



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Reacciones de transesterificación empleando cutinasas producidas por *Aspergillus nidulans* PW1

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Israel Isaac Rivera Enciso

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Amelia Farrés González Sarabia
[Facultad de Química](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dr. Arturo Navarro Ocaña
[Facultad de Química](#)
Dr. Manuel Jiménez Estrada.
[Instituto de Química](#)

Ciudad de México, Junio 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

Dr. Sergio Sánchez Esquivel

Dr. Miquel Gimeno Seco

Dr. Carlos Felipe Peña Malacara

Dr. Ismael Bustos Jaimes

Dr. Francisco Ruiz Terán

Este trabajo se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, de la Facultad de Química, bajo la tutela de la Dra Amelia Farrés.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (beca 323109), PAPIIT IN231311 y CONACYT 153500

Agradecimientos

- A la Dra. Amelia Farrés por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, su apoyo durante el posgrado y posterior al mismo.
- A la Dra. Carolina Peña, por el tiempo que siempre tuvo para atender cualquier duda o dificultad que surgiera.
- A la Dra. Hilda Calderón, gracias a sus consejos y contribución al desarrollo de la detección de cromatografía de gases.
- A Ingrid, Brenda y Augusto, por apoyarme con su amistad y auxilio en el laboratorio.
- A los miembros del comité tutorial: al Dr. Navarro por sus observaciones puntuales y al Dr. Manuel Jiménez por sus ánimos y consejos.
- A los compañeros del laboratorio 312 por auxiliarme e integrarme en el grupo de trabajo del departamento de alimentos.

Dedicatorias

- A mis padres, cuyo amor y apoyo incondicional han impulsado siempre mi avance tanto profesional como personal.
- A mi hermana, quien siempre tiene una palabra de ánimo cuando estoy abrumado por los problemas.
- A mi familia, que trasciende barreras simples como la distancia y siempre supieron alentarme y orientarme aunque estuviese perdido.

Índice

Resumen.....	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	4
2.1 Enzimas.....	4
2.1.1 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos	5
2.1.2 Reacciones catalizadas	6
2.1.3 Cutinasas y su importancia.....	8
2.2 Hongos y el género <i>Aspergillus nidulans</i>	10
2.2.1 <i>Aspergillus nidulans</i>	11
2.3 Inmovilización de enzimas	11
2.3.1 Retención física	13
2.3.2 Unión química	13
2.4 Aplicación de los biocatalizadores	19
2.4.1 Producción de biodiesel	19
3. Justificación	28
4. Hipótesis.....	29
5. Objetivos	30
5.1 Objetivos generales.....	30
5.2 Objetivos particulares	30
6. Materiales y métodos	31
6.1 Materiales	31
6.2 Estrategia experimental	32
6.2.1 Microorganismo	33
6.2.2 Medios de cultivo	33
6.2.3 Crecimiento de <i>A. nidulans</i> y cosecha de esporas	35
6.2.4 Producción y análisis de enzima.....	35
6.2.5 Inmovilización.....	37
6.2.6 Análisis de biocatalizador	39
6.2.7 Condiciones de reacción para la transesterificación.....	40
6.2.8 Determinación de productos de transesterificación.....	41

7. Resultados y discusión	42
7.1 Producción de la enzima	42
7.1.2 Determinación de pH	43
6.1.3 Determinación de proteína extracelular	45
7.1.4 Determinación de actividad enzimática por métodos cualitativo y cuantitativo	46
7.2 Identificación de las proteínas con actividad esterasa por geles SDS-PAGE y zimogramas ...	48
7.3 Inmovilización de enzimas	51
7.3.1 Inmovilización en Accurel MP100	51
7.3.2 Inmovilización en Nylon 6	53
7.3.3 Inmovilización en Celite 545	54
7.3.4 Formación de Agregados Enzimáticos Entrecruzados (AEE)	56
7.3.5 Cuantificación de actividad del biocatalizador.....	56
7.4 Síntesis de metil ésteres.....	57
7.5 Determinación de metil ésteres.....	58
7.5.1 Cromatografía de capa fina	58
6.5.2 Cuantificación de productos por cromatografía de gases	60
7.5.3 Identificación del producto de reacción por Espectrometría de masas	60
8. Conclusiones	62
9. Perspectivas	63
10. Bibliografía	64
Anexo	71
Anexo A. Curva patrón para la determinación de proteína mediante el método de Bradford	71
Anexo B. Curva patrón de <i>p</i> NP para la determinación de esterasa.....	72
Anexo C. Estándar para cromatografía de gases.....	73
Anexo D. Cromatograma del estándar de oleato de metilo en cromatografía de gases.....	74
Anexo E. Cromatograma del estándar de linoleato de metilo en cromatografía de gases	75
Anexo F. Cromatograma del producto de reacción de AN CUT1 en cromatografía de gases	78
Anexo G. Cromatograma del producto de reacción de AN CUT2 en cromatografía de gases	77
Anexo H. Determinación del producto en espectrometría de masas.....	78

Índice de figuras

Figura 1 Representación del motivo α/β hidrolasa característico de las enzimas	6
Figura 2 Diagrama de la ubicación de la tríada catalítica	9
Figura 3 Distintos medios de inmovilización para enzimas en soportes	12
Figura 4 Representación del proceso de inmovilización covalente	14
Figura 5 La unión de la enzima al soporte se da por medios físicos	16
Figura 6 Formación de una monocapa para la cobertura total de la superficie de un soporte	17
Figura 7 Proceso de inmovilización por agregados enzimáticos	18
Figura 8 Determinación de actividad hidrolítica de ANCUT1 y ANCUT2 con acetato de α -naftilo y FastRed	48
Figura 9 Perfil de proteínas en gel SDS PAGE del extracto crudo con la proteína ANCUT1	48
Figura 10 Perfil de proteínas en gel SDS PAGE del extracto crudo con la proteína ANCUT2	49
Figura 11 Zimograma de comparación de esterasas encontradas en distintas condiciones de producción	50
Figura 12 Aplicación de agregados enzimáticos entrecruzados de ANCUT1 y en el ensayo con métodos colorimétricos	56
Figura 13 Nylon 6 posterior a una reacción de transesterificación	57
Figura 14 Síntesis de ésteres de metilo con ANCUT2 en cromatografía de capa fina	58
Figura 15 Síntesis de ésteres de metilo con ANCUT1 en cromatografía de capa fina	59
Figura 16 Reacciones de transesterificación con aceite de jatrofa	59
Figura 17 Reacciones de transesterificación con aceite de coco	60
Figura 18 Cromatograma de espectrometría de masas que representa al 9-12 dioctadecanoato (linoleato de metilo)	61
Figura 21 Cromatograma de espectrometría de masas que representa al 9 octadecanoato de metilo (oleato de metilo)	61

Índice de esquemas

Esquema 1 Distintas reacciones catalizadas por lipasas	7
Esquema 2 Cambios estructurales de la enzima durante la reacción de hidrólisis	8
Esquema 3 Resolución de productos para comprobar la estereoselectividad de cutinasas	10
Esquema 4 Proceso de transesterificación con catalizador alcalino	21

Esquema 5 Proceso de transesterificación con catalizador ácido	23
Esquema 6. Reacción de transesterificación mediada por la tríada catalítica de una Carboxilesterasa	24

Índice de tablas

Tabla 1 Aplicación de hidrolasas	4
Tabla 2 Grupos funcionales comunes para inmovilizar covalentemente a soportes	15
Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas del biodiesel de ajonjolí	20
Tabla 4 Comparación de características entre la síntesis homogénea y la síntesis heterogénea	27
Tabla 5 Aceites empleados para síntesis de ésteres de metilo	27
Tabla 6 Reactivos empleados durante los experimentos	31
Tabla 7 Composición del medio mínimo para <i>A. nidulans</i> PW1	33
Tabla 8 Composición de la solución de Sales 20x	33
Tabla 9 Composición de la solución de elementos traza 100x	34
Tabla 10 Composición del medio de cultivo para inducir ANCUT1	34
Tabla 11 Composición del medio de cultivo para inducir ANCUT2	35
Tabla 12 Actividad hidrolítica de cada catalizador obtenido para ANCUT1	56
Tabla 13 Actividad hidrolítica de cada catalizador obtenido para ANCUT2	57
Tabla 14 Concentración de metil ésteres producidos	60

Índice de gráficas

Gráfica 1 Crecimiento de <i>A. nidulans</i> durante 72 h en el medio de inducción de ANCUT1	42
Gráfica 2 Crecimiento de por <i>A. nidulans</i> durante 48 h en el medio de inducción de ANCUT2	43
Gráfica 3 Variación del pH del extracto crudo con ANCUT1 a lo largo del proceso de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	44
Gráfica 4 Variación del pH del extracto crudo con ANCUT2 a lo largo del proceso de crecimiento de <i>A. nidulans</i>	44
Gráfica 5 Producción de proteína en el medio para inducir ANCUT1 obtenida durante los distintos tiempos de la fermentación	45
Gráfica 6 Producción de proteína en el medio para inducir ANCUT2 obtenida durante los distintos tiempos de la fermentación	45
Gráfica 7 Actividad específica de esterasa de la enzima ANCUT1 por <i>A. nidulans</i>	46

Gráfica 8 Actividad específica de esterasa de la enzima ANCUT2 por <i>A. nidulans</i>	47
Gráfica 9 Rendimiento de inmovilización de ANCUT1 en Accurel MP1000	51
Gráfica 10 Rendimiento de inmovilización de ANCUT2 en Accurel MP1000	52
Gráfica 11 Rendimiento de inmovilización de ANCUT2 en Nylon 6	53
Gráfica 12 Rendimiento de inmovilización de ANCUT1 en Celite 545	54
Gráfica 13 Rendimiento de inmovilización de ANCUT2 en Celite 545	55

Resumen

En este trabajo se presenta la evaluación de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2, sintetizadas por *Aspergillus nidulans*, en la transesterificación de aceites comestibles, así como el desarrollo de biocatalizadores con las enzimas inmovilizadas. Las cutinasas se produjeron en matraces agitados, se determinó la relación entre el punto máximo de producción de las proteínas de interés y su desarrollo micelar. El extracto crudo se concentró por ultrafiltración y se preservó por liofilización para la preparación de los biocatalizadores. Inicialmente se consideró el polipropileno Accurel MP1000, que había sido empleado con éxito por el grupo de trabajo en la inmovilización de las enzimas ANCUT2 (29 kDa), PrtA (37 kDa) y Nstcl (32 kDa), pero no con ANCUT1 (22 kDa). Además, se consideró el uso de otros soportes, tales como el Nylon 6 (poliamida sintética), Agregados Enzimáticos Entrecruzados (AEE's) y Celite 545 (óxido de sílice). La evaluación preliminar mostró que Celite 545 es el soporte más adecuado para llevar a cabo las reacciones de transesterificación de aceite de ajonjolí con metanol. Cabe destacar que este soporte ofrece facilidad de manejo, de preparación y gran área de contacto con sustratos. Se obtuvo un rendimiento de inmovilizado de 14% para proteína y 37% de actividad enzimática para ANCUT1, mientras que para ANCUT2 se retuvo un 52% de proteína y 86% de actividad enzimática.

Estos biocatalizadores se emplearon para la producción de ésteres de metilo, mezcla generalmente conocida como biodiesel, a partir de aceite comestible de ajonjolí. Se evaluaron variaciones de la concentración de metanol en el medio y de humedad relativa. Se determinó que las condiciones de reacción óptimas para 1 mL de aceite fueron una relación molar aceite:metanol 1:6; 300 mM metanol adicionado en 2 pasos, agitación de 300 rpm durante 48 horas. Cualitativamente, por cromatografía en capa fina, se detectó el producto esperado. Posteriormente se determinó la concentración de ésteres de metilo en el medio a través de cromatografía de gases y se comprobó su identidad por espectrometría de masas.

El resultado dio las bases para la generación de un biocatalizador estable, activo y económico, una alternativa a la lipasa de *Candida antarctica* comercializada como Novozym 435, para poder realizar reacciones de síntesis orgánica, en particular, la producción de ésteres de metilo a partir de aceite de origen vegetal.

1. Introducción

La biotecnología se define como el conjunto de técnicas que usan organismos vivos, o sustancias producidas por ellos, para hacer o modificar un producto, incluyendo técnicas usadas para la mejora de las características de plantas y animales importantes para la economía. Esta multidisciplinaria ha tenido un auge en la segunda mitad del siglo XX, pero sus orígenes pueden trazarse a formas de producción más primitivas, como lo es la fermentación de bebidas alcohólicas en la antigüedad, donde los biorreactores eran simples jarrones (Clark, 2009).

Las reacciones que interesan a la biotecnología generalmente dependen de un catalizador para que se produzcan a un ritmo importante (Jegannathan et al., 2013). Los catalizadores se definen como moléculas que reducen la barrera energética que se requiere para la conversión de una sustancia a productos deseados, lo que se logra mediante la interacción del catalizador con un sustrato y, producir un compuesto transitorio para, finalmente, dejar al catalizador intacto y obtener los productos de reacción (Illanes, 2008). El catalizador no se consume, pero en las reacciones tiene vida útil limitada y sólo mientras conserve su estructura activa podrá realizar su función. En sistemas biológicos se puede resaltar a ciertas proteínas con capacidades catalíticas: las enzimas, catalizadores altamente eficientes que funcionan en condiciones de reacción fisiológicas.

Estos catalizadores no solo funcionan en ambientes particulares, sino que se ha logrado su aplicación en condiciones muy distintas a las de la fuente original (Hamdy et al., 2012). Las enzimas tienen el problema de perderse en el medio de reacción, aunque existe la posibilidad de prepararlas como biocatalizadores insolubles que se pueden utilizar en múltiples ocasiones, lo que reduce costos, y por lo tanto las vuelve interesantes para su aplicación en la industria. A este proceso de insolubilización se le conoce como inmovilización y se clasifica de acuerdo a cómo se retiene la enzima: por métodos físicos o químicos (Brady et al., 2009). Como resultado, el soporte ofrece estabilidad a la enzima ante los efectos nocivos de las condiciones de reacción, así como de algunos factores que la desestabilizan de manera parcial o incluso irreversible, lo que se traduce en disminución de actividad o en la completa inactivación de la misma.

La fuente de obtención de enzimas incluye desde células animales hasta microorganismos, y estos últimos se prefieren por obtenerse mayores rendimientos. Además, es posible producir enzimas de origen vegetal o animal con sistemas recombinantes, incluso en sistemas eucarióticos como *Pichia pastoris*, lo que facilita su producción a gran escala. Entre los hongos empleados para producir enzimas, tenemos a *Aspergillus nidulans*, cuyo genoma ya ha sido secuenciado y es bien conocido por la ciencia. En el grupo de trabajo se emplea una cepa de este hongo de la cual se han producido exitosamente una proteasa con actividad promiscua de carboxilesterasa (Castro, 2008), una esterasa que fue clonada exitosamente en *P. pastoris* (Peña, 2009) y dos cutinasas, AN CUT1 y AN CUT2 (Vergara, 2010 y Esqueda, 2012). Estas últimas poseen alta actividad catalítica de esterasa y son inducidas por fuentes de carbono específicas para la expresión de cada una: AN CUT1 es inducida por una fuente de carbono que pudiera considerarse “desecho” pues proviene de la cáscara de manzana, mientras que AN CUT2 requiere la presencia de aceite de olivo en el medio.

Las cutinasas, como las lipasas, poseen el potencial de aplicación en la industria para muchos productos (Carvalho et al., 1998) como detergentes, fármacos, ácidos grasos y biodiesel (Badenes et al., 2010). A continuación se define este último producto.

El biodiesel contiene un conjunto de ésteres de metilo y es un tipo de biocombustible que se deriva de aceites comestibles (canola, soya, girasol, aguacate, uva, cacahuete, coco o chía) o no comestibles (jatrofa, ricino, algodón, tabaco o árbol de resina) y se obtiene mediante reacciones específicas, enzimáticas o no (Jain, 2010; Atadashi et al., 2011 y Demirbaş, 2002). Los sustratos de obtención son baratos o derivados de desecho y los biocatalizadores tienen mejor rendimiento y por lo tanto, se ha ganado la atención de la industria para la producción a gran escala del biocombustible. Los ésteres de metilo son un tipo de biocombustible más limpio en su combustión, además de que carecen elementos que provocan la formación de lluvia ácida (Zabeti et al., 2010). Otra de sus ventajas es que los motores de combustión actual son compatibles con el mismo y por lo tanto requieren modificaciones mínimas para su introducción. Se ha documentado que el uso de una mezcla del 10% de biodiesel con petrodiesel contribuye a la limpieza del motor. Algunas de sus desventajas es que tiene un punto de nube relativamente bajo, lo que aumenta la opacidad del combustible y comienza a volverse sólido a bajas temperaturas, dependiendo del largo de la cadena alifática del ácido graso de procedencia, lo que limita su uso en climas fríos. La combustión no produce tanta energía como su contraparte fósil (Knothe, 2013 y Jain, 2010).

