



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**INMOVILIZACIÓN DE CUTINASAS
RECOMBINANTES DE *Aspergillus nidulans* Y SU
APLICACIÓN EN LA LIPOFILIZACIÓN DE
ANTIOXIDANTES**

TESIS

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

PRESENTA

QUIROZ MERCADO ROCIO ABISH



CD.MX.

2018



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: Profesor: Dr. Eduardo Bárzana García

VOCAL: Profesor: Dra. Carmina Montiel Pacheco

SECRETARIO: Profesor: Dra. Carolina Peña Montes

1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Sara Margarita Garza Aguilar

2º SUPLENTE: Profesor: Dra. Amelia Farrés González Sarabia

El trabajo de investigación se desarrolló 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 Farrés González-Saravia

SUSTENTANTE:

Rocio Abish Quiroz Mercado

El trabajo de investigación se presentó en los siguientes eventos:

Modalidad cartel:

- "Generación de compuestos con actividad antioxidante incrementada por la acción de esterasas producidas por *A. nidulans*", en el simposio: "Biocatálisis: una herramienta clave para la química sustentable", Junio 2016, Ciudad de México.
- "Transesterificación enzimática del aceite de tiliapo por acción de cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* inmovilizadas"; Simposio "Impacto de la Biocatálisis en la Química de alimentos, farmacéutica y ambiental, abril 2017, Ciudad de Veracruz. Red temática BIOCATTEM y el Instituto Tecnológico de Veracruz

Modalidad oral:

- "Cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* inmovilizadas y su aplicación en la producción biocatalítica de compuestos de interés en alimentos", XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C, junio 2017, Puerto Vallarta, Jal.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca No. 153500 otorgada durante la realización de este trabajo.

Al financiamiento del proyecto PAIP 5490-5000 otorgado.

A la Dra. Amelia Farrés por la oportunidad que me brindó de trabajar en su línea de investigación, por todo el apoyo durante mi estancia y por su gran ejemplo de humildad, fortaleza y por creer en mí para realizar esta investigación.

A la Dra. Carolina Peña por su asesoría durante la elaboración de la tesis, por acercarme a la investigación y divulgación científica, su ánimo, su constante apoyo y por enseñarme que las metas se pueden cumplir.

Al Dr. Arturo Navarro O. por su asesoría y materiales brindados para la realización de las reacciones.

Al Instituto Tecnológico de Veracruz en la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, en el laboratorio de poscosecha por el apoyo brindado durante mi estancia en Veracruz.

Al M. C. Augusto Castro por su asesoría y gran amistad durante la elaboración de la tesis, y por los grandes consejos brindados.

A la Q. A. Sara Luz Morales por su asesoría y su bella amistad brindada durante la elaboración de la tesis.

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

Al Q. A. Ricardo Rodríguez quien me asesoro en las primeras semanas en el laboratorio y su gran amistad.

Al Q. A. Alfredo por sus consejos, llamadas de atención y amistad.

A mis padres Olivia y Mario por tanto amor, apoyo, paciencia y por siempre buscar darme lo mejor.

A mis hermanos Cinthya y Job por su apoyo, cuidado y gran ejemplo.

A mi familia adoptiva, mis hermanos Erika, Mario, María y mi madre Carolina por su amor, su apoyo, su gran ejemplo de fortaleza e interés en mi bienestar.

A Lulu, Vannesa, Jorge, Nath, Toño, Brenda, Monse y Miriam, amigos que me han apoyado, regañado y acompañado en momentos inolvidables durante la carrera, gracias por su verdadera amistad.

A mi hermana y mejor amiga Ana por su amor y por estar presente en cada momento de mi vida.

A Javier por las charlas tan largas y su bella amistad.

A mi tía Rita porque siempre me motivaba y cantaba, descansa en paz donde quiera que estés.

DEDICATORIA ESPECIAL

A Juan Carlos Segundo por ser parte de mi vida y llenar mi vida de magia cada vez que estaba junto a él, por su gran ejemplo de lucha y sacrificio, por su amor tan pleno y sin medida que me dio en los buenos y malos momentos de mi vida.

Por su optimismo por salir adelante a pesar de las pruebas tan difíciles que pasamos juntos, por tantas risas compartidas, los bellos recuerdos y la historia de amor más grande que viví a su lado.

Porque fuiste mi motor y mi razón siempre te recordaré, te has ido de esta vida y jamás podré borrar de mis oídos el sonido de tu voz, en mi mente quedará grabada tu sonrisa, y a pesar de que no estás aquí, siempre te siento, gracias por apoyarme durante toda mi carrera, por desvelarte conmigo y despertarme para continuar estudiando, por ayudarme a transcribir tareas para entregar a mano, por recogerme de la universidad cuando salía de los exámenes departamentales, por asistir a mi fiesta de graduación a pesar de tu cansancio y malestar, y sobre todo por las grandes aventuras vividas, donde no podía dejar de sonreír.

Va por ti Juan

“Porque toda mi vida y después de ella te amaré”

Juan Carlos Segundo

ÍNDICE GENERAL

<u>1. INTRODUCCIÓN</u>	2
<u>2. MARCO TEÓRICO</u>	3
2.1. Biocatálisis	3
2.2. Cutinasas	3
2.3. Microorganismos productores de cutinasas	8
2.4. Género <i>Aspergillus</i>	10
2.5. Expresión de la enzima en <i>Pichia pastoris</i>	11
2.6. Inmovilización	14
2.6. Aplicaciones de las cutinasas en la industria alimentaria.....	17
2.7. Reacciones de lipofilización	18
2.8. Compuestos bioactivos de alimentos de origen vegetal	21
2.8.1. <i>Hibiscus sabdariffa</i> (flor de jamaica)	22
<u>3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO</u>	25
<u>4. JUSTIFICACIÓN</u>	28
<u>5. HIPÓTESIS</u>	28
<u>6. OBJETIVOS</u>	29
6.1. Objetivo general	29
6.2. Objetivos particulares	29
<u>7. DESARROLLO EXPERIMENTAL</u>	30
7.1. Primera parte: Obtención, inmovilización y caracterización de las enzimas.....	30
7.2. Segunda parte: Evaluación de las enzimas en condiciones de reacción y reacciones de transesterificación del aceite de tiliapo	36
7.3. Tercera parte: reacciones de lipofilización	40
<u>8. RESULTADOS</u>	44
8.1. Obtención de cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2.....	44

8.2. Inmovilización	50
8.3. Caracterización de las enzimas inmovilizadas.....	55
8.4. Reacción de transesterificación del aceite de tiliapo	71
8.5. Cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante de las antocianinas soportadas y perfil de antocianinas del maíz morado y jamaica	79
8.5. Reacciones de lipofilización de antocianinas.....	84
<u>9. CONCLUSIONES</u>	<u>96</u>
<u>10. RECOMENDACIONES</u>	<u>99</u>
<u>11. BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>99</u>
<u>12. APÉNDICE.....</u>	<u>107</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las α/β hidrolasas.	5
Figura 2. Morfología de la cutícula en plantas superiores.....	6
Figura 3. Unidad básica de la estructura de la cutina y principales ácidos grasos	7
Figura 4. Reacciones de síntesis	7
Figura 5. Mecanismo catalítico de las serín-proteasas	8
Figura 6. Vía metabólica del metanol en <i>P. pastoris</i>	13
Figura 7. Mecanismo esquematizado para la esterificación catalizada por cutinasas... 18	
Figura 8. Mecanismo de acilación de isoquercitina.....	20
Figura 9. Reacción de lipofilización de antocianina-3-O-sambubiosida con cloruro de octanoílo.	21
Figura 10 . Diagrama general.....	30
Figura 11. Diagrama del desarrollo experimental primera parte.....	30
Figura 12 Diagrama del desarrollo experimental segunda parte	37
Figura 14. Diagrama del desarrollo experimental tercera parte.	41
Figura 15. Perfil electroforético en gel SDS-PAGE de los extractos concentrados de la enzima ANCUT1.	47
Figura 16. Zimograma para la determinación de actividad esterasa en gel SDS-PAGE usando como sustrato acetato de α -Naftilo y como revelador Fast red.....	48
Figura 17 Perfil electroforético en gel SDS-PAGE del extracto concentrado de ANCUT2 teñido con comassie	49
Figura 18. Zimograma para la determinación de actividad esterasa en gel SDS-PAGE usando como sustrato acetato de α -Naftilo y como revelador Fast red.....	50
Figura 19. Cromatografía en capa fina de las reacciones de transesterificación probadas con metanol a 37°C con 120 h a 250 rpm.....	74
Figura 20. Cinética de la reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 analizada cualitativamente por cromatografía en capa fina probadas con butanol a 37 °C 24-120 h a 250 rpm.....	75
Figura 21. Cinética de la reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545 analizada cualitativamente por cromatografía en capa fina probadas con butanol a 37 °C 24 -120 h a 250 rpm.....	75
Figura 22. Cromatograma del tratamiento de transesterificación ácida del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000.....	77
Figura 23. Cromatograma del tratamiento de transesterificación ácida del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545. 77	
Figura 24. Cromatograma del tratamiento de transesterificación alcalina del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000.....	78
Figura 25. Cromatograma del tratamiento de transesterificación alcalina del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545. 78	
Figura 26. Perfil de antocianinas de la Jamaica y del maíz morado. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1).	80
Figura 27. Estructuras químicas de algunas antocianinas de <i>H. Sabdariffa</i> (Heba et al., 2014).	81

Figura 28. Estructuras químicas de algunas antocianinas del maíz morado (Castañeda <i>et al.</i> , 2005).	82
Figura 29. Reducción de DPPH A) Jamaica B) Maíz morado	84
Figura 30. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada con diferentes medios de reacción.	88
Figura 31. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona con diferentes reveladores.....	89
Figura 32. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona.	89
Figura 33. Cromatograma a 520 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona.	90
Figura 34. Cromatograma a 325 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona.....	91
Figura 35. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada ...	92
Figura 36. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada.....	92
Figura 37. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas de Jamaica catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada.....	93
Figura 38. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de la jamaica catalizadas por la enzima ANCUT 2 inmovilizada.....	93
Figura 39. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2.	94
Figura 40. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. B; blanco de reacción, Rx; reacción química, ET; ésteres de tilipo.....	95
Figura 41. Cromatograma a 520 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada.	95
Figura 42. Cromatograma a 325 nm de los productos de reacción de la lipofilización del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT 2 inmovilizada.....	96

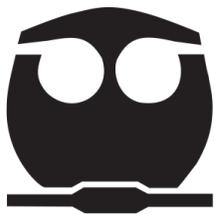
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Microorganismos productores de cutinasas	9
Tabla 2. Ventajas y desventajas de <i>Pichia pastoris</i> como sistema de expresión.....	12
Tabla 3. Características y funciones de los vectores del sistema de expresión de <i>P. pastoris</i>	13
Tabla 4. Características de los soportes en estudio.....	16
Tabla 6. Aplicaciones de las cutinasas en la industria alimentaria	17
Tabla 6. Propiedades funcionales de la jamaica y compuestos bioactivos (<i>Hibiscus sabdariffa</i>).....	23
Tabla 7. Propiedades funcionales y compuestos bioactivos del maíz morado (Guillén-Sánchez <i>et al.</i> , 2014; Huamán-Alvino <i>et al.</i> , 2016).	24
Tabla 8. Perfil de ácidos grasos de la semilla del tiliapo	25
Tabla 9. Caracterización bioquímica de la enzima nativa ANCUT1 de <i>A. nidulans</i> PW1 (Vega, 2013) e inmovilizada (Castro, 2014) y la enzima recombinante ANCUT1 (Solís, 2015).....	26
Tabla 10. Caracterización bioquímica de la enzima nativa ANCUT2 de <i>A. nidulans</i> PW1 (Bermúdez, 2013) e inmovilizada (Castro, 2014) y la enzima recombinante ANCUT2 (Morales, 2015).	26
Tabla 11. Condiciones de reacción probadas.....	38
Tabla 12. Condiciones del análisis CG.....	40
Tabla 13. Condiciones de reacciones de lipofilización de antocianinas	43
Tabla 14. Método de CLAR para antocianinas (Fernández, 2014)	44
Tabla 15. Comparación entre el extracto enzimático de la enzima ANCUT1 en condiciones óptimas (Castro, 2017) y por Solís (2010) quien lo realizó de acuerdo a la metodología descrita.	45
Tabla 16. Resultados de prueba cualitativa de la enzima ANCUT1	45
Tabla 17. Resultados de la determinación de proteína y actividad de la enzima ANCUT1.	46
Tabla 18. Resultados de prueba cualitativa de actividad esterasa.....	48
Tabla 19. Determinación de proteína y actividad de ANCUT2.	49
Tabla 20. Parámetros determinados para la inmovilización de enzimas recombinantes ANCUT1 (Accurel MP 1000) y ANCUT2 (Celite 545).	50
Tabla 21. Eficiencia de la inmovilización de las enzimas.....	55
Tabla 22. Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes inmovilizadas....	55
Tabla 23. Condiciones de reacción de transesterificación probadas.....	73
Tabla 24. Condiciones óptimas de reacción	76
Tabla 25. Porcentaje de ácidos grasos butilados	79
Tabla 26. Cantidad de antocianinas soportadas en sílice 60.....	79
Tabla 27. Rf de las antocianinas de la jamaica y del maíz morado.....	80
Tabla 28. Concentración necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%	84
Tabla 29. Condiciones de reacción de lipofilización de antocianinas	87
Tabla 30. Composición del medio YPD 2X.....	107
Tabla 31. Composición del medio YPD-Glicerol	107
Tabla 32. Composición del medio BMGY.....	108

Tabla 33. Composición del medio YP	108
Tabla 34. Composición del medio BMMY	108
Tabla 35. Resultados de la curva de calibración de Bradford	109
Tabla 36. Resultados de la curva de calibración de cuantificación de actividad enzimática.....	110

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Cinética de adsorción ANCUT1 (Accurel MP 100).	52
Gráfico 2. Cinética de adsorción de la enzima ANCUT2 (Celite 545).	52
Gráfico 3. Cantidad de proteína para la enzima inmovilizada ANCUT1 en Accurel MP 1000.	53
Gráfico 4. Cantidad de proteína para la enzima inmovilizada ANCUT2 en Celite 545. .	54
Gráfico 5. Efecto del pH en la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000)	57
Gráfico 6. Efecto del pH en la enzima ANCUT2 (Celite 545)	58
Gráfico 7. Efecto de la temperatura de ANCUT1 (Accurel MP 1000)	59
Gráfico 8. Efecto de la temperatura de la enzima ANCUT2 (Celite 545).	60
Gráfico 9. Estabilidad al pH enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).	61
Gráfico 10. Estabilidad al pH enzima ANCUT2 (Celite 545).	62
Gráfico 11. Estabilidad térmica de la enzima ANCUT1	63
Gráfico 12. Estabilidad térmica de la enzima ANCUT2 (Celite 545).	64
Gráfico 13. Especificidad de sustrato enzima ANCUT1.	65
Gráfico 14. Especificidad de sustrato enzima ANCUT2 (Celite 545)	66
Gráfico 15. Estabilidad operacional de la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).	67
Gráfico 16. Estabilidad operacional de la enzima ANCUT2 (Celite 545).	68
Gráfico 17. Estabilidad de la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).	69
Gráfico 18. Tiempo de vida media de la enzima inmovilizada (ANCUT1) en Accurel MP 10000.	70
Gráfico 19. Estabilidad de la enzima ANCUT2 (Celite 545).	70
Gráfico 18. Tiempo de vida media de la enzima inmovilizada (ANCUT2) en Celite 545.	71
Gráfico 19. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT1 (Accurel MP 1000) en medios de reacción de transesterificación.	72
Gráfico 20. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT2 (Celite 545) en medios de reacción de transesterificación	73
Gráfico 21. Reducción del radical DPPH de las antocianinas de la jamaica	82
Gráfico 22. Reducción del radical DPPH de las antocianinas del maíz morado.	83
Gráfico 23. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT1 (Accurel MP 1000) para reacciones de lipoflización.	85
Gráfico 24. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT2 (Celite 545) para reacciones de lipoflización	86
Gráfico 25. Calibración para la cuantificación de proteína.	109



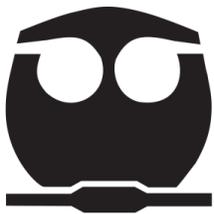
1. INTRODUCCIÓN

Las enzimas catalizan reacciones químicas específicas, ofreciendo alta velocidad de reacción, mayor ventaja en términos de selectividad, eficiencia, seguridad y sustentabilidad (Fontes y Alves, 2009).

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son enzimas que pertenecen a la familia de las α / β hidrolasas, se clasifican como hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos y son capaces de hidrolizar una gran variedad de sustratos como ésteres solubles e insolubles, como ésteres de cadena corta, media, larga y triacilgliceroles, siendo el sustrato principal la cutina, un biopolímero que consta de ácidos grasos epoxi e hidroxilados de cadena larga (principalmente C16 y C18). También catalizan reacciones de esterificación y transesterificación (Castro-Ochoa *et al.*, 2010).

Las enzimas libres al ser solubles en agua, su separación de los sustratos y productos es difícil, y por tanto, no se pueden reutilizar. La inmovilización es una solución para conseguir una recuperación y mejorar la estabilidad (Sirisha *et al.*, 2016).

En este trabajo se realizó la inmovilización de las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 en Accurel MP 1000 y Celite 545 respectivamente y se caracterizaron bioquímicamente, con el fin de explorar su potencial en la biocatálisis mediante reacciones de transesterificación.



2. MARCO TEÓRICO

2.1. Biocatálisis

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas específicas y son empleadas por las ventajas que presentan a comparación de los catalizadores químicos, como son una velocidad de reacción alta, mayor actividad catalítica, selectividad (quimio-, regio- y estereoselectividad), mayor eficiencia, parámetros de reacción compatibles con los procesos industriales y sustentabilidad (Fontes y Alves, 2009).

2.2. Cutinasas

Las hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos (EC 3.1.1.X) son un grupo diverso de enzimas de sustratos diversos. En este grupo de enzimas se incluyen las cutinasas (EC 3.1.1.74) (Castro-Ochoa *et al.*, 2010), las cuales son capaces de hidrolizar una amplia variedad de sustratos (Dutta *et al.*, 2009), mostrando propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, debido a que hidrolizan ésteres solubles de cadena corta, media, larga, triacilgliceroles, poliésteres y ceras (Fontes y Alves, 2009). Sin embargo se pueden distinguir de las esterasas por su capacidad para hidrolizar triacilgliceroles y de las lipasas por su capacidad para hidrolizar ésteres solubles e innecesaria activación interfacial (Chen *et al.*, 2013).

Las lipasas investigadas hasta ahora varían ampliamente en tamaño y secuencia de aminoácidos. Sin embargo, pertenecen a la clase de serin esterasas y a la familia de las α / β hidrolasas en las que la serina nucleofílica se encuentra en la entrada de un giro extremadamente estrecho entre una cadena β y una α -hélice. Las lipasas se caracterizan por los residuos de la triada catalítica Ser, His, Asp (Glu) y por un sitio oxianión que estabiliza el estado de transición.

Las cutinasas son enzimas hidrolíticas que degradan la cutina; son los miembros más pequeños de las α / β hidrolasas, tienen una triada catalítica clásica de Serina, Histidina y un grupo carboxilo (Fontes y Alves, 2009). La triada catalítica Ser120, Asp175 e His188, es accesible y está localizada en un extremo del elipsoide de proteína, y está rodeada por el bucle 80-87 y por el bucle más hidrófobo 180-188. La serina de la triada catalítica, a diferencia de algunas lipasas no está cubierta por una "tapa" anfipática por lo tanto es accesible a solventes y sustratos, incluso en ausencia de alguna fase interfacial (Dutta *et al.*, 2009).

Las cutinasas difieren de las lipasas clásicas, ya que no requieren de una activación interfacial. Los bucles mencionados anteriormente 80-87 y 180-188, teniendo aminoácidos hidrofóbicos (Leu81, Gly82, Ala85, Leu86, Pro87, Leu 182, Ileu183 y Val184), pueden constituir el sitio de unión interfacial. A pesar de la existencia de dos cadenas laterales puentes de aminoácidos Leu81 y Val184, y Leu182 y Asn84, la serina catalítica de las cutinasa no esta enterrada bajo bucles de superficie. La unión de la cutinasa a las interfaces parece no requerir un reordenamiento, como en el caso de las lipasas.

La serina se encuentra en el extremo C-terminal de una cadena β y el péptido Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly que contiene el aminoácido del sitio activo Ser120, presenta una alta homología con la secuencia consenso Gly-(Tyr o His)-Ser-X-Gly comúnmente presente en lipasas. Dos puentes disulfuro están presentes en la cutinasa de *F. solani*; el primero, Cys 31-Cys 109, uniendo el extremo del N-terminal a un giro- β que participa en la estabilización del plegamiento molecular global; el segundo puente de disulfuro, Cys 171-Cys 178, estabiliza dos giros- β consecutivos, los cuales se localizan en el residuo catalítico Asp 175 (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). La enzima presenta una estructura compacta (figura 1) compuesta por 197 residuos, que están dispuestos a un núcleo hidrofóbico hecho por una

hoja central β rodeada por 5 α -hélices, y un único residuo de triptófano (Trp 69), que se encuentra al lado de un enlace disulfuro (Cys 31-Cys 109) (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Otra característica es que tiene una cavidad oxianiónica preformada que no presentan ni las esterasas ni las lipasas, lo que provee un ambiente electrofílico, estabilizando la carga negativa generada durante el ataque nucleofílico del enlace hidrolizable del sustrato (Castro-Ochoa *et al.*, 2010).

Las cutinasas catalizan la hidrólisis del biopolímero cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. La cutina forma parte de la cutícula (figura 2) la cual es la capa protectora que se encuentra en la superficie más externa de las plantas superiores y que interacciona con el ambiente (Tafolla-Arellano, 2013).

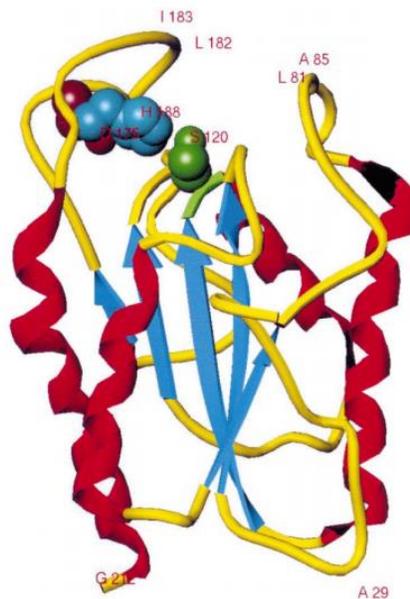


Figura 1. Estructura de las cutinasas. Se muestran α - Hélices (rojo), β -hoja plegada (azul) y bucles (amarillo). Los residuos de la tríada catalítica (Ser120, verde; His188, azul; Asp175, roja). Los residuos de los bucles que delimitan el catalizador (Residuos 80 ^ 88 y 180 ^ 188) (Longhi, 1999).

La hidrólisis enzimática de la cutina es uno de los primeros pasos de infección en plantas, se trata de un polímero insoluble de estructura

amorfa constituido principalmente por ácidos grasos de 16 y 18 carbonos, los cuales se encuentran formando enlaces tipo éster entre sí (figura 3) (Heredia *et al.*, 1998). Además de catalizar reacciones de hidrólisis son capaces de catalizar reacciones de síntesis (figura 4) como la esterificación y transesterificación.

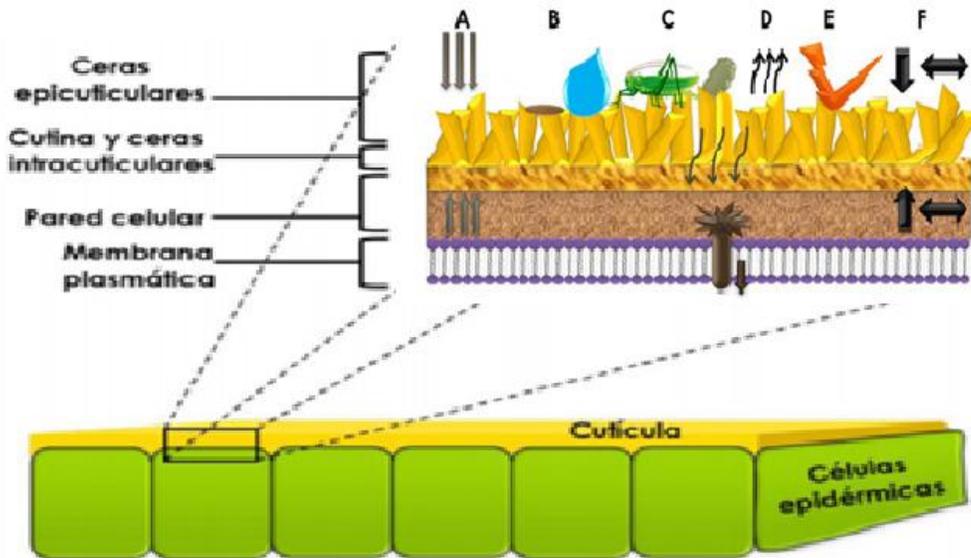


Figura 2. Morfología de la cutícula en plantas superiores.

Ubicación de la cutícula con respecto a las células epidérmicas, y principales funciones de la cutícula en las plantas: A; reducción de la pérdida de agua y difusión de gases, B; evita la acumulación de agua y polvo, C; participa en las interacciones planta-insecto, D; participa en la traducción de señales para la activación de genes específicos, E; controla los cambios de temperatura, F; provee soporte mecánico (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013).

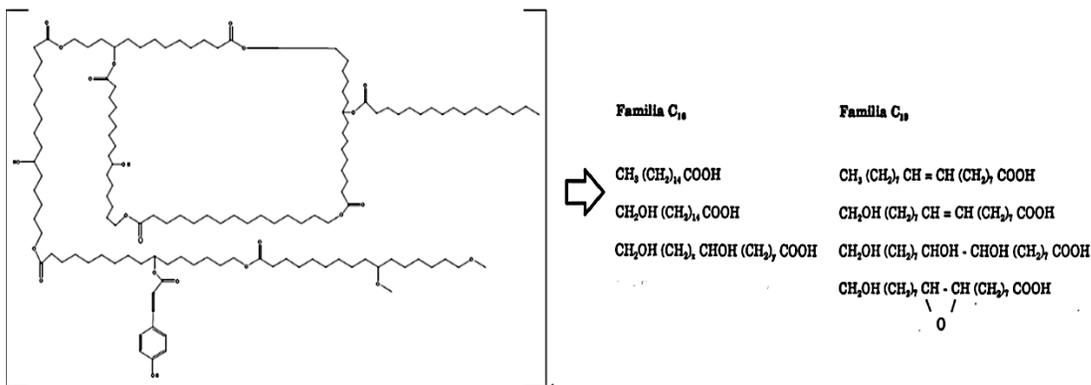


Figura 3. Unidad básica de la estructura de la cutina y principales ácidos grasos (Kolattukudy, 1985; Heredia *et al.*, 1998).

Hidrólisis (medio acuoso)



Esterificación (medio orgánico)



Transesterificación



Figura 4. Reacciones de síntesis (Ghanem, 2007).

Las cutinasas, al igual que otras α / β serin hidrolasas, realizan la catálisis como se muestran en la figura 5, con un intermedio covalente que enlaza la serina catalítica con el grupo carbonilo del éster que se esté hidrolizando (Chen *et al.*, 2013). El mecanismo catalítico consta de cuatro pasos; en el primer paso el hidrógeno del ácido aspártico se une a la histidina promoviendo la formación de un puente de hidrógeno entre la serina y el anillo imidazol de histidina. En presencia del sustrato la histidina actúa como una base, desprotonando la serina para generar un grupo alcóxido (-O-); en el segundo paso la serina del sitio activo es un nucleófilo, que ataca al grupo carbonilo del ácido, formando un intermedio tetraédrico estable complejo de acilo-enzima, el complejo acilo-enzima se estabiliza por medio de la cavidad oxianiónica; como tercer paso se libera agua y el intermediario tetraédrico genera el acilo enzima, mediante la transferencia de un protón desde el residuo de histidina cargado

positivamente al grupo amino formado por la ruptura del enlace peptídico. La molécula de agua se sitúa en el lugar ocupado por el componente amina del sustrato y en el último paso, el grupo éster del acil-enzima se hidroliza ahora mediante un proceso donde la histidina actúa como un catalizador básico, separando el protón de la molécula de agua y el ión hidroxilo resultante ataca al átomo del carbono carbonilo del grupo acilo, formando un intermediario tetraédrico. Esta estructura se descompone para formar el producto ácido carboxílico (Barros *et al.*, 2010).

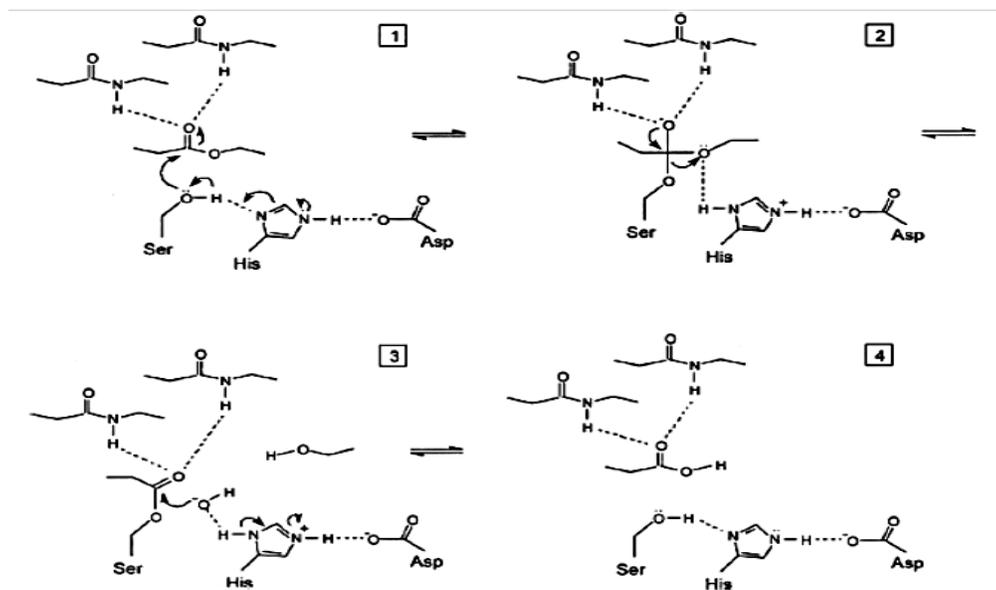


Figura 5. Mecanismo catalítico de las serín-proteasas (Chen *et al.*, 2013).

2.3. Microorganismos productores de cutinasas

Los primeros trabajos se centraron en el papel de las cutinasas en la infección de plantas por hongos fitopatógenos. Las cutinasas son enzimas inducibles producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Chen *et al.* (2013) demostraron que las cutinasas son un grupo diverso de enzimas, en las que algunas cutinasas son esenciales para la patogenicidad, mientras que otras son expresadas durante el crecimiento saprofito de la cutina como fuente de carbono.

También han demostrado que tanto los microorganismos patógenos como los saprofitos expresan cutinasas, sus genomas pueden albergar varias cutinasas diferentes, estas enzimas son expresadas en diferentes momentos durante el ciclo de vida microbiano.

Las cutinasas son enzimas hidrolíticas cuya producción se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en cutina como única fuente de carbono. Posteriormente se reportó la producción de cutinasas en polen de plantas, bacterias, levaduras e incluso en hongos no patógenos (Castro-Ochoa *et al.*, 2010). Algunos de los microorganismos productores son listados en la tabla 1, sin embargo, podemos esperar muchos más debido a la transferencia horizontal de genes.

