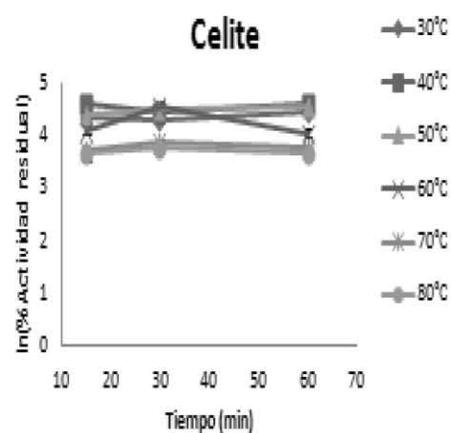
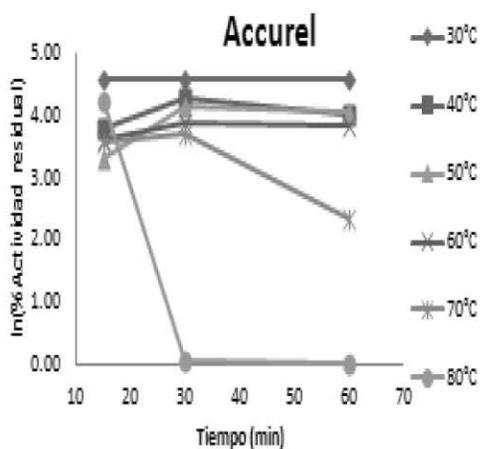
Evaluación de la estabilidad al pH de los biocatalizadores



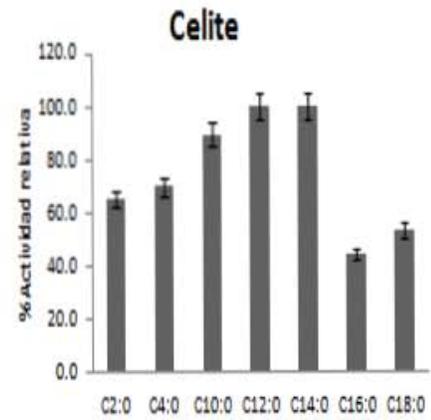
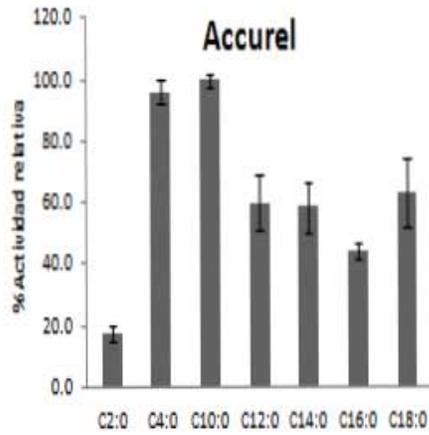
Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores, enzima libre e inmovilizada



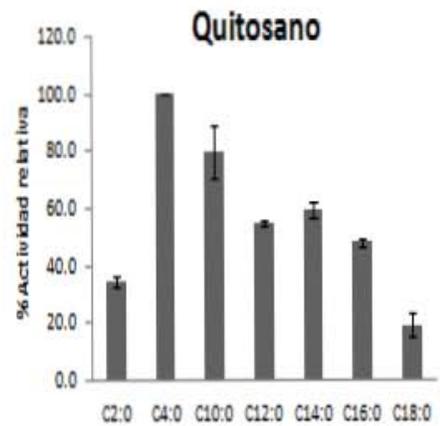
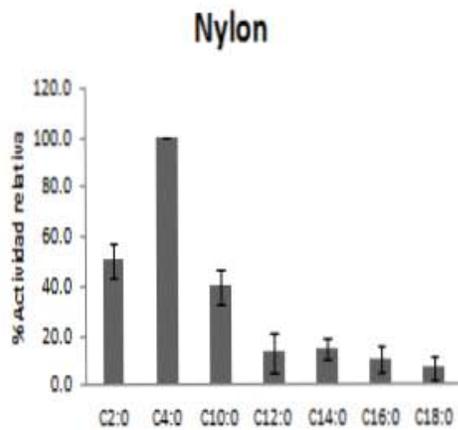
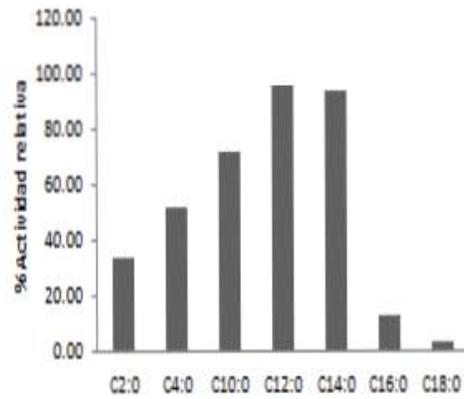
Estabilidad térmica de ANCUT2 libre e inmovilizada



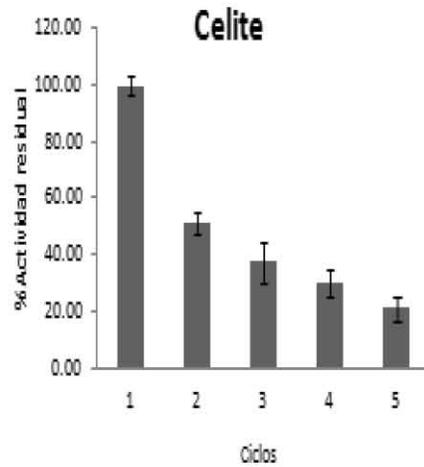
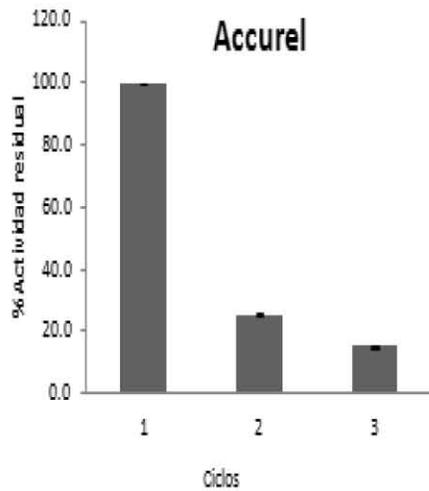
Especificidad de sustrato



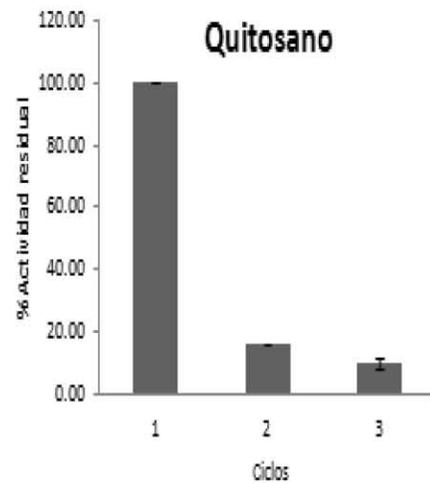
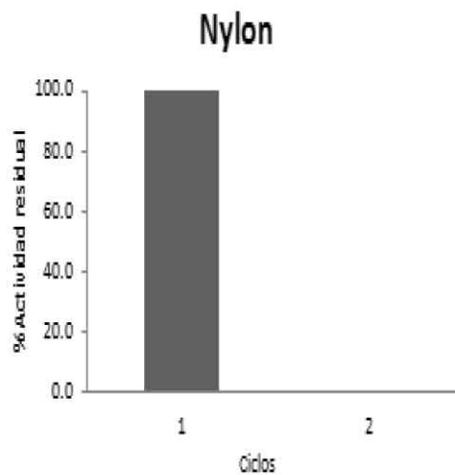
ANCUT2



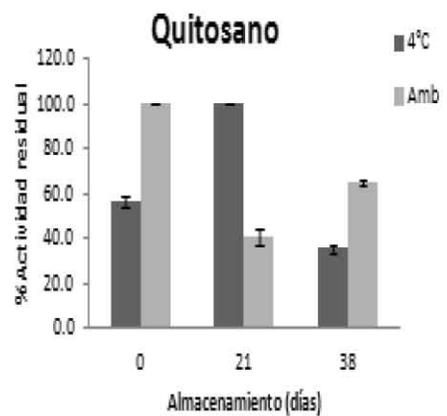
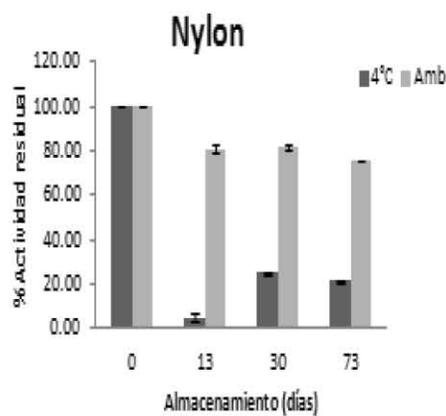
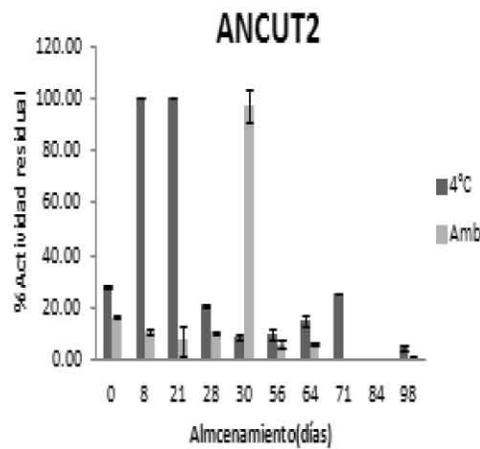
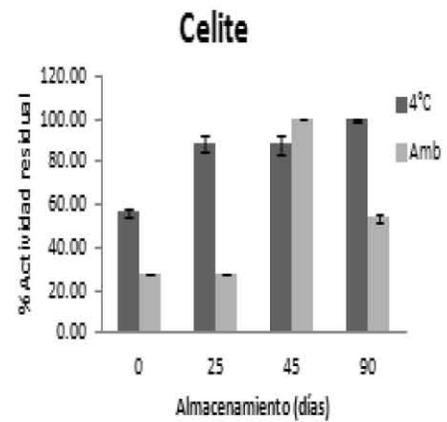
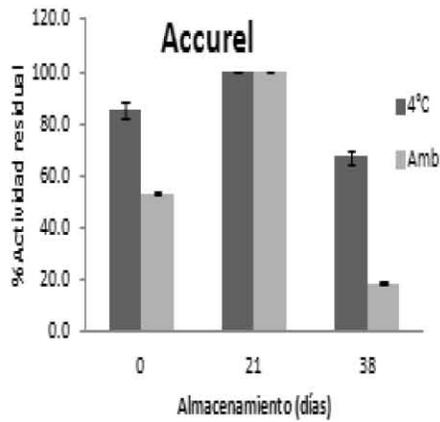
Reuso del biocatalizador