En el proceso de obtención de ésteres de metilo, uno de los factores limitantes es el soporte adecuado para la enzima empleada. Entre los que más interés han generado, son los soportes que retienen por adsorción a las enzimas (Atadashi et al., 2011 y Zabeti et al., 2010). Aunque se tiene preferencia por la adsorción, es cierto que la tecnología ha avanzado en las técnicas de inmovilizado, de tal modo que ahora no solo se emplean métodos tradicionales como los agregados enzimáticos, si no que se les ha combinado con partículas magnéticas para mejorar su recuperación. Entre otras técnicas modernas también se encuentra la inclusión en monolito, que se parece al encapsulamiento, pero tiene la ventaja de que se inmovilizan varias capas de enzima, en vez de un concentrado que pueda interferir con el contacto de la enzima con su sustrato (Jun, 2012; Urban et al., 2012 y Lam et al., 2010). En el grupo de trabajo se ha observado la capacidad de síntesis de cumarato de metilo con ANCUT1 y la hidrólisis selectiva de ácido kójico. Este trabajo busca obtener nuevas opciones de inmovilización para ANCUT2 y comprobar la capacidad de ANCUT1 para asociarse a un soporte de manera estable, y además, la aplicación de dichos biocatalizadores para la transesterificación de triglicéridos derivados de aceite de ajonjolí para producir biodiesel.

2. Antecedentes

2.1 Enzimas

No todas las proteínas secretadas por microorganismos tienen capacidades catalíticas, y de estas últimas, no todas tienen interés industrial. La IUBMB (International Union of Biochemistry and Molecular Biology) asignó a dichas proteínas catalíticas 6 familias de acuerdo a su acción:

1. Oxidoreductasas.
2. Transferasas.
3. Hidrolasas.
4. Liasas.
5. Isomerasas.
6. Ligasas.

Si bien todas las familias tienen su importancia y nicho en la industria, una de interés es el grupo de las hidrolasas, que son capaces de romper enlaces empleando agua en el proceso y se clasifican según el tipo de enlace sobre el que actúan. Las aplicaciones industriales se describen en la tabla 1:

Tabla 1. Aplicaciones de hidrolasas (Kirk et al., 2002)

Industria	Clase de enzima	Aplicación
Detergente	Proteasa	Remoción de manchas de naturaleza proteica
	Amilasa	Remoción de manchas de almidón
	Lipasa	Lavado de manchas de grasas
	Celulasa	Lavado general, clarificación de color
	Mananasa	Eliminación de manchas de origen alimentario
Almidón y gasolina	Amilasa	Licuefacción de almidón y sacarificación
	Amiloglucosidasa	Sacarificación
	Pullulanasa	Sacarificación
	Xilanasa	Reducción de viscosidad
	Proteasa	Lisis de proteínas
Alimentos (incluye lácteos)	Proteasa	Coagulación de leche, fórmulas bajas en alérgenos, sabores
	Lipasa	Sabores en quesos
	Lactasa	Hidrólisis de lactosa
	Pectin metilesterasa	Reafirmante de productos frutales
	Pectinase	Aplicación en productos de frutas
Panadera	Amilasa	Ajuste de la harina para la suavidad y volumen del pan
	Xilanasa	Suavizante de la masa
	Lipasa	Estabilidad y suavizado de masas
	Fosfolipasa	Emulsificante <i>in situ</i>
	Proteasa	Sabores en bizcochos y galletas
Alimento para animales	Fitasas	Digestibilidad de fitato
	Xilanasa	Digestibilidad
	Pectinasa	Digestibilidad
Bebidas	Pectinasa	Degradación de pectina

	Amilasa	Tratamiento de jugos y cerveza de bajas calorías
	β -Glucanasa	Macerado
	Lacasa	Clarificación de jugos, sabores en cerveza
Textil	Celulasa	Suavizante de algodón, acabados finos.
	Amilasa	Solubilización de partículas pequeñas
	Catalasa	Acabado blanqueado
	Lacasa	Blanqueado
Papel	Lipasa	Control de contaminantes
	Proteasa	Remoción de biopelículas
	Amilasa	Cobertura de almidón, destintado, mejora de drenaje
	Xilanasa	Aumento de blanqueado
	Celulasa	Destintado, mejora de drenaje, modificación de fibras
Grasas y aceite	Lipasa	Transesterificación, resolución quiral de alcoholes y amidas
	Fosfolipasas	Desgomado, producción de lisolecitina
Síntesis orgánica	Lipasa	Resolución de alcoholes quirales y amidas
	Acilasas	Síntesis de penicilina semisintética
	Nitrilasa	Síntesis de ácidos carboxílicos de pureza enantiomérica
Cuero	Proteasa	Remoción de pelo y proteínas para plisar.
	Lipasa	Penetración de agentes de bronceado
Cuidado personal	Amiloglucosidasa	Antimicrobiano

2.1.1 Hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos

Las esterasas representan un grupo muy diverso que catalizan el corte de enlaces éster. Con una amplia variedad de sustratos también se caracterizan por ser regio y esteroespecíficas. Esta familia de enzimas posee tres miembros a destacar: las esterasas, lipasas y cutinasas. Todas son caracterizadas por una estructura tridimensional que las agrupa como α/β hidrolasas que consiste en un orden definido de alfa hélices y hebras beta dispuestas en un orden específico para exponer a la tríada catalítica correspondiente al sitio activo (figura 1).

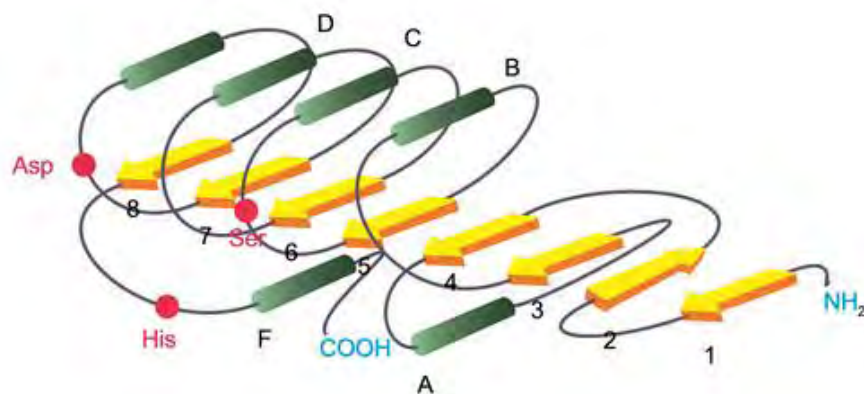


Figura 1. Representación del motivo α/β característico de las hidrolasas de ésteres carboxílicos. Las hebras β representadas por las flechas amarillas (1-8), α hélices (A-F) son los cilindros verdes. Los 3 aminoácidos representados por los círculos son la tríada catalítica (Bornscheuer et al., 2002)

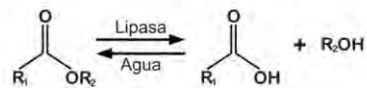
La tríada catalítica está formado por Serina-Aspártico- Histidina (o Glutámico en vez de la Aspártico en algunas lipasas) y también cuenta con un pentapéptido consenso formado por Glicina-x-Serina-x-Glicina (donde X representa un aminoácido cualquiera) que se encuentra alrededor de la Serina del sitio activo (Illanes, 2008 y Bornscheuer et al., 2002).

Cada enzima se distingue por su especificidad de sustrato tal que las esterasas tienen preferencia por ésteres de cadena corta (menos de 10 carbonos), mientras que las lipasas son más afines hacia los grupos acilo de cadena larga (a partir de 14 carbonos). Una peculiaridad es que las lipasas se caracterizan por un fenómeno llamado activación interfacial. Este fenómeno se debe a un dominio hidrofóbico presente en la enzima que sirve como “tapa” para el sitio activo de las lipasas, el cual solo se desplazará en presencia de una concentración mínima específica del sustrato y expondrá el sitio activo para permitir la catálisis (Ghanem, 2007).

2.1.2 Reacciones catalizadas

Una característica importante de las hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos es que en fase orgánica (ausencia de agua, presencia de solventes) pueden catalizar reacciones inversas como la interesterificación o la transesterificación, esto siempre y cuando el medio de reacción esté deshidratado, ya que un poco de agua puede inhibir por completo la catálisis (Esquema 1). Esta capacidad la comparten con cutinasas y lipasas (Badenes et al., 2010 y Aurilia et al., 2008).

1.- Hidrólisis (medio acuoso)

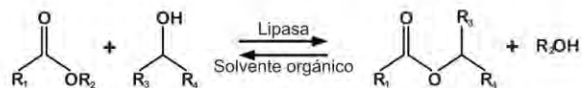


2.- Esterificación (medio orgánico)



3.- Transesterificación

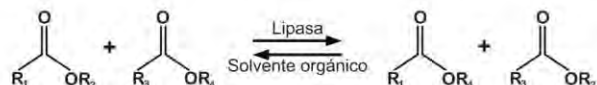
a) Alcohólisis



b) Acidólisis

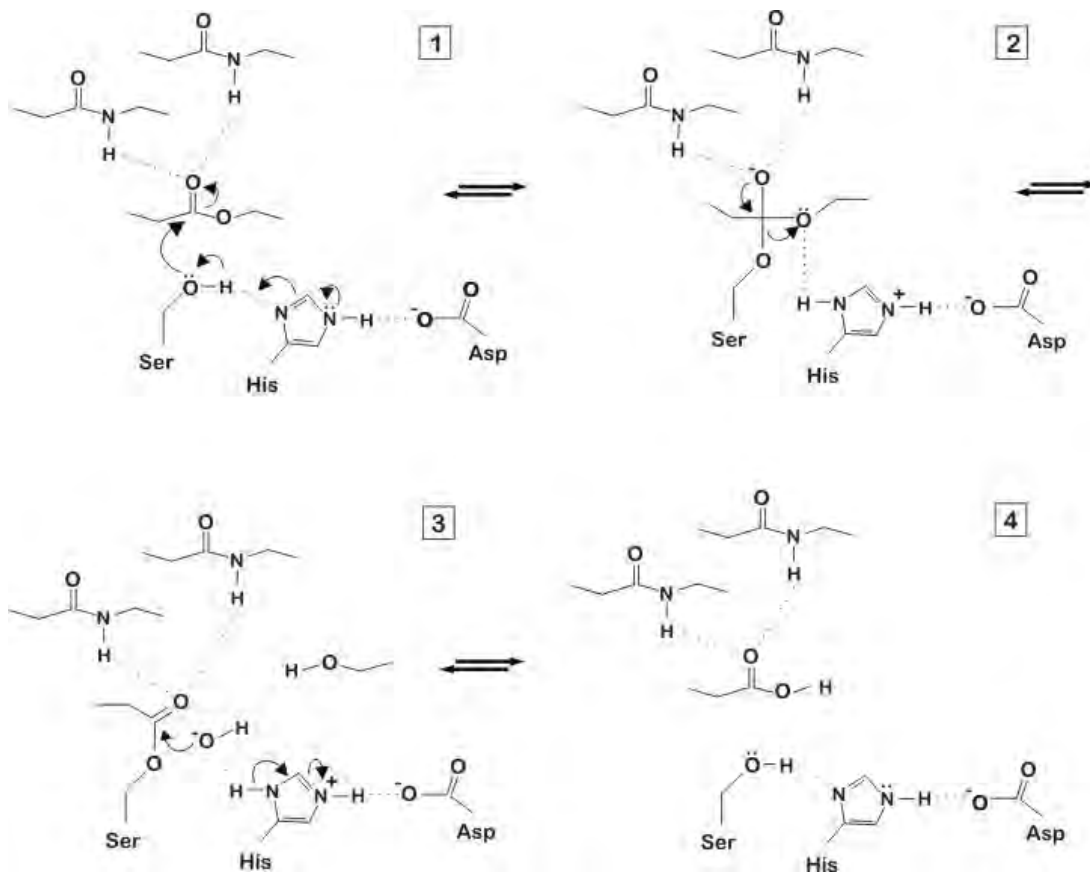


4.- Interesterificación



Esquema 1. Distintas reacciones catalizadas por lipasas según el medio en que se encuentran (Ghanem, 2007).

El mecanismo de reacción de las enzimas (Esquema 2) consiste en una serie de cambios en la tríada catalítica que desemboca finalmente en la liberación del producto y la regeneración del sitio activo para reiniciar el ciclo. El mecanismo de hidrólisis se inicia en el incremento del carácter nucleofílico de la serina. Esto conduce al ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible. Después se forma un intermediario tetraédrico, donde el átomo del oxígeno del carbono carbonilo adquiere carga negativa y se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los grupos -NH de la cadena principal. Luego, la histidina dona un protón al oxígeno del éster en el enlace donde se lleva a cabo la ruptura, se libera un alcohol y se forma un segundo intermediario con el ácido graso del sustrato, que se encuentra esterificado a la serina, lo que se denomina enzima acilada. Finalmente ocurre una desacilación, en la que se presenta un ataque nucleofílico al átomo del carbono carbonilo del intermediario covalente, gracias a una molécula de agua que provoca la ruptura del enlace éster entre la serina y el componente acilo. Al final de este ciclo se libera el producto y se regenera la enzima (Mendes et al., 2012).



Esquema 2. Cambios en la estructura de la enzima durante la reacción de hidrólisis (Jaeger et al., 1999).

El proceso de síntesis en la transesterificación es muy parecido al de la hidrólisis. La diferencia fundamental radica en que el agua del medio es reducida o nula, y la reacción ocurre en un líquido orgánico hidrofóbico, siendo los alcoholes de cadena corta los más utilizados en la producción de biodiesel. En caso de la transesterificación con metanol, se siguen los mismos pasos de la hidrólisis al preparar a la serina para un ataque oxianiónico, la formación de un intermediario enzima-grupo acilo y la liberación del producto, que conduce a la regeneración de la enzima a su estructura original, esta vez mediada por una molécula de metanol (Jegannathan et al., 2013).

2.1.3 Cutinasas y su importancia

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de cutina, un biopolímero que es parte de la cutícula de la planta, la cual está compuesta por una variada familia de hidroxiacidos grasos unidos por enlaces éster: dihidroxiaácido palmítico, ácido 18-hidroxi-9,10-epoxi octadecanoico saturado y ácido 9,10, 18-trihidroxi octadecanoico insaturado. Aunque la composición de la cutina depende de la planta de la que provenga, se puede establecer como una generalidad la abundancia de ácidos grasos con 16 y 18 carbonos, predominantemente dihidroxipalmitato (Longhi et al., 1997).

El tamaño de las cutinasas corresponde al de los miembros más pequeños dentro de la familia de serin hidrolasas. A diferencia de las lipasas su sitio activo se muestra como una cavidad oxianiónica que

presenta la tríada catalítica clásica (figura 2) compuesta por serina, histidina y un aminoácido con un grupo carboxílico (Asp o Glu) pero no contiene la estructura tipo tapa, que obliga a que en el caso de la catálisis por lipasas se requiera activación interfacial. La molécula presenta una estructura formada por un promedio de 197 residuos que se disponen igual que la lipasa y la esterasa en un conjunto de hebras β y hélices α . Se debe destacar que la serina catalítica se encuentra en un área rígida de la enzima, localizada en una vuelta entre una hebra β y una α hélice, mientras que los otros dos residuos se localizan en zonas más flexibles de la proteína situados en un asa del lado del carbono terminal de la proteína (Egmond et al., 2000).

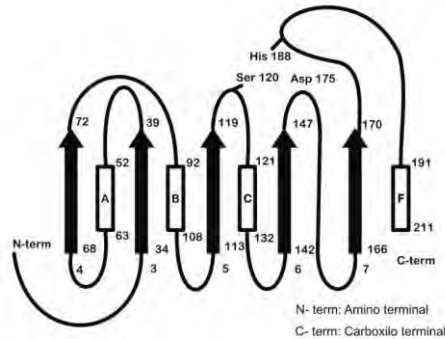


Figura 2. Diagrama de la ubicación de la tríada catalítica de la cutinasa de *Fusarium solani* (Egmond et al., 2000).