Tabla 1. Microorganismos productores de cutinasas

Fuente	Género	Especie	Referencia	
Bacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>Scabies</i>	McQueen <i>et al.</i> , 1987	
		<i>Acidiscabies</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992	
		<i>Badius</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992	
	<i>Pseudomonas</i>	<i>Putida</i>	Sebastian, 1988	
		<i>mendocina</i>	Kim <i>et al.</i> , 2003	
		<i>aeruginosa</i>	Fett <i>et al.</i> , 1992	
<i>Thermonospora</i>	<i>Fusca</i>	Fett <i>et al.</i> , 1999		
Hongo	<i>Fusarium</i>	<i>solani pisi.</i>	Martínez <i>et al.</i> , 1992	
		<i>oxysporum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Colletotrichum</i>	<i>kahawae</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007	
		<i>gloeosporioides</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007	
	<i>Monilinia</i>	<i>fructicola</i>	Wang <i>et al.</i> , 2002	
	<i>Venturia</i>	<i>inaequalis</i>	Trail, 1990	
	<i>Alternaria</i>	<i>brassicicola</i>	Trail, 1993	
	<i>Phytophthora</i>	<i>cactorum</i>	Egmond <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	Maeda <i>et al.</i> , 2005	
		<i>nidulans</i>	Castro Ochoa, 2014	
	<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	Farah <i>et al.</i> , 2005	
	<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	Rubio <i>et al.</i> , 2008	
	Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	<i>sp.</i>	Masaki <i>et al.</i> , 2005
		<i>Pseudozyma</i>	<i>jejuensis</i>	Seo <i>et al.</i> , 2007

Polen	(<i>Nasturtium</i> pollen) <i>Tropaeolum</i>	majus	Shayk <i>et al.</i> , 1977
--------------	--	-------	----------------------------

2.4. Género *Aspergillus*

Aspergillus es un hongo filamentoso ubicuo en la naturaleza, pertenece a la división *Deuteromycota*, que corresponde a los hongos filamentosos a los cuales no se les conoce una forma sexuada para su reproducción, y a la clase *Hyphomycetes*, que son los hongos que forman micelio pero carecen de esporocarpio (Viniegra, 2003). En general, el género *Aspergillus* se caracteriza por tener conidióforos con esporas organizadas en rosarios largos que tienen un arreglo similar a una regadera o aspersor, algunas especies producen esporas sexuales y asexuales (ascomiceto). El ciclo biológico de *Aspergillus* comprende la germinación, a partir de esporas, el crecimiento micelar y la esporulación que incluye la formación de micelio (Viniegra, 2003).

Este género agrupa a una variedad de especies fitopatógenas de hábitat terrestre con una amplia capacidad metabólica y producción de numerosas enzimas extracelulares. Tiene la capacidad de crecer con rapidez, excretar un gran número de enzimas y separarse con facilidad de los caldos de cultivo (Viniegra, 2003). Algunas de las especies de importancia industrial son: *A. awamori*, *A. flavus*, *A. sydowii*, *A. niger*, *A. nidulans*, y *A. oryzae*, entre otros (Galagan *et al.*, 2005).

Aspergillus nidulans, también conocido como *Emericella nidulans* cuando se refiere a su forma sexual (teleomorfo), es un hongo filamentoso perteneciente a la familia *Trichocomaceae*, filo *Ascomycota* (Castro-Ochoa, 2014), pertenece a la clase *Eurotiomyces* y al orden *Eurotiales*. Crece rápidamente como hongo filamentoso en sólidos o en medio líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales, es homotálico y, normalmente haploide. También puede ser inducido a crecer como

diploide vegetativo. Se reproduce por medio de esporas asexuales (conidias) o por esporas sexuales (ascosporas) (Bermúdez, 2013).

Es capaz de producir una gran variedad de enzimas extracelulares con aplicaciones potenciales, como proteasas, esterases o cutinasas.

Es usado como modelo biotecnológico ya que cuenta con un ciclo sexual caracterizado, también es un microorganismo genéticamente manipulable debido a que se conoce su genoma. Este contiene 30.07 Mpb, divididas en 8 cromosomas y con un total de 10,560 genes codificantes (Galagan *et al.*, 2005). A partir del análisis de su genoma, se han reportado, aislado, clonado y caracterizado 4 genes que codifican para cutinasas (Bermúdez, 2013):

- AN07541 (257aa) en el cromosoma IV
- AN05309 (213aa) en el cromosoma V
- AN07180 (221aa) en el cromosoma IV
- AN10346 (223aa) en el cromosoma VI

Aspergillus nidulans requiere cuatro cutinasas posiblemente a un sinergismo o regulación aunque se cree que están relacionadas con el metabolismo de lípidos (Hynes *et al.*, 2006).

2.5. Expresión de la enzima en *Pichia pastoris*

Debido a que la producción de enzimas silvestres en muchos casos es muy baja, se ha estudiado y logrado la expresión de diversas enzimas en sistemas heterólogos como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, entre otros (Castro-Ochoa, 2010).

2.5.1. *Pichia pastoris*

Un sistema de expresión lo conforma un organismo hospedero y un vector de expresión o fragmentos de ADN que posean los elementos génicos necesarios para realizar los procesos de transcripción y traducción por

dicho organismo hospedero. El sistema de expresión de *P. pastoris* presenta las siguientes ventajas y desventajas (tabla 2).

Tabla 2. Ventajas y desventajas de *Pichia pastoris* como sistema de expresión (Guerrero-Olazarán et al., 2004).

Ventajas	Desventajas
<p>-Manipulación sencilla a nivel laboratorio e industrial</p> <p>-Secreción eficiente de la proteína heteróloga</p> <p>-Los cultivos alcanzan altas densidades celulares</p> <p>-Altos niveles de producción</p> <p>-Bajos niveles de secreción de proteínas endógenas facilitando la purificación de la proteína heteróloga</p> <p>-Habilidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a los organismos eucariontes superiores (glicosilación, puentes de disulfuro y procesado proteolítico) que generan un plegamiento correcto de la proteína</p>	<p>-Produce patrones de glicosilación</p> <p>-Actividad proteolítica</p> <p>-Algunas proteínas no se producen de forma eficiente</p>

La expresión de un gen externo en *P. pastoris* comprende tres pasos principales:

1. Inserción del gen en un vector de expresión
2. Inserción del gen en el genoma de *P. pastoris*
3. Examen de la cepa potencial para la expresión del gen externo

P. pastoris es una levadura metilotrófica, es decir es capaz de metabolizar el metanol como única fuente de carbono. Esto es debido a la enzima alcohol oxidasa (AOX), que cataliza el primer paso de la vía de utilización del metanol. En *P. pastoris* existen dos genes que codifican para la alcohol oxidasa: AOX1 y AOX2; AOX1 es la responsable de la mayor parte de la actividad de la alcohol oxidasa en la célula. La expresión del gen AOX1 es controlada a nivel transcripcional.

La forma en la que metaboliza el metanol se basa en la oxidación de metanol a formaldehído. En la figura 6 se esquematiza la vía metabólica del metanol.

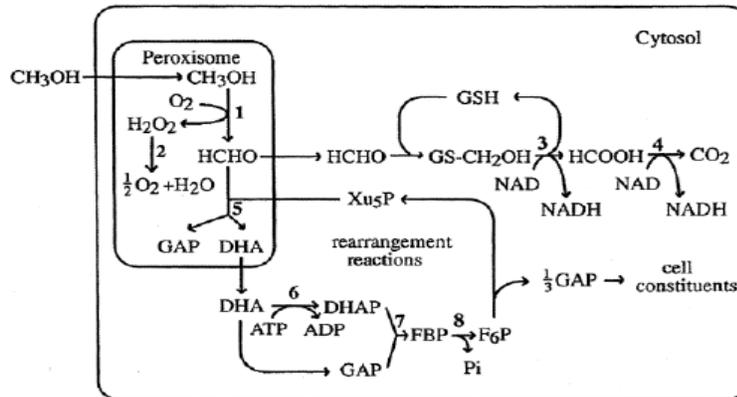


Figura 6. Vía metabólica del metanol en *P. pastoris*.

Enzima que intervienen en la vía metabólica: 1, alcohol oxidasa; 2, catalasa; 3, formaldehído deshidrogenasa; 4, formato deshidrogenasa; 5, dihidroxiacetona sintetasa; 6, dihidroxiacetona cinasa; 7, fructosa 1,6-bisfosfato aldosa; 8 fructosa 1,6-bisfosfatasa (Morales 2015).

2.5.2. Vectores del sistema de expresión de *P. pastoris*

Los vectores del sistema de expresión de *P. pastoris* contienen el marcador de resistencia a zeocina, el cual permite una selección directa de recombinantes e integrantes de copias múltiples. Los vectores tienen las siguientes características (tabla 3):

Tabla 3. Características y funciones de los vectores del sistema de expresión de *P. pastoris* (Morales, 2015).

Característica	Función
Gen 5´ AOX1	Fragmento de 942 pares de bases que contiene el promotor de la AOX1 que permite altos niveles de expresión inducible con metanol.
Señal de secreción α-factor	Dirige a las proteínas recombinantes al medio de crecimiento
Sitio múltiple de clonación	Permite la inserción del gen de interés en el vector de expresión

Epitope <i>myc</i> en el C-terminal	Permite la detección de la proteína de fusión mediante el anticuerpo anti- <i>myc</i>
Cola de polihistidina en el C-terminal	Permite la purificación de la proteína mediante resinas quelantes de metales como níquel
Terminación de transcripción AOX1	Terminación de la transcripción y señal de poliadenilación nativa del gen AOX1
Promotor de TEF1	Promotor del gen de el factor de elongación de transcripción 1 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> que conduce la expresión del gen <i>Sh ble</i> en <i>Pichia</i> , confiriendo resistencia a Zocina
EM7 (promotor procariota sintético)	Promotor constitutivo que conduce la expresión del gen <i>Sh ble</i> en <i>E.coli</i> , confiriendo resistencia a Zeocina
Gen <i>Sh ble</i> (gen <i>ble</i> de <i>Streptoalloteichus hindstanus</i>)	Gen de resistencia a zeocina
Región de terminación de la transcripción CYC1	Extremo 3' del gen CYC1 de <i>S. cerevisiae</i> que permite un procedimiento eficiente del 3' mRNA del gen <i>Sh ble</i> para incrementar su estabilidad
Origen <i>puc</i>	Permite la replicación y el mantenimiento del plásmido en <i>E. coli</i>

2.6. Inmovilización

La inmovilización de una enzima consiste en su localización en una región definida de espacio, generando una forma insoluble que retiene su actividad catalítica y permite su reutilización (Sánchez, 1998; Arroyo, 1998). La inmovilización de las enzimas posibilita la recuperación del biocatalizador, permite la separación del producto fácilmente y aumenta la estabilidad de la enzima. Los principales inconvenientes del proceso de inmovilización son: la alteración de la conformación de la enzima, la heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas con un diferente número de uniones al soporte y pérdida de la actividad de la enzima (Sirisha, 2016).

2.6.1. Métodos de inmovilización

Existen diferentes métodos de inmovilización, se clasifican en dos categorías: retención física y unión química. Los diferentes métodos de inmovilización se agrupan a continuación (Sirisha, 2016; Arroyo, 1998):

Métodos de inmovilización por retención física:

- Atrapamiento
- Inclusión en membranas
- Adsorción

Métodos de inmovilización por unión química

- El enlace covalente / cristales.

2.6.2. Método de inmovilización por adsorción

La adsorción de una proteína sobre una superficie sólida es un método ampliamente utilizado para la inmovilización de enzimas (Peña-Montes *et al.*, 2013). En este método, las enzimas se adhieren al soporte mediante la combinación de interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y por puentes de hidrógeno (Arroyo, 1998). Como principales ventajas de este método están: a) Es una técnica sencilla ya que el proceso consiste únicamente en la suspensión de la matriz con la enzima, b) Representa un costo bajo y c) No existen cambios de especificidad enzimática (Sirisha, 2016).

Sin embargo, un inconveniente es que la unión al soporte es débil, provocando que algunas condiciones puedan debilitar la unión de la enzima al soporte. Las condiciones pueden ser:

-Temperatura alta

-Cambio de pH el cual controla el número y la naturaleza de las cargas que presenta la superficie de la proteína y el soporte

-Cambio en la fuerza iónica (al aumentar la fuerza iónica se produce la desorción de la enzima)

-Diámetro de poro inadecuado

-Adición de sustrato

2.6.3. Soportes para la inmovilización de las enzimas

Los soportes ideales deben de tener las siguientes propiedades:

- Económicos
- Inertes
- Estables
- Capacidad de reuso
- Capacidad para reducir la inhibición del producto
- Capacidad para evitar la contaminación bacteriana
- Deben de ser capaces de adsorber una gran cantidad de enzima

En la tabla 4 se muestran las principales características de los soportes en estudio.

Tabla 4. Características de los soportes en estudio (Castro, 2014; Sirisha et al., 2016).

Propiedad física	Accurel MP 1000	Celite 545
Composición	Polipropileno	SiO ₂
Naturaleza	Orgánica (sintético)	Inorgánico
Tamaño de poro (µm)	5-20	17
Unión	Adsorción	Adsorción
Estabilización	Hidrofóbica	Electrostática
Características	Estructura porosa y estable al ataque microbiano	Bajo costo, baja polaridad, gran área de adhesión, inerte, resistente al pH, temperatura, detergentes y disolventes orgánicos

2.6. Aplicaciones de las cutinasas en la industria alimentaria

Las cutinasas tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria y algunas de ellas se mencionan en la tabla 6.

Tabla 5. Aplicaciones de las cutinasas en la industria alimentaria

Área	Función	Referencia
Tratamiento de frutas, bayas y vegetales	Aumentan la permeabilidad mejorando: <ul style="list-style-type: none"> • Procesos de secado • Permeabilidad de algunas sustancias sintéticas como edulcorantes, potenciadores del sabor, conservantes y estabilizantes • Extracciones de polifenoles En el manejo de residuos de frutas y hortalizas	Nyyssölä, 2015 Fontes <i>et al.</i> , 2009
Agentes aromatizantes	Síntesis de ésteres producidos a partir de ácidos grasos tienen aplicaciones como agentes aromatizantes	Fontes <i>et al.</i> , 2009
Aceites	Reacciones de transesterificación de grasas y aceites, así como la esterificación selectiva de alcoholes para la modificación de grasas y aceites	Fontes <i>et al.</i> , 2009
Lácteos	Hidrólisis de grasa láctea. La liberación de ácidos grasos de cadena corta, imparte sabor, cremosidad, así como aromas mantecosos y de queso al producto.	Nyyssölä, 2015
Ayuda a otras enzimas como la hemicelulasas durante la producción de jarabe de glucosa	Ayudan a la hidrolisis del residuo principal en la producción de jarabe de glucosa el cuál es la hemicelulosa, que es un heteropolisacárido que contiene xilano que esta esterificado con arabinofuranosido y ácido ferúlico.	Fontes <i>et al.</i> , 2009
Antioxidantes naturales	La lipofilización o modificación de estos compuestos vía esterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes) modifica su solubilidad	Castro-Ochoa <i>et al.</i> , 2010

2.7. Reacciones de lipofización

La lipofización es la transesterificación de un componente lipofílico, como un ácido o alcohol graso de cadena larga con sustratos tales como azúcares, proteínas o componentes fenólicos, para generar nuevas moléculas con un balance hidrofílico / lipofílico modificado (Figuroa-Espinoza y Villeneuve, 2005). En la figura 7 se esquematiza el mecanismo de esterificación de las cutinasas, el cual es similar al mecanismo de transesterificación, la diferencia radica en que en lugar de realizar la reacción teniendo como sustrato un ácido carboxílico, se usa éster.

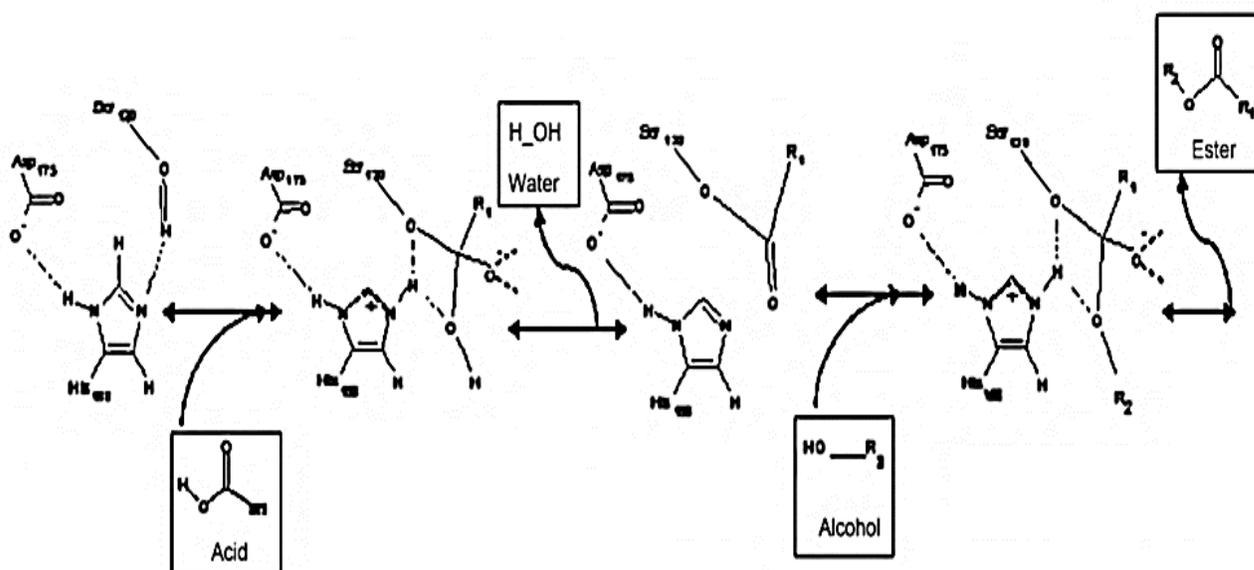


Figura 7. Mecanismo esquematizado para la esterificación catalizada por cutinasas (Barros *et al.*, 2010).

El mecanismo de esterificación es similar al mecanismo de hidrólisis detallado anteriormente, sólo que el alcohol actúa como un nuevo nucleófilo que se enlaza con el intermedio tetraédrico, produciendo el éster y la enzima libre (Barros *et al.*, 2010).

La esterificación y la transesterificación química presentan la desventaja de que no son regioselectivas y puede alterar la funcionalización de los

grupos hidroxilos responsables de la actividad antioxidante; por otro lado, la esterificación y la transesterificación con enzimas es regioselectiva y puede aumentar no sólo su solubilidad en distintos medios, sino su estabilidad y su poder antioxidante (Esqueda, 2012).

2.7.1. Lipofilización de flavonoides

La lipofilización (transesterificación de ésteres de cadenas largas) enzimática de algunos flavonoides ya se han reportado, siendo un grupo importante de compuestos naturales ampliamente distribuido en el reino vegetal debido a sus propiedades biológicas como: eliminación de radicales libres o poder antioxidante, vasodilatadores, anticancerígenos, antiinflamatorias, antibacterianos, inmunoestimulantes, antialérgicos, antivirales. Sin embargo el uso de flavonoides está limitado por su baja solubilidad en las fases oleosas (Castro-Ochoa *et al.*, 2010).

La modificación de su estructura mediante reacciones químicas, enzimáticas o quimio-enzimáticas, permite que los flavonoides sean más hidrófobos por el enlace de ácidos grasos de cadena larga (lipofilización). La acilación química de los flavonoides no es un proceso regioselectivo y conduce a una funcionalización indeseada de los grupos hidroxilos de los compuestos fenólicos que son responsables de la actividad antioxidante de los flavonoides. Sin embargo, la acilación enzimática es regioselectiva y puede aumentar no sólo la solubilidad, sino también su estabilidad (Chebil *et al.*, 2006). La lipofilización enzimática de los ácidos fenólicos presenta ventajas como una especificidad más selectiva, menos generación de subproductos, menos etapas intermedias y parámetros de reacción más suaves (Fontes *et al.*, 2009). Para la acilación enzimática de flavonoides, existen dos reacciones de síntesis: esterificación directa (intercambio del grupo alcoxi de un alcohol con un ácido carboxílico) y la transesterificación (intercambio del el grupo alcoxi de un alcohol con un grupo éster), pero en este trabajo se hace referencia a la lipofilización

como la transesterificación de ésteres de cadena larga (Chebil *et al.*, 2006) como se muestra en la figura 8.

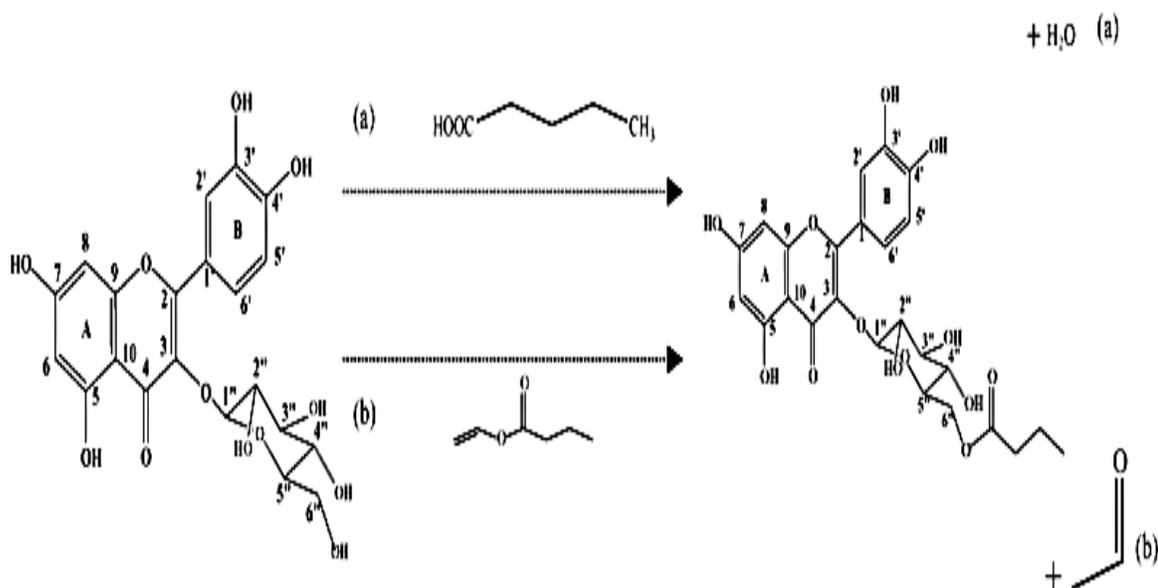


Figura 8. Mecanismo de acilación de isoquercitina.
(a) Esterificación directa; (b) Transesterificación (Chebil *et al.*, 2006).

2.7.2. Lipofilización de antocianinas

Dado que las antocianinas son consideradas como los pigmentos hidrosolubles más importantes de fuentes vegetales, se está estudiando su uso potencial como colorantes en los productos alimenticios o antioxidantes, sin embargo las antocianinas son inestables y sus propiedades cromáticas dependen de factores como las variaciones del pH, la temperatura y la presencia de otros compuestos (ácidos fenólicos, metales); además son poco solubles en disolventes orgánicos. Como consecuencia su incorporación en matrices ricas en lípidos es limitado. La lipofilización tiene como objetivo transformar moléculas polares en moléculas más hidrófobas. Se ha logrado la lipofilización de la antocianina por métodos químicos reportado por Grajeda-Iglesias *et al.* (2017) como se muestra en la figura 9.

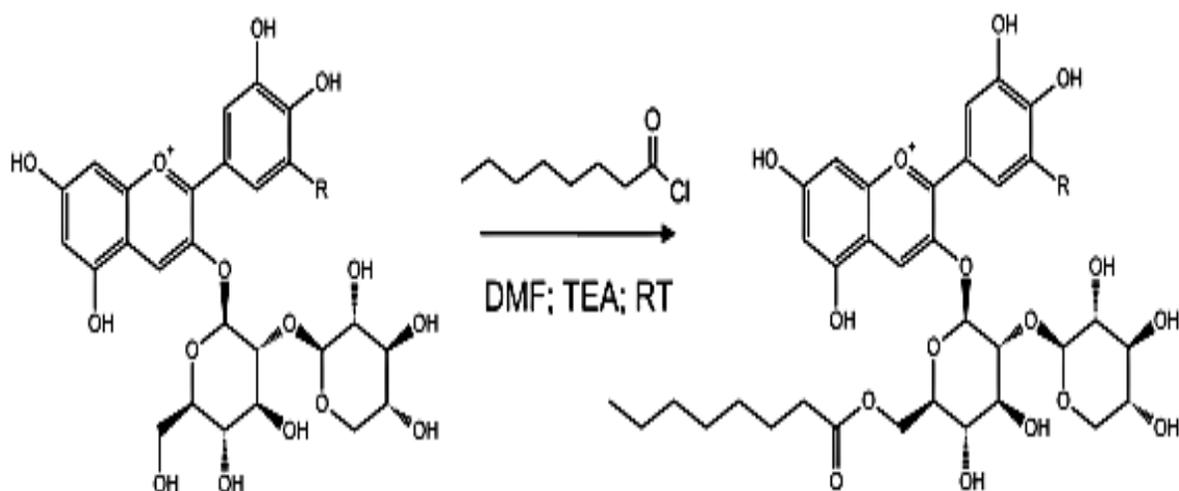


Figura 9. Reacción de lipofilización de antocianina-3-O-sambubiosida con cloruro de octanoílo. R= OH, delfinidin-3-O-sambubiosido, R=H, cianidin-3-O-sambubiosido (Cy-samb). DMF: N, N-dimetilformamida; TEA: trietilamina; RT: temperatura ambiente (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2017).

2.8. Compuestos bioactivos de alimentos de origen vegetal

Una amplia variedad de vegetales son apreciados por su contenido de componentes conocidos como fitoquímicos bioactivos que son benéficos para la salud (Serrano *et al.*, 2006). Los alimentos funcionales se definen como los productos alimenticios de origen animal o vegetal, consumidos en la dieta, que además de aportar nutrientes poseen componentes bioactivos. Entre las sustancias químicas que ejercen esta actividad están compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos grasos indispensables, etc.

En este proyecto se buscó la lipofilización de compuestos de interés en alimentos con ésteres de ácidos grasos indispensables, con mayor interés en las antocianinas como donadoras del grupo alcoxi. Para ello se seleccionaron la flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), que contiene en su mayoría antocianinas aciladas, y el maíz morado (*Zea mays L.*) con mayor contenido de antocianinas no aciladas. Sin embargo, tanto la jamaica como el maíz morado son matrices alimentarias muy complejas con diferentes compuestos bioactivos. Otro alimento funcional que se utilizó

fue el fruto tiliapo con interés en el contenido de aceites esenciales de su semilla, con el propósito de generar los ésteres por medio de reacciones de transesterificación para la reacción de lipofilización.

2.8.1. *Hibiscus sabdariffa* (flor de jamaica)

Hibiscus sabdariffa es una planta herbácea anual dicotiledónea que pertenece a la familia de las Malváceas, se cultiva principalmente en zonas tropicales y subtropicales de ambos hemisferios, es una planta semi-leñosa, sus tallos son lisos generalmente de color rojo. Las hojas son de color verde, alternas, glabras, con vetas rojizas y pecíolos largos y erguidos, con tres a cinco lóbulos de borde dentado. Cuando la corola se marchita y desaparece, quedando sólo los cálices de color rojo o verde que consta de cinco sépalos grandes, los cuales se alargan y se tornan carnosos; son de color rojo oscuro y con sabor ácido (Kumar *et al.*, 2016), de todas las partes de la planta, son las cálices las más usadas, al ser su extracto un remedio tradicional para la constipación, hipertensión, afecciones urinarias, cáncer, diabetes, entre otros.

Se han comprobado que tienen algunas propiedades biológicas como: propiedades antioxidantes, inmunomoduladoras, anticancerígenas, hepatoprotectoras, antimicrobianas, renoprotectiva, diurética y anti-urolitiasis (Bobadilla-Carrillo *et al.*, 2016)

A nivel mundial se cultiva principalmente para la producción de cálices carnosos (China, Tailandia, Sudán, Brasil, Senegal, Tanzania, Mali, West Indies, Nigeria, Indonesia, Malasia, México, Egipto, Arabia Saudita).

Hibiscus sabdariffa contiene proteínas, grasas, carbohidratos, ácidos orgánicos, minerales, vitaminas, así como muchos tipos de compuestos fenólicos. Los polisacáridos y pectinas también forman parte de su composición (Borrás-Linares *et al.*, 2015).

Algunos estudios han demostrado que tienen las siguientes propiedades funcionales y compuestos bioactivos (tabla 6):

Tabla 6. Propiedades funcionales de la jamaica y compuestos bioactivos (*Hibiscus sabdariffa*) (Cid-Ortega, 2012; Borrás-Linares *et al.*, 2015).

Propiedades funcionales	Compuestos bioactivos
Propiedades antioxidantes	Ácido cafeico
Actividad anti-hiperamonemia	Ácido cítrico
Tratamiento contra el cáncer	Luteolina
Efecto hipolipemiante	Ácido hidroxicítrico
Efectos positivos en afecciones cardiovasculares e hipertensivas	Ácido protocatequídico Ácido protocatéquico
Propiedades diuréticas, antipiréticas y contra los efectos de la diabetes	Quercetina y sus glucósidos Antocianinas (cianidin-3-glucósido, delphinidin-3-glucósido, cianidin-3-sambubiósido y delphinidin-3-sambubiósido) Ácido clorogénicos y sus isómeros I y II Glucósidos de miricetina Proantocianidinas Ácido gálico

2.8.2. Maíz morado (*Zea mays L.*)

El *Zea mays L.* variedad morado es un cereal oriundo de Perú y México, es una planta monocotiledónea de estambres hipogénicos, pertenecientes a la familia de las gramíneas. Se caracteriza por sus granos semi-harinosos y su pigmentación debido a la presencia de antocianinas (Guillén-Sánchez *et al.*, 2014). La mazorca (tusa y grano) está constituida en un 85% por grano y 15% por coronta (tusa) utilizado frecuentemente en la preparación de bebidas como la chicha morada y postres como la mazamorra morada. Se cultiva principalmente en la Mesa Central de México: Estado de México, Michoacán, Puebla, Tlaxcala, Hidalgo y partes altas y frías de Veracruz y en la Mixteca de Oaxaca.

Además del valor nutrimental y se ha evidenciado que tienen propiedades funcionales por la presencia de algunos compuestos bioactivos (Guillén-Sánchez *et al.*, 2014) (tabla 7).

Tabla 7. Propiedades funcionales y compuestos bioactivos del maíz morado (Guillén-Sánchez *et al.*, 2014; Huamán-Alvino *et al.*, 2016).

Propiedades funcionales	Compuestos bioactivos
Neutralizar los radicales libres	Antocianinas
Antimutagénico	Ácido protocatéquico
Inhibición de enzimas productoras de radicales libres	Ácido ferúlico
Propiedades antimutagénicas	Quercetina
Retarda la hiperglucemia	Hesperidina
Actividad vasodilatadora	Derivados del ácido cafeico
Tratamientos contra enfermedades renales	Ácidos hidroxicinámicos
Tratamiento contra cálculos en la vejiga	Ácido protocatéquico

2.8.3. Tempesquistle (*Sideroxylon palmeri*)

Nombres vulgares: "tempesquistle", "tempisquistle", "tempenquiste" y "tilazo" (Newman, 2008). Árbol de la familia de las sapotáceas de 5-20 m de alto, produce un fruto de 1.5 a 2 cm de largo, carnosos, elipsoidales o esféricos, sobre pedicelos de casi 1 cm de largo, verdes con látex pegajoso, jugosos, contiene una semilla de 0.8-1 mm de largo oblongo o elipsoidales. *S. Palmeri* es endémica de México, se encuentra en los estados de Chiapas, Durango, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas y Veracruz.

Los frutos inmaduros de tempesquistle son utilizados como alimentos para humanos por todos los hogares campesinos por ejemplo en mole negro y rojo, cocinadas con tomate y cebolla, con nopales y ciruelas pasas, hervidas, fritas o se conservan en vinagre. El fruto maduro se llama tiliapo (expresión deformada del término Nahuatl Tlilic zapotl = negro

“zapote” o fruta carnosa), estas frutas son carnudas, moderadamente tienen un sabor dulce, contienen altas cantidades de látex pegajoso que causan irritación en la lengua, son comidos y usados como forraje para los animales (González-Soberanis y Casas, 2004).

La semilla del fruto maduro presenta el siguiente perfil de ácidos grasos (tabla 8) de acuerdo a la información proporcionada por el Doctor Arturo Navarro Ocaña, de la Facultad de Química de la UNAM.

Tabla 8. Perfil de ácidos grasos de la semilla del tiliapo

Ácido graso	Proporción (% m/m)
Ácido oleico	26
Ácido palmítico	17
Ácido linoleico	17.74
Ácido palmitoleico	0.25
Ácido esteárico	7.42
Ácido linolénico	0.33



3. ANTECEDENTES DEL GRUPO DE TRABAJO

En el grupo de trabajo se han reportado, identificado, y clonado 2 cutinasas (Castro-Ochoa, 2014; Vega, 2013; Esqueda, 2012; Solís, 2015; Morales, 2015). También se han inmovilizado y caracterizado las enzimas nativas ANCUT1 y ANCUT2 de *A. nidulans* PW1 (Castro, 2014). En este proyecto se trabajó con las enzimas ANCUT1 y ANCUT2 recombinantes. En las tablas 9 y 10 se muestran los resultados obtenidos por el grupo de trabajo.

Tabla 9. Caracterización bioquímica de la enzima nativa ANCUT1 de *A. nidulans* PW1 (Vega, 2013) e inmovilizada (Castro, 2014) y la enzima recombinante ANCUT1 (Solís, 2015).