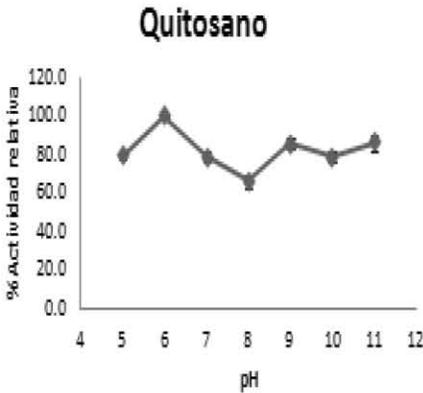
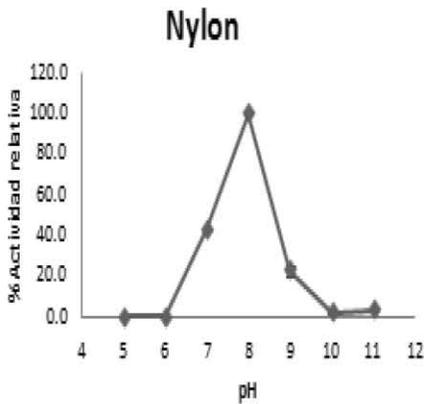
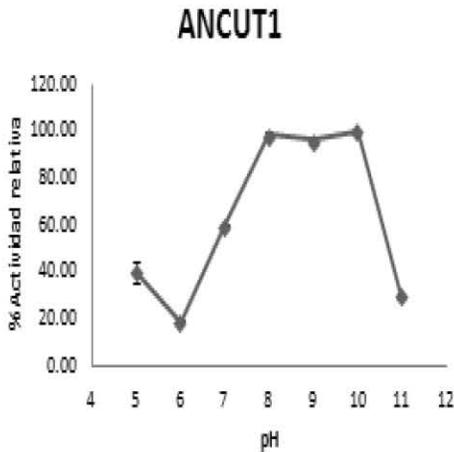
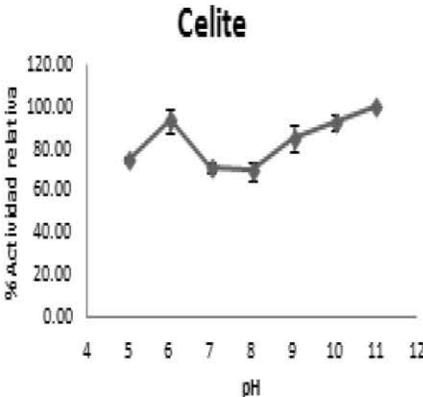
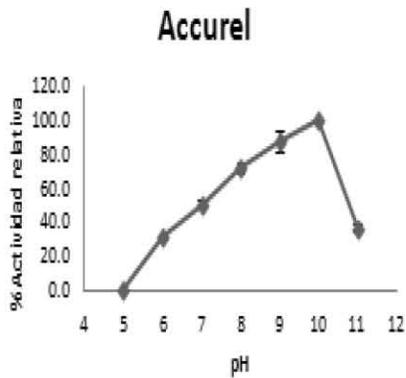
Estabilidad Operacional Ciclos de reuso



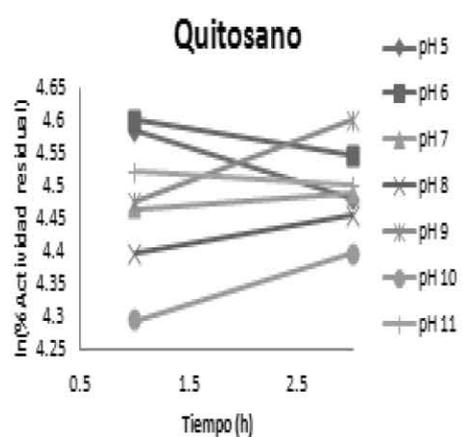
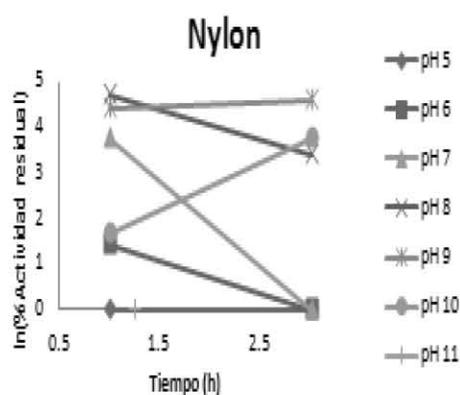
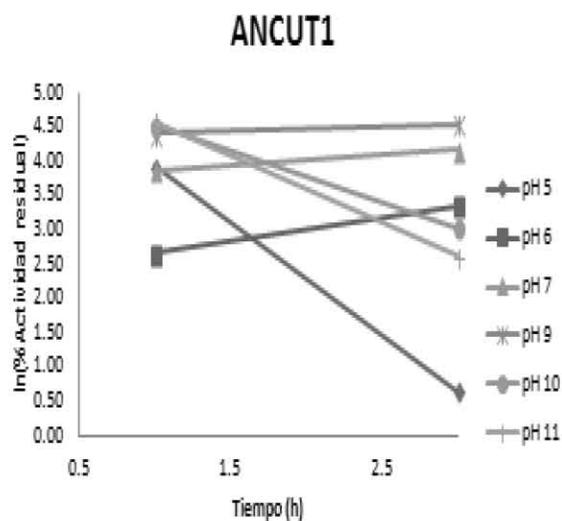
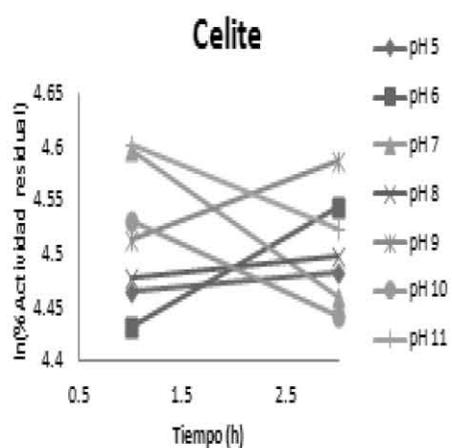
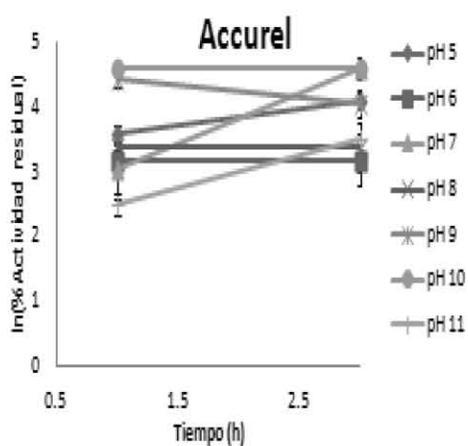
Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución



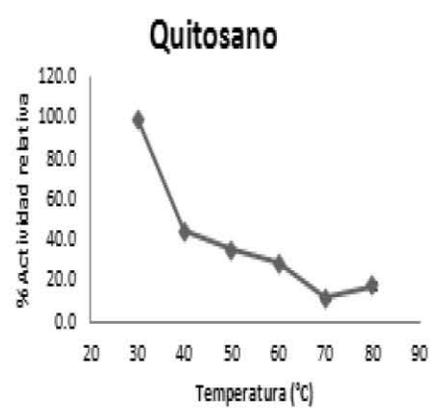
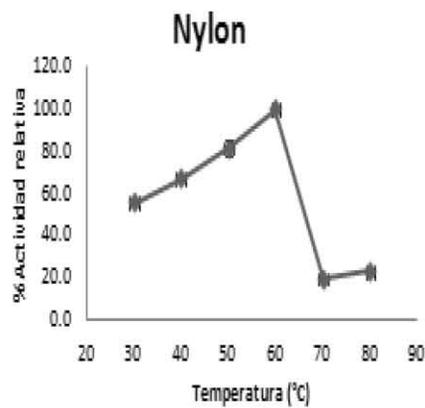
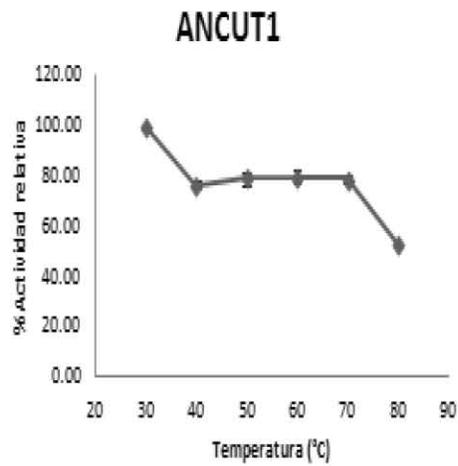
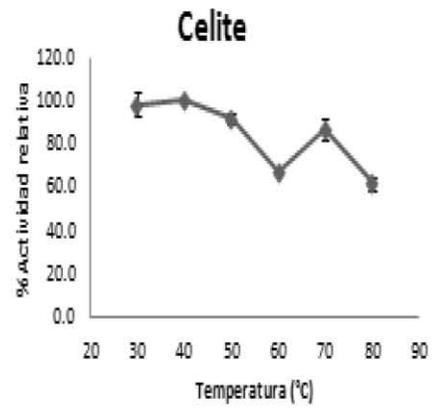
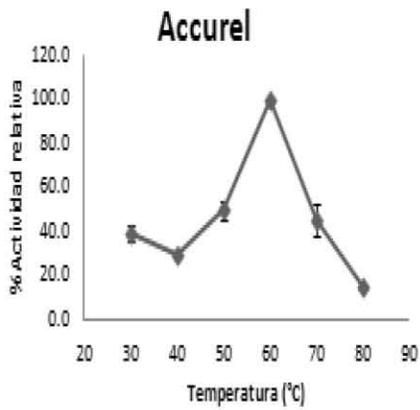
Caracterización bioquímica de la ANCUT1 libre e inmovilizada
Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada.