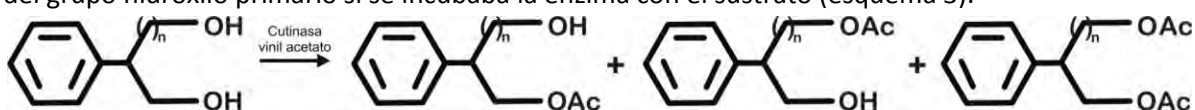
Las cutinasas son enzimas cuya función es degradar la cutícula vegetal que obstaculiza la infección del patógeno (Liu et al., 2016) para promover la invasión de tejidos internos, por lo que la enzima es característica de organismos fitopatógenos. Las cutinasas se encuentran predominantemente en hongos pero estudios recientes han mostrado que algunas bacterias y polen también secretan estas enzimas (Dutta et al., 2009).

A nivel de ensayos de laboratorio es posible trabajar con distintos sustratos, tipo los ésteres de p-nitrofenilo (Esqueda, 2012 y Vergara, 2010), triglicéridos y así se ha identificado el potencial de estas enzimas en diversas áreas industriales, entre las que destacan:

- Aceites y lácteos: modificación de lípidos para adaptarlos a una aplicación particular como el enriquecimiento de triglicéridos con ácidos grasos omega 3, hidrólisis de grasa en leche que presentará sabor y olor intensos.
- Sabores: síntesis de etilésteres de ácidos grasos y de ésteres de terpenos con ácidos grasos de cadena corta, aceites esenciales con un campo de aplicación variado; los más populares son los acetatos, propionatos y butiratos de alcoholes que se fabrican tradicionalmente por síntesis química y con los que mediante tecnología enzimática se ha logrado mejorar rendimientos, costos y desechos.
- Compuestos fenólicos: esta familia se compone de derivados de los ácidos cinámico y benzoico y han ganado popularidad por sus propiedades como antioxidantes, quelantes, antiinflamatorios, antimicrobianos y anticarcinógenos. Tradicionalmente la síntesis de estos productos se hace por vía química y tiene inconvenientes, ya que las condiciones de reacción son complejas, poco

estables y además producen muchas impurezas que se traducen en bajos rendimientos. Las enzimas se proponen como una mejor opción por su regioselectividad y actividad en condiciones suaves.

- Degradación de pesticidas e insecticidas: muchas de estas sustancias persisten en el medio ambiente tras su utilización y representan un peligro latente. El malatión es un insecticida cuya degradación alcanza hasta el 50% luego de 48 horas de contacto con la enzima.
- Industrias textil y de detergentes: se emplean para modificar fibras sintéticas disminuyendo su carácter hidrófobo, con lo que mejora la susceptibilidad a tratamientos y sensación de comodidad al usarla. Como ejemplo se puede considerar la modificación enzimática de tereftalato de polietileno, poliéster, poliamida y acrílico.
- Polímeros: se busca el tratamiento de los residuos y la degradación de poliésteres. Un ejemplo es el dihexilftalato empleado en la fabricación de juguetes, zapatos, guantes y empaques.
- Esterificación enantioselectiva: la regio, estereo y enantioselectividad que tienen las enzimas permiten una gama de aplicaciones de interés. Se ha registrado el uso de cutinasas para síntesis de fenil alcanodiol en fase orgánica, con la posibilidad de aumentar la acilación regioselectiva del grupo hidroxilo primario si se incubaba la enzima con el sustrato (esquema 3).



Esquema 3. Resolución de productos para comprobar la estereoselectividad de cutinasas (Fontes et al., 2009).

- Industria alimentaria: obtención de ácidos grasos como el γ -linoleico a partir de semillas oleaginosas, tratamiento de desechos industriales para disminuir el contenido lipídico o el tratamiento de hemicelulosa (Fontes et al., 2009, Shirke et al., 2017).

2.2 Hongos y el género *Aspergillus nidulans*

Los hongos son de los organismos más diversos en el planeta. Hay cerca de 1.5 millones de especies distribuidas alrededor del mundo, se encuentran en prácticamente cualquier sustrato y ecosistema actuando como saprófitos, parásitos y simbioses. En el género *Aspergillus* al menos hay 200 especies conocidas, y se emplean en diferentes aplicaciones biotecnológicas, desde fermentación tradicional hasta la producción de enzimas recombinantes (Oliveira et al., 2013), es ubicuo y se trata de ascomicetos filamentosos. Aunque incluye a patógenos para el ser humano, la mayoría de los miembros son útiles en la naturaleza para degradar sustancias y en la industria por la producción a gran escala de enzimas heterólogas y homólogas, además de que los productos de ciertas especies de este hongo (*A. niger* y *A. oryzae*) son considerados G.R.A.S. (Generally Recognized As Safe). Algunas especies de este género producen metabolitos secundarios y primarios de interés médico e industrial. En general tienen ciclo sexual y asexual, algunos incluso posean un ciclo parasexual. El ciclo asexual sirve para distribuir la célula y perpetuar el genoma fúngico, además de que la producción de metabolitos secundarios se asocia con este ciclo, se caracteriza por la esporulación de conidia y la propagación de hifas en forma tubular, que crecen por extensión apical y se ramifican para formar una red micelar para la adquisición de nutrientes (Cardoso et al., 1994). En especial *Aspergillus nidulans*, ha sido usado para investigar problemas fundamentales de biología, por lo que se ha considerado como un organismo modelo cuyo

estudio ha permitido descifrar vías metabólicas. Entre y tanto, el ciclo parasexual es un proceso que involucra los beneficios del ciclo sexual (recombinación de genomas y producción de nuevos genotipos) con los del ciclo asexual (no necesita una alta cantidad de nutrientes para formar estructuras de propagación). Finalmente, el ciclo sexual promueve la diferenciación del micelio en estructuras especializadas para formar ascosporas, esta fase tiene una alta posibilidad de generar cepas con genética distinta (Ward et al., 2006).

2.2.1 *Aspergillus nidulans*

Aunque todas las especies de *Aspergillus* tienen importancia, uno de los miembros más prominentes de este género es *A. nidulans*, debido a que su genoma ha sido completamente secuenciado. En su genoma se han encontrado alrededor de 60 hidrolasas de ésteres carboxílicos entre las cuales se encuentran 4 cutinasas (David et al., 2008), dos de las cuales (Anid7541 de 22 kDa y Anid7509 de 29kDa) han sido caracterizadas en el grupo de trabajo a través de inducción por fuente de carbono: aceite de olivo para la de 29 kDa (Castro-Ochoa, 2012 y Vergara, 2010) y cutícula de manzana para la de 22 kDa (Esqueda, 2012). Asimismo, se han reportado sus propiedades bioquímicas y aplicaciones potenciales (Bermúdez, 2017). Los genes han sido aislados y clonados en *Pichia pastoris*, y están sujetos a solicitud de patente, (Farrés, 2016)

2.3 Inmovilización de enzimas

Aunque las enzimas ofrecen grandes ventajas como catalizadores, también tienen algunas desventajas ya que su producción y uso pueden ser costosos en comparación a la síntesis química convencional. Entre las desventajas que enfrentan las enzimas se encuentran:

- Inhibición: la estructura de la enzima puede verse afectada por factores tales como el sustrato, los productos o algún derivado secundario, que se unen de manera irreversible a la proteína y la inactivan.
- Inactivación por medio: la temperatura, o el pH influyen en la proteína de tal manera que distorsionan su estructura, en algunas ocasiones, de manera irreversible.
- Pérdida del catalizador: la enzima libre se encuentra en forma líquida muchas veces se solubiliza en el medio y se homogeniza. Al concluir la reacción se busca separar el producto de los demás componentes y tenerlo tan puro como sea posible. Como entonces la enzima está completamente integrada en la reacción, es difícil su recuperación y arrastra impurezas que pueden interferir con una reacción a futuro, lo que no es atractivo a nivel industrial.
- Costo: las enzimas son un producto resultado de fermentaciones industriales y para obtener cantidades suficientes de enzimas se necesita una importante inversión en infraestructura y reactivos para formular medios de cultivo que sean apropiados para la producción de la proteína. Tal gasto no parece atractivo a la industria, por lo cual, la transición entre síntesis química y síntesis enzimática ha sido lenta o nula.
- Pureza: aunque esto no es un requisito en todos los casos, es posible separar una enzima si se encuentra en una mezcla de proteínas con características similares (Arroyo, 1998 y Brena et al., 2006).

A raíz de la necesidad de desarrollar catalizadores más competitivos con las enzimas, se han desarrollado las técnicas de inmovilización de enzimas. Con ellas se confina o localiza la enzima de interés en una región específica, para obtener formas insolubles que retienen actividad catalítica y que se pueden emplear en repetidas ocasiones. El grado de libertad de movimiento de la enzima al asociarse puede verse restringido de manera parcial o completa. Estas técnicas se dividen en dos grupos (figura 3) de acuerdo a la naturaleza de las fuerzas que se emplean en el proceso de inmovilización (Miletić, 2012):

- Físicas: se basa en la adsorción de las moléculas de enzima en la superficie de una matriz sólida, poniendo en contacto una solución acuosa de enzima con el soporte.
- Químicas: involucran técnicas de preparación para formar enlaces entre la enzima y el soporte de interés, muchas de estas uniones son irreversibles por lo que se puede garantizar que la enzima no se liberará al medio de reacción. Los principales inconvenientes en esta metodología son:
 - La alteración de la conformación de la enzima respecto a la de su estado libre, debido a que se requiere que algunos de los aminoácidos de la proteína queden unidos al soporte, y estos aminoácidos pudieran ser cruciales para su estructura causando que la enzima disminuya su actividad o la pierda por completo.
 - Heterogeneidad del sistema enzima-soporte, donde pueden existir distintas fracciones de proteínas inmovilizadas en distintas combinaciones de uniones al soporte. Esto funciona del siguiente modo: algunos medios con enzima tienen proteínas con capacidad de unirse al soporte pero sin actividad catalítica, el resultado es un biocatalizador que pueda tener la enzima de interés predominando en el soporte o que las proteínas interferentes sean las que quedan unidas al soporte y dejando a la enzima fuera de la matriz de inmovilizado.
 - El biocatalizador es más caro que la enzima libre (Hernández et al., 2011).

Es importante tomar en cuenta parámetros básicos como mantener una alta actividad catalítica, la fuerza de unión de la enzima al soporte para mantener la pureza en el medio de producción y la naturaleza del soporte en costo y disponibilidad (Fokina et al., 2016).

CLASIFICACIÓN DE MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN DE ENZIMAS

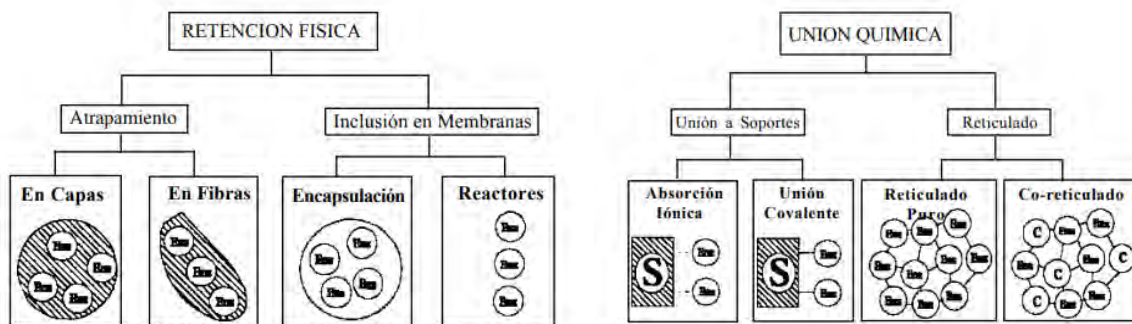


Figura 3. Distintos métodos de inmovilización para enzimas (Arroyo, 1998).

2.3.1 Retención física

Esta técnica secuestra las enzimas a un espacio en particular generalmente en poros del soporte que se utiliza para inmovilizar la enzima. A su vez, se conocen variantes como:

- **Atrapamiento:** consiste en la retención física de la enzima en las cavidades interiores de una matriz sólida porosa, constituida generalmente por polímeros. El proceso de inmovilización se lleva a cabo suspendiendo la enzima en una solución del monómero del polímero a usar, después se polimeriza con un cambio de temperatura o la adición de un químico. Generalmente se emplean geles, también se pueden utilizar fibras, que han recibido especial atención debido a que son más resistentes que los geles. En éstos la enzima se queda en el interior del polímero formado, mientras que con las fibras se busca que la enzima se acomode en las microcavidades. Una gran ventaja de esta forma de inmovilización es que la enzima permanece inalterada en su estructura.
- **Microencapsulación:** las enzimas se rodean de membranas semipermeables que permiten el paso de moléculas de sustrato y producto, pero no de la enzima. Estas membranas semipermeables pueden ser permanentes (polimerización) o no permanentes (micelas). Es posible encapsular un consorcio de enzimas para llevar a cabo reacciones de múltiples pasos (Arroyo, 1998; Brena et al., 2006 y Hernández et al., 2011).

2.3.2 Unión química

Consiste en metodologías que explotan la interacción de algunos grupos de la enzima con grupos específicos en un soporte o un ligando. Una vez que la enzima se une al soporte, no puede separarse a menos que se altere a la enzima o al soporte, por lo que se considera irreversible. La clasificación para este sistema es más compleja que la de los métodos de inmovilización físicos y se divide del siguiente modo:

- **Enlace iónico:** un sistema basado en el principio que se utiliza en la cromatografía de afinidad usando una resina o biopolímero. Es un método simple, pero es difícil encontrar las condiciones en las que la enzima permanece fuertemente unida y completamente activa. También se han empleado ligandos poliméricos para mejorar la interacción entre la enzima y el soporte.
- **Enlaces covalentes:** ampliamente usado debido a que brinda ventajas importantes. Una de ellas es que debido a la naturaleza estable de los enlaces enzima-soporte la enzima no se libera al medio durante su uso, por lo que es un método muy popular cuando se busca pureza absoluta en el producto resultante. La enzima interactúa con un grupo que la une fuertemente al soporte y según la naturaleza de esta unión se podrían contemplar dos metodologías: activación del soporte agregando un grupo funcional al polímero o modificar el polímero para producir grupos funcionales. La enzima se pega a una matriz mediante un enlace a través de una reacción química entre residuos de aminoácidos localizados en la superficie de la misma y un grupo funcional que se encuentra en la parte externa del soporte (Cao et al., 2005; Carta et al., 1991 y Carta et al., 1992). Se requiere una activación, cuyo objetivo es generar grupos electrofílicos que interactuarán con los nucleófilos de la proteína. Las proteínas unidas al soporte se pueden

considerar enzimas con modificaciones físico-químicas, cuya naturaleza será diferente a la de la enzima libre.

- Cross Linked Enzyme Aggregates (Agregados Enzimáticos Entrecruzados): una variedad de la metodología anterior, donde se prescinde de un soporte físico y en cambio se promueve la unión irreversible entre la enzima para así tener un catalizador robusto y económico. Aunque en este sistema de inmovilización se prescinde del paso de activación, se requiere de un paso previo de precipitado para exponer a la enzima a un agente enlazante, que contribuirá a permitir que el precipitado enzimático sea irreversible y a su vez conserve actividad.
- Adsorción: la metodología más simple se basa en la interacción con el soporte mediante la formación de enlaces débiles como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals o interacciones hidrofóbicas. Es posible recuperar el soporte y seguirlo reutilizando si es tratado apropiadamente. La enzima que se inmoviliza mediante esta técnica puede perderse durante la reacción debido a que las fuerzas que la mantienen unida al soporte no son irreversibles, sin embargo las ventajas de este método es que las condiciones de reacción son simples y económicas, generalmente (Hernández et al., 2011; Arroyo, 1998 y Brena et al., 2006).