Parámetros	ANCUT1 nativa (Vega, 2013)	ANCUT1 recombinante (Solís, 2015)	ANCUT1 nativa e inmovilizada en Accurel MP 1000 (Castro, 2014)
P.M. (kDa)	22	22.7 y 24.8	-----
PI	6	6.55	% Eficiencia 40.95
pH óptimo	9	9	10
Estabilidad al pH	>95% pH 10 3 h <40% pH 8 3 h	<20% pH 8 1 h <7% pH 5 1 h	5-11 1-3 h
T (°C) óptima	60	50	60
Estabilidad T	70-60 % 15-60 min 30-60 °C	60% 30 °C 15-60 min <38% 70 °C 15 min	30-80 °C 15-60 min
Esp. de sustrato	Cadena corta	Cadena corta	Corta, media y larga
Efecto de iones	>100% Fe ³⁺	>100% Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , EDTA, Na ⁺ , K ⁺ , Fe ³⁺ y Cu ²⁺ (1 mM)	Ciclos de reuso 9
Solventes	>80% DMSO, acetona, IPA, hexano, metanol y etanol al 30%	>80% DMSO, acetona, IPA, hexano, metanol y etanol al 30%	Almacenamiento a 4 °C 38 días

%; Actividad residual; Esp: especificidad; T: temperatura.

Tabla 10. Caracterización bioquímica de la enzima nativa ANCUT2 de *A. nidulans* PW1 (Bermúdez, 2013) e inmovilizada (Castro, 2014) y la enzima recombinante ANCUT2 (Morales, 2015).

Parámetros	ANCUT2 nativa (Bermúdez, 2013)	ANCUT2 recombinante (Morales, 2015)	ANCUT2 nativa e inmovilizada en Celite 545 (Castro, 2014)
P.M. (kDa)	29	37	-----
PI	4.9	4.6-4.8	% Eficiencia 24.49
pH óptimo	9	9	9
Estabilidad al pH	<20% a pH 7 >80% pH 10 3 h	<20% a pH 6 >80% pH 10 3 h	pH 6-11 1-3 h

T (°C) óptima	60	40	40
Estabilidad T	>80% 1 h 60 °C <30% 1 h 70 °C	30- 60 °C 15-60 min	30 – 60 °C 15-60 min
Especificidad por su sustrato	Cadena corta y larga	Cadena corta y larga	Corta y media
Efecto de iones	Aumenta la actividad con EDTA	Aumenta la actividad con EDTA	Ciclos de reuso 5
Solventes	50% con hexano y DMSO	> 100% DMSO, acetona, hexano, metanol y etanol	Almacenamiento a 4°C 90 días

‰: Actividad residual; Esp: especificidad; T: temperatura.

Se han realizado trabajos relacionados a la modificación de moléculas mediante reacciones de hidrólisis y síntesis. Esquivel-Bautista (2011) reportó la producción de un antioxidante de carácter hidrofóbico, el 7-0-lauroilo de ácido kójico, mediante esterificación regioselectiva en tolueno utilizando la cutinasa AN7541 de *A. nidulans*. Por otro lado, Bermúdez (2010) logró la esterificación de dos flavonoides, rutina y naringina con ácidos grasos de cadena media (ácido octanoico) y la transesterificación de un tercer flavonoide, quercetina con vinil isopropilato, utilizando un extracto inmovilizado de corboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1. Peña-Montes (2009) realizó reacciones de desacetilación de fenoles, alcoholes alifáticos y flavonoides, para recuperar la actividad antioxidante utilizando dos esterasas, *NstcI* y *StcI* de *A. nidulans*. Esqueda (2012) no logró la transesterificación de cianidina-3-glucosido con acetato de vinilo, pero logró la transesterificación de cumarato de metilo en cumarato de butilo.



4. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años el interés por los alimentos funcionales ha ido en aumento ya que además de su aporte nutrimental proporcionan compuestos bioactivos benéficos a la salud del consumidor. Dentro de dichos compuestos se encuentran los antioxidantes naturales, los cuales, por su naturaleza hidrofílica, no se pueden aplicar en alimentos hidrofóbicos. Una alternativa es aumentar su hidrofobicidad mediante reacciones de transesterificación. Un ejemplo son los antioxidantes naturales, los cuales aumentan su hidrofobicidad al ser lipofilizados, lo que amplía su intervalo de aplicación en alimentos. A pesar de que existe la transesterificación química, la transesterificación por vía enzimática ofrece mayores ventajas como: mayor selectividad del sustrato, menor número de intermediarios de reacción, sustentabilidad y condiciones de trabajo compatibles con procesos industriales. A su vez la inmovilización de las enzimas permite la reutilización de las mismas, aumentan su estabilidad y mejora las condiciones de reacción.

Por lo tanto, en este trabajo se exploró el uso de dos cutinasas recombinantes inmovilizadas, ANCUT1 y ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*, para llevar a cabo reacciones de transesterificación.

5. HIPÓTESIS

Las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 recombinantes al ser inmovilizadas presentarán mayor estabilidad.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo general

Inmovilizar y caracterizar las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 para efectuar reacciones de transesterificación:

6.2. Objetivos particulares

- Determinar las mejores condiciones de inmovilización las enzimas ANCUT1 (Accurel MP 1000) y ANCUT2 (Celite 545).
- Realizar la caracterización bioquímica de las enzimas inmovilizadas
- Evaluar la estabilidad de las enzimas inmovilizadas en diferentes medios de reacción para síntesis.
- Extraer el aceite de la semilla de tiliapo.
- Obtener enzimáticamente ésteres de metilo y butilo a partir del aceite extraído de la semilla de tiliapo.
- Extraer, cuantificar y determinar la capacidad antioxidante en las antocianinas de la jamaica (*Hibiscus Sabdariffa L.*) y del maíz morado (*Zea mays L.*).
- Obtener antocianinas lipofilizadas utilizando los ésteres de metilo o butilo generados como donadores del grupo acilo.



7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

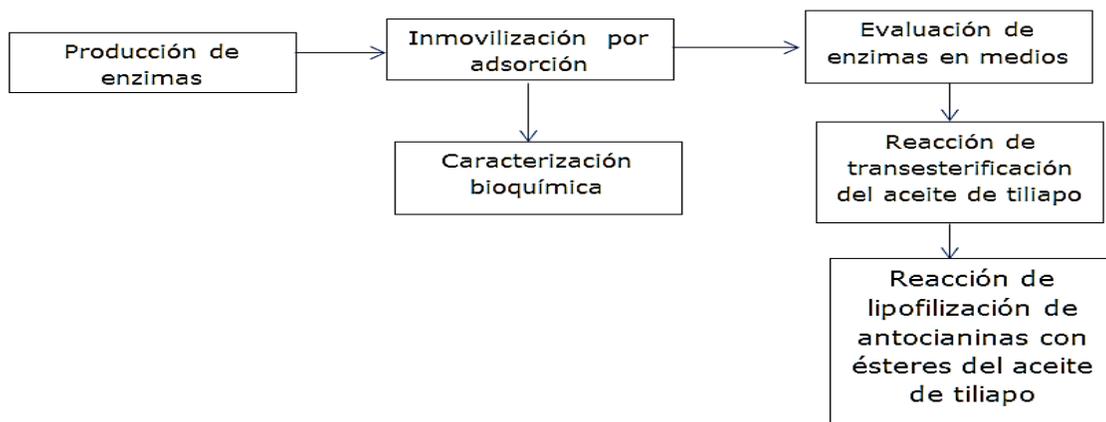


Figura 10 .Diagrama general

El desarrollo experimental se dividió en tres partes:

1. Producción, inmovilización y caracterización de las enzimas
2. Evaluación de las enzimas en condiciones de reacción y reacciones de transesterificación del aceite de tiliapo
3. Reacciones de lipofilización de antocianinas

7.1. Primera parte: Obtención, inmovilización y caracterización de las enzimas



Figura 11. Diagrama del desarrollo experimental primera parte.

En el Apéndice se describe la preparación de los medios cultivos y las curvas de calibración para la determinación de proteína y actividad enzimática.

7.1.1. Crecimiento de clonas *P. pastoris*

Se realizó la metodología de acuerdo con lo descrito en el manual de Easysselect Pichia expression kit (2010), el cual consistió en conservar las clonas de *P. pastoris* en medio YPD-Glicerol a -70 °C. Para posteriormente hacerlas crecer en dos medios de cultivo BMGY y BMMY.

7.1.2. Determinación de actividad cualitativa con acetato de α -Naftilo

Se empleó la metodología de Mastropaolo y Yoccino (1981). Se colocó en una microplaca un volumen de 50 μ L de extracto enzimático (o amortiguador en caso del blanco) y 50 μ L del stock de acetato de α -Naftilo. Se homogenizó e incubó a temperatura ambiente por 15 min, después se añadió 50 μ L del stock Fast Red.

- Stock de acetato de α -Naftilo: Se pesaron 2 mg del reactivo y se disolvieron en 0.5 mL de acetona, posteriormente se llevó a un volumen de 2 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7.
- Stock Fast Red: Se pesaron 5 mg del reactivo y se añadió 0.5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7 con 50 μ L de Tritón 100-X y se llevó a 2 mL.

7.1.3. Determinación de proteína por el método de Bradford

De acuerdo con Bradford (1976), se colocaron 160 μ L de extracto enzimático (o amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7) en una microplaca y 40 μ L del reactivo de Bradford, se homogenizó e incubó por 5 min a temperatura ambiente. Después se determinó la absorbancia a 585 nm en el espectrofotómetro Epoch.

7.1.4. Determinación de la actividad esterasa con acetato de p-Nitrofenil

Se realizó la determinación de acuerdo con la metodología modificada por Morales (2015) (Ejima, 2004; Nawani, 1988; Bornscheuer, 2002). Se colocaron 10 μ L de extracto enzimático (o amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7 en el caso del blanco) en una microplaca con 170 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM a pH 7. Antes de medir se colocó 20 μ L sustrato esterato de p-Nitrofenil 1 mM y se monitoreó la cinética cada minuto a 420 nm durante 10 min en el espectrofotómetro Epoch.

7.1.5. Elaboración de geles SDS-PAGE

Se realizaron geles de electroforesis desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con Laemmli (1970). Los geles se hicieron tipo discontinuo utilizando un gel concentrador al 4% y un gel separador al 14% de poliacrilamida. Se usó un marcador de peso molecular Low Range BioRad, en una cámara de electroforesis MiniProtean II y se revelaron con azul de Coomassie.

7.1.6. Determinación de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida por medio de zimograma

Se llevó a cabo una renaturalización de los geles SDS-PAGE (Karpushova et al., 2005), colocando el gel en dos disoluciones renaturalizantes; un lavado de 30 min con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y Tritón X-100 al 5% incubando con agitación, posteriormente se colocó en el segundo lavado toda la noche en una disolución de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y Tritón al 0.5%. La actividad *in situ* se realizó al cambiar la disolución con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 y se adiciono una disolución del stock de acetato de α -Naftil por 15 min y usando Fast Red como revelador por 4 min, deteniendo la reacción con agua desionizada.

7.1.7. Ultrafiltración del extracto enzimático

Se ultrafiltró en Amicon con membranas YM con un límite de exclusión de 10 kDa a temperatura ambiente y se concentró diez veces cada extracto.

7.1.8. Inmovilización

La inmovilización de las enzimas se llevó a cabo por el método de adsorción (Castro, 2014), usando Accurel MP 1000 para ANCUT1 y Celite 545 para ANCUT2, esto debido a que Castro en 2014, probó diferentes soportes como: Accurel MP 1000, Celite 545, Nylon y Quitosano en ambas enzimas nativas ANCUT1 Y 2, observándose que al usar Accurel MP 1000 para la enzima ANCUT1 y Celite 545 para la enzima ANCUT2, las enzimas presentaron una mayor estabilidad.

7.1.8.1. Pretratamiento de Accurel MP 1000

Se tamizó con malla del No. 30 μm , colocando el soporte en tres disoluciones: etanol absoluto, etanol al 50% y agua desionizada, cada etapa durante 30 min. El soporte se filtró a vacío y se secó en estufa estática por 24 h a 37 °C, con el fin de aumentar su porosidad.

7.1.8.2. Pretratamiento de Celite 545

El soporte se colocó en dos disoluciones: acetona y amortiguador Tris-HCl pH 9 durante 30 min cada una, se dejó sedimentar y se realizó una filtración a vacío, para aumentar su porosidad.

7.1.8.3. Proceso de adsorción

Se pesó 1 g de soporte pretratado y se colocó en un tubo Falcon o en un matraz Erlenmeyer. A cada soporte se le adicionó 20 mL del extracto enzimático concentrado a 1 g de soporte. La agitación se llevó a cabo en una incubadora orbital a 250 rpm y a 4 °C. El monitoreo del proceso de adsorción se determinó midiendo la cantidad de proteína y la actividad

remanente en el sobrenadante. Al finalizar el tiempo de inmovilización se filtró a vacío y se realizó un lavado con 5 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 9, después se dejó en un desecador por 24-48 h a 4 °C y se refrigeró en un desecador a 4 °C con una disolución de cloruro de magnesio (para obtener un aw de 0.33) hasta su uso.

7.1.8.4. Caracterización de la proteína no adherida

El sobrenadante del inmovilizado se colectó y se cuantificó proteína (punto 7.1.3) y actividad esterasa (punto 7.1.4.).

7.1.9. Caracterización de las enzimas inmovilizadas

La caracterización bioquímica se realizó de acuerdo a las metodologías empleadas por Castro (2014), sin embargo, a diferencia del trabajo presentado por Castro (2014), se buscaron las condiciones óptimas de inmovilización (tiempo de inmovilización y cantidad de proteína por soporte), además de trabajar con extractos enzimáticos concentrados.

7.1.9.1. Determinación de la actividad enzimática de las enzimas inmovilizadas

Se pesaron 5 mg de la enzima inmovilizada en un Eppendorf. A cada soporte se le adicionó un volumen de 900 µL de amortiguador Tris-HCl 50 mM a pH 9 y 100 µL de sustrato de acetato de *p*-Nitrofenil 1 mM. Se llevó a cabo la reacción con agitación a 29 °C en un Termomixer, dando el seguimiento cada 3 min durante un tiempo de 15 min. Se midió en el espectrofotómetro Epoch a una absorbancia de 420 nm.

7.1.9.2. Determinación de pH óptimo de enzimas inmovilizadas

Se prepararon los siguientes amortiguadores: para pH 5 acetatos 50 mM, 6-7 fosfatos 50 mM, 8 y 9 Tris-HCl 50 mM y 10 y 11 CAPS 50 mM.

Se pesaron 5 mg de Accurel MP 1000 y Celite, a cada soporte se le adicionó 900 μ L de su respectivo amortiguador y se continuó con la metodología del punto 7.1.9.1.

7.1.9.3. Estabilidad de pH de enzimas inmovilizadas

Se pesaron 5 mg de Accurel MP 1000 y Celite y a cada soporte se le adicionó 200 μ L de su respectivo amortiguador (pH de 5-11), se incubó a 4 °C durante 1 h y 3 h. Pasado este tiempo se retiró el amortiguador y se cambió por amortiguador, con el que se observó el pH óptimo y se continuó con la metodología del punto 7.1.9.1.

7.1.9.4. Temperatura óptima de enzimas inmovilizadas

Se probaron temperaturas en el intervalo de 30 °C a 80 °C, utilizando el amortiguador óptimo de reacción. Se pesaron 5 mg de las enzimas inmovilizadas y a cada soporte se le determino la actividad enzimática como en los ensayos anteriores (7.1.9.1), sólo que a diferentes temperaturas.

7.1.9.5. Estabilidad térmica de enzimas inmovilizadas

Se probaron temperaturas en un intervalo de 30 a 80 °C. Se pesaron 5 mg de enzima inmovilizada, a cada soporte se le adiciono 200 μ L del amortiguador óptimo, y se incubo a dichas temperaturas durante 15, 30 y 60 min pasado este tiempo se dejó a temperatura ambiente por 15 min y se determinó la actividad como en los ensayos anteriores (7.1.9.1) con el amortiguador a pH óptimo.

7.1.9.6. Especificidad de sustrato

Se pesaron 5 mg de enzima inmovilizada para determinar la especificidad del sustrato con diferentes ésteres de p-nitrofenilo, utilizando el amortiguador óptimo de reacción 900 μ L y 100 μ L del sustrato (ésteres

de p-nitrofenilo) realizando el ensayo como se detalló anteriormente (7.1.9.1).

7.1.9.7. Estabilidad operacional

Se pesaron 5 mg de la enzima inmovilizada y se realizó la reacción de hidrólisis descrita anteriormente, se retiró el medio de reacción y se lavó con amortiguador de trabajo hasta la pérdida de la coloración característica del p-nitrofenol, y nuevamente se llevó a cabo la reacción de hidrólisis; se continuó con este procedimiento hasta que el catalizador perdiera su capacidad catalítica.

7.1.9.8. Estabilidad al almacenamiento

Se almacenaron los biocatalizadores a dos temperaturas distintas, a 4 °C y a temperatura ambiente, y cada cierto tiempo se evaluaba la actividad enzimática como se realizó en los diferentes ensayos.

7.2. Segunda parte: Evaluación de las enzimas en condiciones de reacción y reacciones de transesterificación del aceite de tiliapo

La semilla de tiliapo y el equipo para la extracción del aceite, fueron proporcionados por el Doctor Arturo Navarro Ocaña de la Facultad de Química de la UNAM.

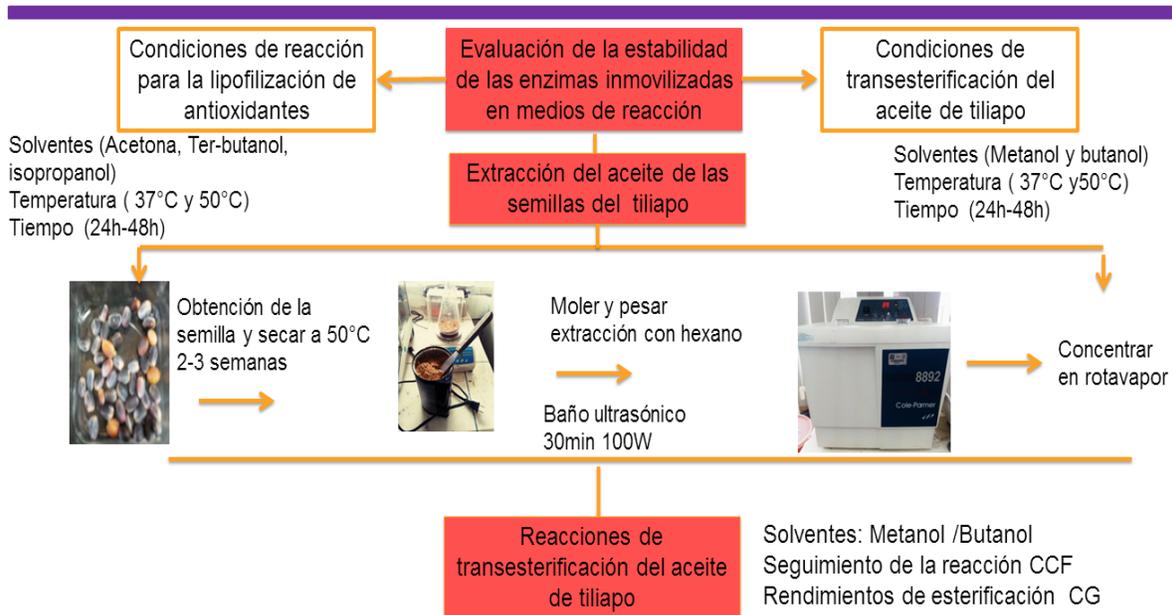


Figura 12 Diagrama del desarrollo experimental segunda parte

7.2.1. Evaluación de la estabilidad de las enzimas inmovilizadas

Se variaron el tiempo (24-48 h), la temperatura (37 y 50 °C) y disolventes (acetona, ter-butanol, isopropanol, metanol y butanol). Se pesó 5 mg del biocatalizador y se colocaron 200 µL del disolvente, se incubaron en una estufa estática de acuerdo a las temperaturas de cada tratamiento. Una vez terminado el tratamiento se retiró el disolvente y se determinó la actividad enzimática como en los ensayos anteriores.

7.2.2. Extracción de ácidos grasos de la semilla de Tiliapo

Para la extracción de ácidos grasos de la semilla de tiliapo (Frey, 2016), se secaron las semillas de tiliapo a 40 °C por 3 semanas, después se molieron y se realizó una extracción en n-Hexano 1:10 (p/v) y se sónico por 30 min, se dejó macerar toda la noche en una incubadora con agitación orbital a 160 rpm. Después se filtró y se concentró en rotavapor y finalmente se almacenó el extracto etéreo a -20 °C hasta su uso.

7.2.3. Reacciones de transesterificación de los ácidos grasos

Para realizar las reacciones de transesterificación los solventes (metanol y butanol) que serán los medios de reacción, fueron secados con malla molecular para mantener la a_w de 0.33, del mismo modo los biocatalizadores fueron colocados en un desecador durante una semana con una solución de cloruro de magnesio saturada para mantener la a_w de 0.33 (Bermúdez, 2010). Las condiciones de reacción que fueron probadas son las siguientes (tabla 11):

Tabla 11. Condiciones de reacción probadas

Relación molar Alcohol :aceite	(%) Enzima	T (°C)	Tiempo (h)
3:1	10	37	24 -120
3:1	15	37	
3:1	20	37	

7.2.3.1. Seguimiento de reacción de transesterificación del aceite de tiliapo por cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó un seguimiento de las reacciones cada 24 h en las diferentes condiciones probadas (tabla 11), colocándose entre 2-3 aplicaciones con capilares en una cromatoplaqueta de sílice, utilizado como fase móvil; hexano/ acetato de etilo /ácido acético (90:10:1) y como revelador sulfato cérico.

7.2.3.2. Análisis de productos de reacción de la reacción de transesterificación en CG.

Se realizó una doble transesterificación, debido que los productos de reacción de la transesterificación fueron ésteres de butilo, y sólo se tenían estándares de ácidos grasos metilados.

Para la doble transesterificación se realizaron dos transesterificaciones a los esteres de butilo, una ácida y una alcalina, como se menciona a continuación.

7.2.3.2.1. Transesterificación alcalina

Se realizó una transesterificación alcalina para metilar los ácidos grasos que fueron esterificados. Se pesó ~25 mg de la mezcla de reacción que fue secada con nitrógeno y se colocaron 2.5 mL de metóxido de sodio 0.5 M, se calentó por 10 min a 80 °C, terminado el tiempo se colocó en un baño de hielo durante 1 min. Posteriormente se colocó 500 µl de estándar C: 13 a 0.0625 µg / µL y 1.5 mL de hexano grado HPLC, se agito en vórtex por 30 segundos, después se colocó 5 mL de carbonato de sodio y se centrifugó por 10 min a 3500 rpm, se tomó la fase orgánica para inyectar en el cromatógrafo de gases inyectando 0.2 µl.

7.2.3.2.2. Transesterificación ácida

Se realizó una transesterificación ácida para metilar todos los ácidos grasos tanto esterificados como no esterificados. Se pesó ~25 mg de la mezcla de reacción que fue secada con nitrógeno y se colocaron 1.5 mL de una disolución metanólica de 0.05 M de H₂SO₄ y se calentó a 60 °C por 30 min, se dejó enfriar en un baño de hielo, después se colocó 500 µL del estándar C:13 a 0.0625 µg / µL y 1.5 mL de hexano y se agitó en vórtex por 30 segundos. Posteriormente se colocó 2.5 mL de carbonato de sodio y se centrifugó por 10 min a 3500 rpm, se tomó la fase orgánica para inyectar en el cromatógrafo de gases inyectando 0.2 µl.

7.2.3.2.3. Condiciones de análisis en el cromatógrafo de gases

El análisis se realizó en un cromatógrafo HEWLETT PACKARD GC System HP 6890 plus 6C, de acuerdo a las siguientes condiciones:

Tabla 12. Condiciones del análisis CG

Detector FID (Ionización de llama)				
Temperatura °C	240			
H₂ flujo mL / min	25			
Aire flujo mL / min	250			
Makeup flow (flujo el gas auxiliar)	N ₂	Const. Col +Makeup mL/min 30		
Especificaciones de columna	Agilent 19091N-136 260 °C máx HP-INNOWAX Polyethylene Glycol Capillary 60.0 m x 250 µm x 0.25 µm nominal			
Split	Gas N ₂			
Temperatura (°C)	200			
Presión (psi)	28.33			
Flujo total (mL / min)	19			
Split Ratio : 10:1	Split Flow: 15 mL/min			
GasServe: 20 mL / min				
Oven Ramp	°C / min	Siguiente °C	Hold min	Run time
Inicial		85	0	0
Rampa 1	15	200	8	15.67
Rampa 2	2	220	4.33	30
Rampa 3	0			
Post Run		0	0	30

El análisis de los ácidos grasos butilados fue realizado en el Instituto Tecnológico de Veracruz en la Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos, en el laboratorio de poscosecha.

7.3. Tercera parte: reacciones de lipofilización

El extracto de maíz morado, el equipo, el material para la extracción y semi-purificación de las antocianinas y su análisis en cromatografía líquida de alta resolución (CLAR / HPLC) fueron proporcionados por el Doctor Arturo Navarro Ocaña, de la Facultad de Química de la UNAM.

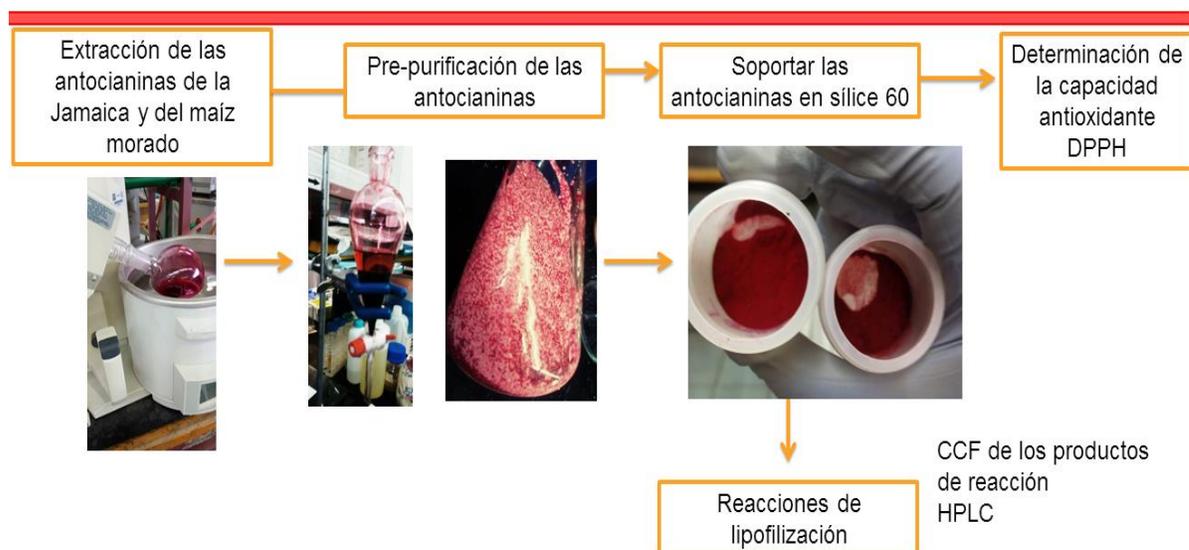


Figura 13. Diagrama del desarrollo experimental tercera parte.

7.3.1. Extracción y adsorción en sílice 60 de las antocianinas de jamaica y del maíz morado

La flor de jamaica fue secada en estufa a 45 °C por 72 h, se pesó 10 g de jamaica seca y molida con 100 mL de Metanol: Agua: HCl (80: 20: 0.1) y se utilizó un baño ultrasónico a 100 W durante 20 min y posteriormente se filtró a vacío y se concentró en un rotavapor a 35 °C, una vez obtenido el extracto, se disolvió en 100 mL de agua. En el caso del maíz morado se partió de 5 g de extracto proporcionado por el Doctor Arturo Navarro Ocaña que fueron disueltos en 100 mL de agua desionizada.

A cada extracto se le realizaron particiones extracto líquido - líquido con hexano (2 lavados) y después con acetato de etilo (3 lavados). Posteriormente las antocianinas se adsorbieron en amberlita XAD-7HP y se realizó un lavado con 500 mL agua finalmente se desadsorbieron con metanol acidificado al 0.1 % HCl y se concentró el extracto en rotavapor hasta sequedad a 35 °C.

Para la adsorción en sílice 60 el extracto a sequedad se le colocó sílice a una relación 2:1 de extracto: sílice 60 y se colocó 10 mL de agua para mezclarlos y concentrar en rotavapor hasta sequedad a 35 °C.

7.3.2. Determinación de antocianinas totales por pH diferencial de las antocianinas soportadas en sílice 60

- Amortiguadores utilizados: amortiguador pH 1 de cloruro de potasio 0.025 M y amortiguador pH 4.5 de acetato de sodio 0.4 M.

La determinación de antocianinas se determinó por el método de pH diferencial (Fernández, 2014), se pesaron 5 mg de sílice 60 con antocianinas adsorbidas y se disolvieron en 1 mL de metanol y se tomaron 200 μ L y se mezclaron con 1800 μ L tanto del amortiguador de pH 1 y pH 4.5. A ambos pH se les midió la absorbancia a 510 y 700 nm para obtener cuatro lecturas. El contenido de antocianinas totales se expresa en mg Cianidina-3-glucósido /L mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianinas totales} = \frac{\Delta A * PM * FD * 1000}{\epsilon * L}$$

Dónde:

$$\Delta A = (abs_{510} - abs_{700})_{pH1} - (abs_{510} - abs_{700})_{pH4.5}$$

PM: 449.2 g/mol cianidina-3-glucósido

FD: factor de dilución 10

L: 1

ϵ = absortividad molar de la cianidina 3-glucósido 26900 L/ cm mg

7.3.3. Cromatografía en capa fina de las antocianinas soportadas

De acuerdo con Fernández (2014), se realizó una cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de sílice gel y como fase móvil butanol, ácido acético y agua (6:1:3).

7.3.4. Actividad antioxidante por inhibición del radical 2,2-dinifenil-1-picrilhidrazilo (DPPH)

- Stock DPPH: Se preparó una solución metanólica de DPPH a 150 μM .
- Preparación de la muestra: Se pesó la cantidad necesaria de antocianinas soportadas en sílice 60 para obtener las siguientes concentraciones: 0.006, 0.012, 0.014, 0.036, 0.083 mg de antocianinas / mL que fueron solubilizadas en metanol.

La determinación (Ordoñez, 2017) consistió en colocar 2 mL de la solución metanoica de DPPH a 200 μL de muestra. El decremento de la absorbancia a 517 nm se registró a los 30 segundos, 1, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 minutos.

La actividad antioxidante se expresa como porcentaje de inhibición de DPPH, dicho porcentaje se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{A - A_1}{A} \times 100$$

Dónde:

A= Absorbancia del blanco (2 mL de DPPH 150 μM y 200 μL de metanol)

A₁= Absorbancia de la muestra

7.3.5. Reacciones de lipofilización de antocianinas

Se probaron las siguientes condiciones de reacción (tabla 13), los solvetes (isopropanol, terbutanol y acetona) fueron secados con malla molecular para mantener la aw de 0.33. A los productos de reacción se les realizó una cromatografía en capa fina de acuerdo a la metodología

Tabla 13. Condiciones de reacciones de lipofilización de antocianinas

Antocianinas: ésteres de butilo	% Enzima	T (°C)	Solvente	Tiempo (h)
---------------------------------	----------	--------	----------	------------

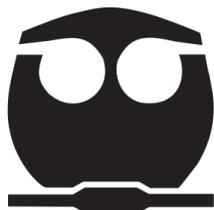
1:5	20	37	Isopropanol	24 -120
1:5	20	37	Terbutanol	
1:5	20	37	Acetona	

7.3.5.1. CLAR de los productos de reacción

Los productos de reacción fueron analizados por CLAR las condiciones se resumen en la tabla (14).

Tabla 14. Método de CLAR para antocianinas (Fernández, 2014)

Sistema	Sistema I		
Columna	ODS Hypersil Gold (250X4.5mm, 5µm)		
Fase móvil	A: H ₂ O/ Ácido acético (90:10) B: MeOH/ H ₂ O/ Ác. acético (50:40:10)		
Flujo (mL/min)	1.2		
Inyección	10µL		
Gradiente	Tiempo (min)	A	B
	0-5	90	10
	5-10	0	100
	10-15	90	10
	20	90	10



8. RESULTADOS

8.1. Obtención de cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2.

Las clonas de *P. pastoris* que codifican para las enzimas ANCUT1 y ANCUT2 fueron recuperadas del medio de conservación a -70°C YPD-glicerol y se cultivaron de acuerdo a lo descrito en la metodología. Las células se centrifugaron y los sobrenadantes fueron caracterizados en términos de cantidad de proteína y actividad enzimática cuantitativa y

cualitativa, tanto en el extracto crudo como en el concentrado por ultrafiltración en Amicon. Los resultados se presentan a continuación.