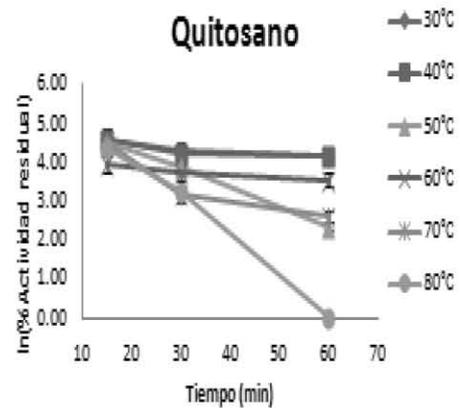
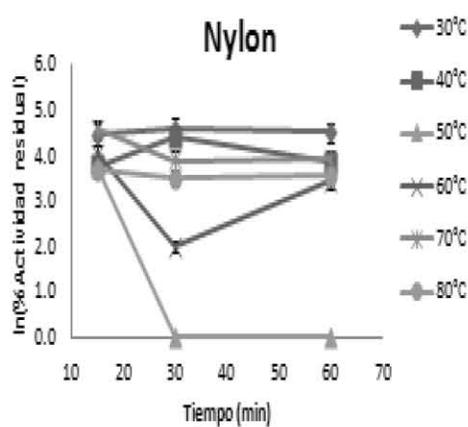
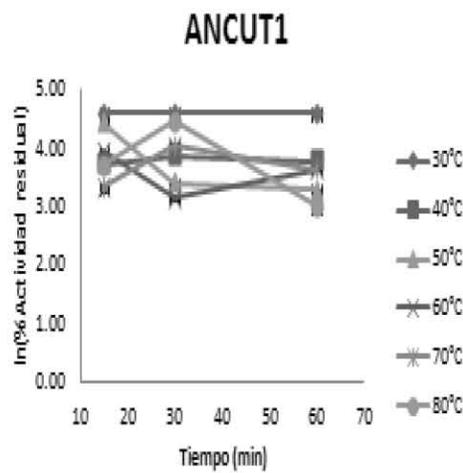
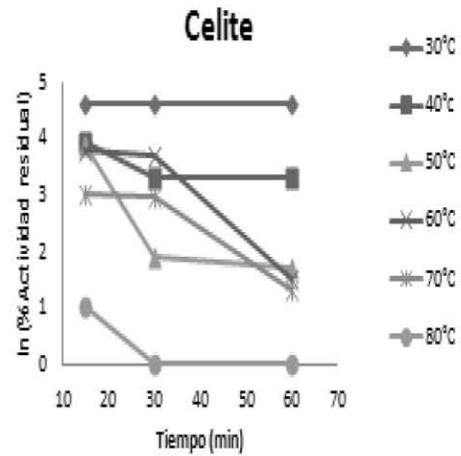
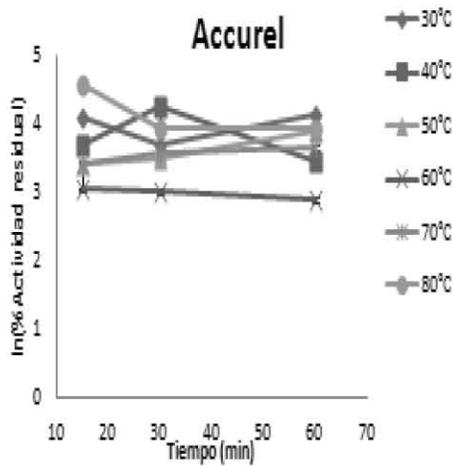
Evaluación de la estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada



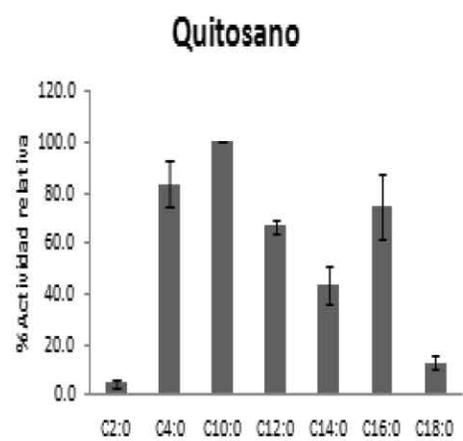
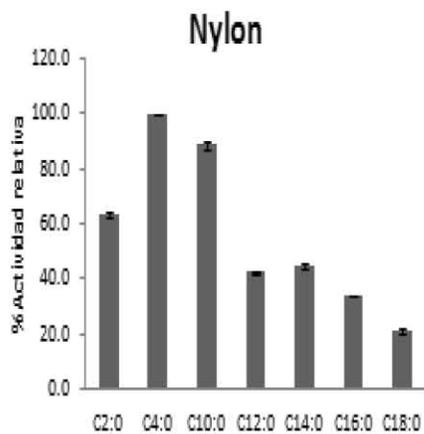
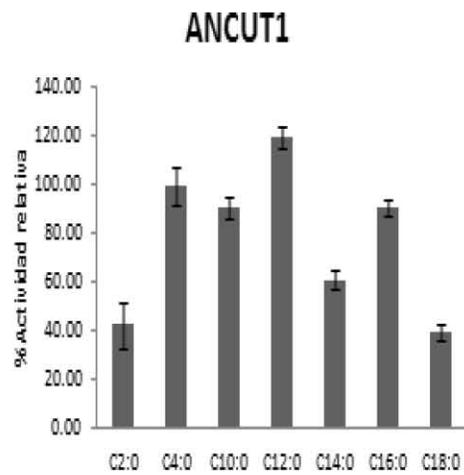
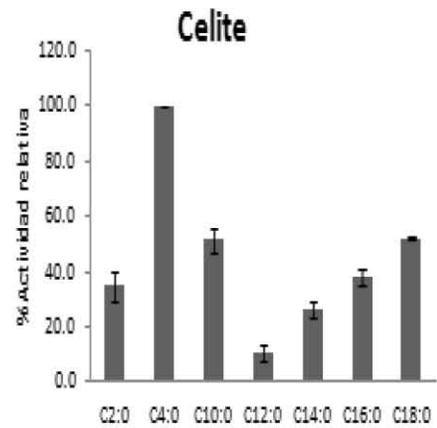
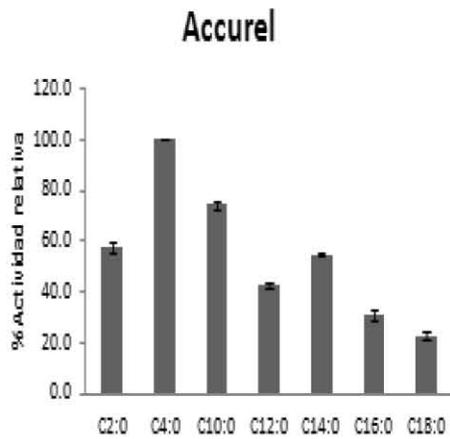
Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores



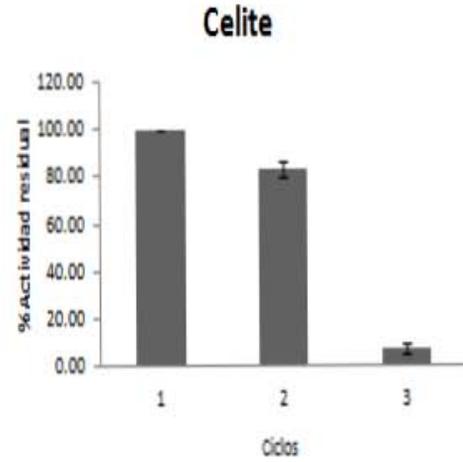
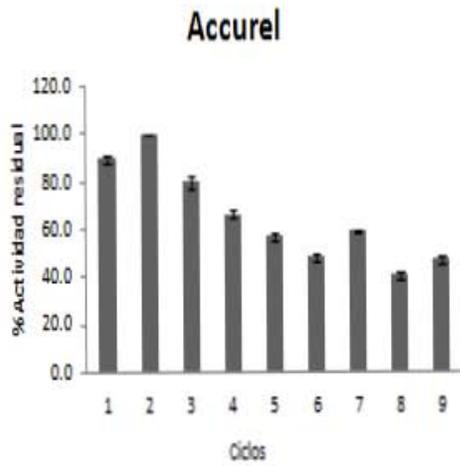
Estabilidad térmica de la enzima en solución e inmobilizada



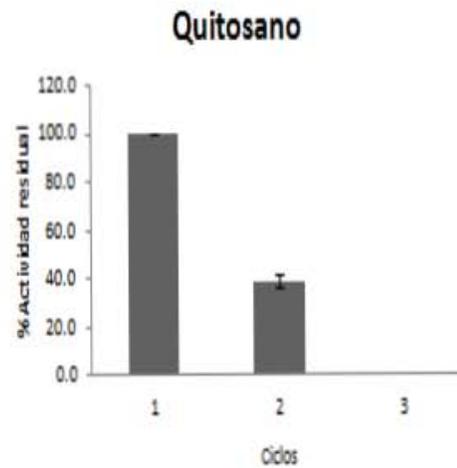
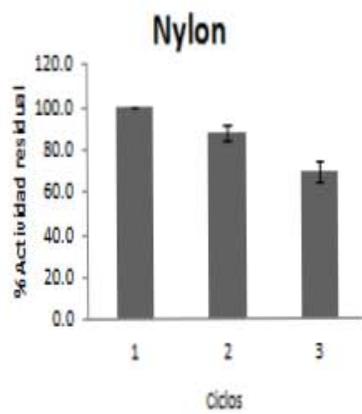
Especificidad de sustrato



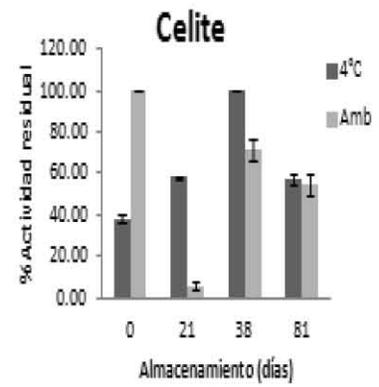
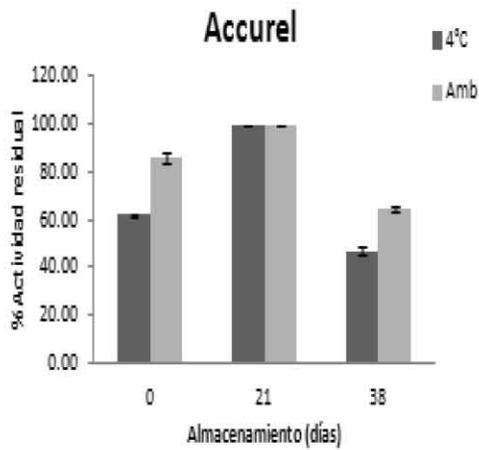
Reuso del biocatalizador



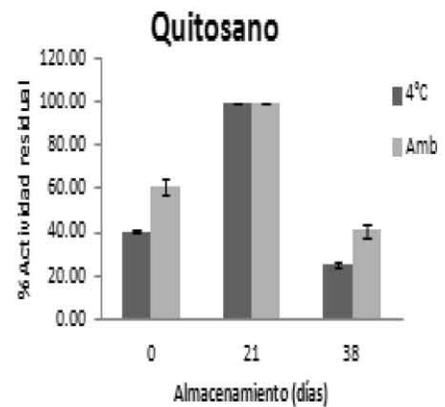
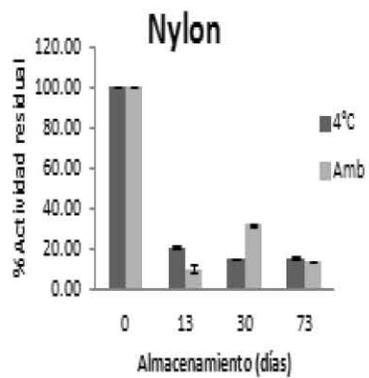
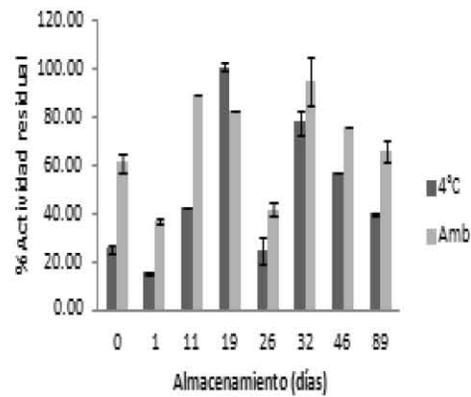
Estabilidad Operacional Ciclos de reuso



Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución

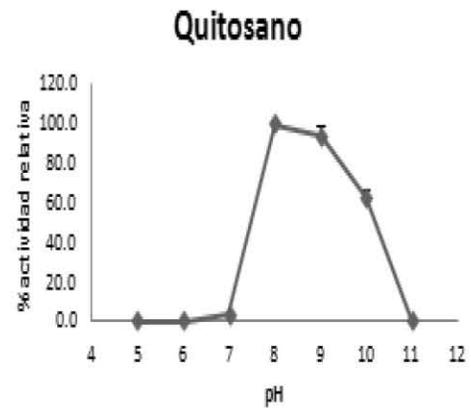
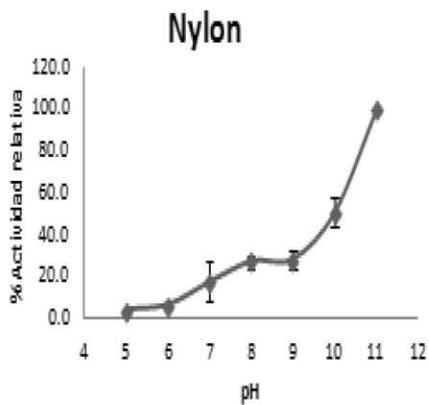
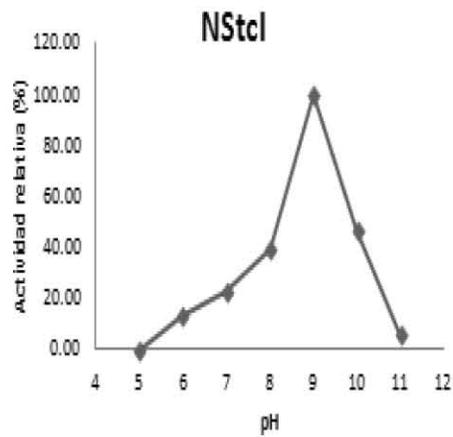
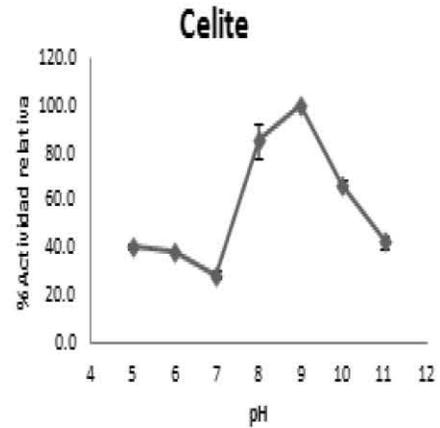
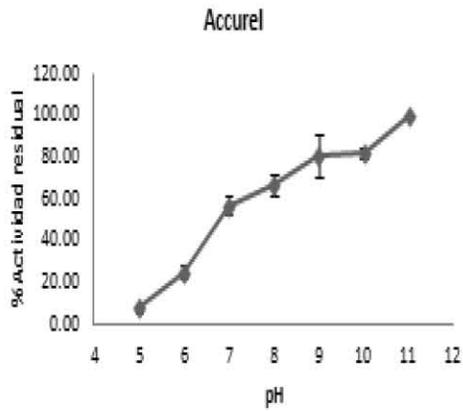


ANCUT1

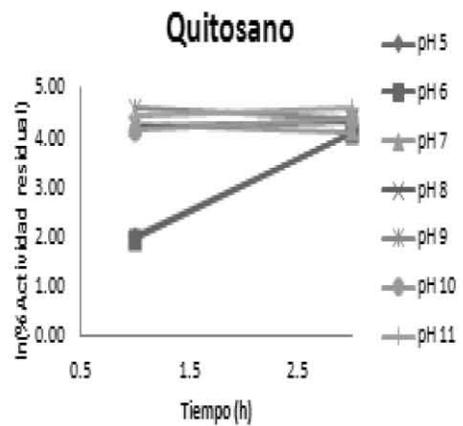
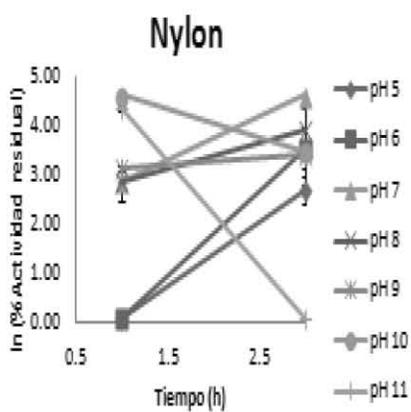
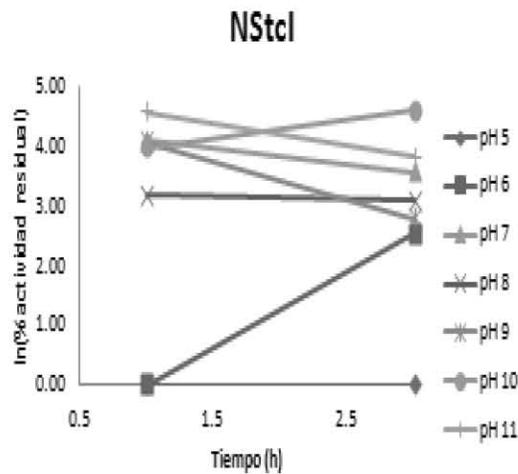
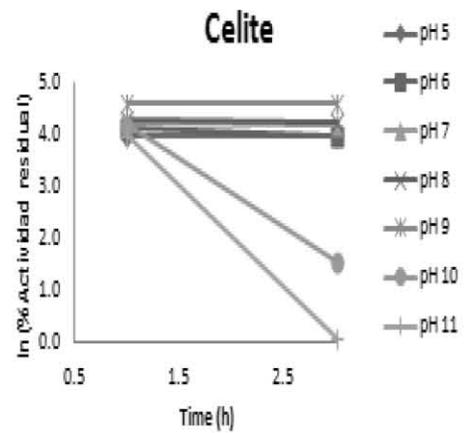
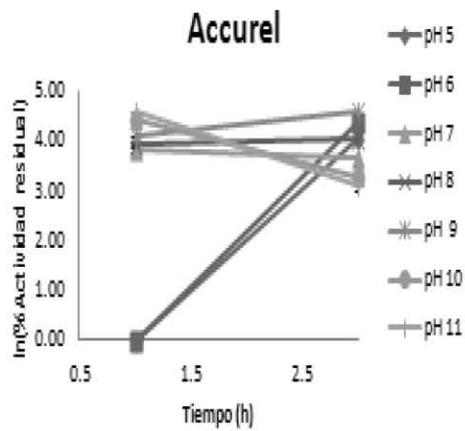


Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo (NStcl).

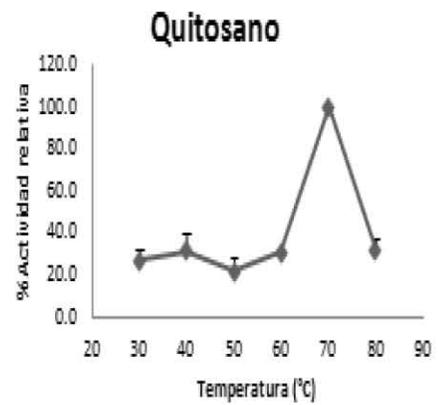
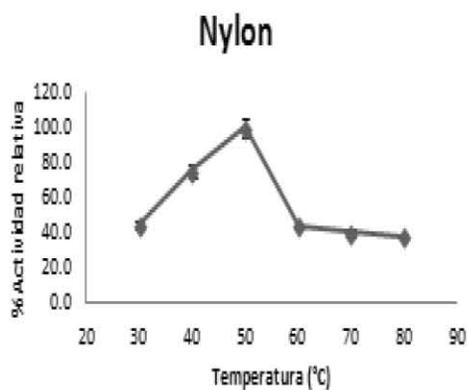
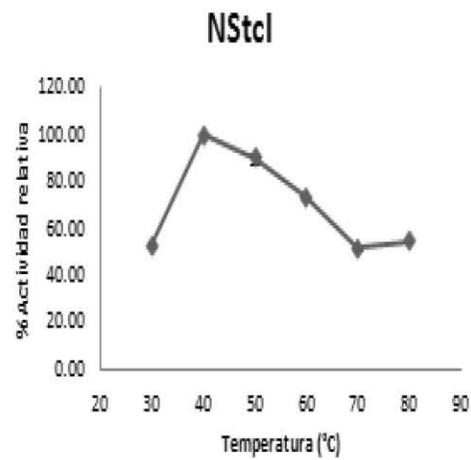
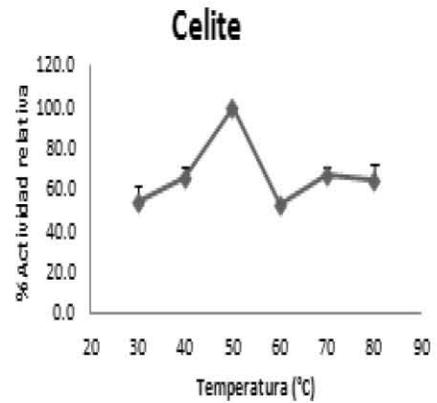
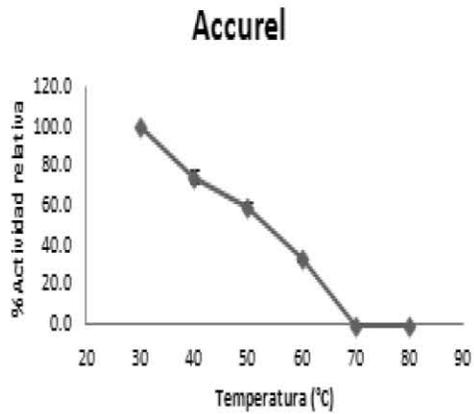
Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada



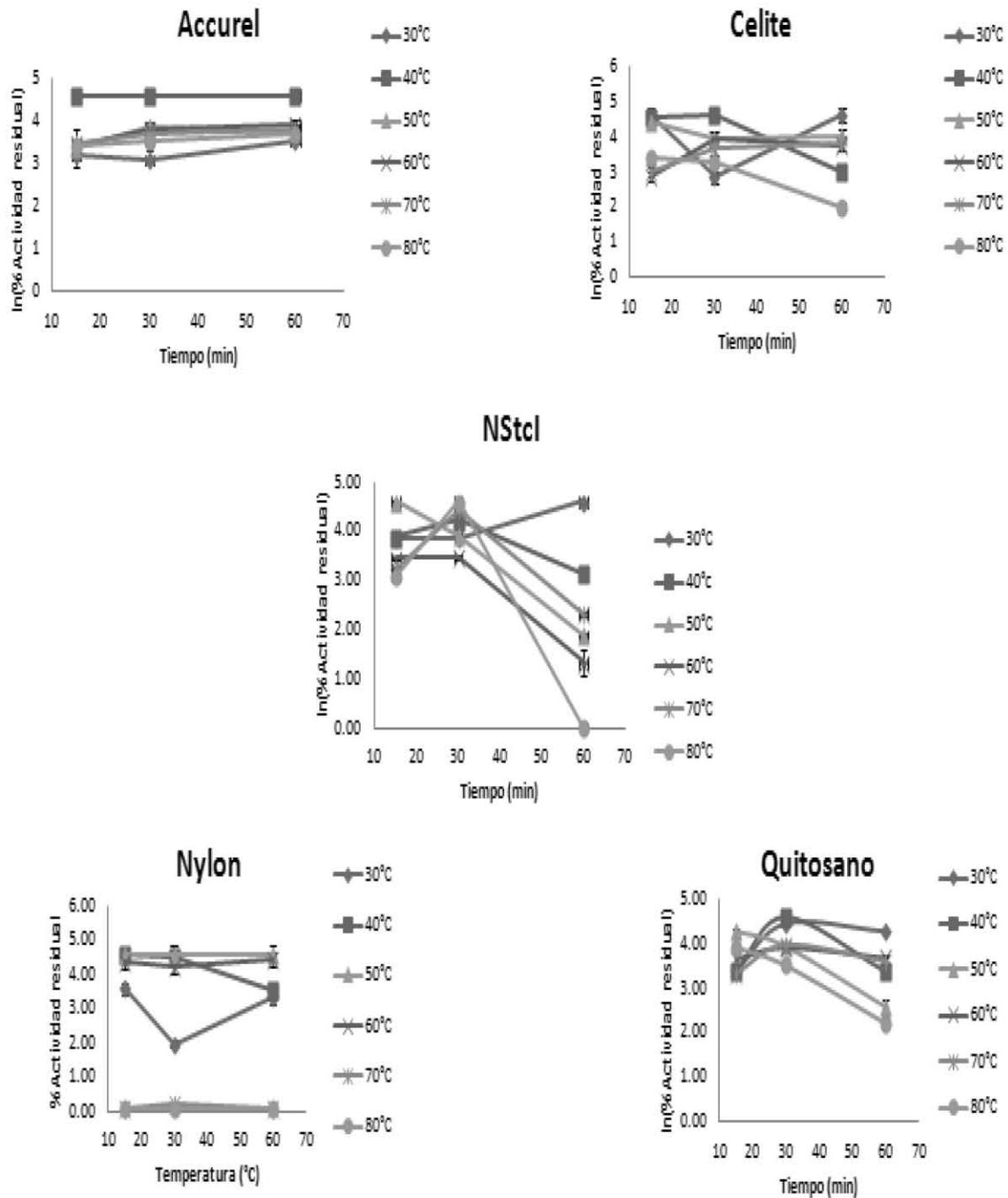
Estabilidad al pH de la enzima libre e inmovilizada



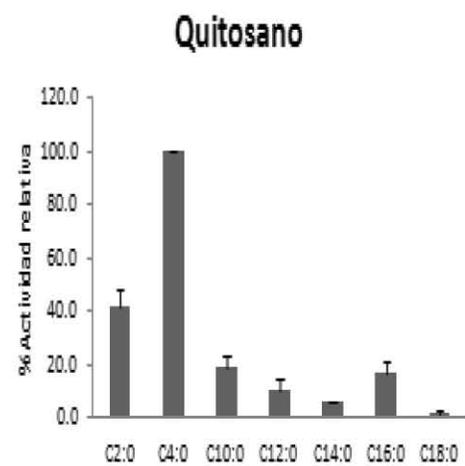
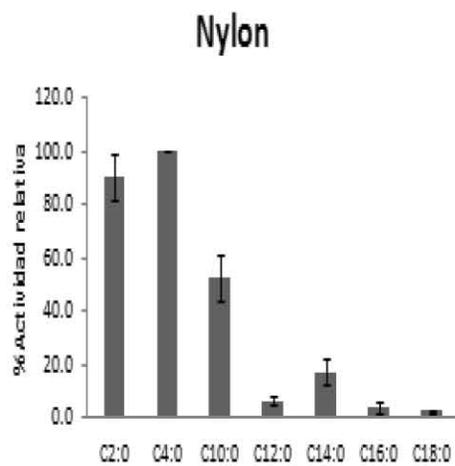
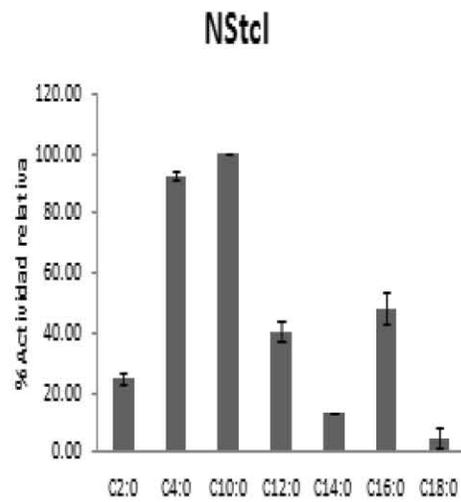
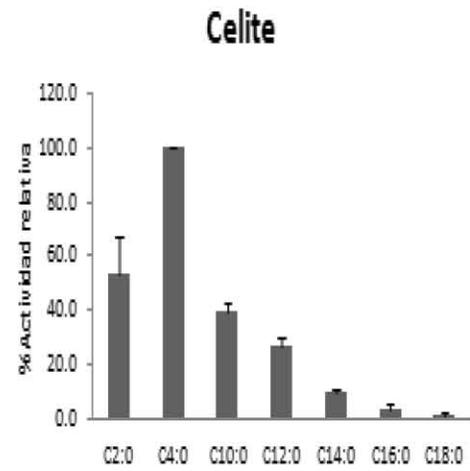
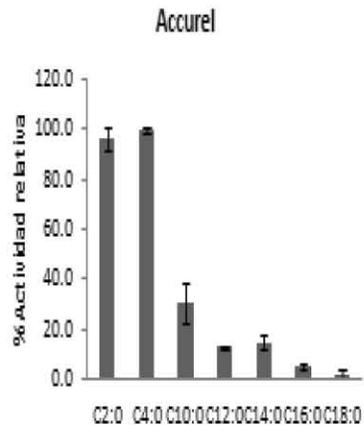
Efecto de la Temperatura sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada



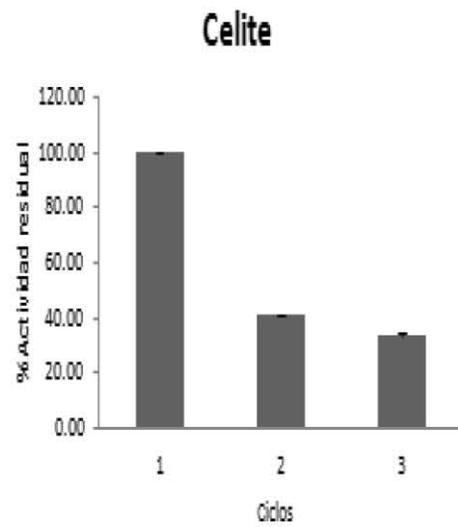
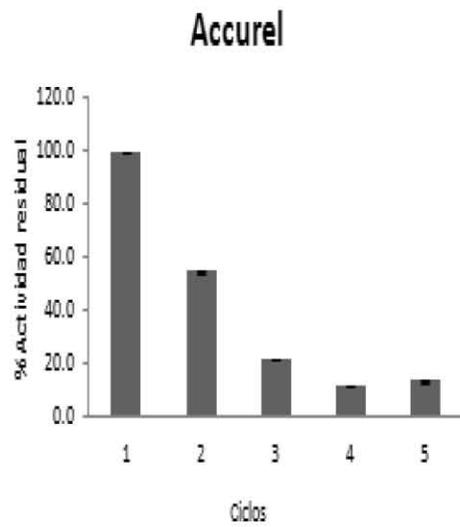
Estabilidad térmica de la enzima en solución e inmovilizada



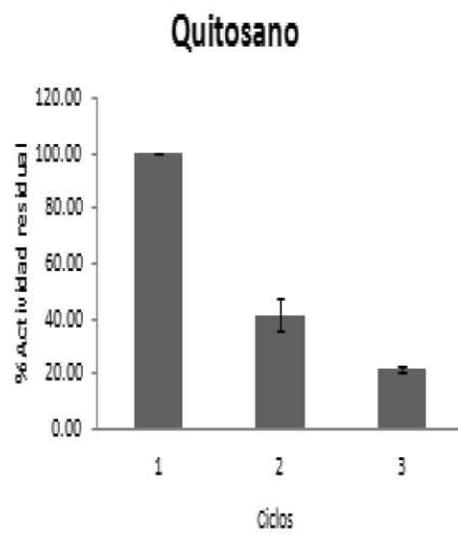
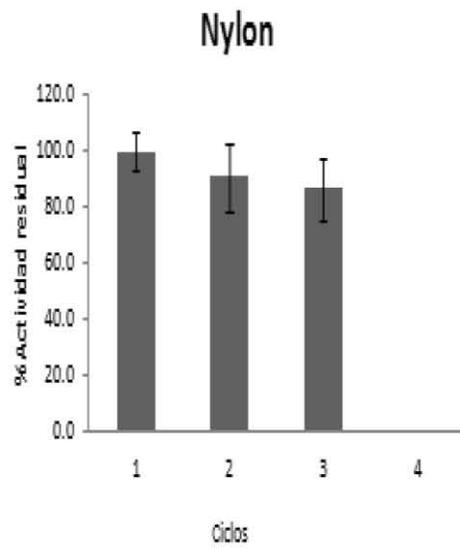
Especificidad de sustrato