2.3.2.1 Inmovilización por enlaces covalentes

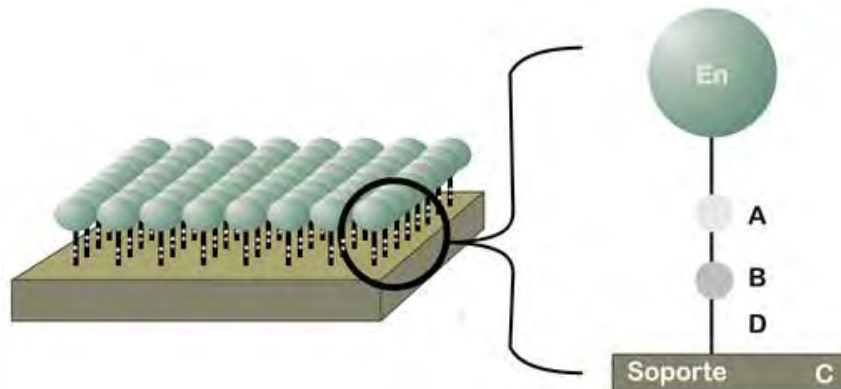


Figura 4. Representación didáctica de la inmovilización covalente donde En representa la enzima, A representa el grupo amino que se une al soporte, B es un grupo enlazante, D es el grupo funcional del soporte, C es el soporte (Cao et al., 2005).

Dado que la metodología incluye múltiples elementos (figura 4) se espera también que haya características particulares que definan el comportamiento del biocatalizador resultante. Estas características incluyen:

- La naturaleza física del soporte (tamaño del poro, tamaño de partícula, forma, etc.), que en general incluyen medidas dimensionales como superficie, forma, tamaño y estructura interna.
- La naturaleza química del soporte (química del grupo funcional, reacción para funcionalizar) tomando en cuenta que, además de los grupos que interactúan con la enzima, existen grupos inertes que no toman parte directa en la unión.
- La naturaleza de la unión entre los grupos, ya que para alcanzar una eficiencia mayor debe existir la posibilidad de que los grupos funcionales interactúen. Generalmente en la enzima se buscan grupos amino, como el de la lisina, grupos carboxílicos como el de los ácidos aspártico o

glutámico, grupo guanidinil de la arginina, grupo sulfhidrilo de la cisteína, grupo imidazol de la histidina, grupo tioéter de la metionina, grupo indolil del triptofano y/o el grupo hidroxifenólico de la tirosina.

- La conformación de la enzima cuando se somete a reacción o después del proceso de inmovilización, que puede ser un factor con el que se juegue para mejorar la actividad del biocatalizador siendo un ejemplo la modificación de pH del medio de reacción.
- Orientación de la enzima.
- El número de enlaces entre la enzima y el soporte.
- La distribución de la enzima a través del soporte.
- Las propiedades del medio usado para la inmovilización (Cao et al., 2005 y Daka et al., 1988).

Generalmente se utiliza medio acuoso para el proceso de inmovilización, por lo que muchas reacciones que son propensas a la hidrólisis o menos activas en medio acuoso no puede utilizarse para enlazar covalentemente enzimas al soporte, en cuyo caso, el uso de medio orgánico es la solución. Aunque esto parezca una desventaja, de hecho es posible controlar la actividad y selectividad de la enzima usando un medio anhidro (Cao et al., 2005).

Aunque no son todos, los grupos funcionales que más se emplean para inmovilizar covalentemente a un soporte así como los grupos funcionales en el aminoácido con los que se relaciona se muestran en tabla 2.

Tabla 2. Grupos funcionales comunes para inmovilizar covalentemente a soportes (Brena et al., 2006).

<i>Grupos funcionales</i>	<i>Grupos que reaccionan con el soporte</i>
<i>Cloruro de tresilo</i>	<i>tiol, amino</i>
<i>Bromuro de cianidilo</i>	<i>amino</i>
<i>Epóxidos</i>	<i>tiol, amino</i>
<i>Epiclorhidrina</i>	<i>tiol, amino</i>
<i>Glutaraldehido</i>	<i>amino</i>
<i>Glicidol glioxil</i>	<i>amino</i>
<i>N-hidroxi succinimidol</i>	<i>amino</i>

2.3.2.2 Adsorción

Es de los primeros métodos de inmovilización registrado y ha tenido una fuerte atención para su mejora en métodos y materiales más eficientes. Esta metodología tiene grandes ventajas como por ejemplo:

- Reversibilidad, lo que permite no solo la purificación de proteínas sino el reuso de los soportes.
- Simplicidad, lo que permite a la enzima retenerse en condiciones sencillas (pH neutro, temperatura ambiental y sin reactivos adicionales).
- Retención sin modificar químicamente la proteína (Arroyo, 1998 y Cao et al., 2005).

A grandes rasgos la enzima se une en cavidades o a través de fuerzas débiles al soporte (figura 5) sin embargo las enzimas que se inmovilizan por adsorción se tienden a fugar de los soportes, en parte

debido a la unión débil entre la enzima y la matriz de inmovilización (aunque no es una regla ya que existen proteínas inmovilizadas en el soporte adecuado que tienen una estabilidad notable aun en condiciones adversas). A raíz de esta gran desventaja, se han ideado algunas formas de minimizar o anular este dilema como la adsorción por entrecruzado, adsorción modificada, adsorción selectiva, etc.

Como ya se ha aclarado, la adsorción puede conllevar algunas modificaciones metodológicas que se traducen en muchas variantes que se pueden clasificar como:

- Adsorción física no específica, en la que la enzima se adsorbe por fuerzas inespecíficas como fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno o interacciones hidrofílicas.
- Adsorción bioespecífica, que esta mediada por ligandos en el soporte y adsorbe específicamente zonas, aminoácidos o motivos de la enzima.
- Adsorción de afinidad, que involucra metales pegados al soporte.
- Interacción electrostática, que involucra el manejo de cargas en soporte y enzima.
- Interacción hidrofóbica, basada en la unión de regiones hidrofóbicas de la proteína a la matriz de inmovilización.

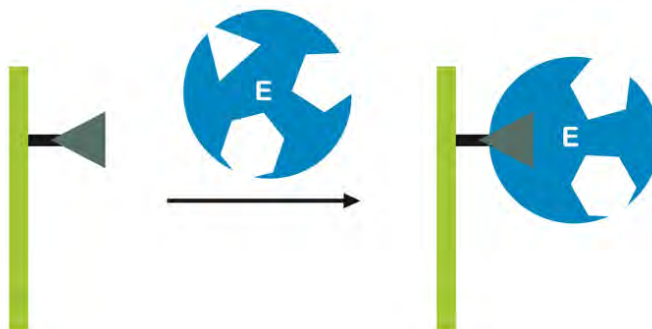


Figura 5. La unión de la enzima al soporte se da por medios físicos, no se involucran interacciones químicas (Cao et al., 2005).

El proceso inicia cuando el soporte contribuye a disminuir las fuerzas que mantienen a la enzima y otros solutos solvatados. Se cree que el mecanismo de unión se da mediante uno de dos principios: la monocapa y el de estabilidad (Hernández et al., 2011 y Miletić et al., 2012).

El principio de monocapa (figura 6) implica que la enzima y el soporte interactúan de un modo en el que la concentración de enzima que se pone en contacto termina determinando la conformación final de la enzima. Esto se explica a raíz que a menor concentración de enzima se tiene una mayor superficie de contacto y el número de uniones entre el soporte y la enzima aumenta, cambiando así la estructura final de la proteína, lo que a su vez puede modificar la actividad. En contraste, el poner exceso de enzima conlleva a saturar la superficie del soporte y a minimizar el número de interacciones que tiene una sola partícula proteica con el soporte. Al final, se podría concluir que la concentración mínima de proteína necesaria para formar una monocapa que cubra por completo el soporte será la que conserve la mayor actividad catalítica retenida (Cao et al., 2005).

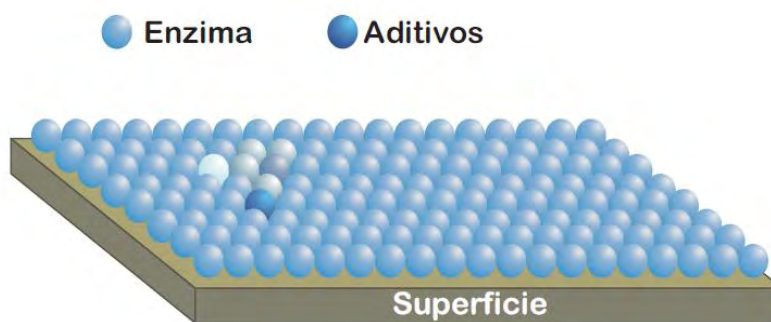


Figura 6. Formación de una monocapa para la cobertura total de la superficie de un soporte, el agregar aditivos es una práctica opcional (Cao et al., 2005).

En algunos casos cuando no se puede alcanzar la máxima cobertura de monocapa, se utilizan aditivos como la albúmina sérica bovina, que sirve como un estabilizante pero no influye directamente en la actividad enzimática (Hernández et al., 2011).

Existe el principio de estabilizado, este dicta que el proceso de inmovilización puede interactuar con la enzima en tres sentidos posibles: reforzar la estructura de la enzima, perder su estructura nativa o no provocar cambios apreciables. En caso de los cambios estructurales se tendrán tres estados posibles entonces y se puede concluir que la reacción de inmovilización es un conjunto de reacciones físicas en las que la enzima y la matriz de inmovilización forman una especie “química” que es el biocatalizador, que supone un producto que no siempre será estable o activo. En conclusión, la desestabilización es el resultado de anclar la conformación desnaturalizada mediante el soporte en el medio de inmovilización y este principio aplica inverso; la estabilización es el resultado de capturar la conformación nativa mediante el soporte en el medio de inmovilización (Milteç, 2012 y Cao et al., 2005).

2.3.2.3 Agregados Enzimáticos Entrecruzados (AEE)

Esta metodología es la más reciente entre las que se han descrito. Se registra alrededor de los años 90 el primer intento de inmovilizar enzimas sin necesidad de un soporte que pudiera interferir en la reacción o que cause un disturbio en la enzima (Sheldon, 2011). Aunque en sus inicios este método era conocido como C.L.E.C. (Cross Linked Enzyme Crystals) el mayor dilema radicaba en que la enzima debía estar pura, cosa que encarecía de manera crítica el proceso de síntesis para el biocatalizador y limitaba su aplicación a enzimas que estuvieran bien caracterizadas y de las que se conocieran formas de producirla pura. Si bien los biocatalizadores derivados eran sumamente activos, resistentes a medios de reacción adversos y retenían actividad durante múltiples aplicaciones en ciclos de reacción, el número de enzimas que se podía preparar así era muy limitado y, por lo tanto, se vio la necesidad de cambiar el proceso para encontrar una metodología de inmovilización más atractiva (Hormigo et al., 2012 y Kartal et al., 2011). Como una forma de disminuir los costos se aplicó el principio de generar un estado insoluble de la enzima, pero sin necesidad de depender de la pureza de la enzima.

En respuesta a la mejora de los C.L.E.C., se hicieron modificaciones al proceso de inmovilización para adaptarlo a enzimas que no se producen totalmente puras, cuya interacción con matrices de

inmovilización se traduce en disminución o pérdida de la actividad catalítica, que pueda sufrir cambios conformacionales en las condiciones de reacción y/o que carezca de compatibilidad con matrices de inmovilización conocidas. El método incluye la adición de sales, solventes miscibles o polímeros no iónicos al medio contenedor de la enzima, tomando en cuenta que no es obligatoria la pureza, para inducir que las proteínas del medio se precipiten en un agregado soluble (paso reversible pues la adición de agua puede disolver el agregado). Se agrega un agente conector que sirva de unión entre dos grupos funcionales de aminoácidos, en esta parte se encuentra la diferencia con los inmovilizados por enlaces covalentes ya que el agente que sirva para que los grupos funcionales se unan debe ser bifuncional y tener como objetivo al mismo grupo funcional del mismo aminoácido para así formar una red entre las enzimas que se mantendrá estable y será el biocatalizador final (aunque en algunos casos se utilizan partículas “inteligentes” como nanopartículas magnéticas) como se ilustra en la figura 7. Cabe resaltar que el glutaraldehído es el agente conector más utilizado pero no el único. Debido a que éste requiere una importante cantidad de lisinas, se han implementado técnicas para aumentar el número de grupos aminos libres que puedan reaccionar con el agente conector (Galvis, 2012; Hormigo et al., 2012; Kartal et al., 2011; Sheldon, 2011 y Yang et al., 2012).

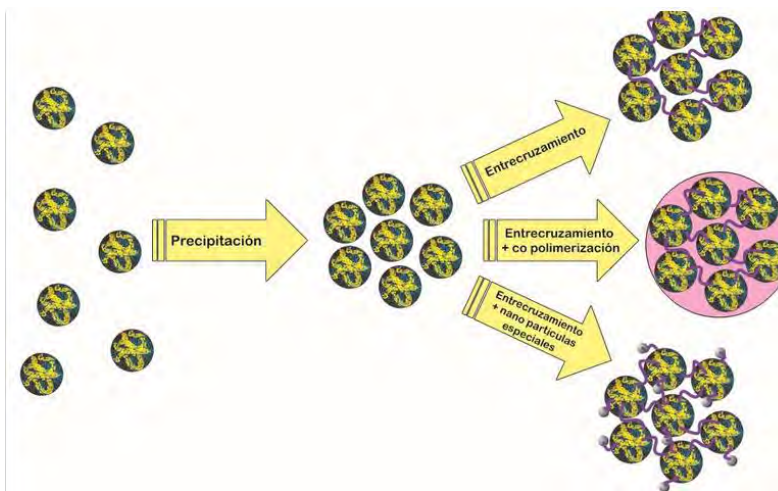


Figura 7. Proceso de inmovilización por agregados enzimáticos, se pueden diseñar como encapsulados y adición de moléculas que contribuyan a su protección o separación del medio de trabajo (Sheldon, 2013).

Sus ventajas son:

- Se pueden combinar dos enzimas en el medio en caso de que se busque hacer una reacción en dos pasos.
- La enzima permanecerá en un estado que permitirá cambios conformacionales, que la harán muy parecida a la enzima libre.
- El proceso de precipitación se hace en condiciones que garantizan una concentración elevada de la enzima a inmovilizar (casi pura).
- Es relativamente económico, debido a que el soporte físico es la misma enzima y, por tanto, no se debe invertir en muchos reactivos.
- Si el proceso está optimizado, se puede esperar una adhesión casi del 100% de la enzima en los agregados enzimáticos entrecruzados.

- No presenta las limitaciones difusionales de algunos materiales.

Como cualquier otro método de inmovilización también tiene desventajas:

- Es necesario tener bien caracterizado el procedimiento de precipitación, ya que se requiere una cantidad muy específica de precipitante (si se usa menos de la cantidad requerida daría como resultado pérdida de actividad, y si se emplea de más, daría como resultado el agregado de una proteína que no interesa).
- La importancia que tiene la estructura tridimensional de la enzima al momento de inmovilizarse es crucial, ya que ésta se conservara al inmovilizarse y acarreará la actividad y especificidad de sustrato que tenían durante el proceso de agregado y entrecruzado.
- Se debe agregar suficiente agente entrecruzante para formar un agregado insoluble que retenga la actividad enzimática. Si se excede se generarán demasiadas uniones entre las proteínas involucradas y así se perderá su capacidad catalítica (Sheldon, 2011).

2.4 Aplicación de los biocatalizadores

Luego de haber descubierto la posibilidad de inmovilizar las enzimas, surge un interés marcado en aplicar las enzimas en muchos ámbitos industriales que se habrían descartado debido a la relación costo-beneficio negativo que genera la pérdida de la enzima. Entre estas aplicaciones se encuentra la producción de metil ésteres, también conocido como biodiesel.