8.1.1. Resultados de la enzima ANCUT1 recombinante

La enzima recombinante ANCUT1 utilizada para la caracterización bioquímica fue obtenida de acuerdo a las metodologías por el grupo de trabajo (Solís, 2015), sin embargo para las reacciones de biocatálisis el M.C. Augusto Castro (Castro, 2017) donó enzima que fue producida en condiciones óptimas, la cual presentó una mayor actividad enzimática y mayor cantidad de proteína (tabla 15).

Tabla 15. Comparación entre el extracto enzimático de la enzima ANCUT1 en condiciones óptimas (Castro, 2017) y por Solís (2010) quien lo realizó de acuerdo a la metodología descrita.

Parámetros	Biorreactor (Castro 2017)	Matraz (Castro, 2017)	Matraz (Solís, 2015)
Cultivo (h)	36	60	24
Proteína	97	134	90
A. V. (U/mL)	590	959	68

8.1.1.1. Determinación actividad cualitativa de acetato de α -naftilo y Fast red

En la tabla 16 se ilustran las determinaciones de la actividad esterasa cualitativa de la enzima, observándose que la enzima ANCUT1 tanto en el sobrenadante como en el extracto concentrado tienen actividad esterasa, ya que hidrolizan el acetato de α -naftilo liberando acetato de α -naftol, el cual reacciona con Fast red, para formar un compuesto cromógeno de color rojo.

Tabla 16. Resultados de prueba cualitativa de la enzima ANCUT1

ANCUT 1	Sobrenadante	
	Concentrado	

B: blanco de buffer de fosfatos pH 7 50 mM. Carriles 1, 2 y 3 muestras de extracto enzimático de la enzima ANCUT1 recombinante crudo o concentrado (triplicado).

8.1.1.2. Determinación de proteína y actividad enzimática

La tabla 17 muestra los resultados de la determinación de proteína y actividad enzimática tanto del extracto producido en matraz como del producido en biorreactor, concentrado diez veces por ultrafiltración en Amicon con membranas YM de 10 kDa.

Tabla 17. Resultados de la determinación de proteína y actividad de la enzima ANCUT1.

ANCUT 1	Proteína (mg / mL)	(U / mL)	(U / mg)
Matraz	0.145 ± 0.030	366.78 ± 34.98	2311.33 ± 384
Biorreactor	0.304 ± 0.082	5164.48 ± 766	16971.67 ± 2520

8.1.1.3. Perfil electroforético de la enzima ANCUT1

En la figura 15 se visualiza el perfil electroforético en gel SDS-PAGE de los extractos concentrados de la enzima ANCUT1.

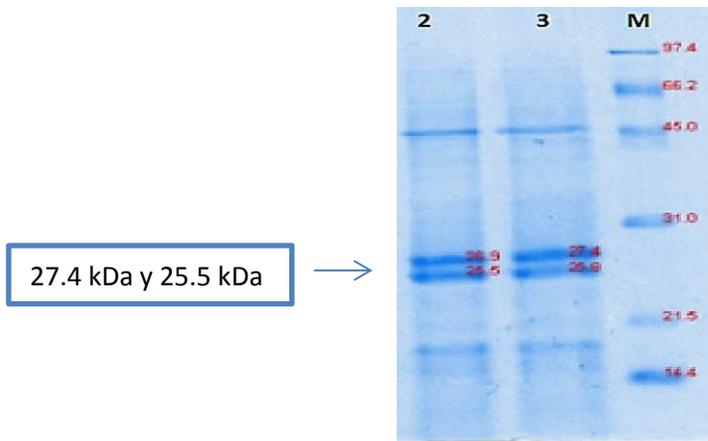


Figura 14. Perfil electroforético en gel SDS-PAGE de los extractos concentrados de la enzima ANCUT1. (2) Extracto producido por matraz y (3) extracto de biorreactor teñido con comassie. M: marcador de peso molecular (Low range, BioRad) se colocaron 10 µg de proteína.

En la figura 15 se pueden observar la presencia de dos bandas a 27.4 y 25.5 kDa características de la enzima recombinante ANCUT1 de acuerdo a lo reportado por Solís (2015) que concluyo que ambas bandas corresponden a la enzima ANCUT1 recombinante, estas dos bandas o dos formas de enzima, se pueden explicar por las modificaciones post traduccionales durante la expresión de la proteína, debido a la presencia del tallo de polihistidina y el epitope myc en el C-terminal fusionados con la cutinasa que tienen un efecto negativo en el proceso de síntesis, plegamiento y secreción; Kwon *et al.* (2009) quienes expresaron una cutinasa de *Fusarium solani* en *P. pastoris* usando como vector pPICZa también presentaron dos formas diferentes de enzima, también se creía que se debía a una posible glicosilación, pero Solís (2015) lo descartó al comprobar a través de diferentes lectinas la ausencia de modificaciones post-traduccionales por glicosilación. También se observa la presencia de proteínas nativas del organismo heterólogo y la degradación de la proteína.

8.1.1.4. Zimograma de actividad esterasa de ANCUT1

En la figura 16 se observa un zimograma de actividad esterasa, donde se puede observar la presencia de dos bandas 22.7 y 24.8 que corresponden a la enzima ANCUT1 y una banda por 14 kDa debido a la degradación de la proteína.

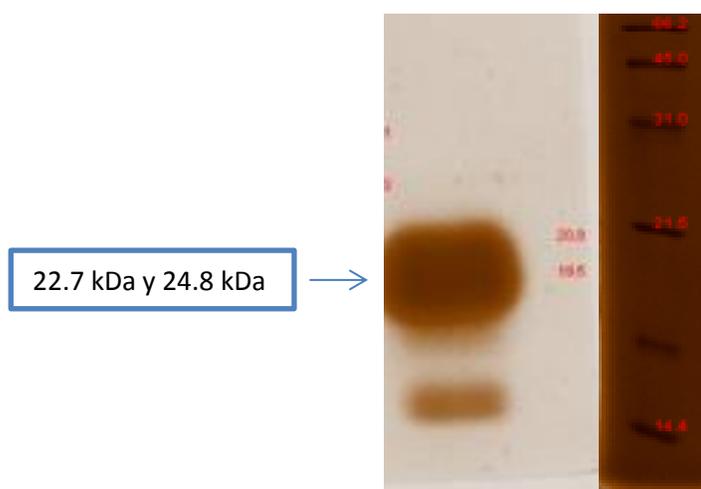


Figura 15. Zimograma para la determinación de actividad esterasa en gel SDS-PAGE usando como sustrato acetato de α -Naftilo y como revelador Fast red. Extracto concentrado de la enzima ANCUT1 con 10 μ g de proteína y marcador de peso molecular (Low range, BioRad).

8.1.2. Resultados de la enzima ANCUT2 recombinante

8.1.2.1. Determinación actividad cualitativa de acetato de α -naftilo y Fast red

En la tabla 18 se muestran las determinaciones de la actividad esterasa cualitativa observándose que la enzima ANCUT2 tanto el sobrenadante como el extracto concentrado tiene actividad esterasa.

Tabla 18. Resultados de prueba cualitativa de actividad esterasa.

ANCUT2	Sobrenadante	
	Concentrado	

B: Blanco amortiguador de fosfatos 50mM pH 7. Carriles 1, 2 y 3 muestras del sobrenadante del extracto crudo y concentrado (triplicado).

8.1.2.2. Determinación de proteína y actividad enzimática

La tabla 19 muestra los resultados de la determinación de proteína y actividad enzimática del extracto enzimático concentrado diez veces por ultrafiltración en Amicon con membranas YM de 10 kDa.

Tabla 19. Determinación de proteína y actividad de ANCUT2.

ANCUT2	Proteína (mg/mL)	(U/mL)	(U/mg)
Matraz	0.145 ± 0.0305	420.396 ± 70.5	2574.112 ± 746

8.1.2.3. Perfil electroforético de la enzima ANCUT2

En la figura 17 se observa una banda característica de la enzima ANCUT2 (37.2kDa) coincidiendo con los resultados obtenidos por Morales (2015).

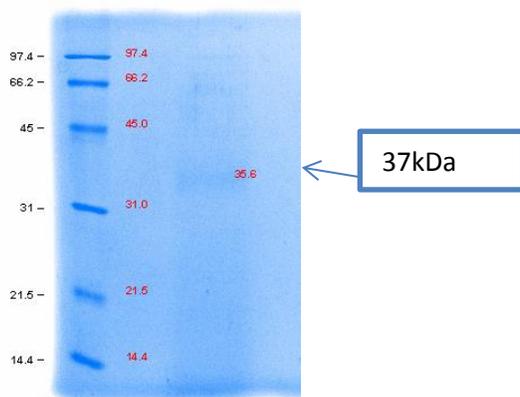


Figura 16 Perfil electroforético en gel SDS-PAGE del extracto concentrado de ANCUT2 teñido con comassie M: marcador de peso molecular (Low range, BioRad).

8.1.2.4. Zimograma de actividad esterasa de ANCUT2

En la figura 18 se observa que la enzima ANCUT2 también presenta dos bandas con actividad esterasa (37-36kDa) coincidiendo con los resultados

de Morales (2015). Donde también se reporta que es un efecto debido a los cambios postraduccionales de *P. pastoris*.

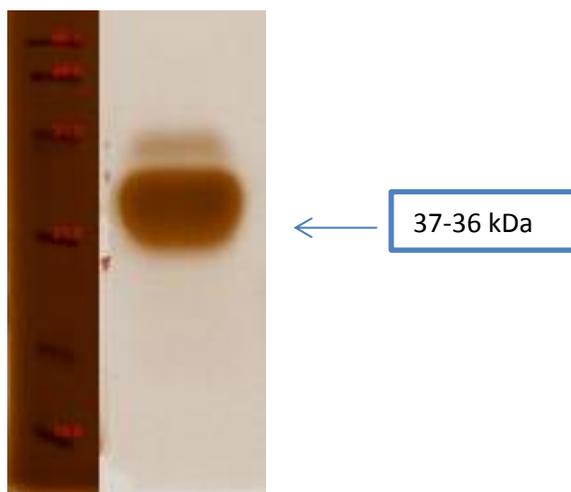


Figura 17. Zimograma para la determinación de actividad esterasa en gel SDS-PAGE usando como sustrato acetato de α -Naftilo y como revelador Fast red. Extracto centrado de ANCUT2 con marcador de peso molecular (Low range, BioRad) colocando 10 μ g de proteína.

8.2. Inmovilización

Se inmovilizaron ambas enzimas para realizar reacciones de transesterificación. Se escogió el soporte Accurel MP 100 para la enzima recombinante ANCUT1 y Celite 545 para la enzima ANCUT2 recombinante, debido a lo reportado por Castro (2014), quién determinó que estos soportes mejoran las propiedades de las enzimas en cuanto a estabilidad, almacenamiento y especificidad.

8.2.1. Condiciones de inmovilización

Con base a los resultados siguientes las condiciones de inmovilización se resumen en la tabla 20.

Tabla 20. Parámetros determinados para la inmovilización de enzimas recombinantes ANCUT1 (Accurel MP 1000) y ANCUT2 (Celite 545).

Condiciones	ANCUT1 (Accurel MP 1000)	ANCUT2 (Celite 545)
Parámetros	Valor obtenido	Valor obtenido
Proteína (mg)	8.43 mg	3.6 mg
Valor de pH	9	9
Temperatura (°C)	4	4
Fuerza iónica	50 mM	50 mM
Agitación (rpm)	250	250
Tiempo (h)	24	24

8.2.1.1. Tiempo de inmovilización

Se determinó el tiempo de inmovilización construyendo una curva de adsorción de las enzimas al soporte, a las condiciones de pH 9, temperatura a 4 °C y 250 rpm. Se hizo el seguimiento de la cinética de adsorción determinando el porcentaje de la actividad residual de lo no adsorbido al soporte y el porcentaje de proteína adsorbida al soporte. Los resultados se muestran en los siguientes gráficos (gráfico 1 y gráfico 2).

En el gráfico 1 se observa una tendencia de disminución respecto al porcentaje de actividad residual conforme al tiempo, apreciándose una pérdida del 75% a las 24 h, lo mismo ocurre con el porcentaje de proteína adsorbida donde se observa que a las 24 h hay un 47% de proteína adsorbida al soporte, por lo que se eligió un tiempo de inmovilización de 24 h.

Cinética de adsorción Ancut 1 (Accurel MP 100)

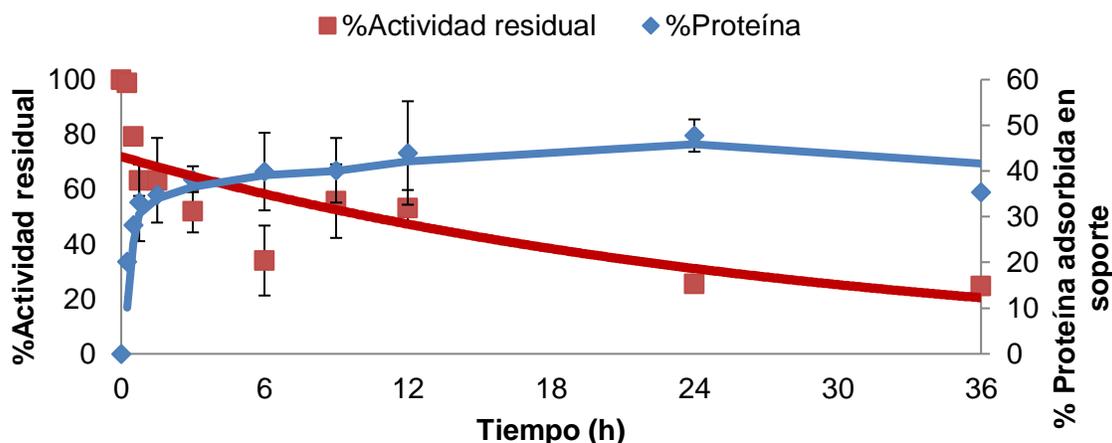


Gráfico 1. Cinética de adsorción ANCUT1 (Accurel MP 100).

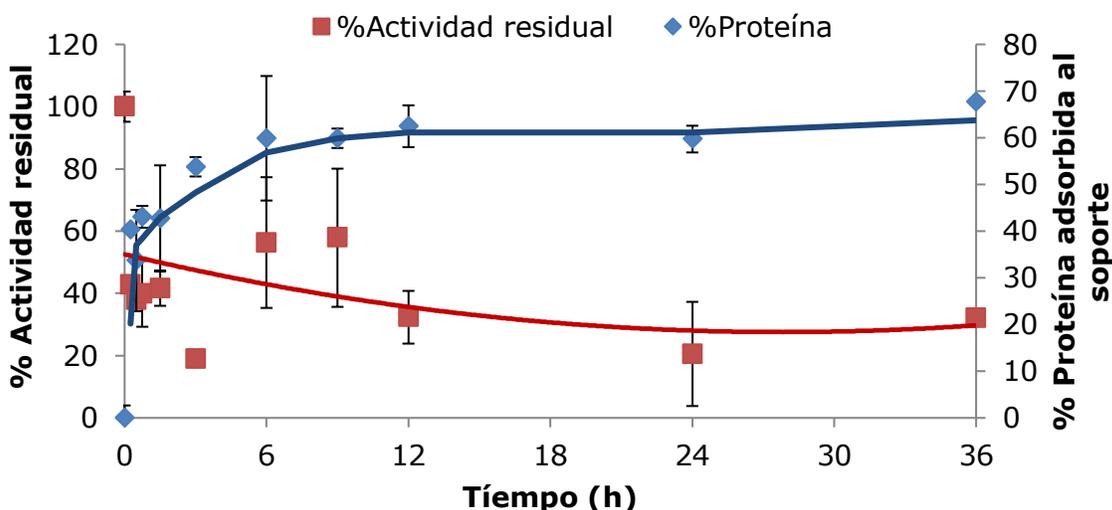


Gráfico 2. Cinética de adsorción de la enzima ANCUT2 (Celite 545).

En el gráfico 2 se observa un comportamiento similar al observado con la enzima ANCUT1, ya que el porcentaje de actividad residual disminuye conforme al tiempo y el porcentaje de proteína adsorbida aumenta, sin embargo el gráfico de acuerdo con el porcentaje de proteína adsorbida a las 36 h se adsorbió el 67% de proteína, pero en cuanto a la actividad residual a las 24 h hubo una disminución del 80% de la actividad residual, por lo que se eligió un tiempo de inmovilización de 24 h, ya que el tamaño

de partícula del soporte es mayor al tamaño de la enzima, y al estar en agitación durante 36 h hubo una desorción de la enzima de interés ocasionado que a las 36 h haya una menor caída de la actividad residual (70%).

8.2.1.2. Cantidad de proteína por soporte

Para determinar la cantidad de proteína se evaluaron distintas cantidades de proteína por gramo de soporte, evaluando el porcentaje de proteína adsorbida y la actividad enzimática de la enzima inmovilizada. La cantidad de proteína, dependió de la cantidad de proteína que se obtuvo en el extracto enzimático concentrado para cada enzima, para la enzima ANCUT1 se probó de 1 hasta 16 mg de proteína por g de soporte (gráfico 3), en el caso de la enzima ANCUT2 se probaron 1 a 3 mg de proteína por gramo de soporte (gráfico 4), esto debido a que la producción de la enzima ANCUT1 es mayor que la enzima ANCUT2. Las condiciones de inmovilización fueron bajo las condiciones de pH 9 (de acuerdo con Morales (2015) y Solís (2015) el pH óptimo de las enzimas es de 9), temperatura 4 °C, 250 rpm por 24 h.

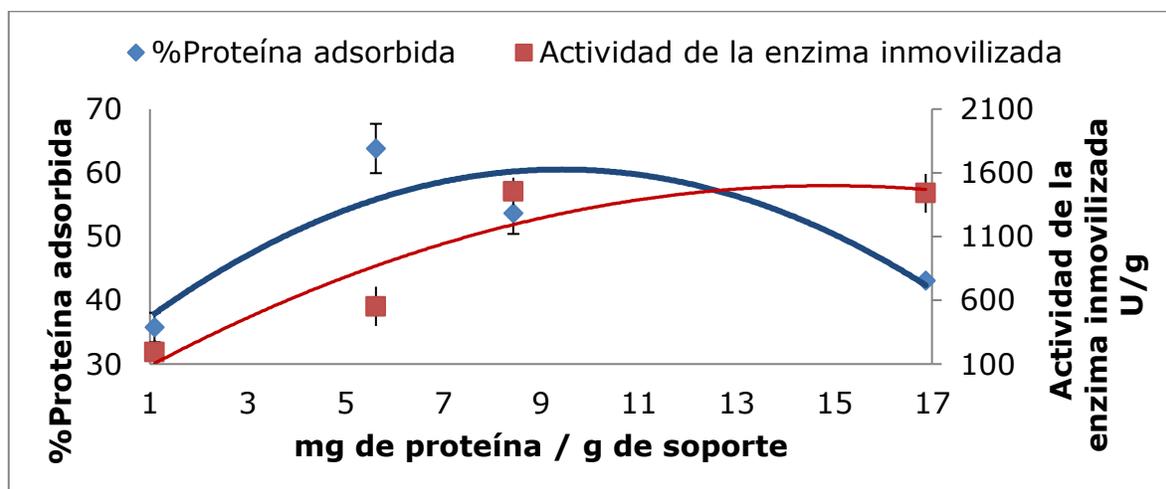


Gráfico 3. Cantidad de proteína para la enzima inmovilizada ANCUT1 en Accurel MP 1000.

El gráfico 3 indica que a cantidades mayores de 9 mg de proteína por gramo de soporte, existe una disminución del 10 % del porcentaje de proteína adsorbida, de la misma manera se observa que la actividad de la enzima inmovilizada disminuye 16 U de actividad por gramo de soporte. La desorción se debe al tiempo de agitación, debido a que el tamaño del poro del soporte es grande a comparación del tamaño de las proteínas, para evitar el consumo innecesario de proteína se prefiero trabajar a concentraciones de proteína de 8.4 mg de proteína por soporte.

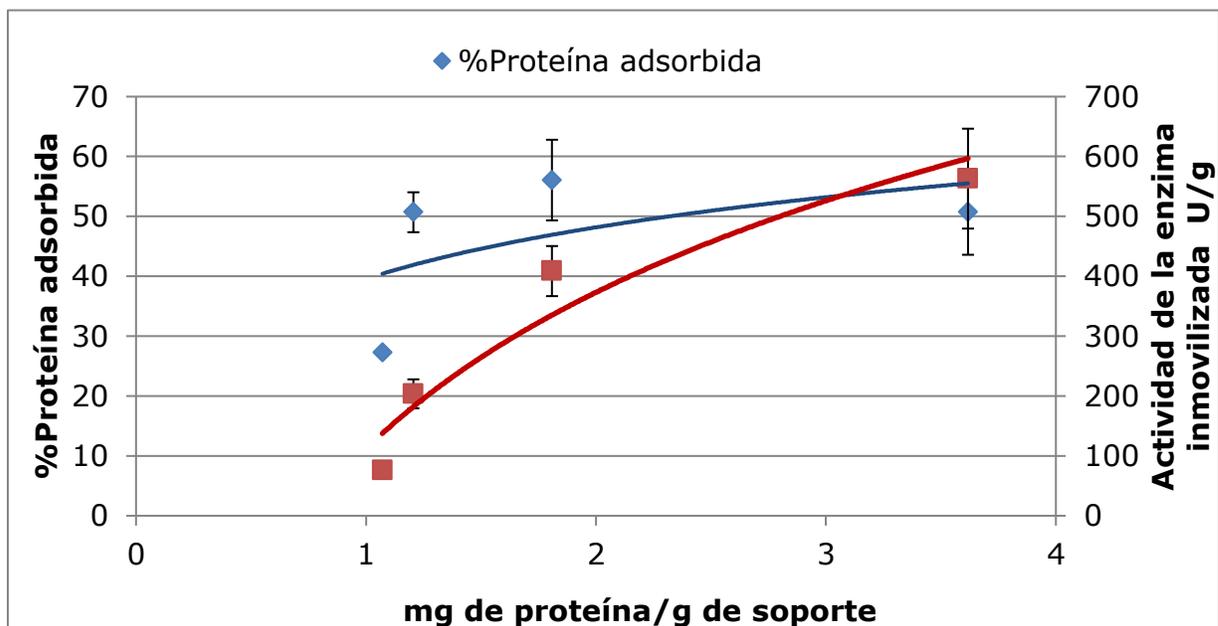


Gráfico 4. Cantidad de proteína para la enzima inmovilizada ANCUT2 en Celite 545.

En el caso de la enzima ANCUT2 no se observó una saturación del soporte, por lo que se escogió trabajar con 3.6 mg de proteína por soporte, debido a que a esa concentración de proteína hay un 50% de adsorción y la mayor actividad enzimática 563.045 U / g.

8.2.2. Eficiencia de la inmovilización

En la tabla 21 se muestran los resultados de eficiencia de las enzimas inmovilizadas.

Tabla 21. Eficiencia de la inmovilización de las enzimas.

Enzima	Soporte	E (%)
ANCUT 1 recombinante	Accurel MP 1000	86.49
ANCUT 2 Recombinante	Celite 545	58.42

E %; Fue calculada con la ecuación que a continuación se describe: $E (\%) = \frac{U_E - U_I}{U_E} \times 100$ 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.

En la tabla 21 se observa que las enzimas recombinantes obtuvieron un porcentaje de eficiencia mayor a 50%, lo que nos indica que la inmovilización por adsorción en soportes de naturaleza hidrofóbica son eficientes debido a la interacción de los residuos hidrofóbicos de las enzimas al soporte.

8.3. Caracterización de las enzimas inmovilizadas

Los resultados de la caracterización bioquímica se resumen en la tabla 22. Cabe mencionar que se escogieron diferentes soportes debido a lo reportado por Castro (2014), que observó que la inmovilización de las enzimas al usar Accurel MP 1000 para ANCUT1 nativa y Celite 545 para ANCUT2 nativa, estas presentaron una mayor estabilidad, la cual es una propiedad que se desea para las reacciones de lipofilización, ya que las enzimas estarán en contacto con diferentes disolventes y temperaturas de reacción.

Tabla 22. Caracterización bioquímica de las enzimas recombinantes inmovilizadas

Parámetros	ANCUT1 ACCUREL MP1000	ANCUT2 CELITE 545
pH óptimo	9	9
Estabilidad al pH	>50% AR pH 5-11, 1-3 h	>60% 5-7 pH, 1-3 h >30% 9-11, 1-3 h
Temperatura (°C)	30	40
Estabilidad térmica	100% AR a 30 °C ,15 -30 min <20% AR a 50 °C, 60 min	>80% AR 30 °C, 15- 60 min >40% AR a 60 °C, 15-60 min
Sustratos p-NF esteres	Corta, media y larga	Corta y media
Ciclos de reuso	7	6
Almacenamiento a 4°C	115 días 50% AR	60 días 50% AR

AR: Actividad residual

8.3.1. Efecto del pH y temperatura sobre la actividad enzimática

La evaluación de la actividad enzimática a diferentes valores de pH se realizó con valores de pH entre 5 y 11 usando como sustrato el acetato de p-nitrofenil usando datos de velocidad inicial, el gráfico 5 corresponde a la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 y el gráfico 6 a la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545.

El pH óptimo de las cutinasas se encuentra a pH neutro o alcalino y por lo general no son funcionales a pH ácido, al menos hacia el sustrato natural, la cutina (Nyssölä, 2015), y esto se debe a que a valores de pH bajos hay un exceso de cargas positivas en la superficie de la enzima lo que no permite la desprotonación de los aminoácidos que conforman la triada catalítica, y la desprotonación de la triada catalítica es necesaria para que las enzimas puedan llevar a cabo la catálisis, también se ha observado que a valores de pH por arriba de 10, existe un exceso de carga negativa, generando una desestabilización de la estructura de las cutinasas (Morales, 2015).

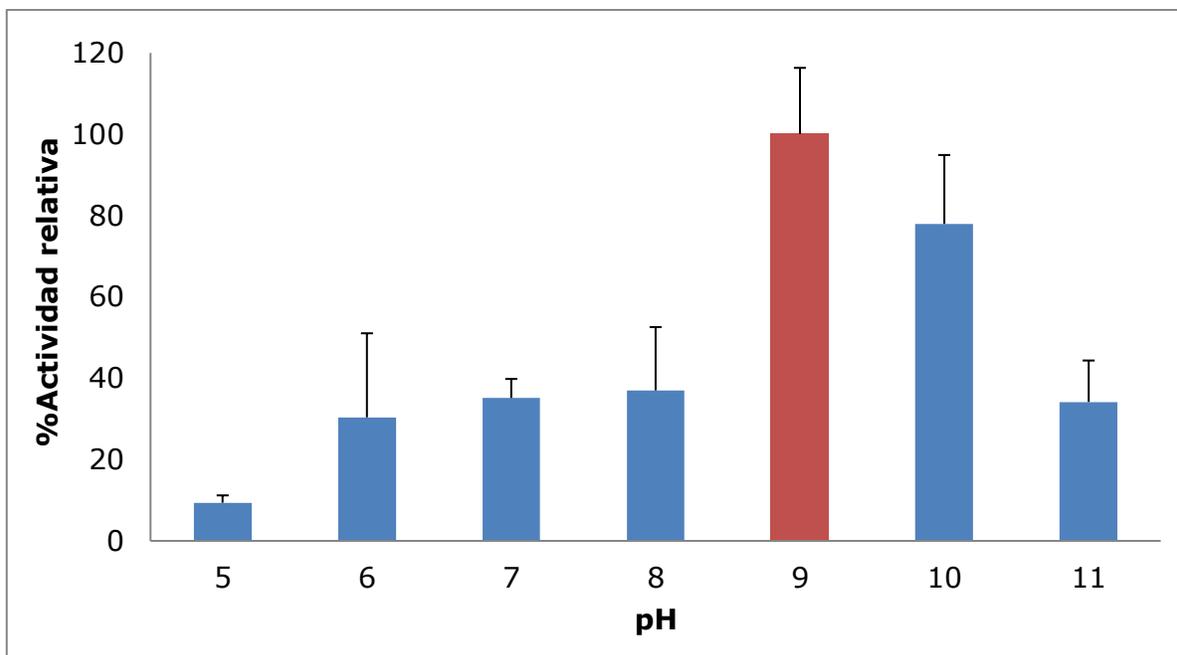


Gráfico 5. Efecto del pH en la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000)

El gráfico 5 muestra la actividad hidrolítica mayor a pH 9 coincidiendo con los resultados de la caracterización tanto de la enzima nativa ANCUT1 reportado por Vega (2013) y la enzima ANCUT1 recombinante libre reportado por Solís (2015) donde el pH óptimo de ambas es a pH 9, sin embargo la enzima ANCUT1 nativa inmovilizada en Accurel MP 100 reportado por Castro (2014) el pH óptimo cambió a pH 10, aunado a esto se puede concluir que la inmovilización de la enzima recombinante ANCUT1 no es afectada en cuanto al pH óptimo, pero si mejora la actividad en el intervalo de pH 5-6 comparada con la enzima recombinante libre, y esto puede deberse a que el extracto concentrado de la enzima antes de inmovilizar tiene un pH 9, quedado carga suficiente para presentar actividad en el intervalo de pH 5 a 6.

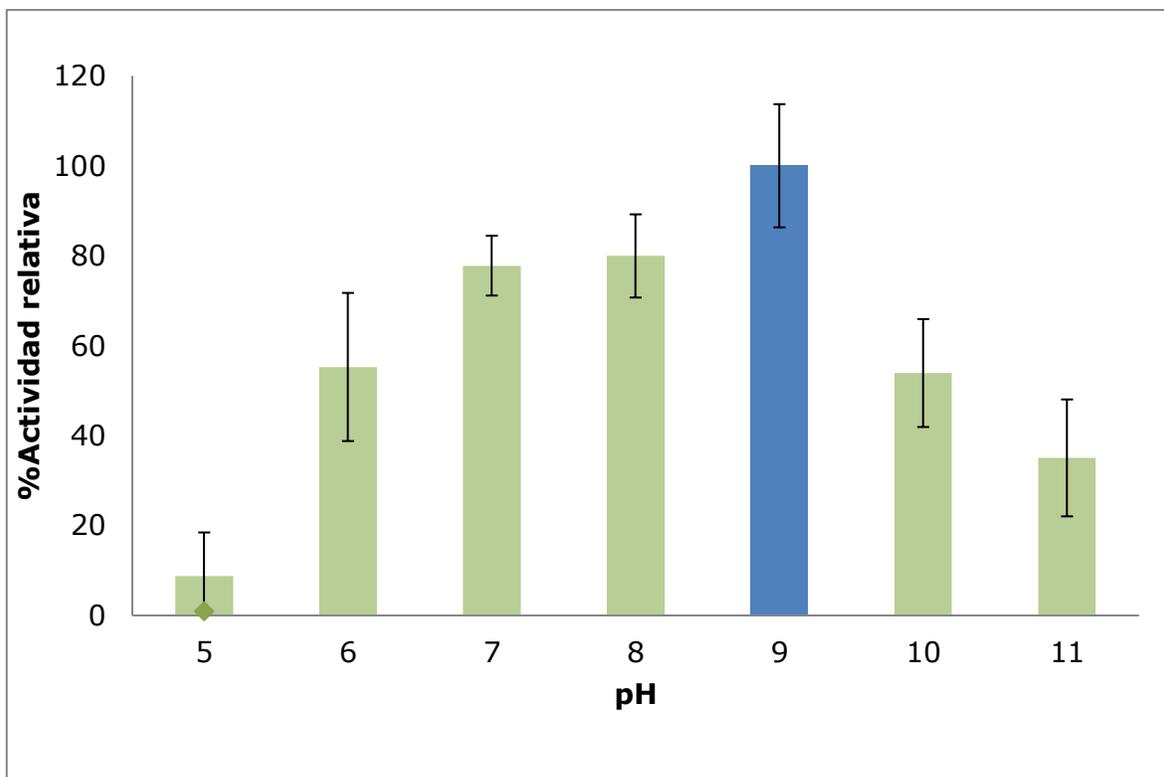


Gráfico 6. Efecto del pH en la enzima ANCUT2 (Celite 545)

En el gráfico 6 la enzima ANCUT2 recombinante inmovilizada en Celite 545 presentó una mayor actividad hidrolítica a pH 9, coincidiendo con los resultados reportados por Bermúdez (2013) en el caso de la enzima nativa libre, Morales (2015) con la enzima recombinante libre, y Castro (2014) con la enzima nativa inmovilizada en Celite 545 donde el pH óptimo de todas fue de 9, por tanto la inmovilización no afectó el comportamiento de la enzima respecto al pH.

En el caso del efecto de la temperatura se evaluó en un intervalo de 30 a 80 °C los resultados corresponden a los gráficos 7 y 8 respectivamente.