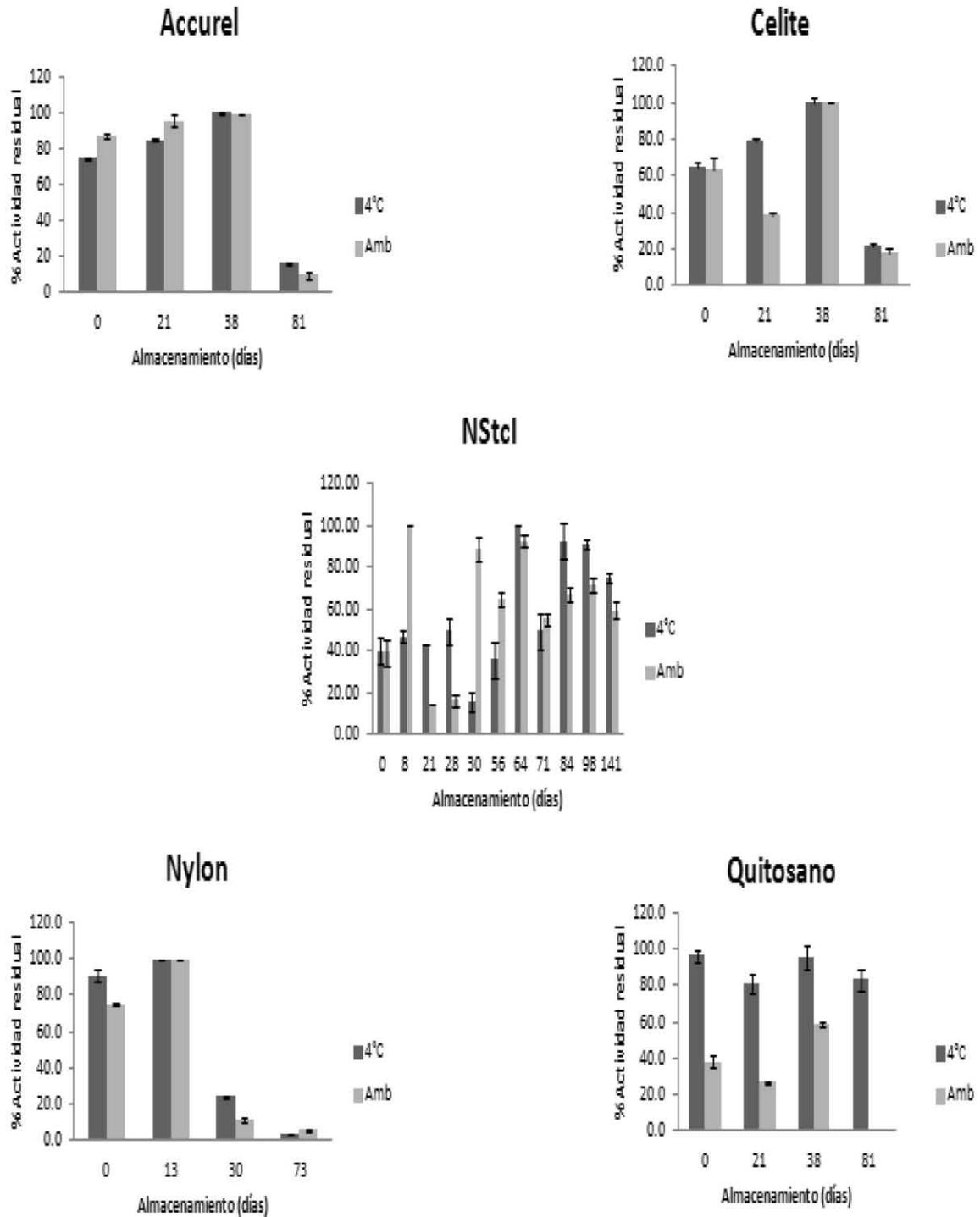
Reuso del biocatalizador



Estabilidad Operacional Ciclos de reuso

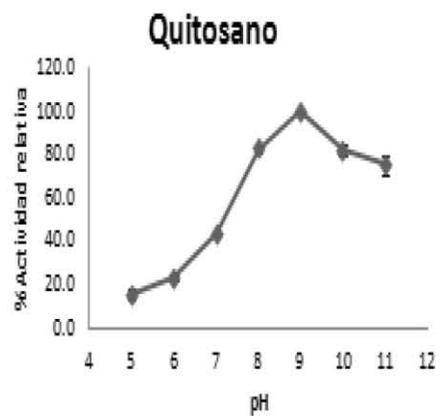
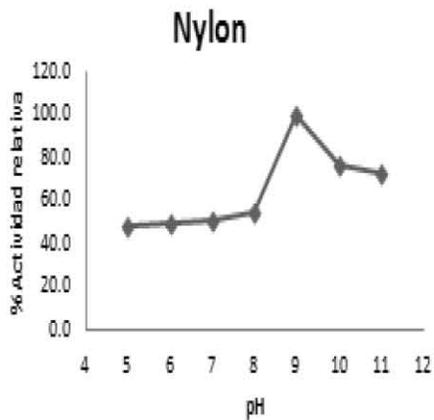
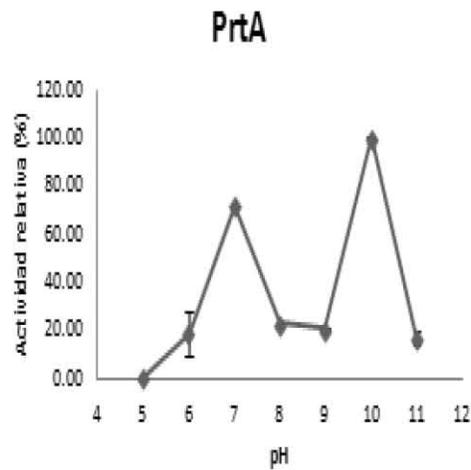
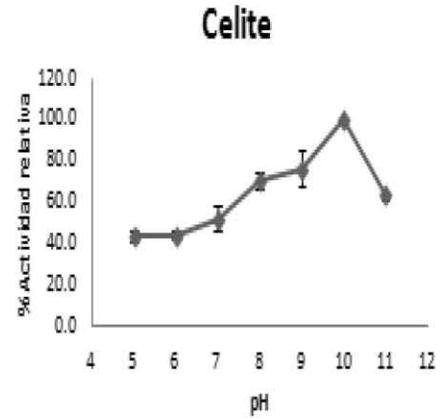
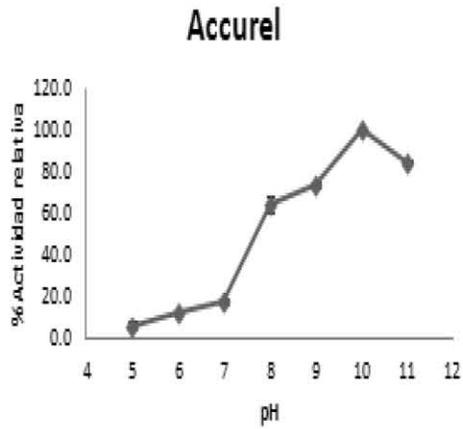


Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución

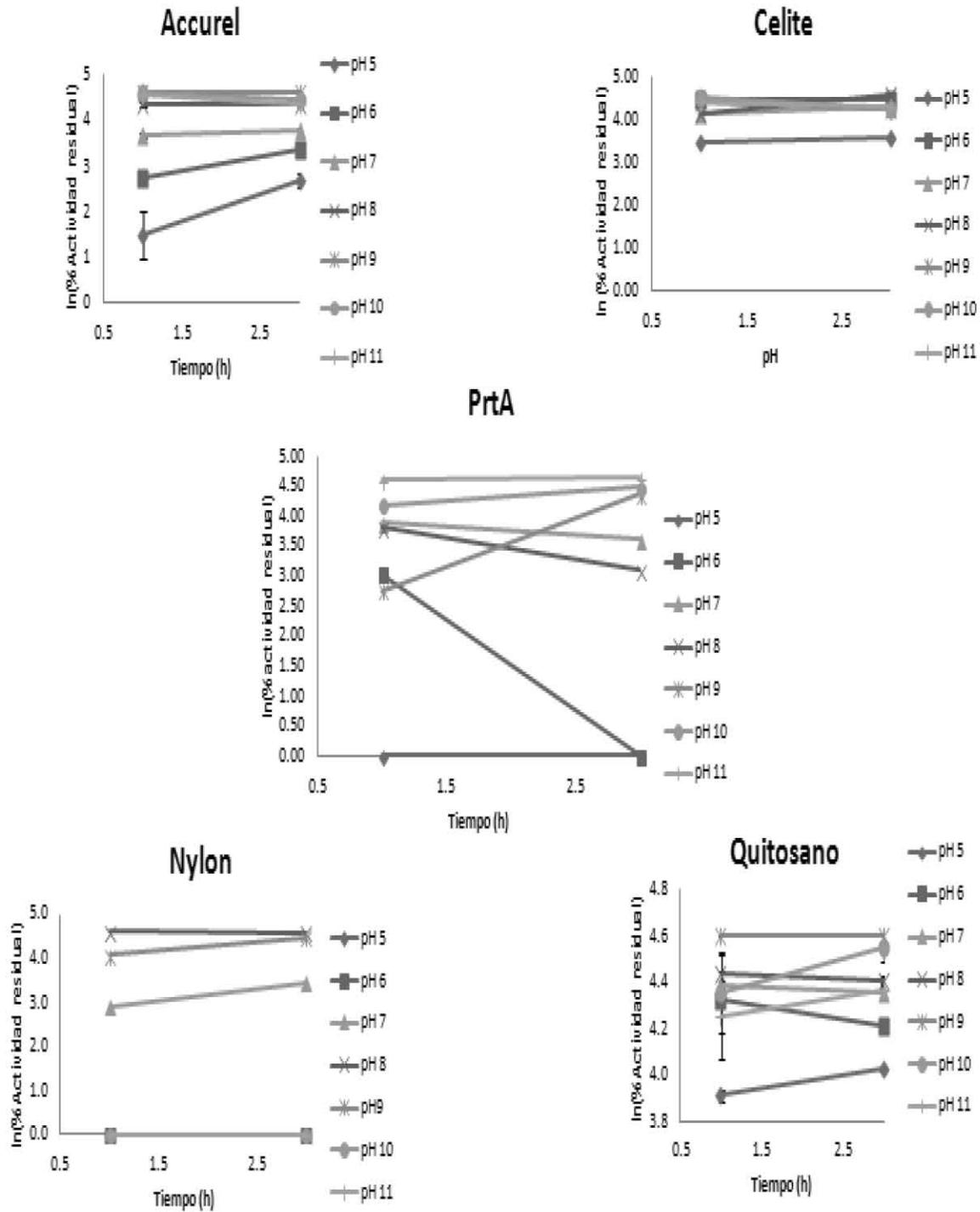


Caracterización de la enzima inmovilizada y el extracto crudo (PrtA).