2.4.1 Producción de biodiesel

El agotamiento de combustibles fósiles es un problema latente debido a que es un recurso no renovable y se prevé que su demanda superará a la oferta en un futuro. Como alternativa se han estado diseñando biocombustibles para satisfacer esta demanda con las siguientes características (Lam et al., 2010):

- De origen renovable: biodiesel, bioetanol, hidrógeno y biogás son los combustibles renovables que más atención tienen actualmente. Cada uno se sintetiza de elementos existentes en la naturaleza o desechos. El biogás se tiende a obtener de los desechos orgánicos en fermentación, el hidrógeno puede obtenerse del mismo modo, el bioetanol se sintetiza a partir de biomasa vegetal y el biodiesel, de aceites. En este trabajo se le hace énfasis al biodiesel, el cual se ha clasificado por generaciones según el sustrato de síntesis para su obtención: la primera generación se concentra en usar el aceite de origen vegetal directamente en los motores de diesel, tenía el gran inconveniente de que su combustión era ineficiente (no generaba mucha energía mecánica) y dejaba residuos carbonizados que reducían aún más la eficiencia del motor dejándolo inútil a la larga. En la segunda generación se decidió utilizar una vez más aceite vegetal, pero el aceite puro se utiliza en una reacción de transesterificación que convierte los triglicéridos del aceite en alquil ésteres, los cuales son más simples de consumir para producir energía, no producen desgaste en el motor (excepto en ciertas partes plásticas) y contribuyen a remover residuos nocivos del motor. Su origen provoca el debate de que la producción de combustible contribuiría a la escasez de alimentos, causaría que el combustible fuese demasiado caro. La tercera generación trata de compensar las problemáticas de la generación

anterior recurriendo a desperdicios derivados de actividad humana alimentaria, tal como los aceites usados de restaurantes, tejido adiposo derivado de animales, desperdicios animales (plumas de pollo) y aceites que no son de consumo humano o algas con alto contenido lipídico (Kondamudi et al., 2009 y Huang et al., 2010). Esto provocaría una disminución en el costo de producción para biodiesel y elimina la necesidad de que el sustrato compita con las actividades alimentarias. Las desventajas que presenta esta etapa de biodiesel para los sustratos derivados de desperdicio se necesita cierto tratamiento para eliminar residuos interferentes o preparar al sustrato para que sea vulnerable a la reacción de transesterificación, para los aceites que no son de consumo humano se vuelve controversial el que se ocupe terreno de siembra extra y se contribuya a la erosión de áreas verdes y para las algas se enfrenta la complejidad de ser una tecnología novedosa, por lo que aún no se tienen experimentos de gran escala.

- La composición de los biocombustibles no genera tanta contaminación como su contraparte fósil, ya que se elimina el contenido de compuestos azufrados y disminuye el porcentaje de emisiones de carbono. Cabe destacar que con respecto al desempeño del motor éste es parecido al petrodiesel (Yadav et al., 2016).
- Su toxicidad ambiental es nula o mínima. En comparación con los derivados del petróleo, los biocombustibles no se vuelven una catástrofe ecológica en casos de derrame accidental, pues el biogás solo provoca un hedor en la zona de escape, el hidrógeno se disipa en la atmosfera sin causar mayor problema, el bioetanol volatiliza al poco tiempo de ser derramado (e incluso a temperaturas elevadas se acelera este proceso, sin caer en combustión espontánea) y el biodiesel, por ser un derivado lipídico, puede servir de fuente de carbono para microorganismos que contribuirán a su degradación sin dejar residuos contaminantes (Lam et al. 2010; Meher et al., 2006 y Singh et al., 2010).

Las características físicas del biodiesel como un combustible se especifican en la tabla 3:

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del biodiesel de ajonjolí (Ahmad et al., 2010).

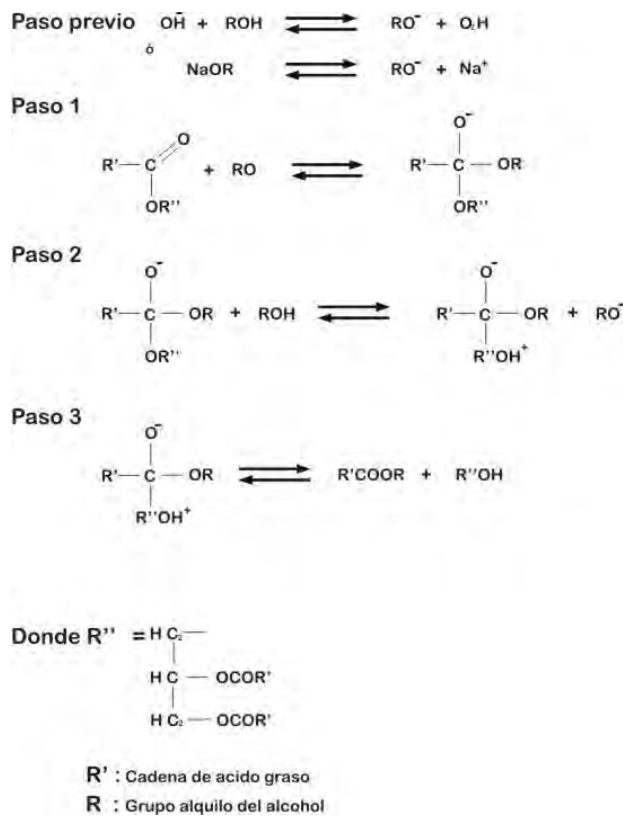
Propiedades	Biodiesel de ajonjolí
Densidad a 15°C	0.8712 g/cm ⁻³
Viscosidad cinética a 40°C	5.77 cSt
Punto de nube	-6.3°C
Punto de fluidez	-18°C
Punto de inflamación	110°C
Índice de acidez	0.28 mg de KOH
Contenido de azufre	0%

2.4.1.1 Síntesis homogénea


La síntesis homogénea puede dividirse en dos, síntesis alcalina y síntesis ácida, cada una con sus virtudes y debilidades:

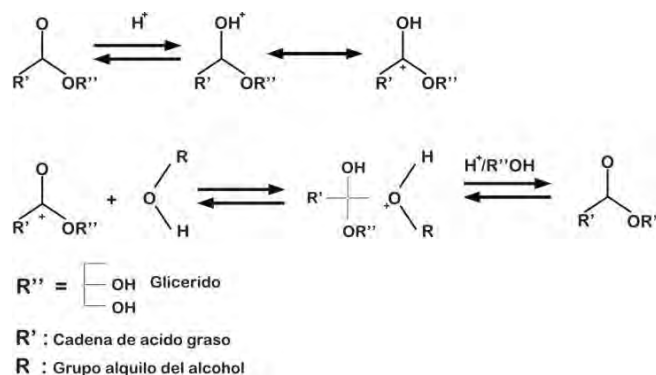
- La síntesis alcalina se ilustra en el esquema 4 y emplea álcalis disponibles para que el aceite objetivo se conviertan en biodiesel tras un tiempo de reacción. Los catalizadores más

comunes son el hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, metóxido de sodio y metóxido de potasio, siendo el aceptor de acilo preferido el metanol. Las ventajas que incluye esta vía de síntesis es que el rendimiento de metil ésteres obtenidos es superior al 92% en la mayoría de los casos y que el equipo no presenta corrosión. Se necesita hacer especial énfasis en la materia prima debido a que los ácidos grasos libres en aceites usados disminuyen dramáticamente la reacción de transesterificación y esto se traduce al final como bajo rendimiento. Esta síntesis se ha empleado debido a su bajo costo y alto rendimiento, además de que se han visto buenos resultados con la variación de sustratos. Sin embargo los residuos generados a raíz de esta metodología son problemáticos, debido a que la glicerina no sirve para productos cosméticos. Ya que es muy alcalina y con residuos de la reacción. Además, el lavado para separar al biodiesel genera grandes volúmenes de agua con pH elevado, que ya no pueden utilizarse en riego ni para consumo humano (Singh et al., 2010; Huang et al., 2010 y Meher et al., 2006).



Esquema 4. Proceso de transesterificación con catalizador alcalino. R' es el grupo de ácido graso perteneciente al triglicérido y R es el grupo alquilo que pertenece al donador del grupo (generalmente metanol) (Meher et al., 2006).

-
- 
- La síntesis ácida, descrita en el esquema 5, consiste en utilizar ácidos fuertes para permitir la transesterificación, Los elementos más usados son ácido sulfúrico, metóxido sulfúrico y como donador de acilo, se emplea el metanol. A su favor se puede definir que el método no se ve afectado por los ácidos grasos libres y tiene un rendimiento elevado (reportado arriba del 92% de transformación de aceite al menos). Sin embargo su desventaja está en que el material sufre constantemente de corrosión derivada del catalizador y que las condiciones de reacción son peligrosas, pues las temperaturas necesarias para que esta reacción se lleve a cabo están por arriba de los 100°C (Atadashi et al., 2011 y Jain et al., 2010).



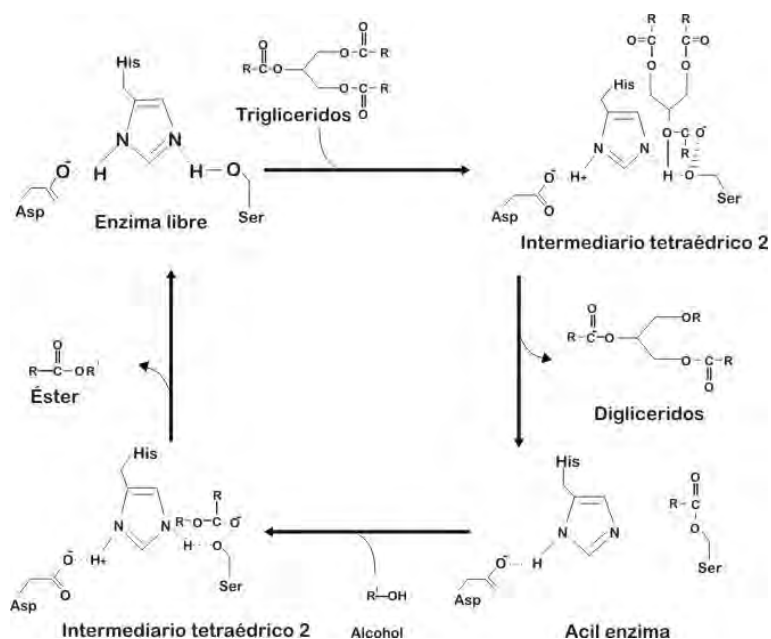
Esquema 5. Transesterificación con catalizador ácido (esquema 5). R' es el grupo del ácido graso perteneciente al triglicérido y R es el grupo alquilo perteneciente al donador (generalmente metanol) (Meher et al., 2006)

2.4.1.2 Síntesis heterogénea

En esta categoría se encuentra la síntesis a través de catalizadores que no son solubles, que son de fácil separación y que son de fácil recuperación. Se han reportado óxidos insolubles, resinas (Lam et al., 2010) y enzimas generalmente inmovilizadas (Zhang et al., 2011 y Lai et al., 2012), siendo las enzimas las que muestran más variabilidad en sus resultados pues, a pesar de estar inmovilizadas, son un sistema dinámico. Las enzimas inmovilizadas tienen un comportamiento muy interesante: no se ven influenciados por los ácidos grasos libres, los que incluso pueden contribuir a mejorar la transesterificación (Shah, 2007). Las condiciones de reacción son más suaves comparadas con las presentes en la catálisis homogénea, lo que ofrece ventajas porque no hay un gasto importante de energía para promover la reacción. La separación de productos-desechos-catalizador es más sencilla, además de que la glicerina derivada es útil para múltiples aplicaciones. Es posible emplear la enzima en su forma libre y en forma inmovilizada. Sin embargo la forma libre puede sufrir daños en el medio de reacción. Se sabe que el donador de acilo puede inducir una inactivación de la enzima y por lo tanto, pérdida parcial o total de la actividad catalítica, lo que se traduce en rendimientos bajos o nulos (Tan et al., 2010 y Lam et al., 2010). La enzima inmovilizada posee una resistencia superior a alteración por el medio de reacción o por la presencia de inactivadores comparada con la enzima libre, la que es más difícil de recuperar tras los procesos de separación. Para superar estos inconvenientes se han diseñado pasos extra en la síntesis para mejorar los rendimientos y conservar el catalizador por más ciclos, estas consisten en las siguientes modificaciones a la reacción (Lam et al., 2010; Tan et al., 2010 y Zhang et al., 2011):

- La adición de líquidos iónicos para mejorar la homogenización de fases.
- El agregar el total del metanol (o el donador de acilo en cuestión) en fracciones de cantidades distintas para así impedir que tenga influencia negativa en la enzima.
- El manejo de distintos donadores de acilo, para buscar el que permita el mejor rendimiento sin sacrificar economía de proceso.


En el caso de la catálisis enzimática, la proteína sufre una serie de cambios estructurales para llevar a cabo su función (como se ilustra en el esquema 6):



Esquema 6. Reacción de transesterificación mediada por la triada catalítica de una carboxilesterasa (Jegannathan et al., 2008)

Es importante controlar las condiciones de reacción de manera estricta para conseguir un mejor rendimiento y evitar productos distintos por reacciones secundarias a la de interés. Los factores más importantes a considerar para tener un buen rendimiento son:

- Relación molar alcohol:aceite: Muchos reportes han remarcado la importancia de no exceder el máximo necesario para promover la reacción de transesterificación puesto que el exceso de alcohol induce la inactivación de la enzima (Badenes et al., 2010 y Sampaio et al., 2010). Además, el no tener suficiente alcohol resultaría en un bajo rendimiento de alquil ésteres a causa de que no se le ofrece suficiente sustrato a la enzima. La mayoría de los autores ubican que la relación molar más común es 6:1 (Sharma et al., 2009; Behnia et al., 2011; Ahmad et al., 2011; Hayyan et al., 2011 y Guan et al., 2009) para el proceso químico y para la síntesis enzimática se ha reportado variaciones según convenga para cada caso (Ognjanovic et al., 2009; Sampaio et al., 2010; Lu et al., 2007 y Vasconcellos et al., 2012). La relación molar 6:1 solamente se puede tomar como referencia para realizar pruebas ya que hay que recordar que las enzimas son dinámicas y pueden mostrar diferencias muy marcadas.
- Temperatura de reacción: Este aspecto está relacionado con la termoestabilidad de la enzima y con la flexibilidad económica del proceso, ya que mantener una reacción por mucho tiempo a altas temperaturas puede traducirse en costos elevados y pérdida de ganancia. Por otra parte la enzima puede mostrar actividad en rangos muy particulares de



temperatura y variaciones en dicho rango resultan en pérdida de actividad, disminución de la misma o en una mejora de sus cualidades como biocatalizador (Sharma et al., 2009 y Lam et al., 2010). La literatura reporta una temperatura alrededor de 60°C para la reacción química (Sabudak et al., 2010; Sharma et al., 2009; Ognjanovic et al., 2009; Ahmad et al., 2011; Behnia et al., 2011; Ahmad et al., 2011; Hayyan et al., 2011; Guan et al., 2009 y Saydut et al., 2008), sin embargo la temperatura óptima para las cutinasas ronda entre 30 y 40°C. Comparada con la temperatura de 60°C empleada en la catálisis química, la enzima actúa en condiciones más suaves. Esto se puede traducir como un proceso más económico y por lo tanto, la catálisis enzimática se vuelve una opción más atractiva en aspectos de ahorro de energía. La catálisis enzimática se ha reportado como óptima en el umbral de temperatura entre 37 y 40° C (Badenes et al., 2010; Sampaio et al., 2010; Watanabe et al., 2007; Lu et al., 2007; Lee, 2011; Zhang et al., 2011 y Vasconcellos et al., 2012). Otra cuestión a considerar es que la temperatura ambiente dicta cuánta energía se debe invertir para este aspecto. Mientras que una temperatura ambiente cálida puede favorecer la reacción a temperaturas más elevadas, en un clima frío se necesita mayor inversión energética y, por lo tanto, se busca el punto de temperatura más cercano al de su actividad óptima.