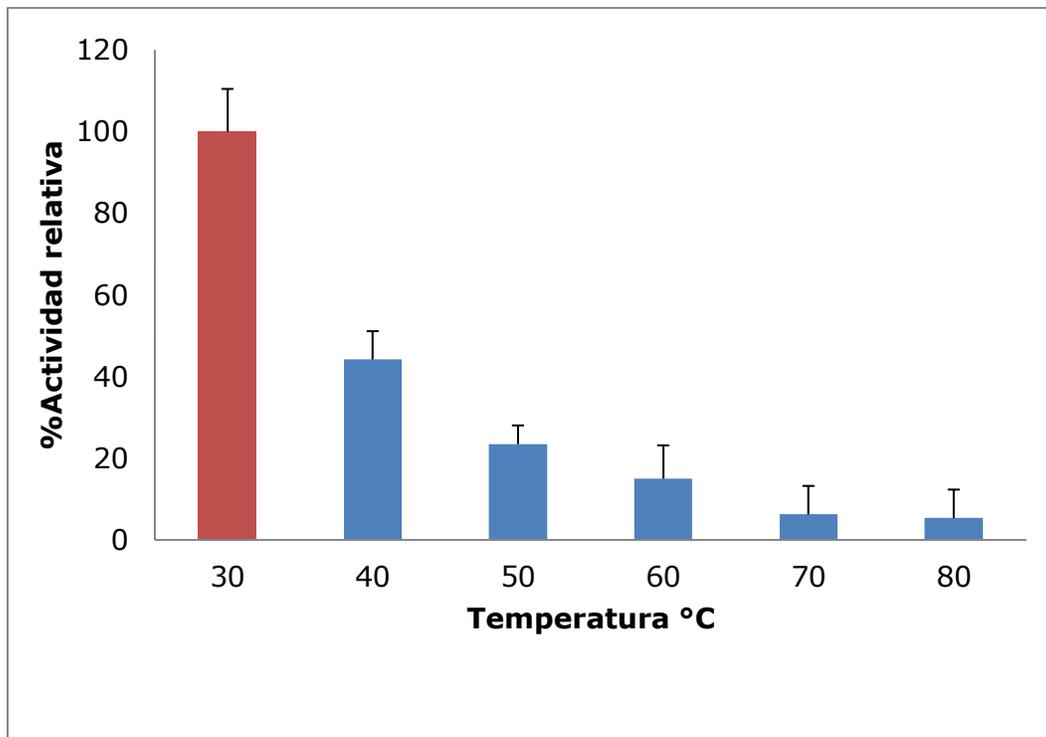


Gráfico 7. Efecto de la temperatura de ANCUT1 (Accurel MP 1000)

En el gráfico 7 se muestra que a 30 °C fue la temperatura con el mayor porcentaje de actividad, sin embargo este resultado es diferente al reportado por la enzima nativa ANCUT1 libre y la enzima nativa ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 (Vega,2013 ; Castro, 2014) la cual fue de 50°C, también es menor en comparación con la enzima recombinante ANCUT1 libre (Solís, 2015) siendo 50°C su temperatura óptima, lo que puede indicar que la absorción de la enzima recombinante al soporte fue afectada debido a la interacción de la enzima en el soporte, pudiendo desestabilizar su estructura.

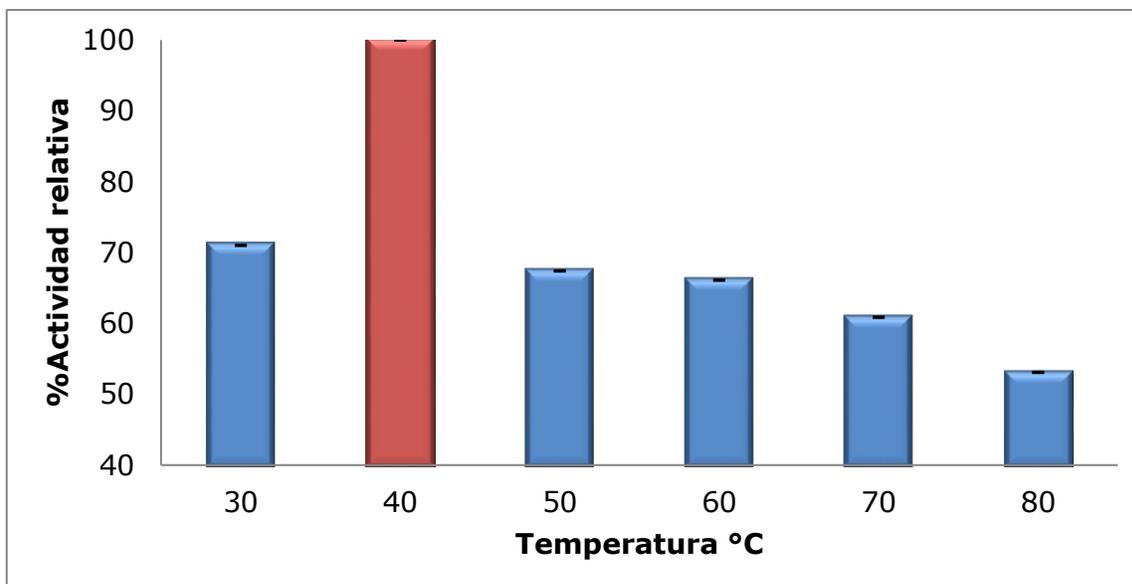


Gráfico 8. Efecto de la temperatura de la enzima ANCUT2 (Celite 545).

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima ANCUT2 de acuerdo al gráfico 8, a 40 °C presentó el mayor porcentaje de actividad concordando con la enzima recombinante ANCUT2 libre reportado por Morales (2015). Al comparar los resultados de la enzima nativa (Bermúdez, 2013) y la enzima nativa inmovilizada en Celite 545 (Castro, 2014) se observó que la inmovilización modificó la temperatura óptima, debido a que la enzima nativa inmovilizada presentó una temperatura óptima de 40 °C y la nativa libre 60°C. Lo que podría indicar que la enzima recombinante ANCUT2 no es afectada respecto a la temperatura por la inmovilización en Celite 545.

8.3.2. Determinación de la estabilidad térmica y pH

Se evaluó la estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas, incubando a valores de pH de 5 a 11 por 1 y 3 h. En el caso de la estabilidad térmica se incubaron a temperaturas desde 30 a 80 °C, a un valor de pH 9 durante 15, 30 y 60 minutos.

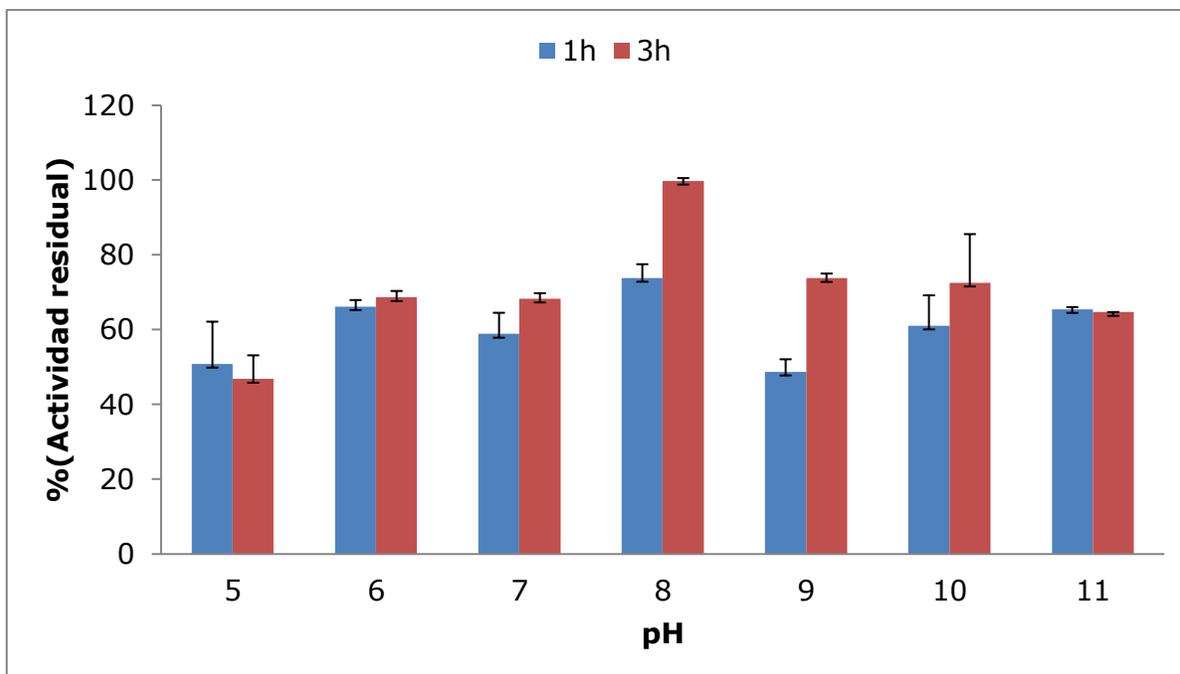


Gráfico 9. Estabilidad al pH enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).

En el gráfico 9, se aprecia que la enzima recombinante ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 es estable a pH 5 con un 50% de actividad residual a 1 y 3 h, y con un porcentaje mayor a 50% en un rango de pH de 6 a 11, obteniendo el mayor porcentaje (99%) a pH 8 por 3 h, también se observa que conforme pasa el tiempo la enzima inmovilizada tiene un porcentaje mayor de actividad residual para cada pH y esto puede ser debido a que un mayor tiempo de incubación permitió que la enzima lograra desprotonar completamente la triada catalítica, en el caso de la enzima recombinante libre (Solís, 2015) donde se tiene menos del 7% de actividad residual a pH 5 por 1 h y menor al 20% de actividad residual a pH 8 por 1 h, lo que indica que al inmovilizar la enzima recombinante ANCUT1 en Accurel MP 1000 mejora su estabilidad al pH.

Lo mismo ocurrió con la enzima nativa libre (Vega, 2013) y la enzima nativa inmovilizada en Accurel MP 100, siendo esta última también estable en un rango de pH de 5 a 11.

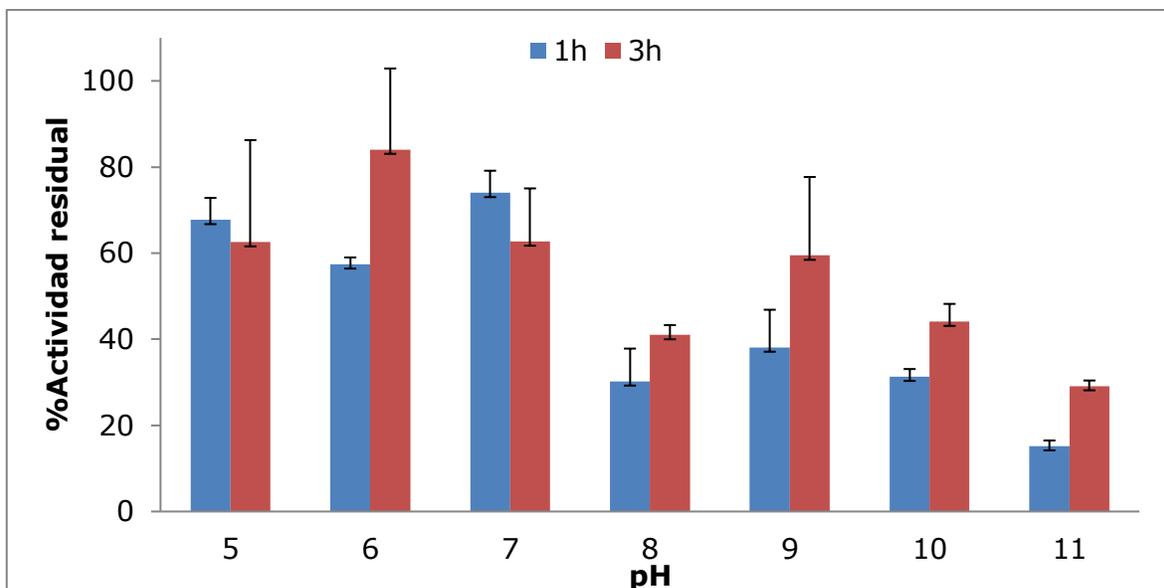


Gráfico 10. Estabilidad al pH enzima ANCUT2 (Celite 545).

En el gráfico 10 se observa una mayor estabilidad en el intervalo de pH 5 a 7 en comparación de un rango más alcalino de 8 a 11, también se observa que la mayor estabilidad fue a pH 6 a 3 h obteniendo un 84% de actividad residual y siendo el pH menos estable a pH 11 con 15 % de actividad residual a 1 h, estos resultados comparados con la enzima recombinante ANCUT2 libre (Morales, 2015) que presentó menor del 20% de actividad residual a pH 6, pero mayor al 80% a pH 10, algo similar ocurrió con la enzima nativa libre (Bermúdez, 2013) y la enzima nativa libre inmovilizada en Celite 545 (Castro, 2014) ya que la enzima inmovilizada presentó estabilidad en los rangos de pH 6 a 11 y la enzima libre de 7 a 10, esto puede deberse a que el extracto concentrando antes de ser inmovilizado tenía un pH de 9, quedando carga suficiente para presentar actividad a pH 6.

En cuanto a la estabilidad a la temperatura de las enzimas recombinantes, la etiqueta de histidinas que ambas contienen en el carbonilo terminal puede influir negativamente en la termoestabilidad de las enzimas, sin embargo también se sabe que los enlaces de disulfuro que contienen las cutinasas aportan estabilidad a las enzimas.

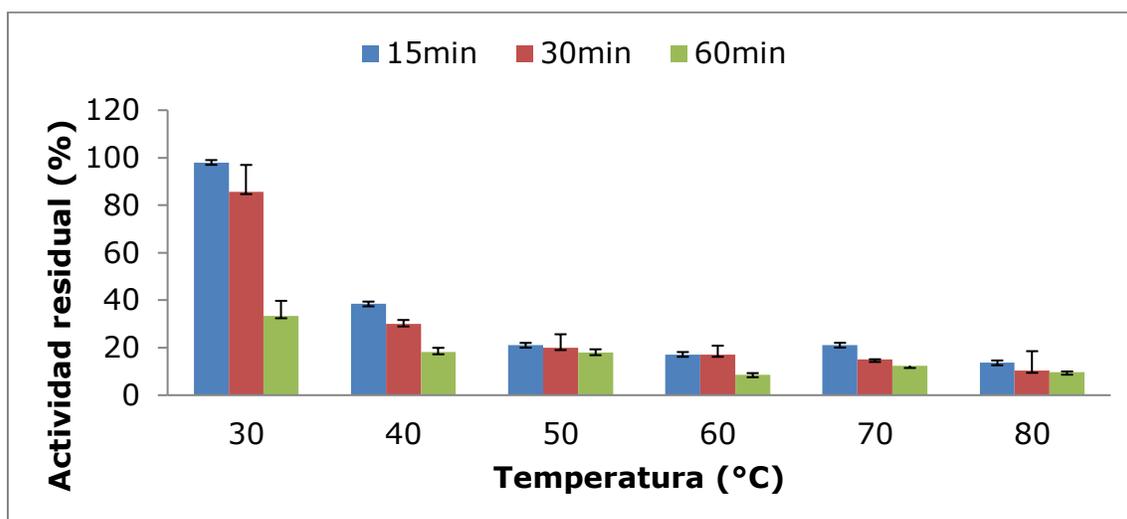


Gráfico 11. Estabilidad térmica de la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).

En el gráfico 11 se observa el efecto de la inactivación por temperatura de la enzima recombinante ANCUT1 inmovilizada, observándose una mayor estabilidad a 30 °C a los 15 y 30 min de incubación con 98% y 85% de actividad residual, para el caso de la enzima nativa; libre (Vega, 2013) e inmovilizada (Castro, 2014) se observó que la inmovilización mejoró la estabilidad térmica en un rango de 30 °C y 80 °C, pero al comparar los resultados con la enzima recombinante se observa que la enzima libre tienen 60% de actividad residual a 30 °C de los 15 a 60 min de incubación, y un porcentaje menor del 38% a 70 °C por 15min, lo que podría indicar que la enzima ANCUT1 recombinante inmovilizada en Accurel mejoró su estabilidad térmica sólo a 30 °C, pero no a mayores temperaturas (40-80 °C).

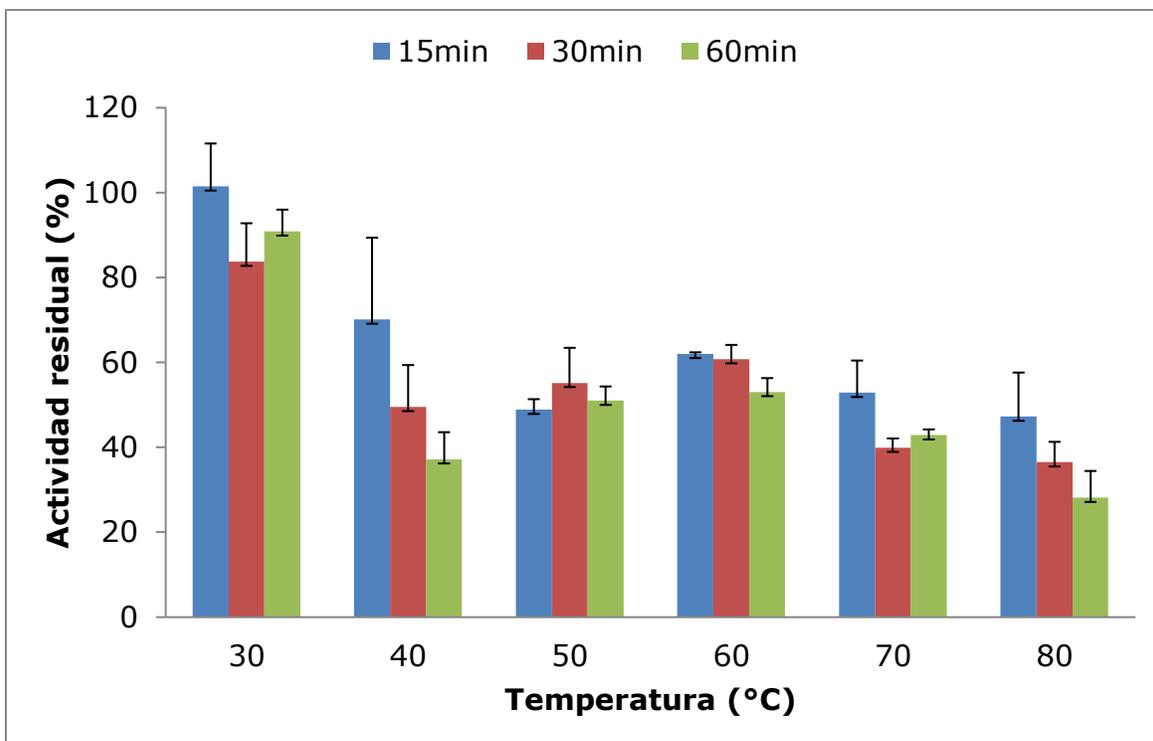


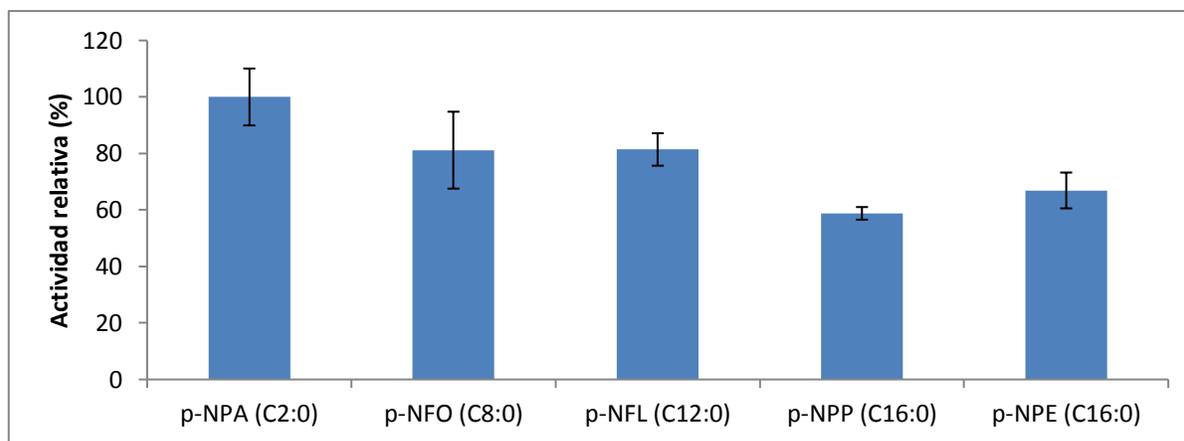
Gráfico 12. Estabilidad térmica de la enzima ANCUT2 (Celite 545).

En el gráfico 12 se aprecia el efecto de la temperatura observándose que la enzima recombinante ANCUT2 inmovilizada en Celite 545, es estable en un rango de temperatura de 30 a 70 °C ya que se obtuvieron valores mayores al 50% de actividad residual; a 30, 50 y 60 °C se obtuvieron valores mayores al 50% de actividad residual a los 15, 30 y 60 min de incubación; a 40 y 70 °C tuvieron más del 50% de actividad residual a los 15 min de incubación. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Castro (2014) y Bermúdez (2013), donde se observó que al inmovilizar la enzima nativa ANCUT2 en celite 545, se mejoró la estabilidad térmica debido a las interacciones hidrofóbicas de los residuos hidrofóbicos de las enzimas al soporte, que pueden estar estabilizando a las enzimas.

8.3.3. Determinación de la especificidad de sustrato

Se evaluó la capacidad de hidrólisis de las enzimas inmovilizadas, sobre ésteres de *p*-nitrofenilo (acetato de *p*-Nitrofenil, octanoato de *p*-Nitrofenil,

laurato de p-Nitrofenil, palmitato de p-Nitrofenil y esterato de p-Nitrofenil) con diferente largo de cadena, a pH 9 y 30 °C.



**Gráfico 13. Especificidad de sustrato enzima ANCUT1
(Accurel MP 1000)**

En el gráfico 13 se observa que la enzima inmovilizada tiene afinidad tanto por sustratos de cadena corta, media y larga, Chen *et al.* (2013) explicaron que las cutinasas adoptan un pliegue α / β que expone a la serina del sitio catalítico al medio de reacción, en lugar de cubrir el sitio activo con un bucle hidrófobo como las lipasas, y al inmovilizar la enzima, tal vez el sitio activo o la enzima modificó su plegamiento ampliando su especificidad. También Chen *et al.* (2013) describieron que para ampliar la especificidad de sustratos de las cuinasas era necesario crear más espacio en el sitio activo, siendo la estrategia más utilizada sustituir los residuos que se encuentran cerca del sitio activo por residuos más pequeños como alanina, sin embargo se observó que la inmovilización puede modificar la especificidad de la enzima ya que en la matriz del soporte las proteínas se pueden acomodar de diferentes maneras ocasionando una sinergia dentro del soporte.

La mayor afinidad fue hacia sustratos de cadena corta (2 carbonos) y cadenas medias (8 y 12 carbonos) teniendo 100% y 81% de la actividad

relativa respectivamente, donde obtuvo una menor actividad fue en cadenas de 16 y 18 carbonos teniendo 58% y 66% de actividad relativa respectivamente, al comparar con la enzima ANCUT1 recombinante libre la cual tiene actividad sólo con cadenas cortas (Solís, 2015), indica que al inmovilizar la enzima se provocan modificaciones en cuanto a su especificidad, lo mismo se observó con la enzima nativa ANCUT1 libre que tuvo una mayor especificidad hacia cadenas cortas (Vega, 2013) pero al inmovilizarla también se modificó su especificidad presentando afinidad por cadenas cortas, medias y largas (Castro, 2014), posiblemente a los diferentes acomodos de las proteínas al soporte, provocando una sinergia dentro de la matriz del soporte.

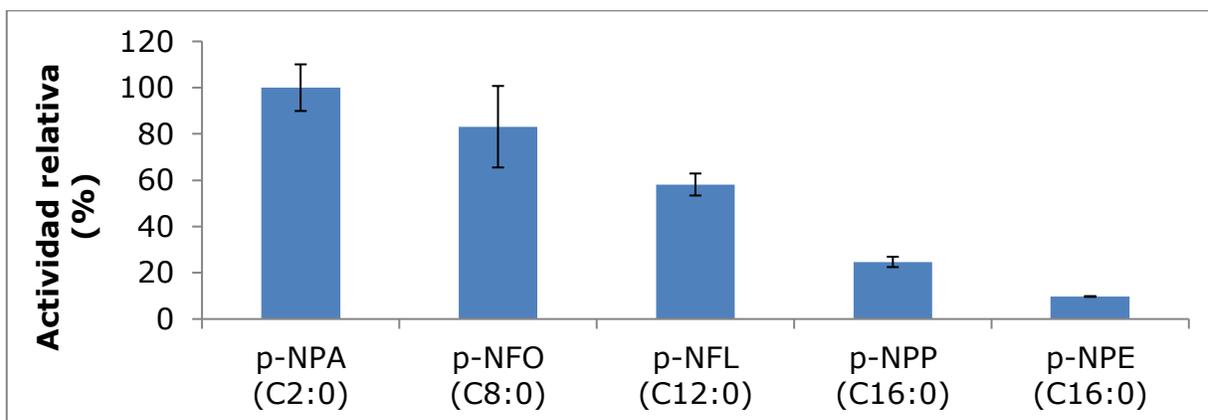


Gráfico 14. Especificidad de sustrato enzima ANCUT2 (Celite 545)

En el gráfico 14 se encontró que la enzima ANCUT2 tiene una mayor afinidad por sustratos de cadena corta y media, a comparación de la enzima recombinante libre que tiene especificidad por sustratos de cadena corta y larga (Morales, 2015), lo que indica que al inmovilizar en celite, existen interacciones que puedan implicar el acomodo de los sustratos de cadena larga, lo mismo ocurrió al inmovilizar la enzima ANCUT2 nativa ya que está presentó especificidad por cadenas cortas y

largas (Bermúdez, 2013) y al inmovilizarla en celite 545, la enzima tuvo una mayor afinidad a cadenas cortas y medias (Castro, 2014).

8.3.4. Estabilidad operacional del biocatalizador

Se determinaron los ciclos de reuso de las enzimas inmovilizadas a pH 9 y 30 °C, determinando el porcentaje de actividad residual de cada ciclo de reuso.

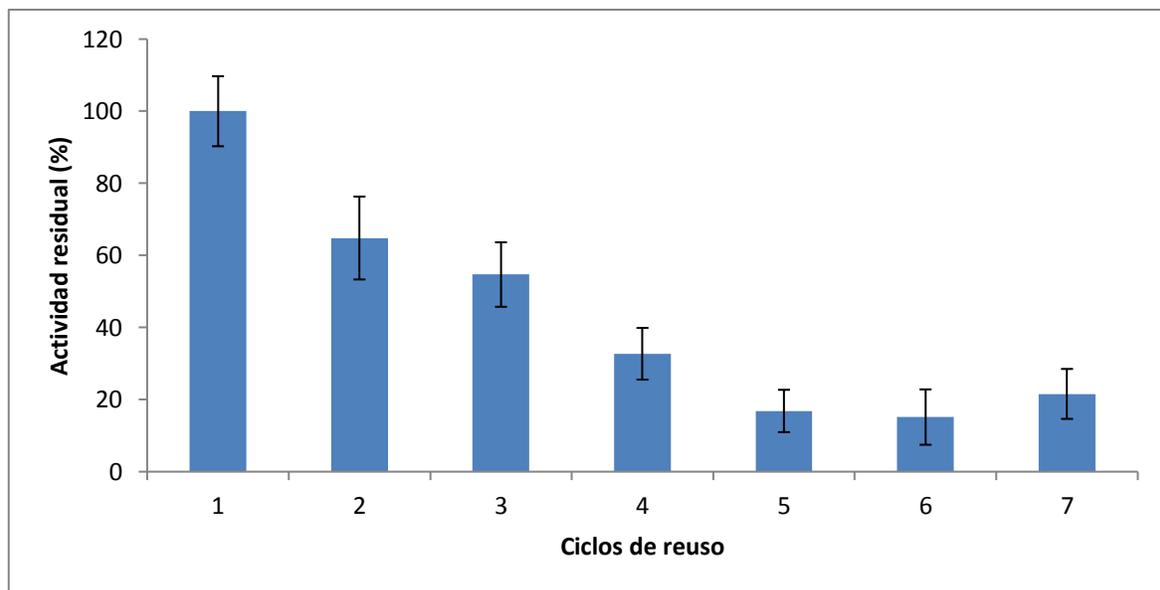


Gráfico 15. Estabilidad operacional de la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).

La enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 realizó 7 ciclos de reuso, manteniendo más del 50% de actividad residual en los primeros tres ciclos de reuso, sin embargo en el ciclo 7 la enzima tuvo 194 U/g de soporte. Al comparar los resultados con lo obtenido con la enzima nativa inmovilizada en Accurel MP 1000 (Castro, 2014), esta obtuvo nueve ciclos de reuso teniendo más del 40% de actividad residual, podemos concluir que la enzima ANCUT1 recombinante tiene una menor estabilidad operacional, y esto puede ser debido a que existe una diferencia para las enzimas recombinantes de sus enzimas nativas respectivamente, y esto

puede ser debido a que la adición de 118 aminoácidos a la secuencia de la enzima nativa, utilizados como una estrategia del proceso de clonación, 94 residuos en la parte del N- terminal y 24 residuos en la parte del C-terminal. Sin embargo, es importante considerar que la región N-terminal, 89 residuos son eliminados debido a que pertenecen a la secuencia señal del factor α , quedando sólo 5 aminoácidos adicionales en el N-terminal de la proteína nativa (Solís, 2015), que podrían estar influyendo en la estabilidad operacional.

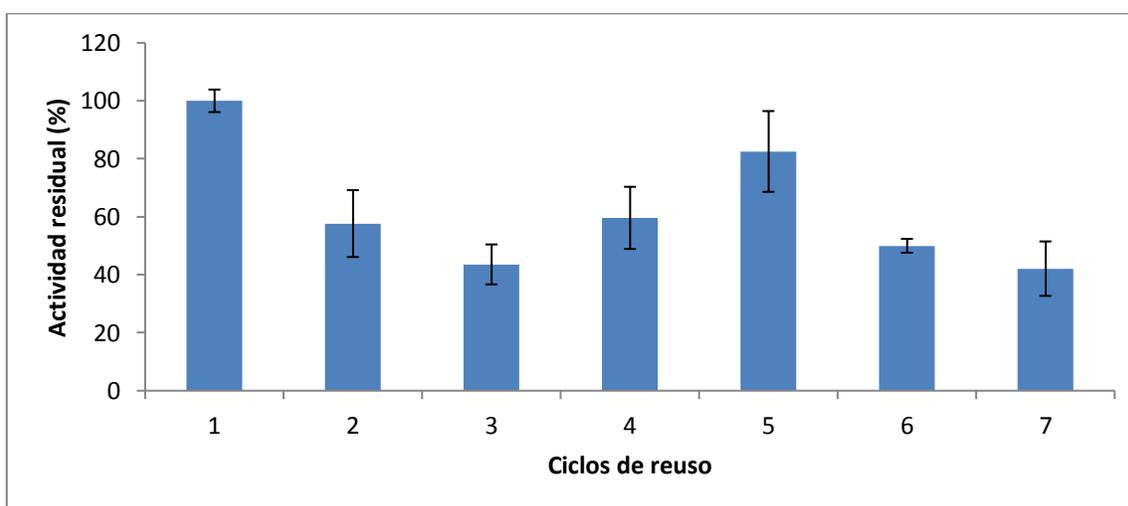


Gráfico 16 Estabilidad operacional de la enzima ANCUT2 (Celite 545).

La enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545 presentó 7 ciclos de reuso manteniendo más del 40% de actividad residual en el ciclo 7 con una actividad de 275 U / g de soporte, al comparar con la enzima nativa inmovilizada en celite 545 (Castro, 2014) que obtuvo 5 ciclos de reuso teniendo el 30% de actividad residual. Lo que puede indicar que la enzima recombinante tiene una mejor interacción con el soporte Celite 545.

8.3.5. Almacenamiento de la enzima inmovilizada

Se determinó el almacenamiento de las enzimas inmovilizadas a dos temperaturas; temperatura de refrigeración 4 °C y temperatura

ambiente, evaluando la actividad residual de las enzimas inmovilizadas conforme al tiempo.

En el gráfico 17 se observa que la enzima ANCUT1 mantiene su actividad a los 214 días manteniendo el 51% de actividad residual a 4 °C y 41% a temperatura ambiente. Sin embargo no se descarta el hecho de una posible contaminación, ya que a partir de 68 días se observa que la enzima inmovilizada a 4 °C aumenta su actividad, en el caso de la temperatura ambiente ocurre a partir de 45 días. A comparación de la enzima nativa inmovilizada en Accurel MP 1000 (Castro, 2014) que presentó una estabilidad a los 38 días con un 47% de actividad residual, la enzima recombinante inmovilizada es más estable.