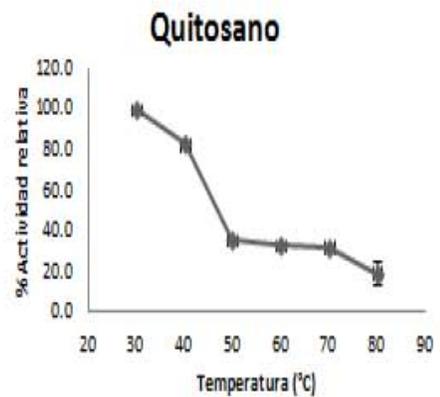
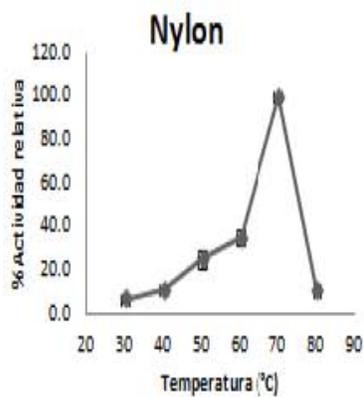
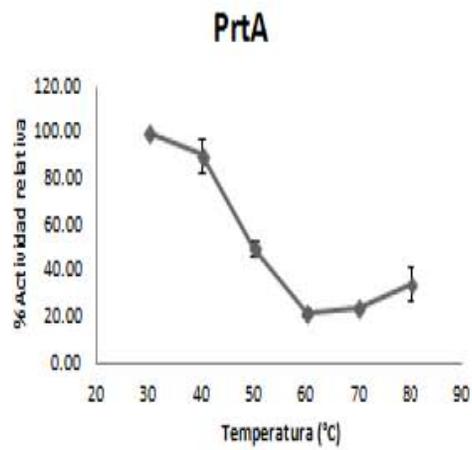
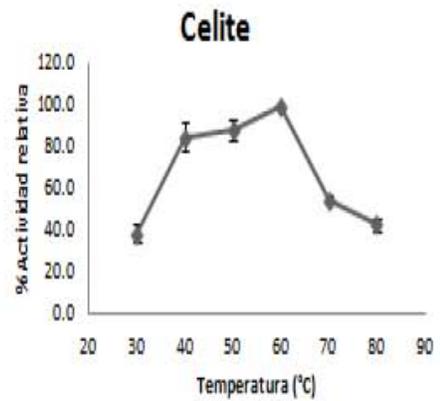
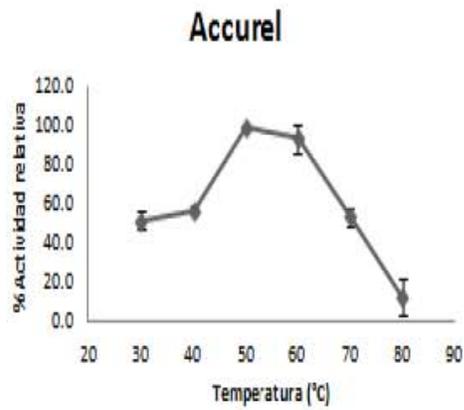
Efecto del pH sobre la actividad de la enzima libre e inmovilizada



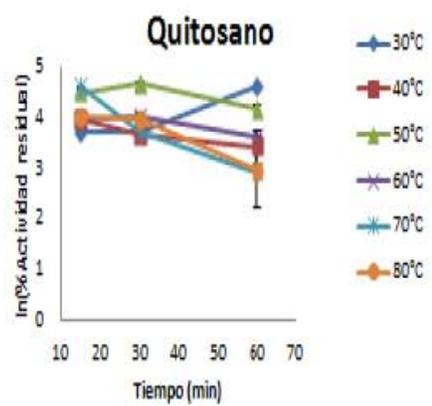
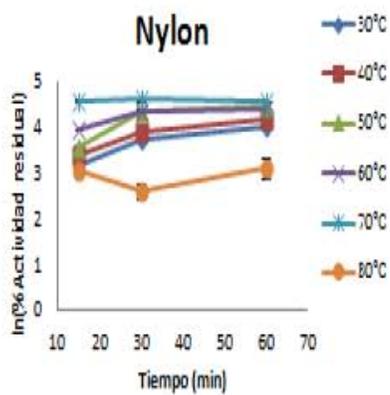
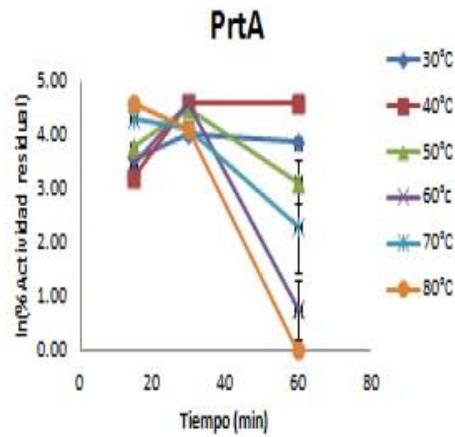
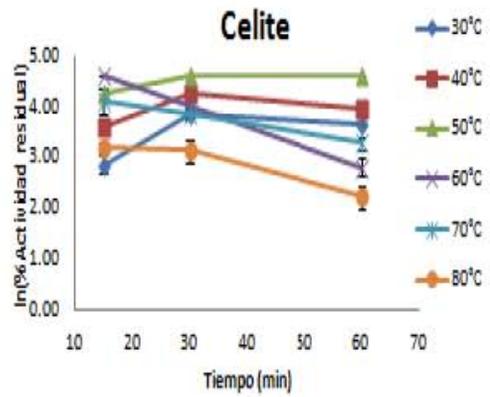
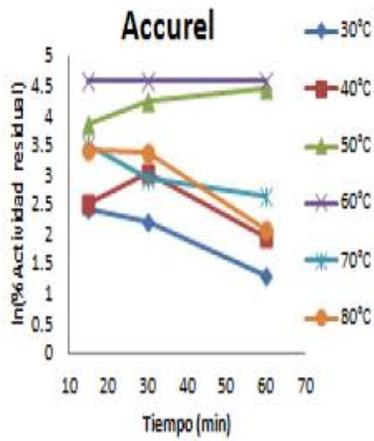
Estabilidad al pH de los biocatalizadores



Efecto de la Temperatura sobre la actividad enzimática de los biocatalizadores

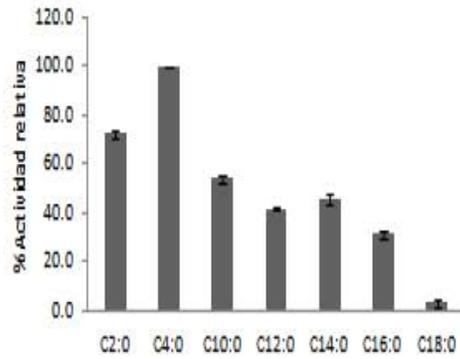


Estabilidad térmica de PrtA libre e inmovilizada

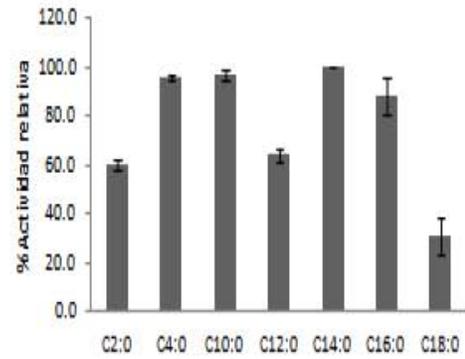


Especificidad de sustrato

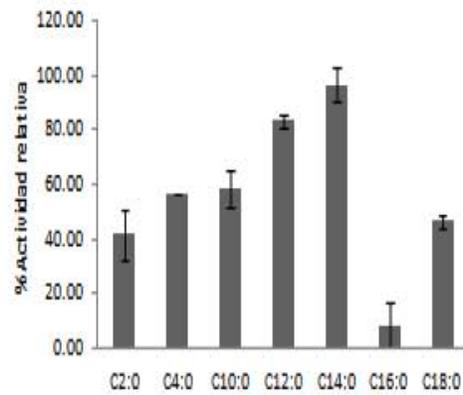
Accurel



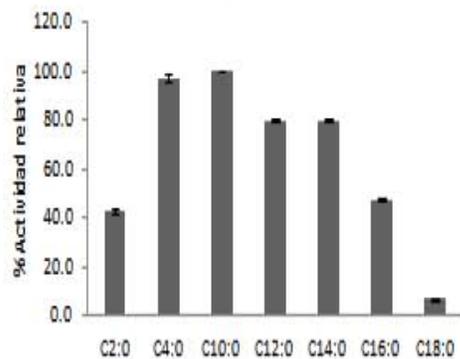
Celite



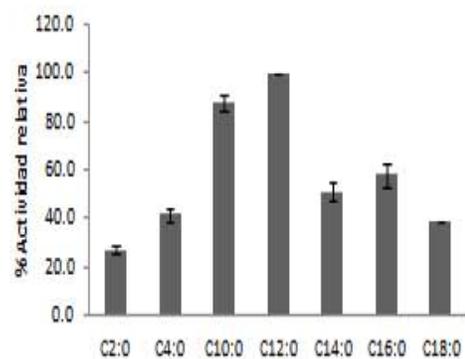
PrtA



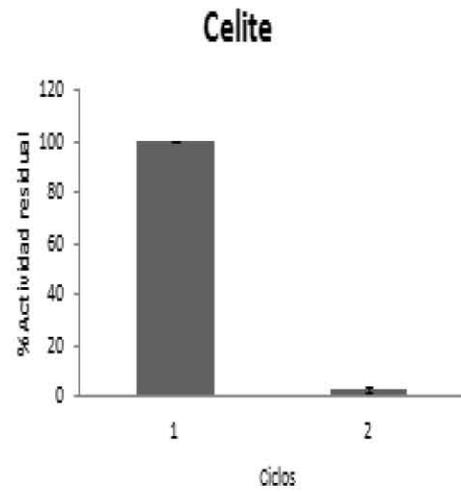
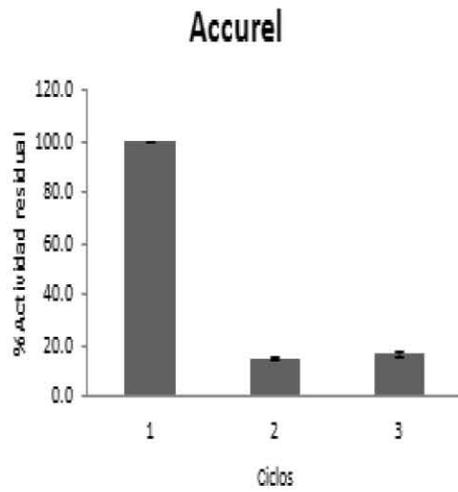
Nylon



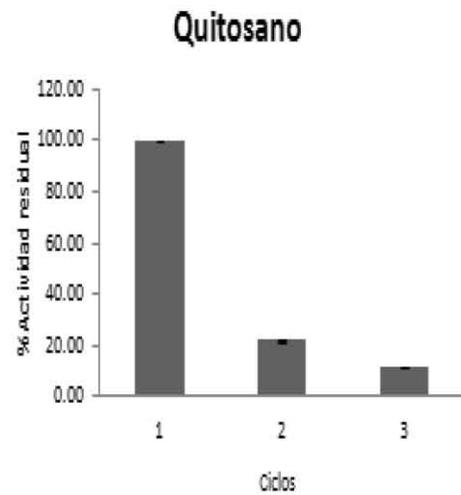
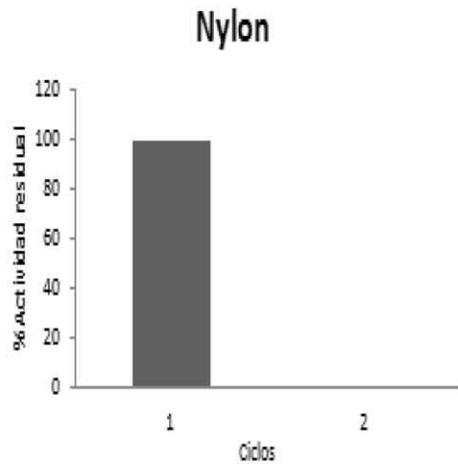
Quitosano