- Velocidad de agitación: Es una de las condiciones más críticas en este proceso. Combinada con la adición de terbutanol o algún líquido iónico, su meta final consiste en la homogenización del sistema y el favorecer la interacción de los elementos de reacción con la enzima. Sin embargo, en el caso de las enzimas inmovilizadas por adsorción, una agitación elevada puede superar un umbral que causará la desorción de la proteína del soporte y, en contraste, el no agitar lo suficiente impide que la reacción se lleve a cabo. El punto exacto de agitación según la literatura circula entre 100 y 300 rpm en placa con agitación orbital (Ognjanovic et al., 2009; Watanabe et al., 2007; Lee, 2011 y Zhang et al., 2011) y en reacciones conducidas por agitación magnética, se ha establecido entre 400 y 600 rpm (Sampaio et al., 2010; Badenes et al., 2010; Ahmad et al., 2011 y Hayyan et al., 2011).
- Presencia o ausencia de líquido iónico: este aspecto contribuye a la homogenización del medio de reacción. En la literatura se encuentran muchos reportes en los que la adición de alguno de estos elementos favorece radicalmente el rendimiento de obtención de alquil ésteres por lo que se ha vuelto una práctica común, además de que se ha incrementado la investigación de nuevos reactivos para este fin (Zhang et al., 2011; Sabudak et al., 2010 y Guan et al., 2009). Una gran desventaja que aún no se supera es que el costo del proceso tiende a encarecer a raíz que estos reactivos no son baratos, no es fácil su recuperación y que la presencia de estos en el producto final se considera un contaminante tanto a nivel de calidad como a nivel ambiental.
- Control de la humedad del medio: La presencia de agua en el medio se reconoce como un factor importante en la reacción de transesterificación, el tener demasiadas moléculas de agua en el medio de reacción conducirá la reacción hacia la hidrólisis (Sharma et al., 2009; Lu et al., 2007 y Lam et al., 2010). Una estrategia común es el tener un medio de reacción completamente hermético, desecar los reactantes con malla molecular o utilizar sales

higroscópicas para controlar el A_w (Ognjanovic et al., 2009). En algunos casos se opta por acciones más radicales y se agrega malla molecular directamente al medio, haciendo el proceso completamente anhidro para poder forzar la reacción de transesterificación (Lam et al., 2010 y Enweremadu et al., 2009). Podría creerse que el medio anhidro es el mejor camino a tomar para la producción de biodiesel, pero se debe tomar en cuenta que la enzima requiere un mínimo de agua para conservar su actividad catalítica (Zhang et al., 2011). Aunque se supone que la enzima inmovilizada está protegida de cualquier distorsión, no es cierto en todo momento, ya que el metanol pueda influir en el sitio catalítico y producir la inactivación del biocatalizador o pérdida parcial de su actividad catalítica y por lo tanto, ocurre una disminución del rendimiento del producto.

- Tiempo de reacción: La literatura reporta tiempos cortos para la catálisis homogénea que van de 2 horas, hasta 12 horas (Sabudak et al., 2010; Sharma et al., 2009; Ognjanovic et al., 2009; Ahmad et al., 2010; Behnia et al., 2011; Ahmad et al., 2011; Hayyan et al., 2011; Guan et al., 2009 y Saydut et al., 2008). En contraste, la catálisis heterogénea requiere períodos mayores, de mínimo 12 horas de reacción e incluso se han reportado tiempos de hasta 72 horas de reacción (Badenes et al., 2010; Sampaio et al., 2010; Watanabe et al., 2007; Lu et al., 2007; Lee et al., 2011; Zhang et al., 2011 y Vasconcellos et al., 2012). El conservar un medio de reacción por tiempos tan prolongados se traduce en costos elevados y hace que se pierda interés en esta forma de producción. Los tiempos de reacción largos contribuyen a que la catálisis ocurra. Sin embargo el mantener el biocatalizador en el medio de reacción por demasiado tiempo aumenta las probabilidades de perder actividad o inducir la distorsión de la conformación enzimática que favorece la catálisis, de allí la importancia de encontrar el tiempo de reacción óptimo para que se dé la transesterificación y no se reduzca la actividad catalítica del biocatalizador.
- Modalidad de adición del metanol: Está documentado que la interacción entre metanol y el biocatalizador disminuye su actividad, aun a pesar de que el proceso de inmovilización la proteja. Para evitar este tipo de contratiempos se diseñaron metodologías para minimizar el contacto de metanol pero conservar la concentración suficiente para promover la transesterificación. Una práctica común es el dividir la cantidad total de alcohol metílico en tres partes, una al inicio y agregando el resto del metanol según se vaya consumiendo o en tiempos específicos, dependiendo de la concentración de metil ésteres resultantes (Sabudak et al., 2010; Ognjanovic et al., 2009; Lu et al., 2007 y Zhang et al., 2011). Una variante de este principio es el utilizar un material absorbente y que permita la liberación del metanol conforme pase el tiempo, lo que se puede lograr sumergiendo sílica gel en el alcohol metílico anhidro y luego adicionar las perlas de sílica en el medio de reacción (Lee et al., 2011), permitiendo que haya una liberación gradual de metanol y manteniendo una concentración adecuada para la transesterificación (y por supuesto contribuyendo al desecado del medio de reacción).

Cada uno de estos aspectos contribuye a la producción de metil ésteres de manera positiva o negativa, según sea el caso. Los principales factores se podrían resumir en la tabla 4:

Tabla 4. Comparación de las características más importantes entre la catálisis química y la catálisis enzimática.

	Catalizadores químicos	Catalizadores enzimáticos
Temperatura de reacción	60-110 °C	30-40°C
Presencia de ácidos grasos libres	Produce sales de ácidos grasos que pueden ser inhibidores	Genera metil ésteres que no inhiben reacción
Humedad en el medio	Disminuye rendimiento	Inhibe la reacción
Rendimiento de metil ésteres	Elevado	Conversión variable
Purificación de metil ésteres	Múltiples enjuagues	No requiere lavado
Costo del proceso	Económico	Relativamente caro

2.4.1.3 Materia prima

Como ya se mencionó, el avance en la tecnología de síntesis de biodiesel se tradujo no solo en el empleo de distintos biocatalizadores, sino en el uso de diferentes tipos de aceite empleados para la producción de los metil ésteres. Si bien en las primeras dos generaciones se contemplaba el uso de aceites vegetales de consumo humano (siendo algunos de los más comunes los mencionados en la tabla 5), al final de esta generación comenzó el uso de aceites de distintas naturalezas, como por ejemplo, el aceite usado o derivado de desechos de semillas o aceites que no son comestibles, como el de *Jatropha curcas*, que supone materia prima económica y con una disponibilidad importante (Jain et al., 2010 y Shah et al., 2007). Otro ejemplo de innovación en el uso de materias primas para la producción de biodiesel es el de algas marinas. Se conoce que algunos tipos de algas pueden contener una alta tasa de ácidos grasos que se pueden extraer como un aceite de la biomasa antes mencionada. Si bien el resultado del empleo de los distintos aceites genera biodiesel de calidad suficiente para su utilidad de combustible, se registran diferencias obvias conferidas por su contenido de ácidos grasos (Jain et al., 2010 y Demirbaş, 2002) y en algunos casos, se comprobó que distintos aceites resultaban en distintas concentraciones de glicerol producido (Atadashi et al., 2011).

Tabla 5. Distintos sustratos empleados para la producción de metil ésteres.

Aceite	Referencia
Aceite de palma	Chongkhong et al., 2009
Aceite de soya	Suppes et al., 2004
Aceite de canola	Zabeti et al., 2010
Aceite de oliva	Jain et al., 2010
Aceite de aguacate	Knothe, 2013
Aceite de jatrofa	Jain et al., 2010
Aceite de sésamo (ajonjolí)	Ahmad et al., 2010



3. Justificación

Las cutinasas AN CUT1 y AN CUT2 descritas y caracterizadas por el grupo de investigación parecen tener un gran potencial biotecnológico, ya que se han empleado en sistemas de producción de ácido kójico (Vergara, 2010), así como en degradación de poliésteres como PBS y PET (Sánchez, 2016). En el presente trabajo se quiere explorar la posibilidad de empleo en la generación de biodiesel, es decir, de metil ésteres. En los procesos enzimáticos de transesterificación contrasta la capacidad de las enzimas para solubilizarse espontáneamente en solución acuosa con la incapacidad de solubilización del sustrato (lípidos), por lo que es necesario añadir emulsificantes o solventes. Esto provoca dificultades en el proceso, como actividad residual en el sistema de reacción o la pérdida de la enzima en el sistema, causando que el costo de la enzima se vuelva factor crítico (Al-Zuhair, 2007). Para evitar la pérdida de catalizador y actividad residual, se pretende inmovilizar ambas cutinasas, tras evaluar diferentes soportes, para determinar su utilidad como un biocatalizador económico, eficiente y disponible para la generación de metil ésteres.



4. Hipótesis

Las cutinasas de *Aspergillus nidulans* ANCUT1 (22 kDa) y ANCUT2 (29 kDa) inmovilizadas o libres, tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de polímeros de ácidos grasos, por lo que se esperará que las cutinasas puedan catalizar la transesterificación de ácidos grasos de aceites comestibles en condiciones de reacción apropiadas.



5. Objetivos

5.1 Objetivos generales

- Obtener biocatalizadores que contengan las cutinasas AN CUT1 o AN CUT2 de *Aspergillus nidulans*, a base de Accurel, Celite, Nylon 6 y AEE y seleccionar el idóneo para llevar a cabo la reacción de transesterificación sobre aceites comestibles.

5.2 Objetivos particulares

- Producir cada cutinasa en medios diseñados para producir específicamente la actividad de cada una.
- Inmovilizar en distintos soportes para seleccionar el que retenga la actividad más alta.
- Evaluar condiciones de transesterificación para síntesis de biodiesel.
- Seleccionar el catalizador más adecuado para la reacción propuesta.

6. Materiales y métodos

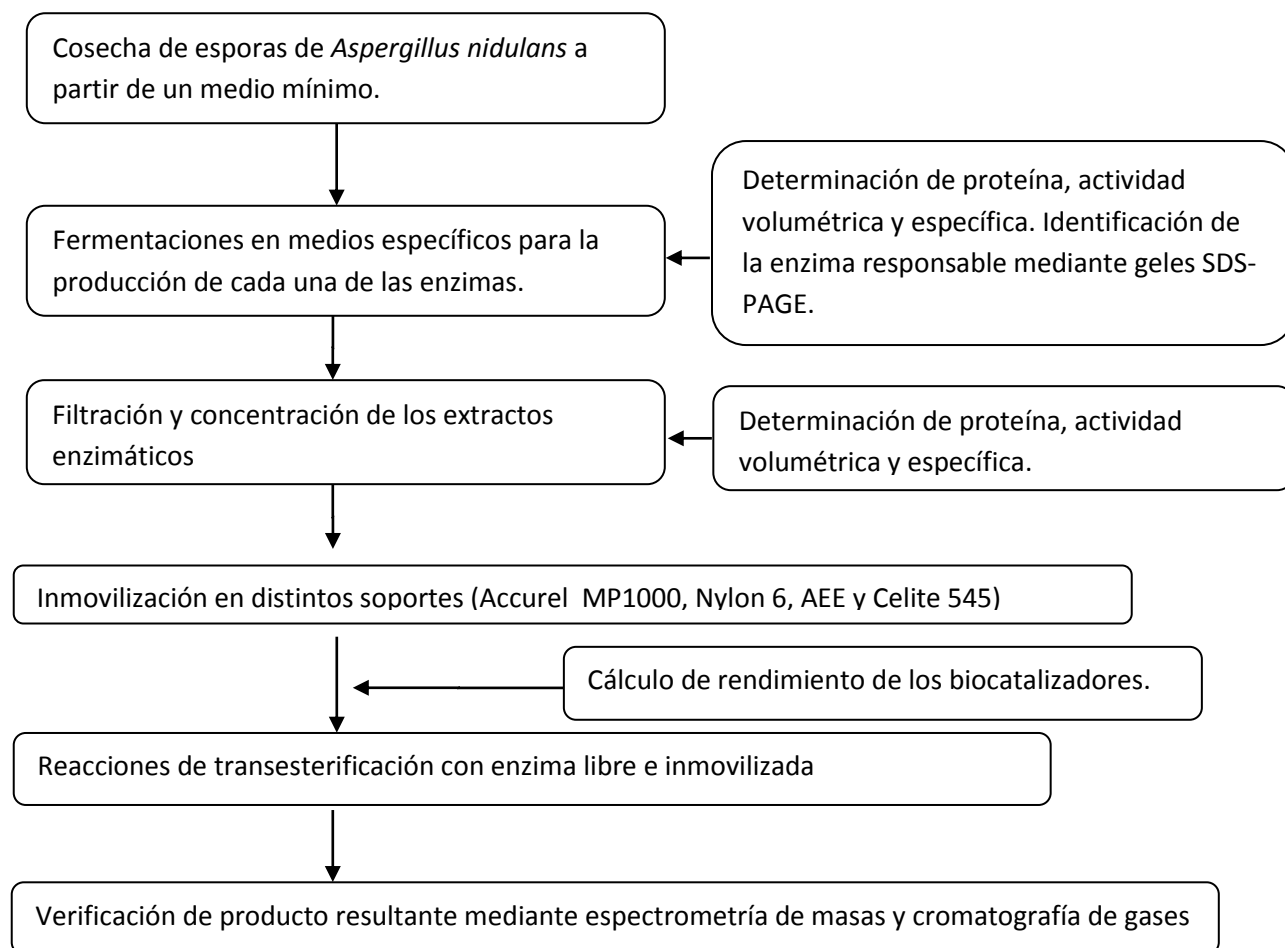
6.1 Materiales

Tabla 6. Reactivos empleados durante los experimentos

Reactivo	Marca
Accurel MP1000	
Acetona	J.T. Baker
Ácido acético glacial	J.T. Baker
Ácido clorhídrico	J.T. Baker
Ácido oxálico	J.T. Baker
Acrilamida	Bio Rad
Bactoagar	
Alcohol isopropílico	J.T. Baker
α -naftil acetato	Sigma-Aldrich
Arginina	Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	Bio Rad
Biotina	Sigma- Aldrich
β -mercaptoetanol	Bio Rad
Bis-acrilamida	Bio Rad
Carbonato de sodio	J.T. Baker
Celite 545	Sigma-Aldrich
Cloruro de cobalto hexahidratado	J.T. Baker
Cloruro de manganeso tetrahidratado	J.T. Baker
Cloruro de potasio	J.T. Baker
Cloruro de sodio	J.T. Baker
Dextrosa	J.T. Baker
EDTA tetrasodico	J.T. Baker
Extracto de levadura	J.T. Baker
Etanol	J.T. Baker
Éter de petróleo	J.T. Baker
Fosfato de sodio básico	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico	J.T. Baker
Glicerol	J.T. Baker
Glutaraldehído	Merck
Hexano	J.T. Baker
Hidróxido de sodio	J.T. Baker
Malla molecular 3Å	Sigma Aldrich
Marcador molecular de bajo peso	Bio Rad
Metanol	J.T. Baker
Metionina	Research organics
Molibdato de amonio tetrahidratado	J.T. Baker
Nitrato de plata	Sigma-Aldrich
Nitrato de sodio	J.T. Baker
Nylon 6	Sigma-Aldrich
Oxalato de amonio	J.T. Baker

p Nitrofenil laurato	Sigma-Aldrich
Persulfato de amonio	Bio Rad
Reactivo de Bradford	Bio Rad
SDS	Bio Rad
Sílica gel	J.T. Baker
Sulfato cúprico	J.T. Baker
Sulfato de amonio	J.T. Baker
Sulfato de magnesio	J.T. Baker
Sulfato de magnesio heptahidratado	J.T. Baker
Sulfato de zinc heptahidratado	J.T. Baker
Sulfato ferroso heptahidratado	J.T. Baker
TEMED	J.T. Baker
Tris base	Bio Rad
Tritón X-100	Sigma Aldrich

6.2 Estrategia experimental



6.2.1 Microorganismo

Se utilizó *Aspergillus nidulans* PW1, una cepa proporcionada por el Dr. Jesús Aguirre, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

6.2.2 Medios de cultivo

6.2.2.1 Componentes

Se empleó como medio base el medio descrito por Kafer y Hill (2001) modificado por Esqueda, (2012) y Castro Ochoa (2010) para favorecer las condiciones de producción de las cutinasas de interés mediante la adición del inductor correspondiente, o la variación en la naturaleza y concentración de la fuente de carbono, según se describe a continuación. El medio base, empleado en forma sólida para la propagación del microorganismo y obtener la cosecha de esporas, se presenta en la tabla 7.

Tabla 7. Composición del medio mínimo para *A. nidulans* PW1.

Compuesto	Concentración
Sales 20 x	50 mL/L
Elementos traza 100 x	1 mL/L
Glucosa	10 g/L
Agar bacteriológico	12.5 g/L
Metionina	0.011 g/L
Arginina	5 mL /L
Biotina	0.5 mL/L

Se ajusta el pH de la solución a 6.5 con NaOH 1 M.

6.2.2.1.1 Sales 20x

Para la formulación de los medios de cultivo se partió de soluciones concentradas. La primera se presenta en la tabla 8 y corresponde a la solución de sales 20x.

Tabla 8. Composición de la solución de sales 20x.

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

6.2.2.1.2 Elementos traza 100x

La tabla 9 ilustra los componentes que deben agregarse para formular la solución de elementos traza 100x. Cabe resaltar que el orden de adición de los compuestos debe respetarse y esperar a que estén totalmente disueltos.

Tabla 9. Composición de la solución de elementos traza 100x.