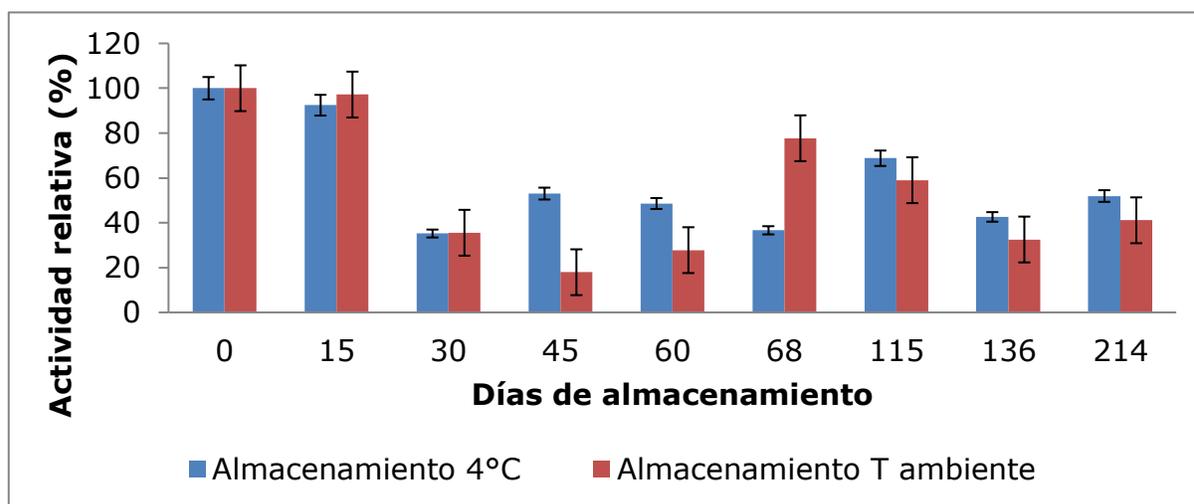


Gráfico 17. Estabilidad de la enzima ANCUT1 (Accurel MP 1000).

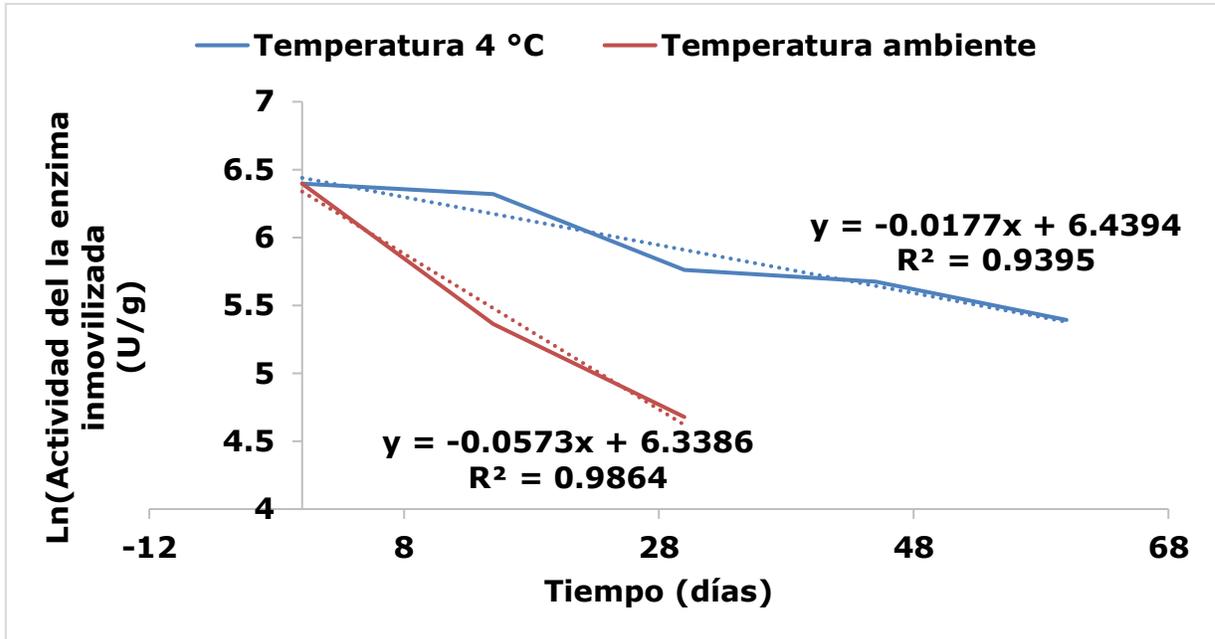


Gráfico 18. Tiempo de vida media de la enzima inmovilizada (ANCUT1) en Accurel MP 10000.

En el gráfico 18 se observa la determinación de la vida media del biocatalizador donde $t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$, el tiempo de vida media para el almacenamiento a temperatura ambiente es de 12.09 días y para un almacenamiento a 4 °C es de 39.16 días.

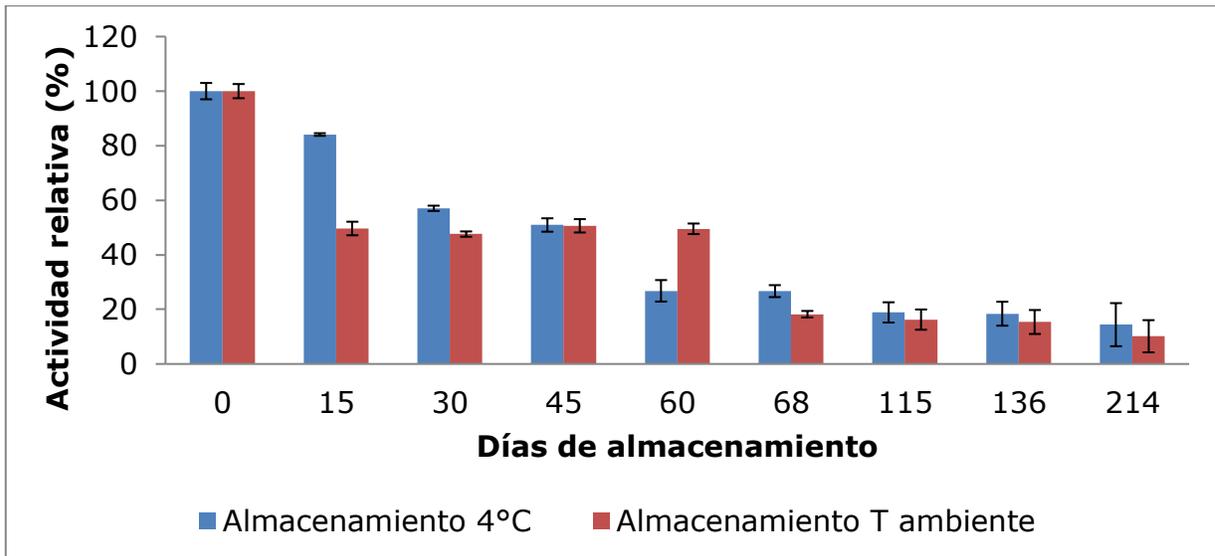


Gráfico 19. Estabilidad de la enzima ANCUT2 (Celite 545).

En el gráfico 19 se observa que la enzima inmovilizada mantiene su actividad a los 45 días teniendo 50% de actividad residual tanto a 4 °C como a temperatura ambiente. La enzima nativa inmovilizada presentó una mayor estabilidad ya que a los 90 días de almacenamiento a 4 °C obtuvo 100% de actividad residual (Castro, 2014).

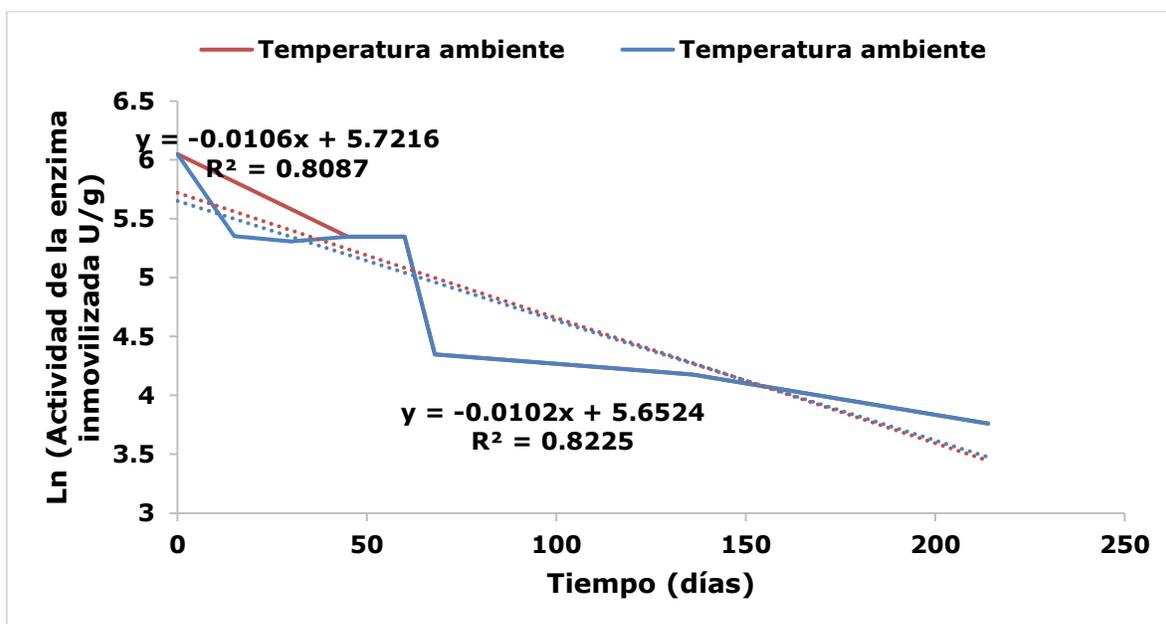


Gráfico 20. Tiempo de vida media de la enzima inmovilizada (ANCUT2) en Celite 545.

En el gráfico 18 se observa que el tiempo de vida media para una temperatura de almacenamiento de 4 °C es de 67.95 días y para un almacenamiento a temperatura ambiente de 65.39 días.

8.4. Reacción de transesterificación del aceite de tiliapo

Se evaluó la capacidad de las enzimas para llevar a cabo reacciones de transesterificación del aceite de tiliapo debido a su gran interés en su perfil de ácidos grasos indispensables, para poder generar ésteres de ácidos grasos y realizar reacciones de lipofilización de antocianinas vía transesterificación.

8.4.1. Estabilidad de las enzimas inmovilizadas en diferentes condiciones de reacción

Se probaron dos solventes; metanol y butanol, y dos temperaturas; 37 °C y 50 °C para evaluar la estabilidad de las enzimas en condiciones de reacción, se determinó la actividad residual respecto a las condiciones óptimas pH 9 y 30 °C usando como sustrato acetato de paranitrofenil.

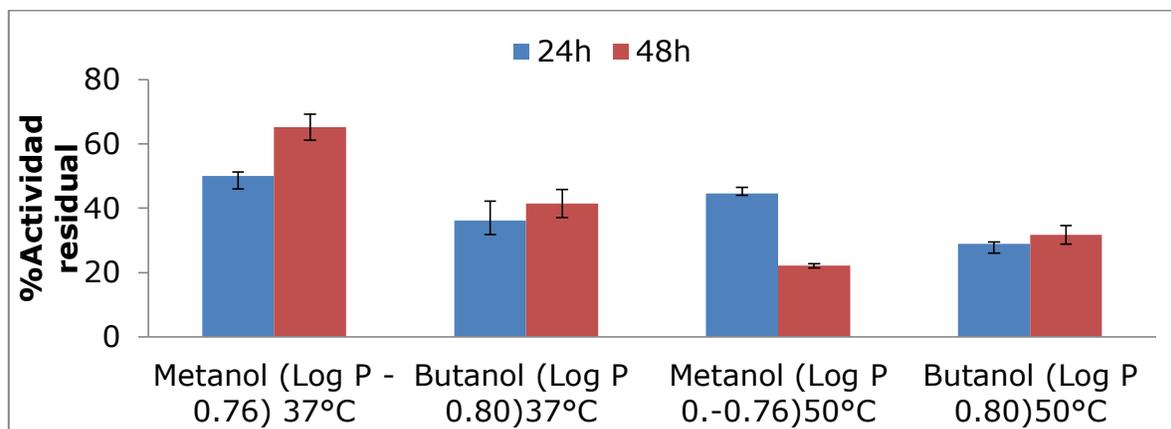


Gráfico 21. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT1 (Accurel MP 1000) en medios de reacción de transesterificación.

En el gráfico 19 se observa que la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000, es más estable en metanol y butanol a 37 °C, manteniendo más del 36% de actividad residual por 24 y 48 h.

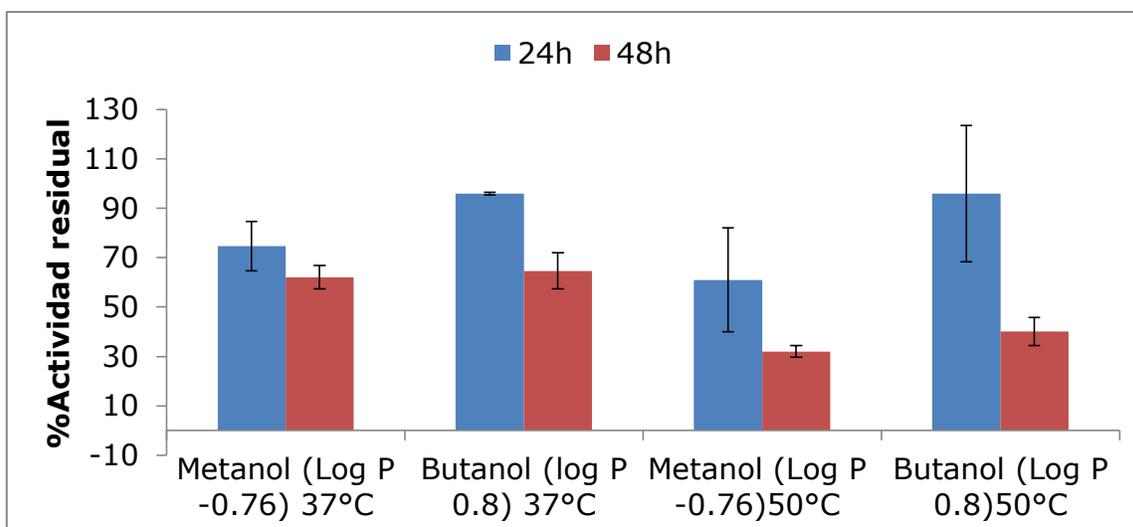


Gráfico 22. Estabilidad de la enzima inmovilizada AN CUT2 (Celite 545) en medios de reacción de transesterificación

La enzima AN CUT2 inmovilizada en Celite 545 es más estable en butanol a 37 °C a 24 y 48 h, ya que tiene más del 60% de actividad residual.

8.4.2. Determinación de la condición óptima de reacción

De acuerdo con los gráficos 18 y 19, se probaron las siguientes condiciones de reacción (tabla 23):

Tabla 23. Condiciones de reacción de transesterificación probadas.

*Se probaron como alcoholes metanol y butanol

Relación molar Alcohol :aceite	% Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
3:1	10	37	24 -120
3:1	15	37	
3:1	20	37	

Se realizaron cinéticas por cromatografía en capa fina para determinar la mejor condición de reacción y los resultados se muestran en las siguientes figuras.

A) ANCUT1

B) ANCUT2

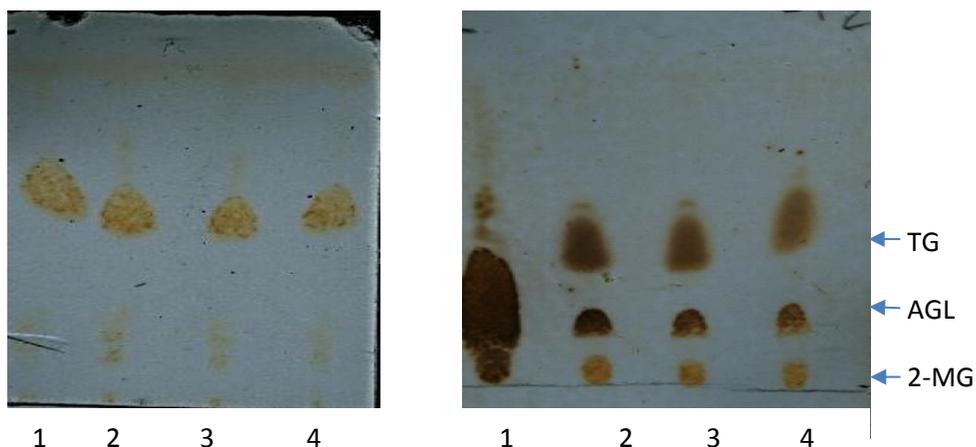


Figura 18. Cromatografía en capa fina de las reacciones de transesterificación probadas con metanol a 37°C con 120 h a 250 rpm. Carril 1: aceite de tiliapo, carril 2, 3, 4 productos de la reacción con diferentes porcentajes de enzima 10, 15 y 20 %. La placa fue revelada con sulfato cérico. Fase móvil; hexano/ acetato de etilo /ácido acético (90:10:1). 2-MG: diglicéridos o monoglicéridos, AGL: Ácidos grasos libres, TG: Triacilgliceridos.

En la figura 19 se observa que ninguna de las enzimas generó producto de reacción a las 120 h. Esto puede deberse a que la reacción con metanol formó una fase interfacial aceite-metanol y las cutinasas no muestran o tienen poca activación interfacial, siendo más activas tanto en triglicéridos solubles como emulsionados (Dutta *et al.*, 2009). Cuando la reacción de transesterificación se llevó a cabo en butanol, ambas enzimas generaron productos de reacción, es decir ésteres del aceite de tiliapo, como se muestran en las siguientes figuras:

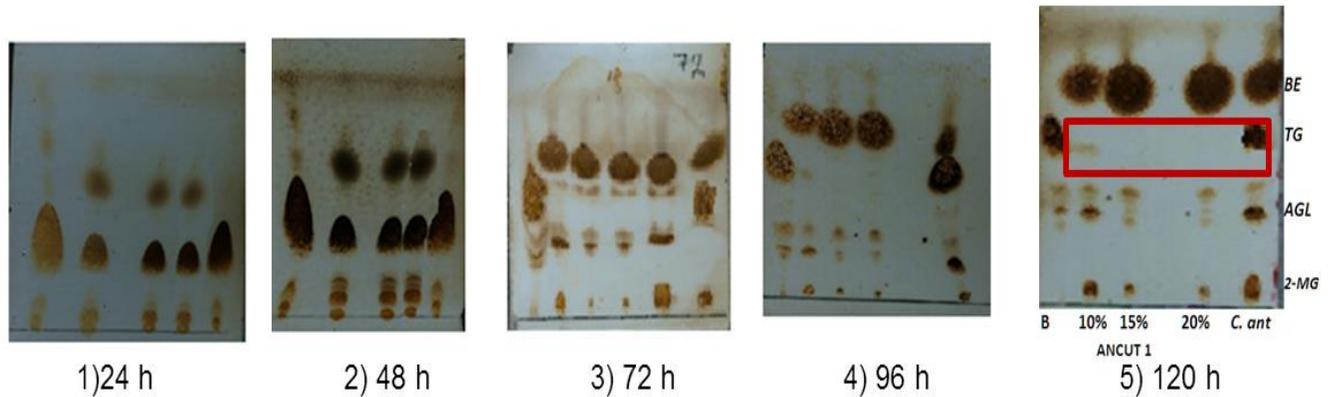


Figura 19. Cinética de la reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000 analizada cualitativamente por cromatografía en capa fina probadas con butanol a 37 °C 24-120 h a 250 rpm. Carril 1: Blanco de reacción; Carril 2: 10% de enzima; Carril 3: 15% de enzima; Carril 4: 20% de enzima y Carril 5: Lipasa de *Candida antartica* comercial inmovilizada 10%. 5) 120 h; BE: Butil ésteres; TG. Triacilgliceridos; AGL: Ácidos grasos libres; 2-MG: diglicéridos o monoglicéridos. La placa fue revelada con sulfato cérico. Fase móvil; hexano/ acetato de etilo /ácido acético (90:10:1).

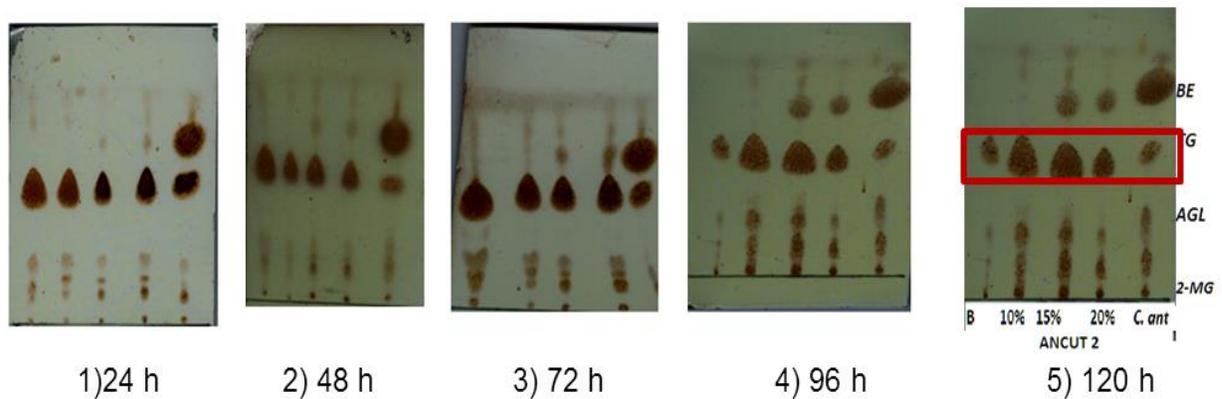


Figura 20. Cinética de la reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545 analizada cualitativamente por cromatografía en capa fina probadas con butanol a 37 °C 24 -120 h a 250 rpm. Carril 1: Blanco de reacción; Carril 2: 10% de enzima; Carril 3: 15% de enzima; Carril 4: 20% de enzima y Carril 5: Lipasa de *Candida antartica* comercial inmovilizada 10% de enzima. 5) 120 h; BE: Butil ésteres; TG. Triacilgliceridos; AGL: Ácidos grasos libres; 2-MG: diglicéridos o monoglicéridos. La placa fue revelada con sulfato cérico. Fase móvil; hexano/ acetato de etilo /ácido acético (90:10:1).

En la figura 20 se observa la cinética de la reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000, siendo la mejor condición a 37 °C, 120 h a 250 rpm con butanol, debido a que no se observan triacilglicéridos a una concentración de 15 y 20%. También se observa que al comparar cualitativamente con la lipasa de *C. antartica*, la enzima ANCUT1 presentó un mayor rendimiento. La figura 21 muestra la cinética de reacción de transesterificación donde se observa cualitativamente un menor rendimiento en comparación con la enzima ANCUT2 y la lipasa de *C. antartica*. Sin embargo ambas enzimas realizaron reacciones de transesterificación, lo que es de gran interés debido a la aplicación en la producción de biodiesel.

8.4.3. Análisis de ácidos grasos esterificados

De acuerdo con lo analizado anteriormente, se consideraron las siguientes condiciones (tabla 24) como las óptimas para cada enzima.

Tabla 24. Condiciones óptimas de reacción

Enzima	Butanol :aceite	% Enzima	Temperatura (°C)	Tiempo (h)
ANCUT1	3:1	20	37	120
ANCUT2	3:1	20	37	

Las reacciones fueron posteriormente analizadas por cromatografía de gases usando el método de estándar interno, realizando una transesterificación alcalina selectiva para ácidos grasos esterificados y una transesterificación ácida no selectiva, para poder determinar el rendimiento de la reacción. A continuación se presentan los cromatogramas y el rendimiento de conversión de la reacción de ambas enzimas.

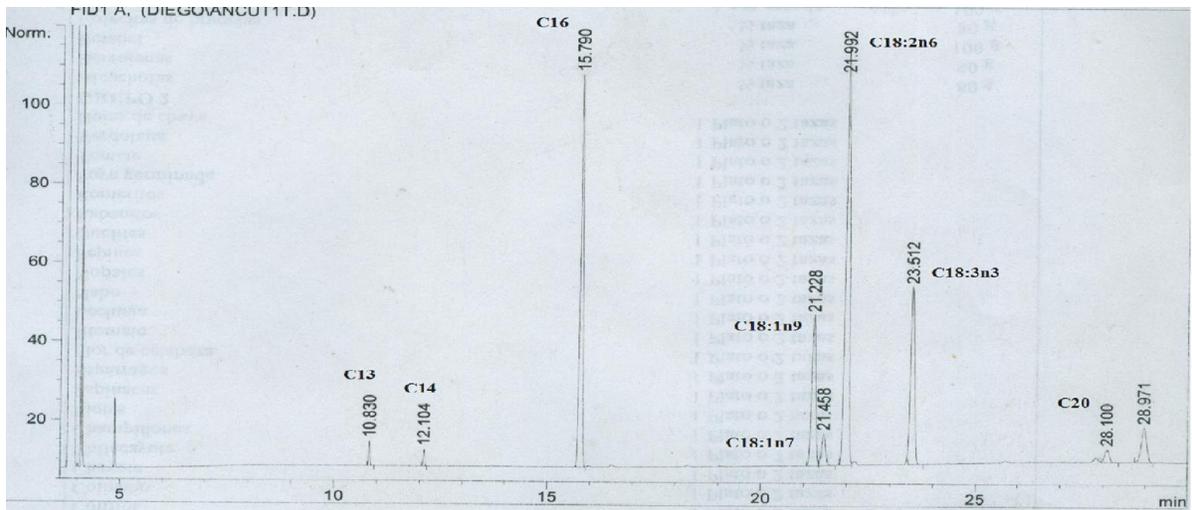


Figura 21. Cromatograma del tratamiento de transesterificación ácida del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000.

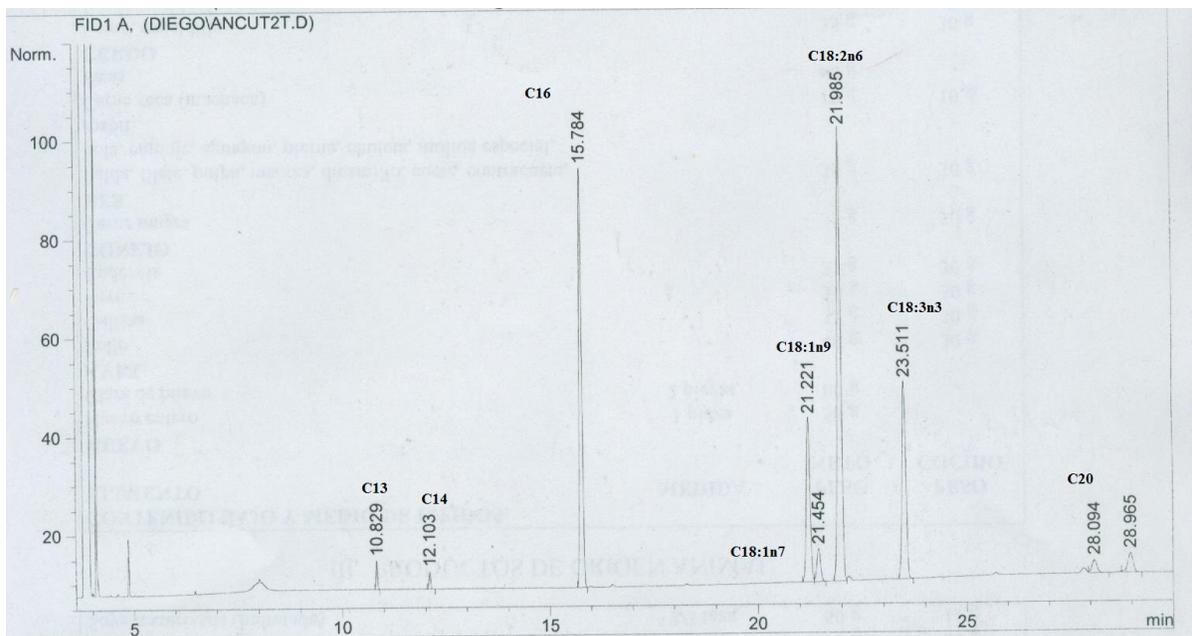


Figura 22. Cromatograma del tratamiento de transesterificación ácida del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545.

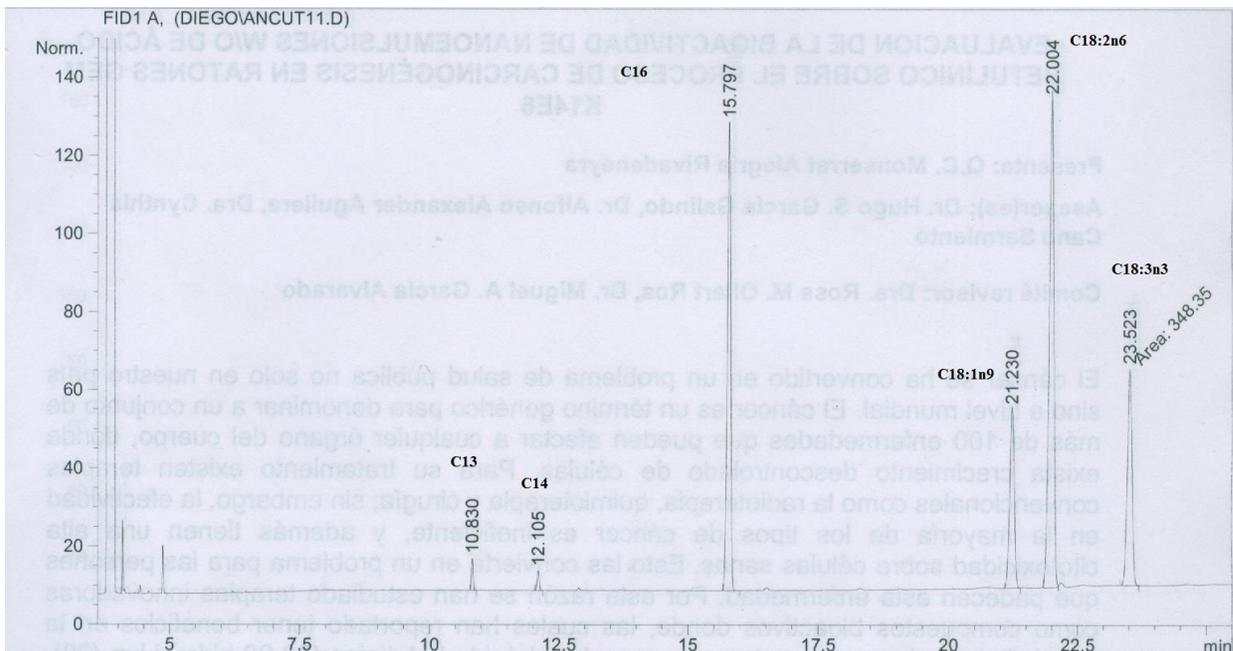


Figura 23. Cromatograma del tratamiento de transesterificación alcalina del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000.

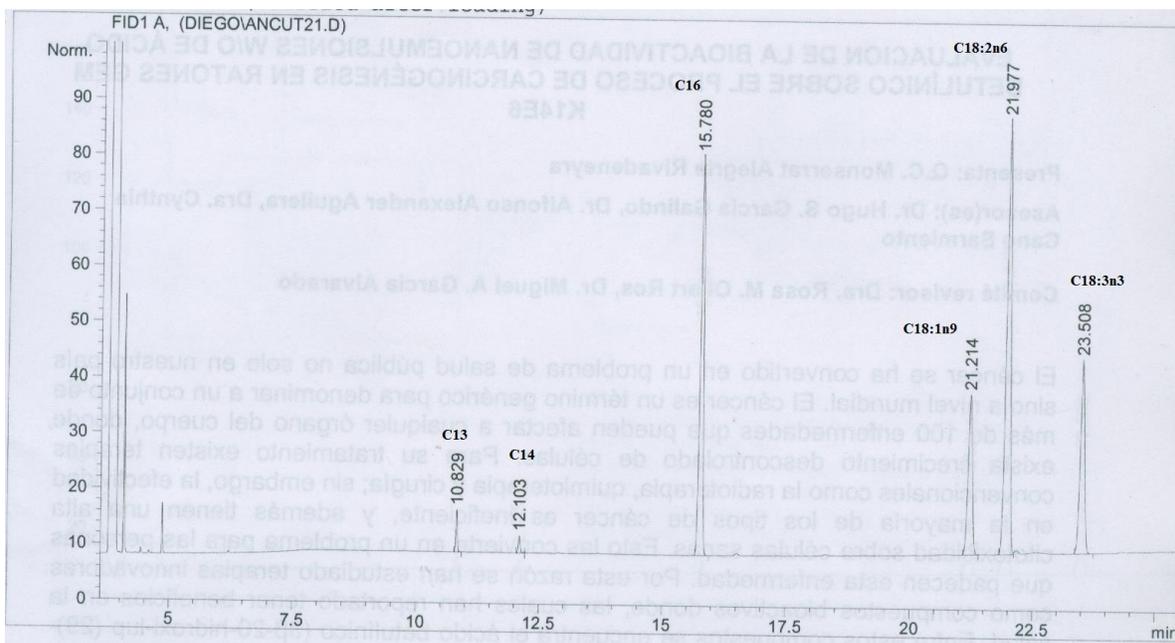


Figura 24. Cromatograma del tratamiento de transesterificación alcalina del producto de reacción de transesterificación de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545.