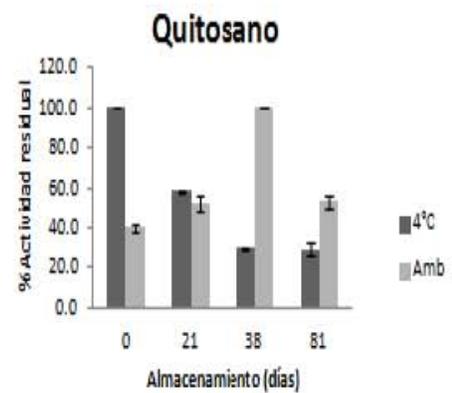
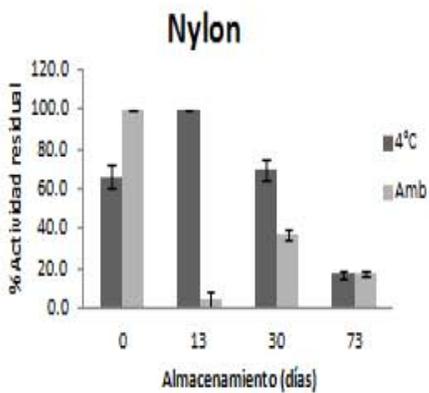
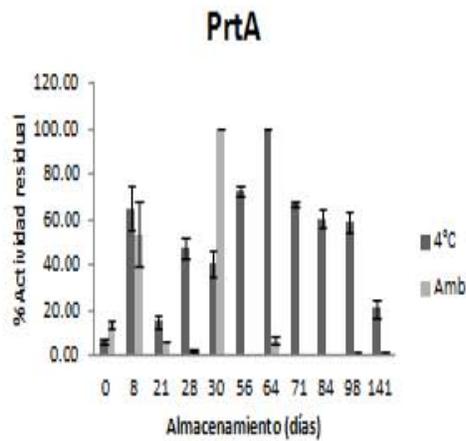
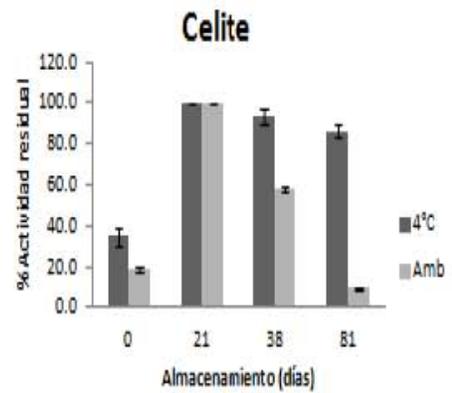
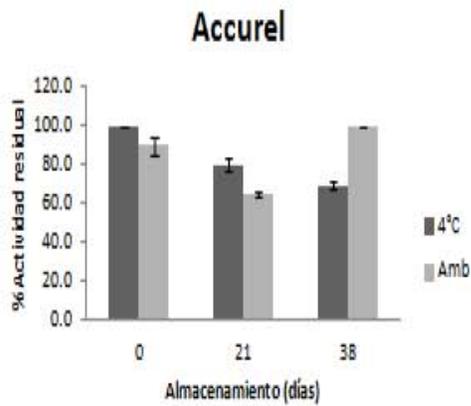
Reuso del biocatalizador



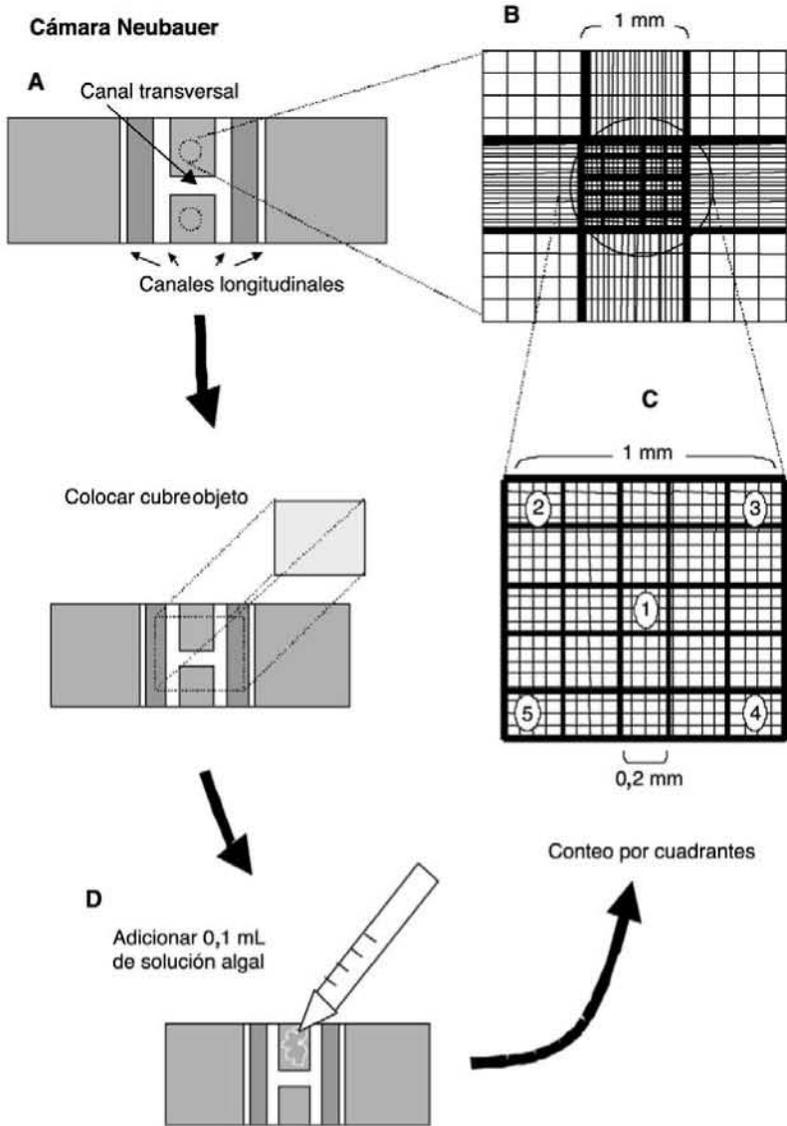
Estabilidad Operacional Ciclos de reuso



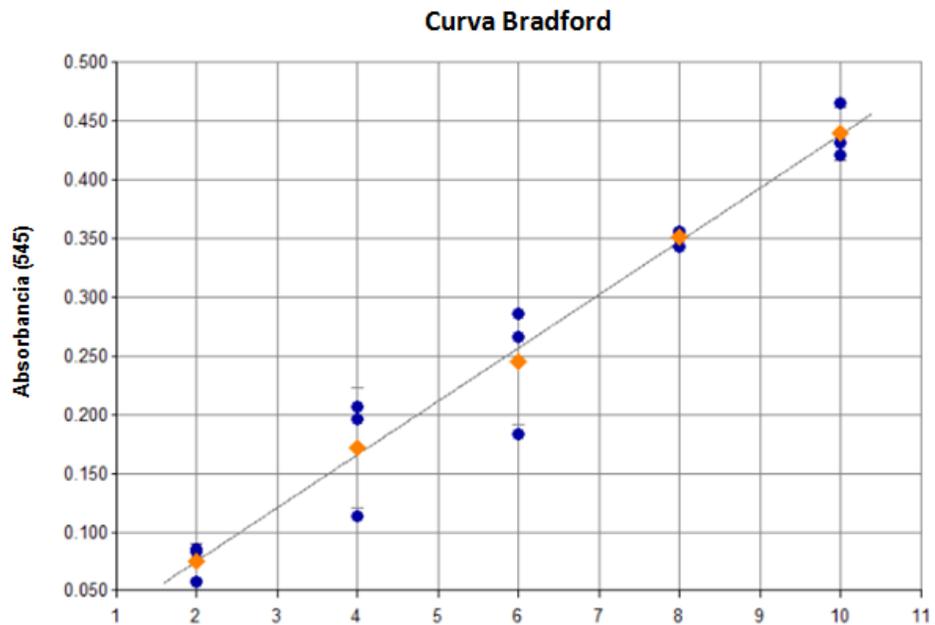
Estabilidad al almacenamiento de la enzima inmovilizada y en solución



ANEXO B: Cámara de Neubauer o Hematocímetro para conteo de esporas.



ANEXO C: Curva de calibración para cuantificación de la concentración de proteína por el método de Bradford

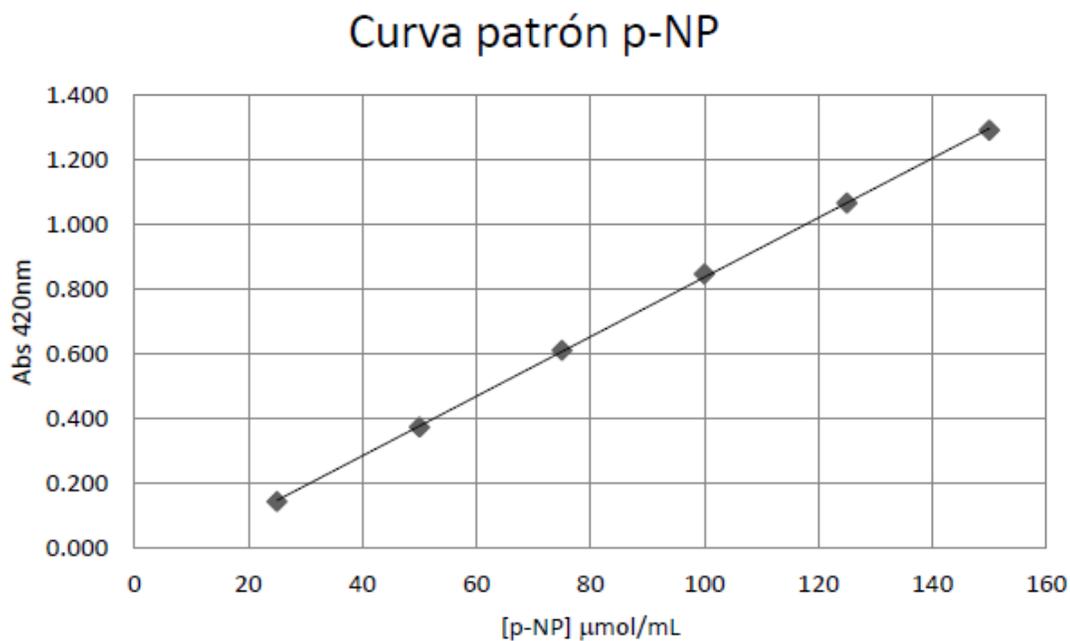


Realizada en el espectrofotómetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).

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

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

Se utilizó como referencia *p*-nitrofenol de 25-200 μmol , las lecturas se midieron a 420 nm.



Realizada en el espectrofotómetro Epoch Microplate Spectrophotometer (BioTek).

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