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

6.2.2.1.3 Cutícula de manzana

Se obtuvo la cáscara de 10 kg de manzana variedad Golden Delicious y se sumergieron en ácido oxálico (4 g/L) y oxalato de amonio (16 g/L). Esta mezcla se calentó hasta ebullición para lograr la separación entre la pulpa y la cáscara, tras lo cual se filtró y se secó en una estufa a 50°C durante una noche. Ya seca, se trituro hasta formar un polvo fino que se almacenó herméticamente a temperatura ambiente.

6.2.2.2 Medio para la producción de ANCUT1

Este medio fue optimizado por Segoviano (2011) y Esqueda (2012) para que *A. nidulans* produzca una única hidrolasa de ésteres carboxílicos. Está formulado como se describe en la tabla 10.

Tabla 10. Composición del medio de cultivo para inducir ANCUT1.

Compuesto	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza 100x	1 mL/L
Metionina	0.011 g/L
Arginina	5 mL /L
Biotina	0.5 mL/L
Cutícula de manzana	4 g / L
Glicerol	5 mL/L

El pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH 1 M antes de agregar la cutícula de manzana para evitar pérdida del compuesto por adhesión de la cutícula al electrodo del potenciómetro.

6.2.2.3 Medio para la producción de ANCUT2

Este medio también parte del reportado por Käfer et al. (2001) y fue modificado en el grupo de trabajo por Castro-Ochoa (2012) y Vergara (2010). Su composición aparece en la tabla 11.

Tabla 11. Composición del medio de cultivo para inducir ANCUT2.

Compuesto	Concentración
Sales 20x	50 mL/L
Elementos traza 100x	1 mL/L
Extracto de levadura	50 g/L
Metionina	0.011 g/L
Arginina	5 mL /L
Biotina	0.5 mL/L
Sacarosa	20 g / L
Aceite de olivo	50 mL/L

Se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 1 M antes de agregar el aceite de olivo para prevenir distorsión de la concentración del aceite por adhesión al electrodo. Tras agregar el aceite se formó una emulsión con un homogeneizador Ultra Turrax a 13500 rpm.

6.2.3 Crecimiento de *A. nidulans* y cosecha de esporas

Se propagaron esporas del hongo, conservadas en granos de sílica gel, en una caja Petri con medio mínimo, cultivándolas durante 7 días a 37°C en incubadora. Una vez que se observó crecimiento, se sembraron otras 10 cajas Petri con medio mínimo estéril, permitiendo su desarrollo por una semana. La cosecha de esporas se llevó a cabo agregando a cada caja 10 mL de una solución de Tween 80 al 0.1% en 2 partes y raspando las esporas con una asa micológica. La mezcla de Tween y esporas resultante se agregó a un tubo Falcon estéril. La solución resultante se centrifugó durante 10 min a 8500 rpm y el pellet resultante se conservó y se resuspendió en agua estéril para lavarlo y centrifugarlo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Esta operación se repitió 2 veces y el pellet final se conservó en 5 mL de agua destilada estéril y en refrigeración a 4°C. Se hizo un conteo de esporas en cámara de Neubauer para determinar el volumen necesario para agregar 1×10^6 esporas por mL de cultivo.

6.2.4 Producción y análisis de enzima

Se agregaron 50 mL de medio de cultivo específico para cada enzima a matraces Erlenmeyer de 250 mL, los cuales se esterilizaron a 121°C durante 15 min, con tapones de algodón. El matraz frío se inoculó con suspensión de 1×10^6 esporas/mL y se incubó por 24 y 48 horas a 300 rpm, 37°C en agitación orbital. Al final de las fermentaciones se filtró el medio de cultivo para separar el micelio del medio extracelular, se desechó el micelio y se conservó el filtrado en congelación.

6.2.4.1 Determinación de crecimiento de *A. nidulans* por peso seco del micelio

El papel filtro que se utilizó para separar el micelio del medio se había llevado a peso constante en estufa a 75°C y después se mantuvo en un desecador hermético con gel de sílice. Al momento de filtrarse el medio, se colocó cada disco de papel identificado en un embudo Buchner hasta que se recolectó todo el micelio, se dejó secando durante toda la noche en la misma estufa en la que se

puso a peso constante y se enfrió en un desecador, para finalmente pesarlo en una balanza analítica.

6.2.4.2 Determinación de pH

Se determinó el pH al extracto recién filtrado con un potenciómetro marca HANNA.

6.2.4.3 Determinación de concentración de proteína

Se hizo la determinación de la concentración proteica en cada filtrado enzimático mediante el reactivo de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un lector de microplacas. Se adicionaron 160 μL de la muestra a medir (diluida en caso de ser necesario) en un pozo de la microplaca y se le agregaron 40 μL del reactivo de Bradford. Se homogeneizó y se permitió reaccionar durante 5 minutos cada mezcla muestra-reactivo, tras lo que se realizó la lectura a una longitud de onda de 595 nm en el espectrómetro Epoch. Cada muestra se analizó por triplicado.

6.2.4.4 Determinación cuantitativa de actividad hidrolítica

La determinación de la actividad hidrolítica usada en este trabajo es una variante de la reportada por Nawani (2006) en la que se utilizan ésteres de p-nitrofenilo, en específico el lauril p-nitrofenilo (pNPL). Se agregaron 50 μL de extracto crudo enzimático a 850 μL de amortiguador de fosfatos 0.05 M pH 7 (amortiguador de trabajo) y se utilizaron 100 μL de una solución de pNPL 1 μM todo en un tubo eppendorff de 1 mL. Se homogenizó por inversión 3 veces y luego se leyó en espectrómetro a 420 nm de longitud de onda durante un minuto. Una unidad de actividad esterasa se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto. Cada muestra se realizó por triplicado. La actividad específica se calculó dividiendo este valor entre la cantidad de proteína presente en el medio.

6.2.4.5 Determinación cualitativa de actividad hidrolítica

Utilizando 75 μL del filtrado enzimático se procedió a hacer reaccionar con 75 μL de solución A y se dejó reposando en una microplaca por 15 min. Pasado el tiempo se agregaron 75 μL de solución B y se procedió a la lectura. Si el medio de reacción tomó una coloración rojiza intensa, se consideró positivo para actividad hidrolítica. Las soluciones A y B se prepararon del siguiente modo:

Solución A: se disolvieron 20 mg de α -naftil acetato en 5 mL de acetona y se agregaron 45 mL de amortiguador de trabajo.

Solución B: se emplearon 50 mg de Fast Red TR y se suspendieron en Tritón X-100 al 0.1% y se llevó a 50 mL con el amortiguador de fosfatos.

6.2.4.6 Determinación del perfil de proteínas en geles SDS-PAGE

Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo a la metodología de Laemmli (1970) utilizando un gel separador al 14% de acrilamida y un gel concentrador al 4% de acrilamida. Una vez cargadas las muestras se corrió la electroforesis a 80 V. Se utilizó un marcador de bajo peso molecular marca Bio Rad para determinar el peso de las proteínas resultantes de la electroforesis.

Se precipitaron entre 50~100 µg de proteína, considerando la concentración determinada por el método de Bradford. Usando el volumen adecuado de filtrado enzimático se agregó el 10% del volumen de filtrado en ácido tricloroacético (TCA), se agitó vigorosamente y se dejó en baño de hielo por 20 min, para luego centrifugar a 10 000 g por 10 min. Se desechó el sobrenadante y el pellet se lavó con 100 µL de acetona al 90%, se centrifugó a 10 000 g por 5 min y se retiró el sobrenadante. Este lavado se repitió 2 veces y la acetona se desecó en campana de flujo laminar por 2 h, para luego solubilizar el pellet en 30 µL de amortiguador de carga y someter a calentamiento (95°C) por 5 min. La solución resultante se congeló en caso de usarse después. Se empleó una tinción con Coomassie para revelar las bandas de proteína en el gel.

6.2.4.7 Identificación de proteínas con actividad de esterasa por zimograma

Se mezclaron 30 µL de enzima directamente con 10 µL de solución amortiguador de carga y se agregaron al gel. Después de la electroforesis se dejó el gel 30 min en solución de amortiguador de trabajo y se transfirió a una solución de amortiguador de trabajo con 5% de Triton X 100 por 30 min. Finalmente, se lavó el exceso de esta solución con amortiguador de trabajo y se dejó reaccionando con la solución A del ensayo cualitativo de actividad hidrolítica durante 15 min, después de los cuales se agregó la solución B para revelado de bandas. El sustrato fue α -naftil acetato.

6.2.5 Inmovilización

6.2.5.1 Tratamiento preparativo para inmovilizar enzima: concentración de extracto enzimático

El extracto se concentró 20 veces, ya que se redujo el volumen de un litro a 50 mL por ultrafiltración en una celda con agitación magnética (Amicon-Millipore), con una membrana con poros de exclusión de 10 kDa de peso molecular. En el caso de la obtención de la cutinasa de 29 kDa se llevó a cabo un tratamiento adicional de éter de petróleo para extraer el aceite de olivo remanente en el filtrado enzimático. Al final los concentrados enzimáticos se diluyeron en 100 mL de amortiguador de trabajo (o 100 mL de amortiguador Tris-HCl pH 8.8 0.05 M). El concentrado enzimático se congeló en un recipiente de plástico por inmersión en un baño de hielo seco y después se congeló en las paredes del envase y se liofilizó. Después de 24 h se obtuvo un polvo que se analizó para determinar su concentración proteica. Se conservó en congelación a -20°C, del que se agregó la cantidad suficiente de liofilizado para tener 200 µg/mL de proteína para llevar a cabo los diferentes procedimientos de inmovilización.

6.2.5.2 Inmovilización en diferentes soportes

Cada soporte distinto tiene una metodología particular para fijar la proteína de interés y obtener el biocatalizador final. Los soportes que se emplearon fueron Accurel MP 1000, Nylon 6 y Celite 545. Adicionalmente se probó el generar AEE a partir de los datos de precipitación de Vega (2013) y Bermúdez (2013). Para Accurel MP1000, Nylon 6 y Celite 545 se conservó la reacción a una temperatura de 4°C. Para el caso de los agregados enzimáticos se realizó en un baño de hielo.

6.2.5.2.1 Accurel MP1000

La metodología de inmovilización se basó en el proceso reportado por Vergara (2010). El soporte se humedeció en etanol absoluto, se decantó y se sumergió en una mezcla de etanol y agua destilada (50:50) para finalmente lavarlo en agua destilada. Terminada esta etapa el soporte se puso a secar en una estufa a 37°C durante una noche, con el fin de incrementar la afinidad de las enzimas por la superficie del soporte. Para lograr la adsorción se agregó un volumen de concentrado enzimático (o liofilizado resuspendido) tal que el volumen de enzima fuera 50 mL por gramo de soporte. Se incubaron el soporte y la enzima dentro de un matraz sobre una placa con agitación orbital a 200 rpm, controlando la temperatura a 4°C durante 3 h. Al final del proceso se filtró el Accurel del medio, se enjuagó con solución amortiguador de trabajo y luego con agua desionizada. El biocatalizador lavado se dejó en un vidrio de reloj o en una caja Petri y se mantuvo en un desecador dentro de un refrigerador hasta que desapareció todo rastro de humedad. Se mantuvo en refrigeración hasta su uso. Para determinar la eficiencia del inmovilizado se miden la concentración inicial de proteína y la actividad específica. Luego del proceso de inmovilizado se miden los mismos parámetros para el sobrenadante y se concluye que la diferencia de valores es la concentración de enzima y su actividad específica que se quedó en el soporte.

6.2.5.2.2 Nylon 6

Se preparó el soporte para antes de ponerlo en contacto con la enzima y un agente enlazante, tal como está reportado por Carta et al. (1991). Se sumergen las perlas en nitrógeno líquido e inmediatamente se trituran en un molino. Se procuró que el tamaño de partícula se conservara entre 0.2 mm y 0.1 mm utilizando tamices. Se pretrató el soporte 5 s con una solución de HCl 6 N y luego se enjuagó el Nylon 6 en agua desionizada. La masa formada se trituró en mortero para separar las partículas tratadas y se volvió a enjuagar el Nylon con agua desionizada. Para lograr la inmovilización por enlace covalente: la enzima se solubilizó respetando la misma proporción masa/volumen que en el caso del Accurel. El Nylon 6 se agregó a la solución junto con glutaraldehído al 2.5% y se mantuvo en agitación a 200 rpm dentro de un vial en refrigeración por 24 h. Al final del ciclo se lavó el biocatalizador con solución amortiguador de trabajo y luego con agua desionizada. La forma final del biocatalizador se almacenó en viales y en refrigeración hasta el momento de su uso. Se evaluó la eficiencia del proceso conforme a lo indicado con el Accurel MP1000.

6.2.5.2.3 Celite 545

Por su alta porosidad permite una gran área de adsorción para inmovilizar enzimas. La inmovilización se realizó a partir de la metodología reportada por Kumar et al. (2011). Primero se lavó el soporte con el objetivo de remover partículas solubles contaminantes y sedimento fino de menor tamaño. Se pesó 1 g de Celite en un vaso de precipitado, al que se le agregó 50 mL de solución tampón de trabajo y se mantuvo en agitación con una barra magnética durante media hora. Al final de este lapso se esperó a que el Celite sedimentara y se descartó el sobrenadante, operación que se repitió tres veces o más, según la claridad del sobrenadante. Al final del proceso se depositó el Celite sobre un papel filtro en un vidrio de reloj y se secó en una estufa a 37°C por toda una noche, para después conservar en un envase cerrado dentro de un desecador. La

adsorción se logró al agregar enzima en la misma proporción que en el caso del Accurel: se mantuvo en agitación por 3 h, sedimentó el biocatalizador y se lavó con amortiguador de trabajo 2 veces para dejarlo en un desecador en refrigeración hasta que perdió todo rastro de humedad. Al final de este proceso el biocatalizador se conservó a 4°C en un envase cerrado hasta el día de su uso. Se siguió la misma técnica para detectar la eficiencia del proceso que se empleó para Accurel MP1000.

6.2.5.2.4 Agregados Enzimáticos Entrecruzados

Se formaron agregados insolubles a partir de una combinación de técnicas reportadas por Sheldon y Gupta et al., (2011) modificado para las cutinasas con los datos de precipitación de Bermúdez (2013) y Vega (2013). Inicialmente se agregó persulfato de amonio en una cantidad específica según cada enzima, de acuerdo al volumen de concentrado enzimático que se utilizó. La solución se mantuvo en baño de hielo durante todo el proceso y en agitación magnética en todo momento, se agregó lentamente el persulfato necesario (50% para ANCUT2 y 65% para ANCUT1) y se verificó la presencia del precipitado enzimático. Posteriormente se procedió al entrecruzamiento. Se empleó como agente el glutaraldehído, que se tomó de una solución concentrada al 25% y se agregó a una concentración final de 0.25% en la solución con el precipitado enzimático. Al final de este paso se obtuvieron partículas de tamaño variable que se trituraron para conservar un polvo fino que es el biocatalizador final (no requiere lavado). Se mantuvo en refrigeración dentro de un frasco hermético hasta el día de su uso. Igual que con el Accurel MP1000, se midieron los parámetros descritos previamente para el sobrenadante.

6.2.6 Análisis de biocatalizador

6.2.6.1 Determinación de la eficiencia de inmovilización

Se determinaron la actividad enzimática y el contenido proteico de la solución enzimática a inmovilizar, para luego medir los mismos parámetros para el sobrenadante y calcular la actividad específica resultante. El rendimiento se calculó al determinar la diferencia de valores en términos de retención de actividad enzimática tras el proceso de inmovilización.

6.2.6.2 Cuantificación de actividad del biocatalizador

Se utilizó una variante del método utilizado para la enzima libre: se pesaron 5 mg del biocatalizador y se adicionaron 900 mL de solución amortiguador de trabajo, para luego agregar 100 µL de pNPL 1 mM y homogenizarlo por inversión durante 10 min. Se centrifugó para sedimentar el biocatalizador y coleccionar el sobrenadante, con el que se hizo una lectura a 420 nm en un espectrofotómetro UV-visible. Se repitió por triplicado y se corrió un blanco con las mismas condiciones.

6.2.7 Condiciones de reacción para transesterificación

Se procedió a emplear la enzima en su forma libre y en sus distintos soportes de inmovilización. Se evaluaron las siguientes condiciones:

- Relación molar alcohol: aceite.

- Temperatura de reacción.
- Velocidad de agitación.
- Presencia y ausencia de *ter*-butanol.
- Control de la humedad del medio.
- Tiempo de reacción.
- Adición de metanol a diferentes tiempos.