Tabla 25. Porcentaje de ácidos grasos butilados

	ANCUT 1	ANCUT 2
Ácido graso	% Ácidos grasos butilados	
C14	89.517	65.091
C16	90.023	65.611
C18:1 n 9	90.216	65.461
C18:2 n 6	90.613	66.397
C18:3 n 3	90.460	29.369

Se observa en la tabla 25 que la enzima ANCUT1 tuvo altos rendimientos de reacción, concordando con la caracterización bioquímica ya que la enzima ANCUT1 inmovilizada tiene especificidad por sustratos de cadena corta, media y larga. Por otro lado la enzima ANCUT 2 obtuvo un menor rendimiento, posiblemente debido a que tiene una mayor especificidad por cadenas cortas y medias.

8.5. Cuantificación y determinación de la capacidad antioxidante de las antocianinas soportadas y perfil de antocianinas del maíz morado y jamaica

Las antocianinas tanto de la jamaica como del maíz morado, fueron semi purificadas y soportadas en sílice 60 con el fin de mantener la aw de 0.33. Los resultados de cuantificación de las antocianinas (tabla 26) y el perfil de antocianinas (figura 26) se muestran a continuación.

Tabla 26. Cantidad de antocianinas soportadas en sílice 60

Muestra	mg de antocianinas empacadas/ g de sílice (pH diferencial)
Maíz morado	5.766 ± 0.345
Jamaica	8.309 ± 0.268

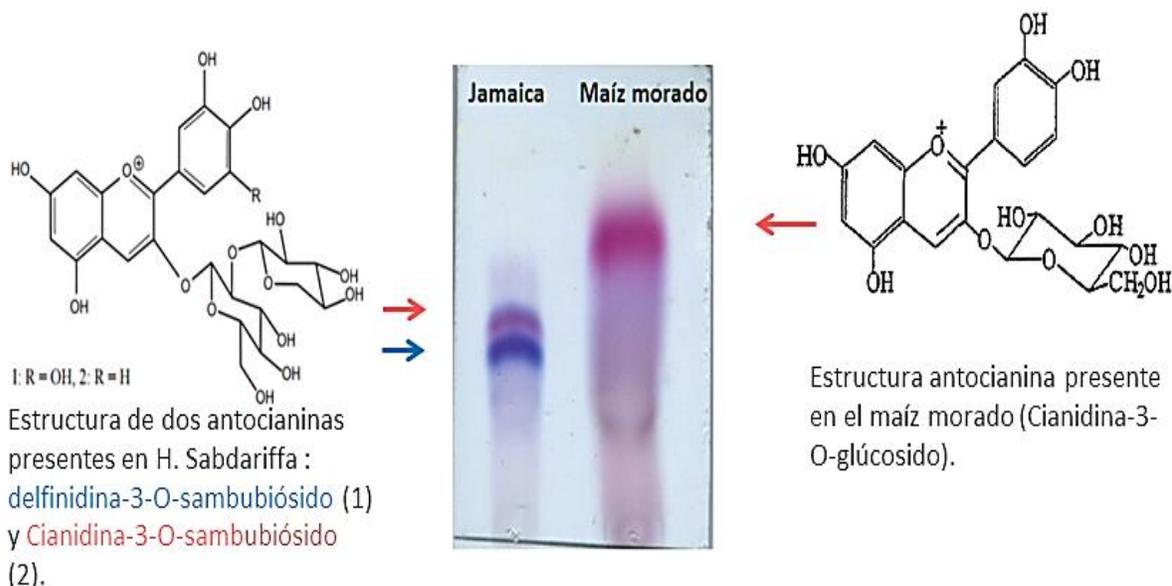


Figura 25. Perfil de antocianinas de la Jamaica y del maíz morado. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1).

En la placa de gel de sílice la cianidina presenta una coloración entre morada y rosa, mientras que la delfinidina presenta una coloración azul como se muestra en la figura 26 además de lo ya reportado por Fernández (2014) quien caracterizó tanto las antocianinas del maíz morado como de las de la jamaica. La coloración para cada tipo de antocianina no proporciona información sobre la sustitución de la antocianina, sin embargo el Rf da una aproximación de la sustitución, un Rf entre 0 a 0.5 corresponde a antocianinas aciladas y un Rf entre 0.5 a 1 es la zona de antocianinas no aciladas. En la tabla 27 se indican los Rf obtenidos tanto de la jamaica como del maíz morado, donde se puede observar que la jamaica presenta antocianinas aciladas y el maíz morado antocianinas no aciladas.

Tabla 27. Rf de las antocianinas de la jamaica y del maíz morado

Muestra	Rf	
Jamaica	0.416	0.52
Maíz morado	0.729	

Se observa en la figura 26 el perfil de antocianinas de la jamaica y del maíz morado, mostrándose las principales estructuras de las antocianinas que concuerda con lo reportado por Fernández (2014), se muestran las dos principales antocianinas de la Jamaica; delphinidina-3-sambubiósido y cianidina-3-sambubiósido que representan el 71 y 29% respectivamente del total de antocianinas (Kalla *et al.*, 2015), en el caso del maíz morado la cianidina 3-o-b-glucósido representa el 70% de antocianinas (Castañeda *et al.*, 2005). Sin embargo como se observa en las siguientes figuras, tanto la Jamaica como el maíz morado contienen diversas antocianinas, pero en menor proporción.

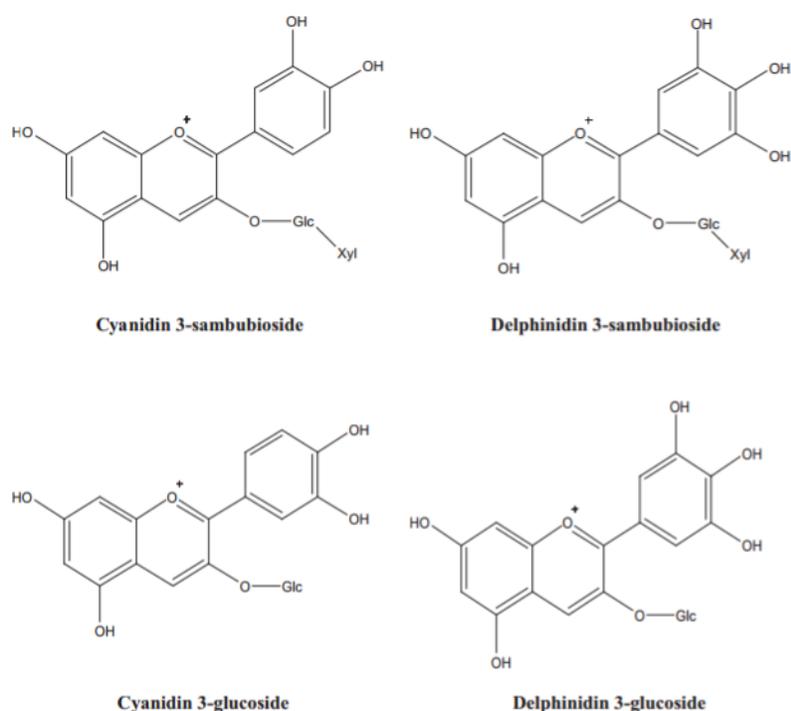
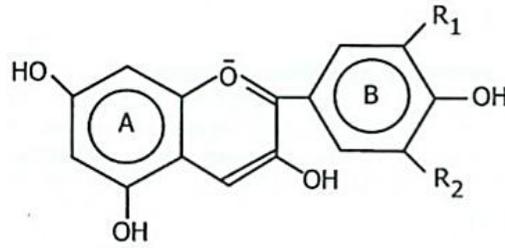


Figura 26. Estructuras químicas de algunas antocianinas de *H. Sabdariffa* (Heba et al., 2014).



R ₁	R ₂	Anthocyanidin
H	H	Pelargonidin
OH	H	Cyanidin
OH	OH	Delphinidin
OCH ₃	H	Paonidin
OCH ₃	OH	Petunidin
OCH ₃	OCH ₃	Malvidin

Figura 27. Estructuras químicas de algunas antocianinas del maíz morado (Castañeda et al., 2005).

Se determinó la actividad antioxidante por inhibición del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), con el fin de verificar que las antocianinas adsorbidas en sílice 60 conservarán su actividad antioxidante, a continuación se muestran los resultados obtenidos.

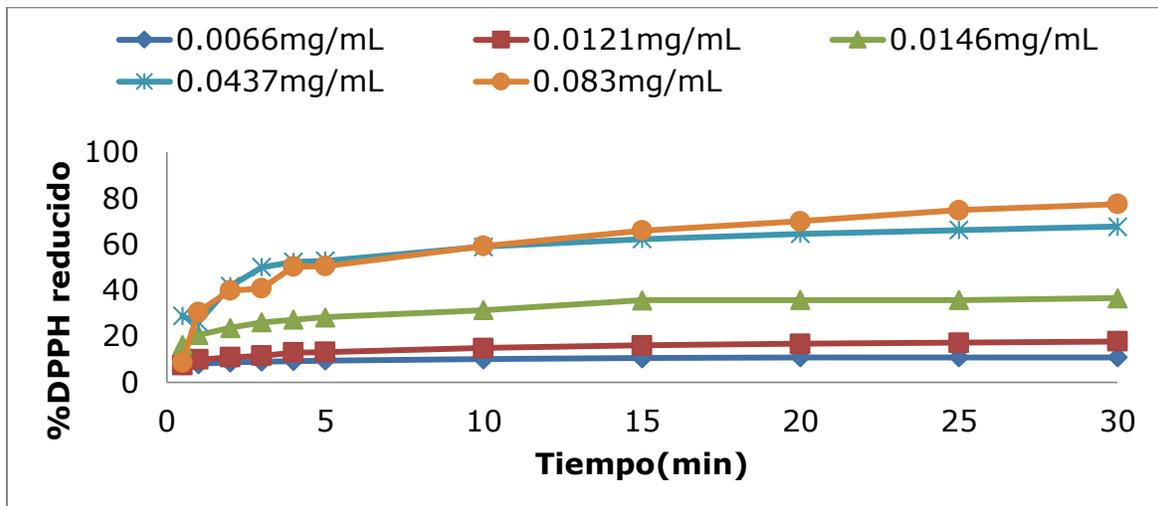


Gráfico 23. Reducción del radical DPPH de las antocianinas de la jamaica

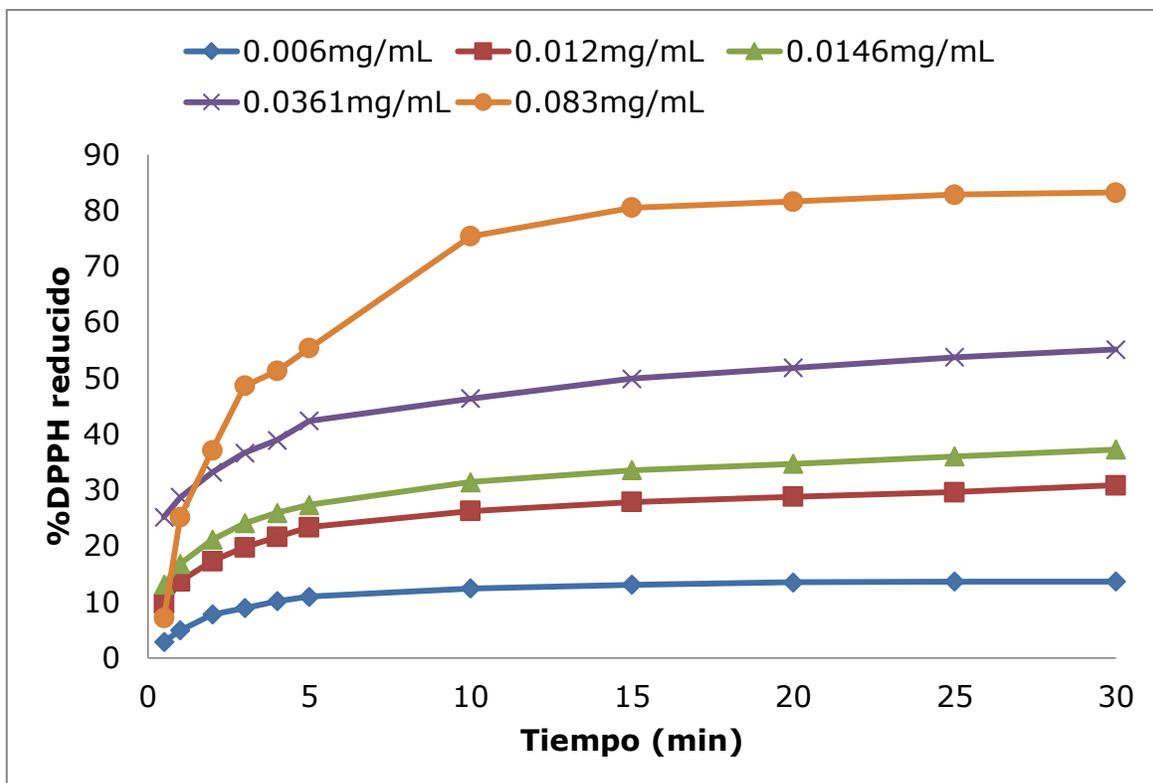


Gráfico 24. Reducción del radical DPPH de las antocianinas del maíz morado

Los gráficos 21 y 22 muestran los porcentajes de DPPH reducido a diferentes concentraciones de antocianinas tanto de la jamaica como del maíz morado, se observa que el porcentaje de DPPH aumenta conforme aumenta la concentración de antocianinas, por lo tanto se demuestra que las antocianinas adsorbidas de la jamaica y del maíz morado tuvieron poder antioxidante. Las antocianinas a una concentración de 0.083 mg/mL reducen el DPPH, a 77% en el caso de las antocianinas de la jamaica, mientras que las antocianinas del maíz morado reducen a 83% el DPPH, en la figura 29 se observa la diferencia de color.

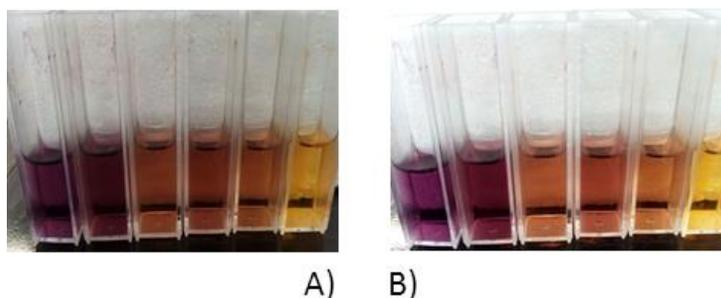


Figura 28. Reducción de DPPH A) Jamaica B) Maíz morado

Una vez obtenido el porcentaje de DPPH reducido a diferentes concentraciones se calculó el IC₅₀, el cual indica la concentración de antocianinas necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%, los resultados se muestran en la tabla 28.

Tabla 28. Concentración necesaria para disminuir la concentración inicial de DPPH al 50%

Muestra	Reducción de DPPH (IC ₅₀)
Maíz morado	0.0362 ± 0.0087 mg / mL
Jamaica	0.0382 ± 0.119 mg / mL

8.5. Reacciones de lipofilización de antocianinas

Las cutinasas tienen un sitio activo suficientemente grande para acomodar sustratos del alto peso molecular y bajo peso molecular como la cutina o ésteres solubles e insolubles (Chen *et al.*, 2013), por ello se evaluó la capacidad de las enzimas para realizar reacciones de lipofilización de antocianinas, debido a que las antocianinas son moléculas de alto peso molecular y con impedimento estérico, para generar antocianinas lipofilizadas o compuestos antioxidantes de interés en alimentos con el fin de aumentar su hidrofobicidad.

8.5.1. Estabilidad de las enzimas en medios de reacción de la lipofilización de antocianinas

Uno de los aspectos más importantes es la estabilidad enzimática en disolventes orgánicos, por ello se probaron diferentes solventes a dos temperaturas de reacción, determinando la actividad residual comparando las condiciones óptimas (pH 9 a 30 °C y usando como sustrato acetato de paranitrofenil), los resultados se muestran a continuación.

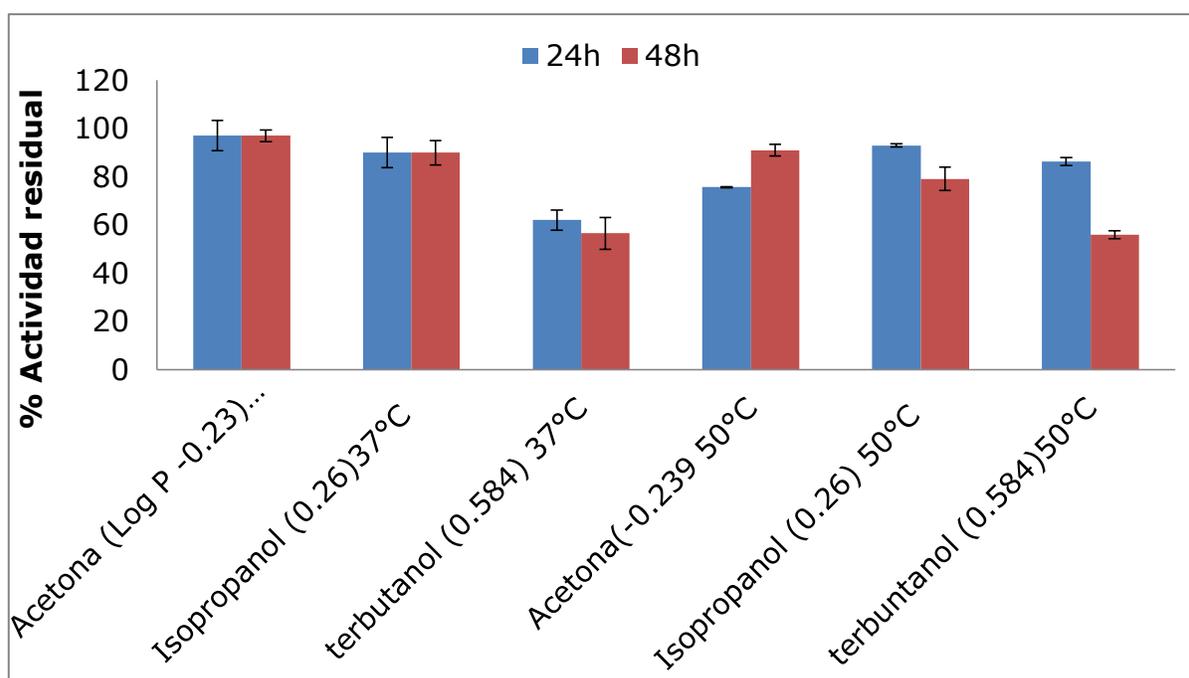


Gráfico 25. Estabilidad de la enzima inmovilizada ANCUT1 (Accurel MP 1000) para reacciones de lipofilización.

En el gráfico 23 se observa que la enzima ANCUT1 inmovilizada mantiene su actividad residual más del 56% respecto a las condiciones óptimas, para todas las condiciones probadas.

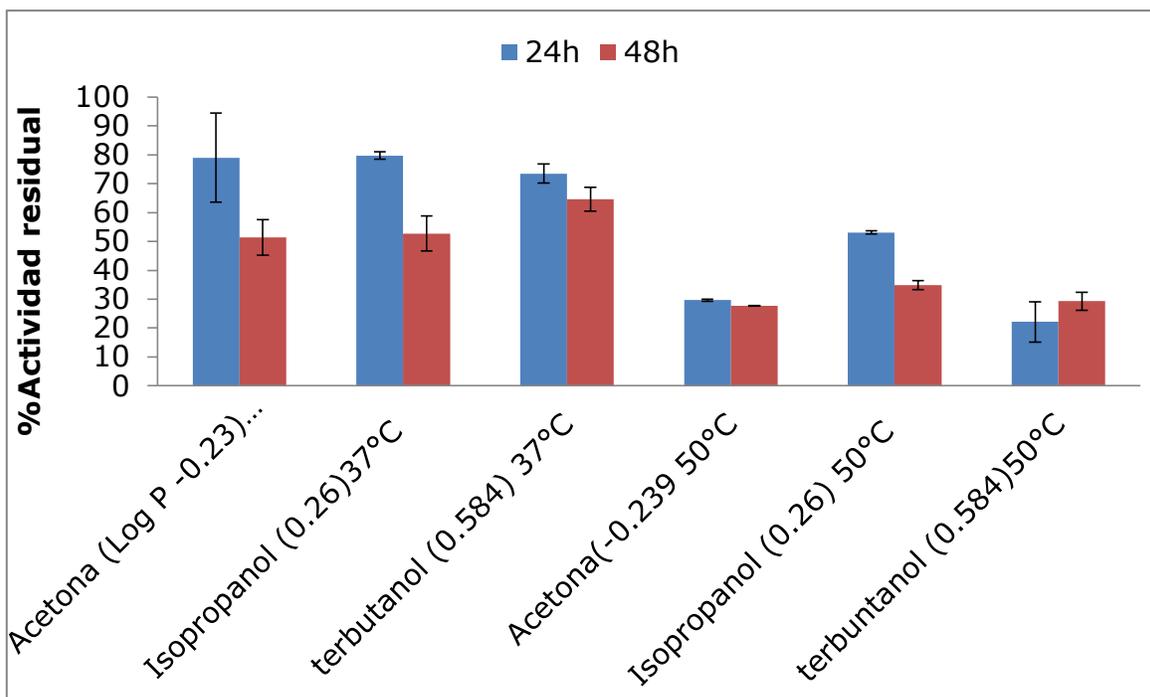


Gráfico 26. Estabilidad de la enzima inmovilizada AN CUT2 (Celite 545) para reacciones de lipofilización

El gráfico 24 se observa que la enzima AN CUT2 inmovilizada mantiene su actividad a 37 °C a las 24 y 48 h teniendo mayor al 50% de actividad residual.

8.5.3. Análisis de productos de la reacciones de lipofilización de antocianinas

Sari *et al.* (2015) estudiaron la acilación de antocianinas demostrando que a través de la lipofilización de antocianinas estas presentan una mayor estabilidad (resistencia a la luz y termoestabilidad).

Durante el análisis de las reacciones de lipofilización un problema que no se pudo controlar es el pH, las antocianinas fueron extraídas con metanol acidificado y se ha demostrado (Cissé *et al.*, 2012) que el ácido causa una hidrólisis parcial de los restos acilo en las antocianinas aciladas.

Las condiciones de reacción que se probaron fueron las siguientes usando como donador del grupo acilo los ésteres de butilo del tiliapo con 90% de conversión:

Tabla 29. Condiciones de reacción de lipofilización de antocianinas

Antocianinas: ésteres de butilo	%Enzima	T (°C)	Solvente	Tiempo (h)
1:5	20	37	Isopropanol	24 -120
1:5	20	37	Acetona	
1:5	20	37	Terbutanol	

8.5.3.1. Análisis de productos de reacción de la enzima ANCUT1 inmovilizada en Accurel MP 1000.

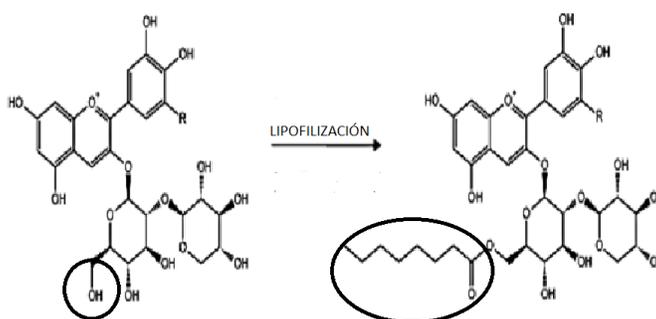


Figura 30. Imagen modificada de la reacción de lipofilización de antocianina-3-O-sambubiosida con cloruro de octanoilo. R= OH, delphinidin-3-O-sambubiosido, R=H, cianidin-3-O-sambubiosido (Cy-samb). DMF: N, N-dimetilformamida; TEA: trietilamina; RT: temperatura ambiente (Grajeda-Iglesias *et al.*, 2017).

8.5.3.1.1. Reacción con antocianinas de la Jamaica

Las reacciones fueron monitoreadas en CCF, a continuación se muestran los resultados cualitativos de los posibles productos de reacción.

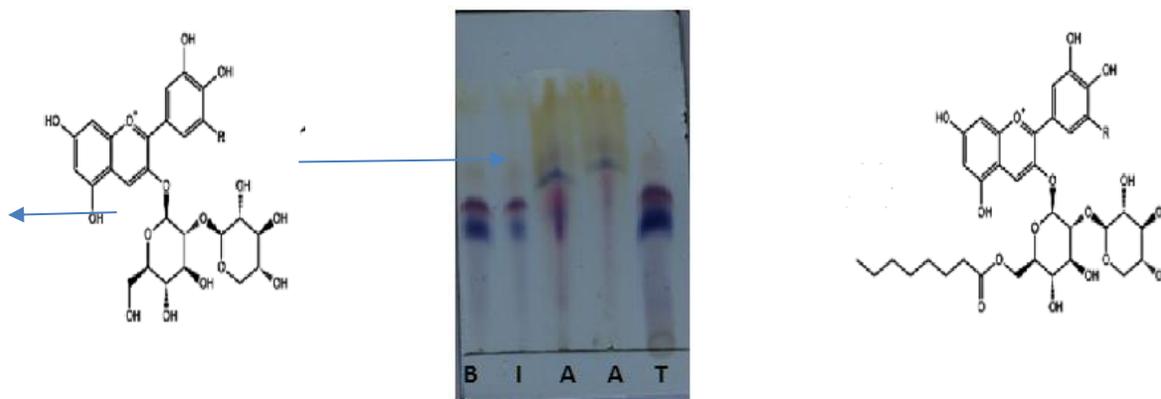


Figura 29. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima AN CUT1 inmovilizada con diferentes medios de reacción. B; blanco, I; reacción en isopropanol; A, reacción en acetona, T; reacción en terbutanol.

Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1).

Como se observa en la figura 30, los productos de reacción catalizados por la enzima AN CUT1, en el caso donde se usaron como medios de reacción isopropanol y terbutanol, no se observó que las antocianinas aumentaran su hidrofobicidad, sin embargo usando acetona como medio de reacción se observa que las antocianinas aumentaron su R_f a comparación del R_f del blanco de reacción, lo que podría indicar que las antocianinas fueron lipofilizadas, sin embargo para descartar algún efecto del disolvente de reacción, a continuación se muestran los resultados obtenidos en acetona tanto el blanco como el producto de reacción con diferentes reveladores.

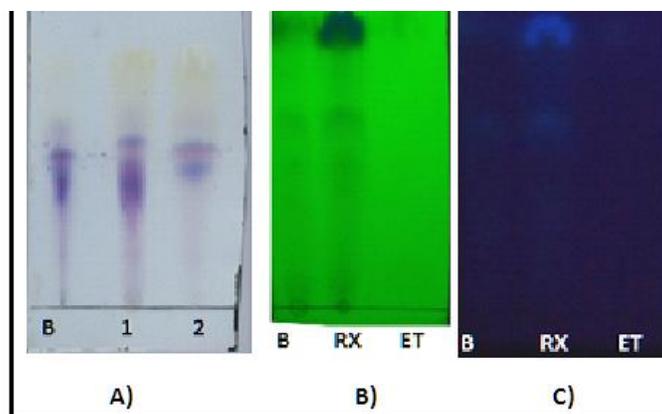


Figura 30. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona con diferentes reveladores. B; blanco de reacción, RX, 1, 2; producto de reacción; ET; ésteres del aceite de tiliapo. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1). B) Se reveló con UV a 254nm y C) Se reveló con UV a 366nm.

En la figura 31 se observan los productos de reacción de lipofilización de la enzima ANCUT1 inmovilizada, muestra los productos de reacción de lipofilización de antocianinas, donde se observa un aumento del R_f, mientras que para las que fueron revelados con UV se observa otro producto esterificado, posiblemente un ácido fenólico o algún flavonoide, por lo que se reveló con DPPH.

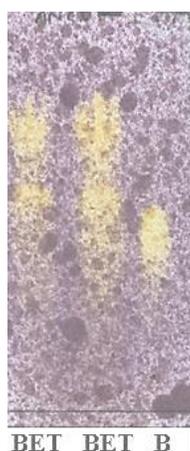


Figura 31. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción

acetona. B; blanco de reacción, BET: producto de reacción. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1). Se reveló con DPPH.

Como se observa en la figura 32 los productos de reacción presentan actividad antioxidante debido a que ocurre la reducción del radical DPPH, y se aprecia la decoloración azul-violeta hacia amarillo pálido, lo que indica que la enzima ANCUT1 esterificó un compuesto con actividad antioxidante.

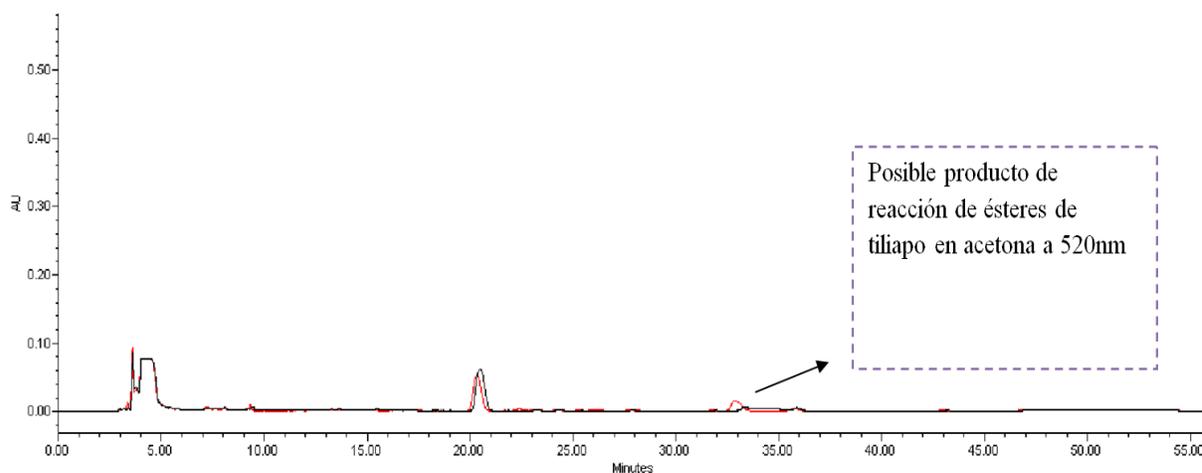


Figura 32. Cromatograma a 520 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. Línea negra: blanco de reacción, Línea roja: producto de reacción.

Como se observa en la figura 33 se realizó un análisis en CLAR a 520 nm para realizar una detección de antocianinas, se observa una pequeña señal con posibilidad de tratarse de antocianinas lipofilizadas. También se realizó un análisis en CLAR a 280 nm, para determinar compuestos ácidos fenólicos, como se observa en la figura 34.

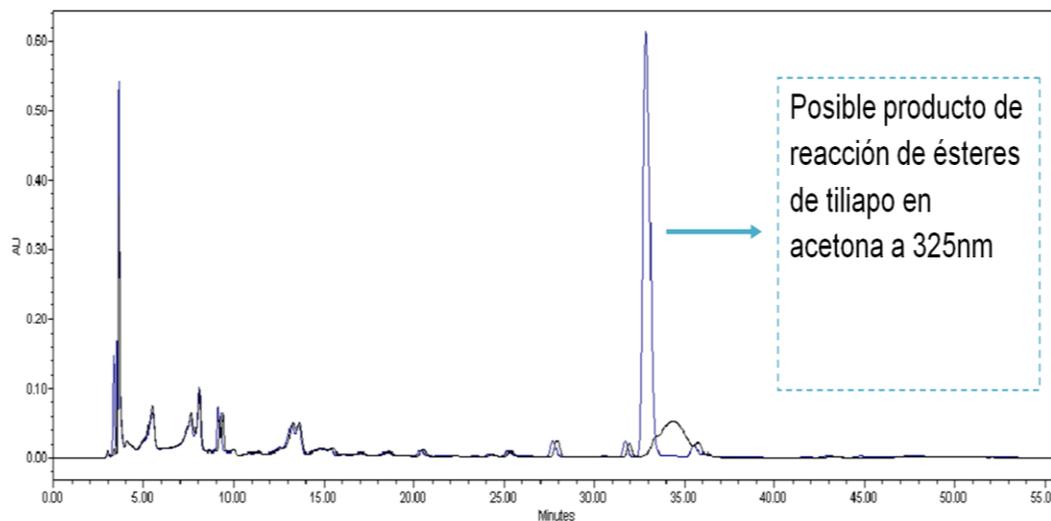


Figura 33. Cromatograma a 325 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de jamaica catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. Línea negra: blanco de reacción, línea azul: producto de reacción.

A una longitud de 325 nm se observan los ácidos fenólicos. En la figura 34 aparece una señal con un tiempo de retención a los 33 min, que podría indicar la lipofilización de algún ácido fenólico.

8.5.3.1.1. Reacción con antocianinas del maíz morado

Los resultados de la reacción de lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas con la enzima ANCUT1 se muestran en la figura 35.

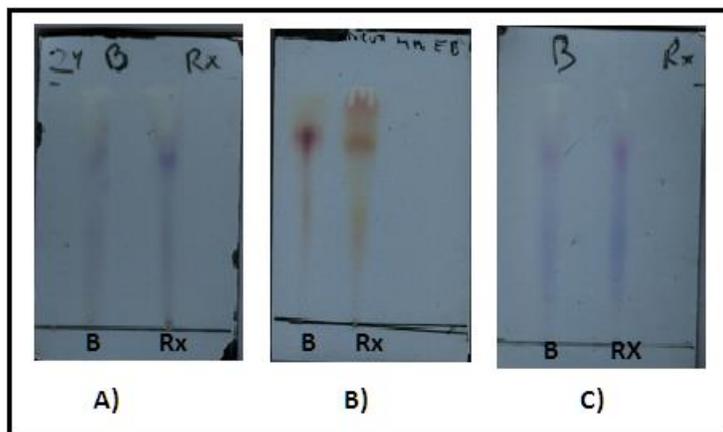


Figura 34. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, A); medio de reacción en isopropanol, B); Medio de reacción en Acetona, C); Medio de reacción en terbutanol. B; Blanco de reacción, Rx; reacción de lipofilización.

Como se observa en la figura 35, el Rf de las antocianinas no aumentó lo que podría indicar que no hubo reacción, tras revelar con UV.

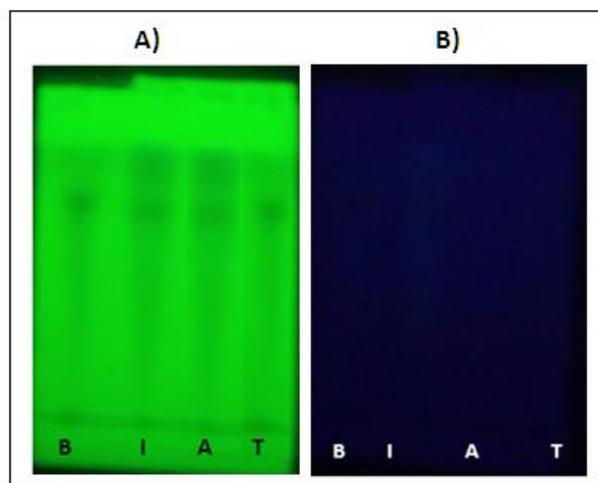


Figura 35. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT1 inmovilizada, usando como medio de reacción: I; isopropanol, A; acetona, T; terbutanol, B; blanco de reacción. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1). A) UV a 254nm y B) UV a 366nm.

En la figura 36 no presentó productos de reacción de lipofilización de algún ácido fenólico.

8.5.3.2. Análisis de productos de reacción de la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545.

8.5.3.2.1. Reacción con antocianinas de la Jamaica

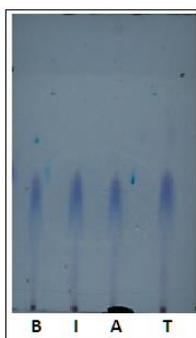


Figura 36. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas de Jamaica catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada, B; blanco de reacción, I; medio de reacción isopropanol, A; acetona; T; terbutanol. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1)

En la figura 37 se muestran los resultados de la reacción de lipofilización de antocianinas de la jamaica, donde se observa que el Rf no aumentó, lo que indica que la enzima ANCUT2 no realizó la transesterificación.

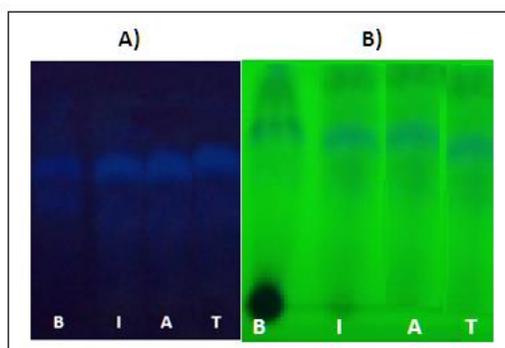


Figura 37. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas de la jamaica catalizadas por la enzima ANCUT 2 inmovilizada, usando como medio de reacción: I; isopropanol, A; acetona, T; terbutanol, B; blanco. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1). A) UV a 254nm y B) UV a 366nm.

En la figura 38 se muestra los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas o ácidos fenólicos de la Jamaica, observándose que no hubo reacción.

8.5.3.2.2. Reacción con antocianinas del maíz morado

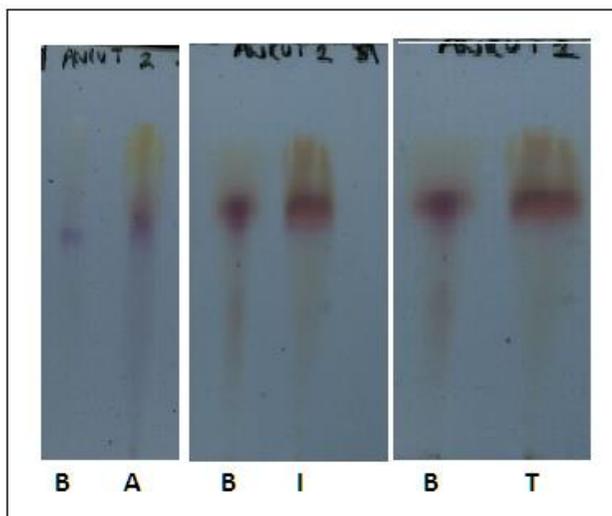


Figura 38. Cromatografía en capa fina de los resultados de la lipofilización de antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2: B; blanco de reacción, A; medio de reacción en acetona y I; medio de reacción en isopropanol, Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1).

En la figura 39 se muestran los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado, donde se observa que cualitativamente la enzima ANCUT2 en medio de reacción con acetona el Rf aumentó lo que podría indicar que la enzima ANCUT2 inmovilizada en Celite 545, realizó una reacción de transesterificación.

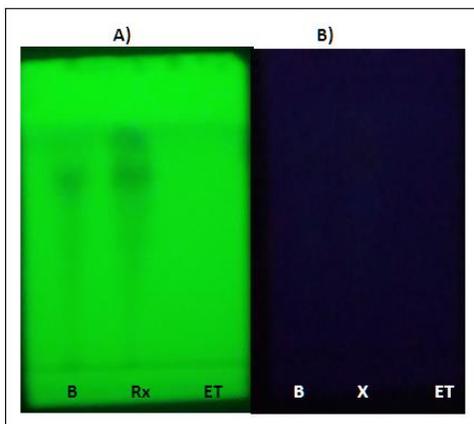


Figura 39. Productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. B; blanco de reacción, Rx; reacción química, ET; ésteres de tilipo. Se utilizó una elución de butanol, agua y ácido acético (6:3:1). A) UV a 254nm y B) UV a 366nm.

Como se observa en la figura 40 en la cromatoplaça A, se aprecia un producto de reacción, y posiblemente sea una antocianina lipofilizada, sin embargo al realizar un análisis en CLAR como se muestra en la figura 41 no se observa alguna señal que indique la presencia de antocianinas lipofilizadas

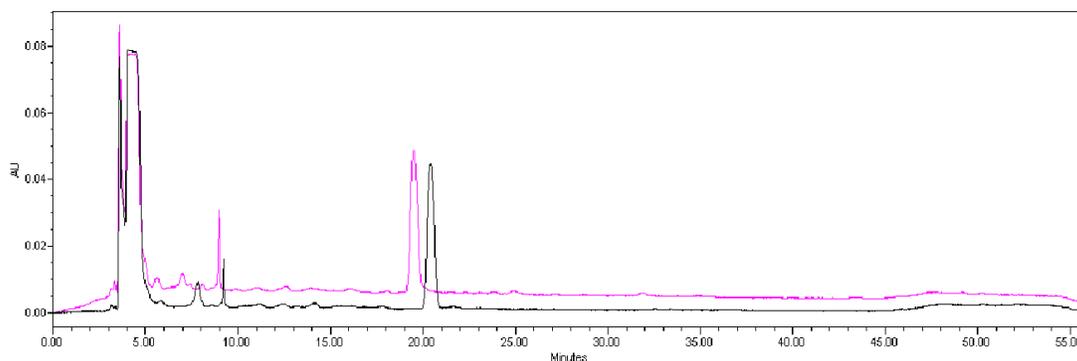


Figura 40. Cromatograma a 520 nm de los productos de reacción de la lipofilización de las antocianinas del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT2 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. Línea negra: blanco de reacción, Línea morada: producto de reacción.

Sin embargo a una longitud de 325 nm, mostrada en la figura 42, hay dos señales a los 25 min, que podrían ser ácidos fenólicos esterificados.

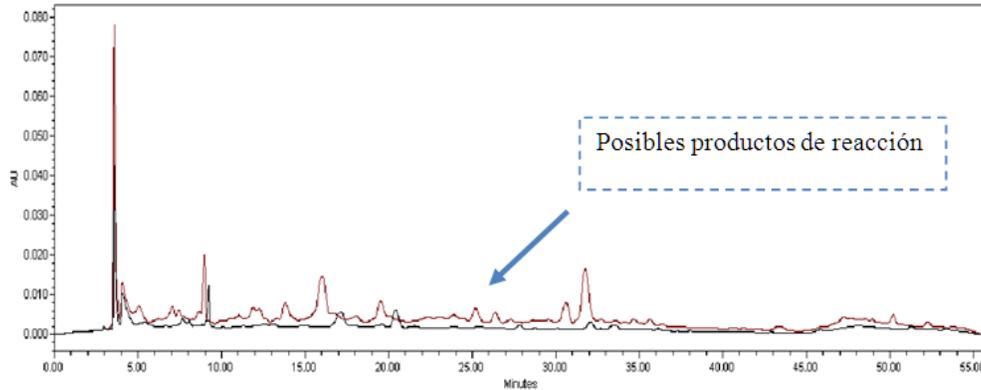
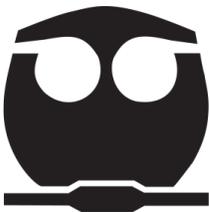


Figura 41. Cromatograma a 325 nm de los productos de reacción de la lipofilización del maíz morado catalizadas por la enzima ANCUT 2 inmovilizada, usando como medio de reacción acetona. Línea negra: blanco de reacción y línea roja: producto de reacción.



9. CONCLUSIONES

- Se inmovilizaron dos cutinasas de *Aspergillus nidulans* PW1 recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 expresadas en *P. pastoris*, sobre los soportes Accurel MP 1000 y Celite 545 respectivamente. Se obtuvieron las siguientes condiciones óptimas de inmovilización: cantidad de proteína 8.43 mg para la enzima ANCUT1 y 3.6 mg para la enzima ANCUT2 por gramo de soporte, pH 9.0, 4 °C y 250 rpm durante 24 horas.
- La enzima inmovilizada ANCUT1 en Accurel MP 100 presentó las siguientes características:
 - El pH óptimo de actividad que se observó fue a 9.0
 - La temperatura óptima fue de 30 °C
 - La enzima fue estable a 30 °C durante 15-60 min. A temperaturas más elevadas se presentó una inactivación de

- la enzima casi total observándose menos del 20% de actividad residual.
- La enzima inmovilizada presentó una mayor estabilidad con respecto a la enzima libre, teniendo 50% de actividad residual a pH 5 y 60% de actividad residual al pH 11 por 3 horas.
 - La enzima inmovilizada tuvo una especificidad por sustratos de cadena corta, media y larga.
 - La enzima fue empleada durante 7 ciclos de reuso.
 - Tuvo un almacenamiento de 115 días con una actividad residual del 50%.
- La enzima inmovilizada ANCUT2 en Celite presentó las siguientes características:
 - El pH óptimo de actividad que se observó fue a 9.0
 - La temperatura óptima fue de 40 °C
 - La enzima fue estable a 30 °C durante 15-60 min teniendo 80% de actividad residual. A temperaturas más elevadas se presentó una inactivación de la enzima observándose 40% de actividad residual a 60 °C de 15-60 min.
 - La enzima inmovilizada presentó una mayor estabilidad con respecto a la enzima libre, presentando 60% de actividad residual a pH 5-7 y menos del 30% de actividad residual en un rango de 9-11 pH por 3 h.
 - La enzima inmovilizada tuvo una especificidad por sustratos de cadena corta y media.
 - La enzima fue empleada durante 6 ciclos de reuso.
 - Tuvo un almacenamiento de 60 días con una actividad residual del 50%.

- La estabilidad de las enzimas inmovilizadas en condiciones de reacción de transesterificación, probando diferentes disolventes como diferentes temperaturas fue:
 - La enzima ANCUT1 presentó estabilidad en metanol y butanol a 37 °C teniendo 50 y 65% de actividad residual en metanol y 36 y 41% con butanol por 24 y 48 horas respectivamente.
 - La enzima ANCUT2 también presentó estabilidad tanto en metanol como en butanol a 37 °C teniendo 74% y 62% de actividad residual en metanol y en el caso de butanol se obtuvo 95% y 64% de actividad residual, a 24 y 48 h respectivamente.
- Las enzimas inmovilizadas llevaron a cabo la reacción de transesterificación del aceite que fue extraído de la semilla de tiliapo, utilizando la siguiente condición de reacción: relación molar butanol: aceite (3:1), 20% de enzima respecto al peso total de la reacción (aceite y solvente), a 37 °C, por 120 h. presentando los siguientes porcentajes de ácidos grasos butilados:
 - La enzima ANCUT1 presentó conversiones del 90%.
 - La enzima ANCUT2 presentó conversiones del 65%.
- Las antocianinas que se extrajeron fueron empacadas en sílice, y mantuvieron su actividad antioxidante.
- La estabilidad de las enzimas inmovilizadas en condiciones de reacción de lipofilización de antocianinas, probando diferentes disolventes como diferentes temperaturas fue:
 - La enzima ANCUT1 es estable en acetona, isopropanol y terbutanol a 37 y 50 °C, por 24 y 48 horas manteniendo más del 50% de actividad residual.

- La enzima AN CUT2 presentó actividad en acetona, isopropanol, terbutanol a 37 °C a 24 y 48 horas teniendo más del 50% de actividad residual.
- Se obtuvieron compuestos antioxidantes lipofilizados de interés en el área de alimentos utilizando la siguiente condición de reacción: acetona, relación molar 1:5 (antocianinas: ésteres de butilo), 20% de enzimas, a 37 °C 120 h. Se obtuvieron posiblemente antocianinas o algún ácido fenólico utilizando los ésteres de butilo del aceite de tiliapo, generados como donadores del grupo acilo.



10. RECOMENDACIONES

- Optimizar las condiciones de la reacción de transesterificación para incrementar el rendimiento y probar con metanol emulsionado en aceite.
- Optimizar las condiciones de lipofilización de antocianinas.
- Evaluar la capacidad de las enzimas para la lipofilización de otros sustratos con actividad biológica.

11. BIBLIOGRAFÍA

Arroyo M. (1998). Immobilized enzymes: Theory, methods of study and applications. Ars Pharmaceutica. 3-10.

Barros D., Lemos F., Fonseca P. L, Carbral J. (2010). Kinetic cutinase-catalyzed esterification of caproic acid in organic solvent system. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 66: 285-293.

Bermúdez García E. P. (2013). Bases Moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinolítico de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. UNAM.

Bermúdez García E. P. (2010). Modificación enzimática de flavonoides con las carboxilesterasas de *Bacillus pumilus* GMA1. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Bobadilla-Carrillo G.I., Valdivia-Reynoso M.G., Machuca-Sánchez M.L., Balois-Morales R., González-Torres L. (2016). Factores precosecha, cosecha y poscosecha inherentes al cultivo de jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.): Una revisión. *Revista BioCiencias*. 4 (3): 256-268.

Borrás-Linares I., Fernández-Arroyo S., Arráez-Romana D. y Palmeros-Suárez A. (2015). Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican *Roselle*. *Industrial Crops and Products*. 69: 385–394.

Bornscheuer, UT. (2002). Microbial carboxil esterases: classification, properties and applications in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews*. 26 (1): 73-81.

Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72 (1): 248

Castañeda C. B., Ibañez A. L. y Mejía R. M. (2005). Estudio Fitoquímico Farmacológico del *Zea mays* L. (maíz morado). *Cultura*. 106-130.

Castro Ochoa L. D. (2014). Producción, identificación y caracterización de carboxilesterasas de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado. UNAM.

Castro-Ochoa D., Peña-Montes C. y Farrés A. (2010). Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 13 (1): 16-25.

Castro Rodríguez J. A. (2014). Inmovilización y caracterización bioquímica de carboxilesterasas de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Castro Rodríguez J. A. (2017). Mejoramiento de la producción de la cutinasa ANCUT 1 utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Tesis de Maestría. UNAM.

Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J., & Ghouil M. (2006). Enzymatic acylation of flavonoids. *Process Biochemistry*. 41: 2237–2251.

Chen S., Su L., Chen J. y Wu J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*. 31 (1): 1754-1767.

Chen Z, Franco CF, Baptista RP, Cabral JMS, Coelho AV, Rodrigues C.J. (2007). Purification and identification of cutinases from *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 73: 1306–1313.

Cid-Ortega y J.A Guerrero-Beltrán. (2012). Propiedades funcionales de la Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*). *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 6 (2): 47-63.

Cissé M., Bohuon P., Sambe F., Kane C., Sakho M. y Dornier M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering*. 109: 16-21.

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

EasySelect™ Pichia Expression Kit. Version G 122701 25-0172.

Egmond MR, Bommel van CJ. (1997). Impact of structural information on understanding lipolytic function. *Methods in enzymology*. 284: 119–129.

Esqueda Domínguez Katia. (2012). Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría. UNAM .

Esquivel Bautista R. (2011). Producción regioselectiva de 7-o-lauroilo de ácido kójico por carboxilesterasas. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Farah Diba, A.B. *et al.* (2005). Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen,

Glomerella cingulata. Asia Pacific. Internaional Journal of Biology Biotechnology. 13 (2): 63-69.

Fernández Aulis M. Fernanda. (2014). Identificación y cuantificación de antocianinas aciladas de plantas endémicas de México (maíces y salvias). Tesis de Maestría. UNAM .

Fett, W.F., Gerard, H.C., Moreau, R.A., Osman, S.F. & Jones, L.E. . (1992). Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutindegarding enzymes. Applied Environmetal Microbiology. 58 (7): 2123-2130.

Fett, W.F., Wijey, C., Moreau, R.A. & Osman, S.F. (1999). Production of cutinase by *Thermonospora fusca* ATCC 27730. Journal of Applied Microbiology. 86: 561-568.

Figueroa-Espinoza M. C. y Villeneuve P. (2005). Phenolic Acids Enzymatic Lipophilization. Journal Agricultural and Food Chemistry. 53: 2779–2787.

Fontes T., Alves G. (2009). Cutinases: Properties and Industrial Applications. In Advances in Applied Microbiology. 1 (66): 77-95.

Frey Aguilar Rodrigo. (2016). Estudio de algunos fitoquímicos de capulín, xoconostle, papaya, piñón y mamey frutas originarias de México. Tesis de Lincenciatura. UNAM.

Galagan J. E., Calvo S. E., Cuomo C, Ma L. J., Wortman J. R. , Batzoglou S., Lee S. I., Spevak C. C., Clutterbuck J., Kapitonov V., Jurka J., Scazzocchio C., Farman M., Butler J., Purcell S., Harris S. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. Nature. 438: 1105-1125.

Ghanem A. (2007). Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. Tetrahedron. 63 (786): 1721-1754.

González-Soberanis C. y Casas A. (2004). Traditional management and domestication of tempesquistle, *Sideroxylon palmeri* (*Sapotaceae*) in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Central Mexico. Journal of Arid Environments. 59: 245–258.

Grajeda-Iglesias C., Salas, Barouh N., Baréa B., Figueroa-Espinoza M. C. (2017). Lipophilization and MS characterization of the main anthocyanins purified from *Hibiscus flowers*. *Food Chemistry*. 230: 189–194.

Guerrero-Olazarán M., Cab-Barrera E., Galán-Wong L. y Viader-Salvadó J.M. (2004). Biotecnología de Proteínas Recombinantes para la Aplicación en Acuicultura. *Avances en Nutrición Acuicola*. 7: 418-440.

Guillén-Sánchez J., Mori-Arismendi S.; Paucar-Menacho L. (2014). Características y propiedades funcionales del maíz morado. *Scientia Agropecuaria*. 5: 211 - 217.

Hariom Kumar Sharma, Moonmoon Sarkar, Shashi Bhushan Choudhary, A. Anil Kumar, R.T. Maruthi, Jiban Mitra y Pran Gobinda Karmakar. (2016). Diversity analysis based on agro-morphological traits and microsatellite based markers in global germplasm collections of roselle (*Hibiscus sabdariffa L.*). *Industrial Crops and Products*. 89: 303-315.

Heba A. Sindi, Lisa J., Marshall Michael R.A., Morgan. (2014). Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chemistry*. 164: 23-29.

Heredia A., Casado C.G., Laguna L., Reina J.J., Serrano J.M. y Domínguez E. (1998). La cutícula vegetal: estructura y funciones. *Ecología*. (12): 293-305.

Huamán-Alvino C., Aquino-Méndez E., Chirinos R., Campos D., y Gálvez-Ranilla L. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de accesiones de maíz (*Zea mays L.*). *Agronomía Colombiana*. 34: 1352-1355.

Hynes M.J., Murray S.L., Duncan A., Khew G. S., Davis M.A. (2006). Regulatory genes controlling fatty acid catabolism and peroxisomal functions in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*. 5(5): 794-805.

Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W. & Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*. 53 (1): 315-351.

Karpushova A., Brümmer F., Barth S., Lange S., Schmid R. D. (2005). Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of

novel esterases from *Bacillus sp.* associated with the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 67: 59-69.

Kasturi Dutta, Shampa Sen y Venkata Dasu Veerank. (2009). Production, characterization and applications of microbial cutinases. *Process Biochemistry*. 44: 127–134.

Kim YH, Lee J, Moon SH. (2003). Uniqueness of microbial cutinases in hydrolysis of p-nitrophenyl esters. *Journal Microbiology Biotechnology*. 13: 57–63.

Kolattukudy P. E. (1985). Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 23 (1): 223-250.

Kumar S.S, Manoj P., Shetty N. P., Giridhar P. (2016). Effect of different drying methods on chlorophyll, ascorbic acid and antioxidant compounds retention of leaves of *Hibiscus sabdariffa* L. *Journal of the Science of Food Agriculture*. 95 (9): 1812-20.

Kwon M., Suk Kim Hyun, Ho Yang Taek, Keun Song Bong, Kwang Song Jae. (2009). High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*. 68: 104–109.

Laemmli U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227 (5259): 680-685.

Madej T., Lanczcki C.J., Zhang D., Thiessen P.A., Geer R. C., Marchler-Bauer A, Bryant S. H. (2014). MMDB and VAST: tracking structural similarities between macromolecular complexes. *Nucleic Acids Research*. 42: 297-303.

Maeda, H. *et al.* (2005). Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 67: 778-788.

Martínez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. & Cambillau, C. . (1992). *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature*. 35 (6):323-345.

Masaki, K., Kamini, N.R., Ikeda, H. & Iefuji, H. . (2005). Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic

acid and others biodegradable plastics. *Applied and Environmental Microbiology*. 71 (11): 7548-7550.

Mastropaolo W., Yourno J. (1981). An ultraviolet spectrophotometric assay for alpha-naphthyl acetate and alpha-naphthyl butyrate esterases. *Analytical Biochemistry*. 115 (1): 188-93.

McQueen, D.A.R. & Schottel. (1987). Purification and characterization of a novel Extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *Bacteriological*. 169 (5):1967-1971.

Morales García S. L. (2015). Purificación y caracterización de la enzima recombinante ANCUT 1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Nawani N., Dosanjh N., Kaur J., (1988). A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnology Letters*. 20 (10): 997-1000.

Newman Mark F. (2008). Sapotaceae Juss. In primera (Ed.), *Flora del Valle de Tehucán-Cuicatlán* (Vol. 57, pp. 1-29).

Nyyssölä A. (2015). Which properties of cutinases are important for applications?. *Applied Microbiology Biotechnology*. 99: 4931-4942.

Ordoñez García P. (2017). Cuantificación de compuestos bioactivos en frutas originarias de México de la región semiárida. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Peña Montes C. (2009). Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa SteI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado. UNAM .

Carolina Peña-Montes, María Elena Mondragón-Tintor, José Augusto Castro-Rodríguez, Ismael Bustos-Jaimes, Arturo Navarro-Ocaña, and Amelia Farrés¹ (2013). Immobilization and Biochemical Properties of the Enantioselective Recombinant NStcI Esterase of *Aspergillus nidulans*. *Hindawi Enzyme Research*. 1-12.

Rubio M.B., Cardoza, R.E., Hermosa R., Gutiérrez, S. & Monte, E. (2008). Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Current Genetics*. 54: 301-312.

Sánchez Ferrer, Antonio. (1998). Recuperación, purificación y caracterización de lipasas producidas por *Candida rugosa*. Aplicación a la resolución de compuestos quirales y diseño del reactor enzimático. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona.

Sari P., Setiawan A. and Siswoyo T.A. (2015). Stability and antioxidant activity of acylated jambolan (*Syzygium cumini*). *International Food*. 22 (2): 671-676.

Sebastian J, Kolattukudy PE. (1988). Purification and characterization of cutinase from a fluorescent *Pseudomonas putida* bacterial strain isolated from phyllosphere. *Archives of Biochemical and Biophysical Research*. 263: 77-85.

Seo H.S. *et al.* (2007). *Pseudozyma jejuensis sp. nov.*, a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Research*. 7 (6): 1035-1045.

Serrano D., López L. M., Espuñes S., Rosario T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*. 37 (4): 58-68.

Shayk, M. & Kolattukudy, P.E. (1977). Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiology*. 60: 907-915.

Sirisha V.L., Jain A y Jain Amita. (2016). Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. *Advances in Food and Nutrition Research*. 79: 1-33.

Solís Báez I. (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante ANCUT1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Tafolla-Arellano J., González-León A., Tiznado-Hernández M., Zacarías García L. y Báez-Sañudo R. (2013). Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 36 (1): 3-12.

Trail F y Koller W. (1990). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi evidence for a relationship between enzyme properties and tissue specificity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 36: 495-508.

Trail F y Koller W. (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification characterization of two cutinases from *Alternaria brassicicola*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 42: 205–220.

Vega Pérez, Fernanda P. (2013). Purificación y caracterización de la cutinasa ancut1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Vergara Barroso A. M. Pilar. (2010). Inmovilización de esterases a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría. Departamento de Alimentos y Biotecnología. UNAM.

Viniegra González G. (2003). Producción de enzimas por *Aspergillus*. *BioTecnología*. 8 (2): 18-30.

12. APÉNDICE

12.1. Medios de cultivo utilizados para la producción de las cutinasas recombinantes (Morales, 2014).

12.1.1. Medio YPD 2X

Tabla 30. Composición del medio YPD 2X

Componente	25 mL	50 mL
Extracto de levadura 1%	0.5 g	2 g
Peptona 2%	0.1 g	4 g
Agua desionizada	20 mL	40 mL
Dextrosa 10x	5 mL	10 mL

*El medio sin dextrosa se esterilizó en autoclave, después se adiciono la dextrosa ya filtrada por una membrana de 0.22mm.

12.1.2. Medio YP-Glicerol

El igual al medio YPD con la diferencia de que se adiciona glicerol en lugar de dextrosa.

Tabla 31. Composición del medio YPD-Glicerol

Medio YPD	10 mL	20 mL
Glicerol	10 mL	20 mL

12.1.3. Medio BMGY

Se utilizó un matraz estéril de 250mL para preparar 25mL de medio y un matraz de 500mL para 50mL.

Tabla 32. Composición del medio BMGY.

Composición	25 mL	50mL
Stock de fosfatos 10X pH 6	2.5 mL	5 mL
Stock YNB 10X	2.5 mL	20 mL
Stock de biotina 500X	50 μ L	100 μ L
Stock glicerol	2.5 mL	5 mL
Agua estéril	17.5 mL	35 mL

12.1.4. Medio YP

Se utilizó un matraz de 500mL para 70mL de medio y un matraz de 1L para 140mL de medio.

Tabla 33. Composición del medio YP

Componente	70 mL	140 mL
Extracto de levadura	1 g	2 g
Peptona 2%	2 g	4 g
Agua desionizada	70 mL	140 mL

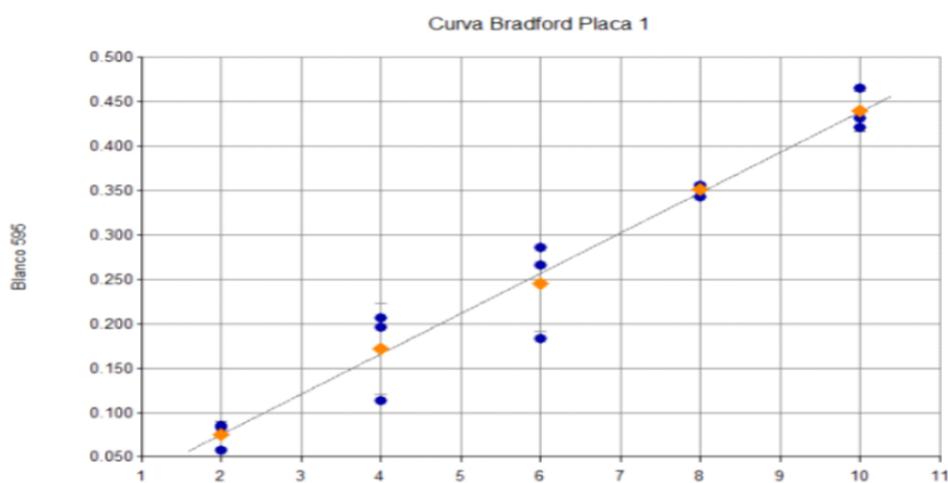
12.1.5. Medio BMMY

Tabla 34. Composición del medio BMMY

Componente	100 mL	200 mL
Medio YP	70 mL	140 mL
Stock de fosfatos 10x	10 mL	20 mL

Stock YNB 10x	10 mL	20 mL
Stock biotina 500x	50 µL	100 µL
Metanol 10x	10 mL	20 mL

12.2. Calibración para cuantificación de proteína (Bradford)



Gráfico

27. Calibración para la cuantificación de proteína

Tabla 35. Resultados de la curva de calibración de Bradford

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

12.3. Curva de calibración de cuantificación de actividad enzimática

Se utilizó como referencia p-nitrofenol de 25-200 µmol, realizando la lectura a 420 nm

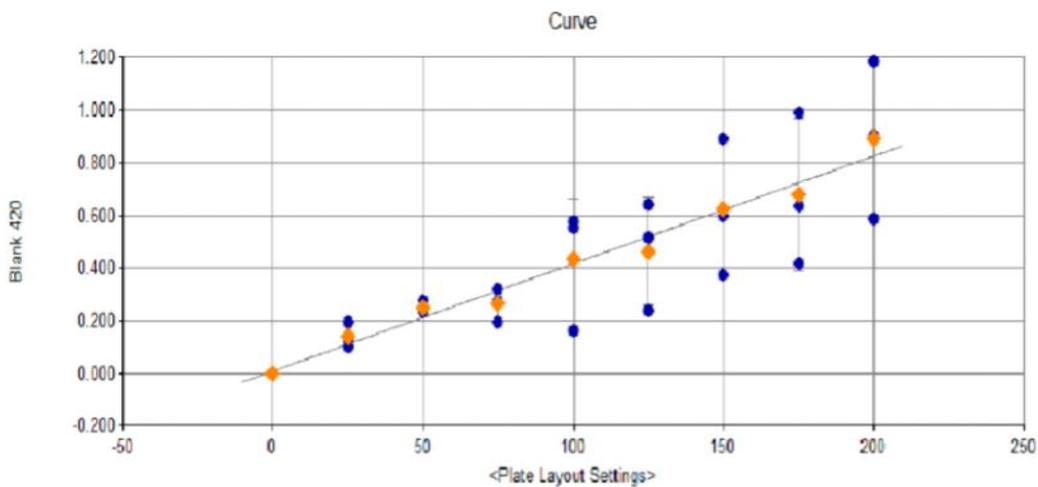


Tabla 36. Resultados de la curva de calibración de cuantificación de actividad enzimática

Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
Y=A*X+ B	0.00409	0.00796	0.978