6.2.7 Condiciones de reacción para la transesterificación

6.2.7.1 Relación molar alcohol:aceite

Se realizaron pruebas con relaciones molares desde alcohol:aceite desde 3:1 hasta 12:1.

6.2.7.2 Temperatura de reacción

Se tomó la condición que representara la temperatura ideal de actividad para las cutinas AN CUT1 y AN CUT2 (Esqueda, 2012 y Castro, 2012) además de una condición reportada en la literatura (Badenes et al., 2010) dejando las condiciones a analizar en 30 y 37°C.

6.2.7.3 Velocidad de agitación

Se empleó una incubadora con agitación orbital y se usaron 200, 250 y 300 rpm durante toda la reacción. Se ajustó el volumen de reacción y el contenedor de tal manera que la homogenización fuera más eficiente, que el biocatalizador no se perdiera en las paredes del matraz y el metanol no se volatilizara.

6.2.7.4 Presencia y ausencia de *ter*butanol

En el proceso se evitó el uso de *ter*butanol, por lo que sólo se evaluó agregar un 10% del volumen total de aceite para favorecer la homogenización del medio de reacción.

6.2.7.5 Control de A_w del medio

Se probaron tanto la enzima libre como fijada a un soporte, controlando el A_w en 0.33 con cloruro de magnesio y detectándolo con equipo Rotronic A_w Quick, conservando condiciones anhidras de reacción. Este solo fue posible para la enzima inmovilizada, ya que su forma libre fue agregada directamente del concentrado enzimático o del liofilizado solubilizado en solución tampón de trabajo. Para manejar condiciones anhidras se agregó malla molecular al medio de reacción en un 10% (w/v).

6.2.7.6 Tiempo de reacción

Se ensayaron tiempos de 12, 24 y 48 h.

6.2.7.7 Adición de metanol a diferentes tiempos

Se adicionó el metanol en 3 partes: la primera al inicio de la reacción, después a las 4 y a las 8 h.

6.2.7.8 Materia prima

Una vez que se encontraron las condiciones más favorables de transesterificación de aceite de ajonjolí, se utilizaron distintos aceites para la reacción: aceite de jatrofa, aceite de pepita de uva y aceite de coco.

El producto de la reacción se sometió a lavado con una parte de agua para separar el glicerol resultante de la catálisis y luego se agregó una parte de hexano mezclándola por inversión. Se conservó la fase orgánica y se dejó volatilizándose. El producto obtenido se empleó para los siguientes experimentos.

6.2.8 Determinación de productos de transesterificación

6.2.8.1 Cromatografía de capa fina

El primer paso para determinar la presencia de metil ésteres es buscar la presencia de biodiesel en capa fina. La fase móvil se compuso de hexano:acetato de etilo:diclorometano en proporción 80:10:10 y se mantuvo en la cámara cromatografía por 30 min para alcanzar el punto de saturación. Se corrió la placa hasta que la fase móvil alcanzó una altura de 4 cm sobre la marca de aplicación y se volatilizó el excedente de fase móvil. La placa se procesó utilizando KMnO_4 al 5% en NaOH al 1% como revelador. Se sumergió la placa en el revelador durante 5 segundos y luego se enjuagó con exceso de agua destilada hasta que se eliminó el color morado de la placa. Se emplearon estándares y blancos de reacción para procesarse a la par de las aplicaciones de las muestras para descartar la presencia o ausencia de metil ésteres.

6.2.8.2 Cromatografía de gases

Las muestras que resultaron positivas en la prueba de cromatografía de capa fina se analizaron posteriormente en un cromatógrafo de gases marca Agilent, con una columna HP-inowax de 30 mx 0.25 mm y diámetro de 0.5 μm . La temperatura que se manejó para el método fue de iniciar a 150°C, luego pasar a 225°C a 15°C/min durante 5 min, mantenerse en 230°C por 20 min y terminar a 240°C por 5 min. Primero se pesaron 5 mg de muestra en un vial previamente lavado con agua destilada y jabón, seguido de limpieza con hexano. Los 5 mg en el vial se disolvieron en 1 mL de hexano grado HPLC y a partir de este punto se preparó el equipo para la determinación.

Las condiciones de lectura consistieron en una inyección de 10 μl mientras que el equipo se mantuvo en las siguientes condiciones: la temperatura del equipo permaneció a 150 °C durante 15 minutos y luego se aumentó gradualmente durante 10 min hasta alcanzar 280°C; finalmente se mantuvo a esta temperatura por 5 min. Se corrieron un blanco y un estándar de metil ésteres de concentración conocida. Se agregó 1 mg del patrón Sigma-Aldrich de 99% de pureza y se solubilizó en 1 mL de hexano.

6.2.8.3 Espectrometría de masas

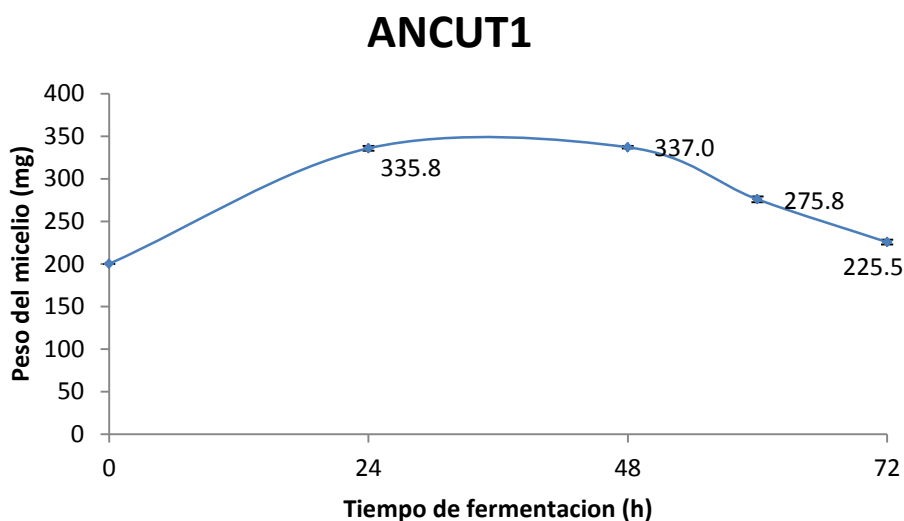
Se envió la muestra a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación para su análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas de ionización en un espectrómetro de tiempo de vuelo Leco Pegasus III, mientras que el cromatógrafo de gases con detector F.I.D fue de la marca Agilent. Se obtuvieron cromatogramas que se cotejaron con una base de datos para especular posibles productos. El programa utilizado para la lectura fue 100°C durante 1.7 min y luego calentar hasta 300°C a 20°C/min hasta que se cumplieran 10 min de estas condiciones.

7. Resultados y discusión

7.1 Producción de la enzima

7.1.1 Determinación de crecimiento por peso seco del micelio

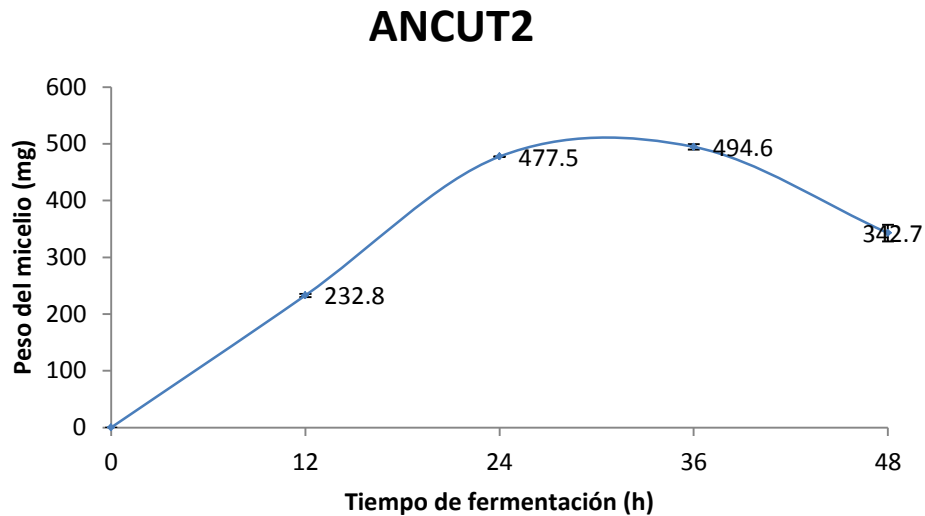
Esqueda (2012) reportó que las condiciones de producción para ANCUT 1 permiten un máximo de producción a las 48 h, y postuló que hay una relación entre desarrollo micelar y concentración de la proteína de interés. En este trabajo para ANCUT1 se exploró la producción a las 24, 48, 60 y 72 h. Para el caso de ANCUT2 se evaluó su producción a las 12, 24, 36 y 48 h tomando en cuenta el informe de Vergara (2010), que indica que a partir de las 24 h se ha reportado tener una buena concentración de la misma.



Gráfica 1. Crecimiento de *A. nidulans* durante 72 h evaluado como peso seco. En el tiempo 0 se toma a consideración el peso de la cutícula.

En la gráfica 1 se observa el peso seco del micelio en cada tiempo a evaluar. Se muestra un peso inicial de 200 mg, que corresponde a la cutícula empleada en el medio de cultivo. Aunque al final de las fermentaciones era posible suponer que se había utilizado una parte del mismo, no era factible determinar cuánta se hidrolizaba. Se ha encontrado que la enzima no es capaz de degradar la cutina en las condiciones ensayadas, según los datos reportados por Esqueda (2012) y por lo tanto, no se podría apreciar hidrólisis de la fuente de carbono, aunque se especula que hay un elemento desconocido en el preparado de cutícula que causa la inducción de ANCUT1, según el trabajo de Bermúdez y Vega en el 2013. Se observa que el peso del micelio y la cutina agregada tienen un cambio al avanzar el tiempo, se podría suponer que es la misma a las 24 y a las 48 h, tiempo señalado por Esqueda (2012) como óptimo para lograr la máxima producción de enzima, pero en términos de productividad enzimática resulta más indicado cosechar a las 24 h. Dado que

no se tiene un método para determinar la cantidad neta de micelio o la cantidad de sustrato consumido, no es posible correlacionar el crecimiento del micelio con la producción de la enzima.



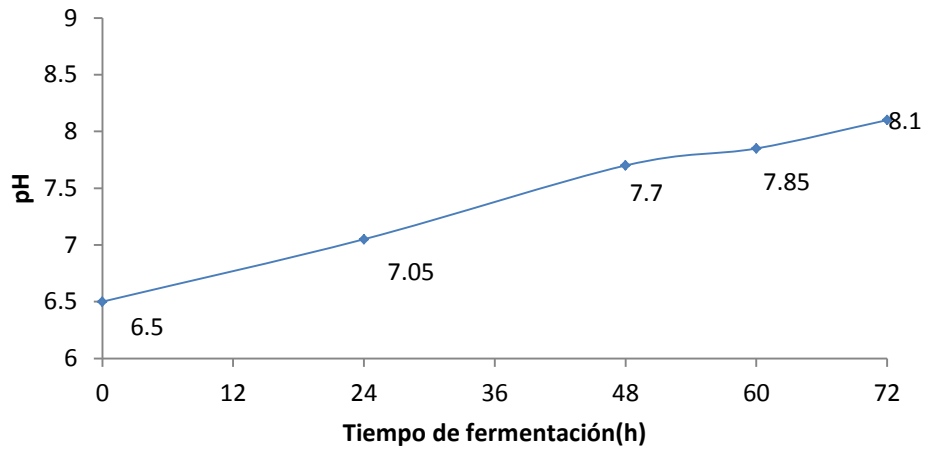
Gráfica 2. Crecimiento de *A. nidulans* durante 48 h, determinado como peso seco, en el medio para ANCUT2.

El comportamiento del crecimiento micelar en el medio de expresión de ANCUT2 (ilustrado en la gráfica 2) es distinto pues el medio es diferente al empleado para producir ANCUT1. La fuente de carbono e inductor del medio de ANCUT2 permiten el desarrollo de biomasa pues no requieren complejos polienzimáticos para su degradación, mientras que en el medio de ANCUT1 el inductor (cutícula) requiere ser cortado por varias enzimas para liberar algún tipo de nutriente. El hongo presenta una curva típica de crecimiento y el tiempo de máximo desarrollo de biomasa coincide con el tiempo reportado por Vergara (2010) para la producción de la enzima, donde se observó que hay una relación entre el desarrollo de biomasa y la producción de la enzima.

7.1.2 Determinación de pH

Al concluir el tiempo indicado, se verificó el pH del filtrado enzimático con un potenciómetro, cuyos resultados para cada enzima se muestran en la Gráfica 3.

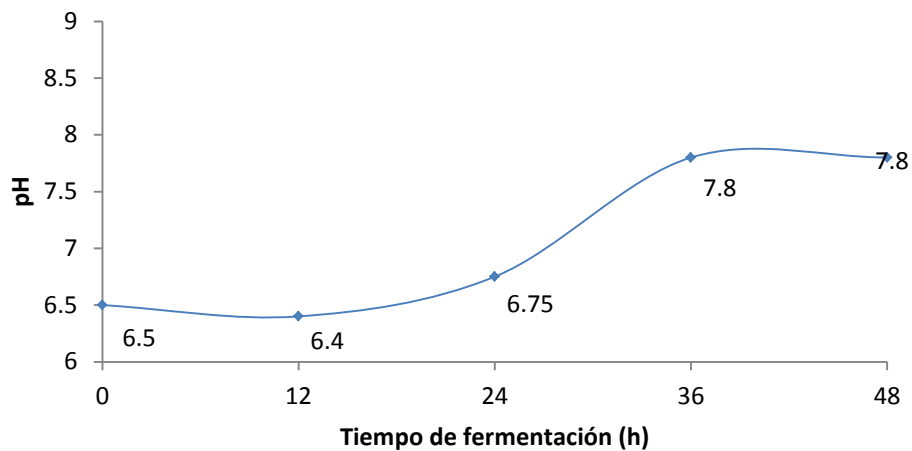
ANCUT1



Gráfica 3. Evolución del pH del filtrado de ANCUT 1 a lo largo del proceso de crecimiento.

La gráfica 3 ilustra la progresión de pH en el medio de ANCUT1 en los tiempos estudiados. El pH va aumentando conforme pasa el tiempo. En virtud de que se ha comprobado que ANCUT1 tiene mayor actividad en pH alcalino (Esqueda 2012) este cambio no afectará la actividad enzimática.

ANCUT2



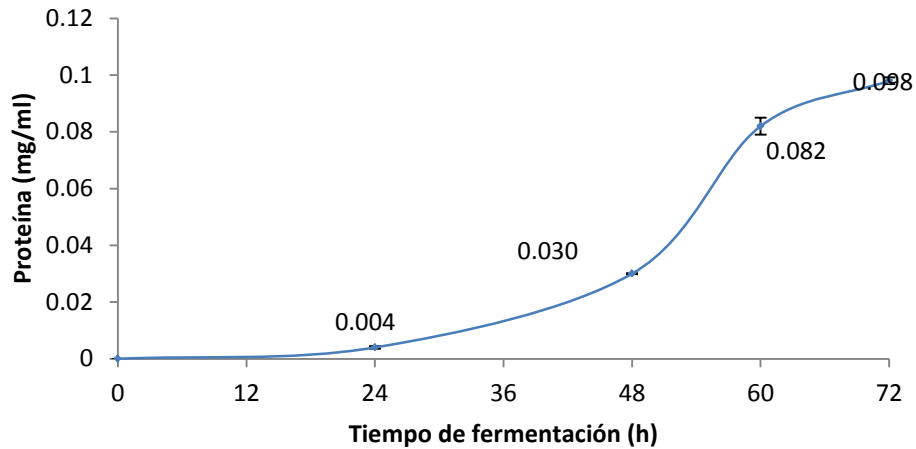
Gráfica 4. Evolución del pH del filtrado de ANCUT2 a lo largo del proceso de crecimiento.

Se midió el pH en los tiempos específicos para ANCUT2 y los resultados se muestran en el gráfico 4. Si bien la cinética de variación de pH es diferente para las dos enzimas, en ambos casos se alcanza el mismo pH a las 48 h.

6.1.3 Determinación de proteína extracelular

Otro parámetro que se evaluó fue la concentración de la proteína extracelular, medida con el reactivo de Bradford.

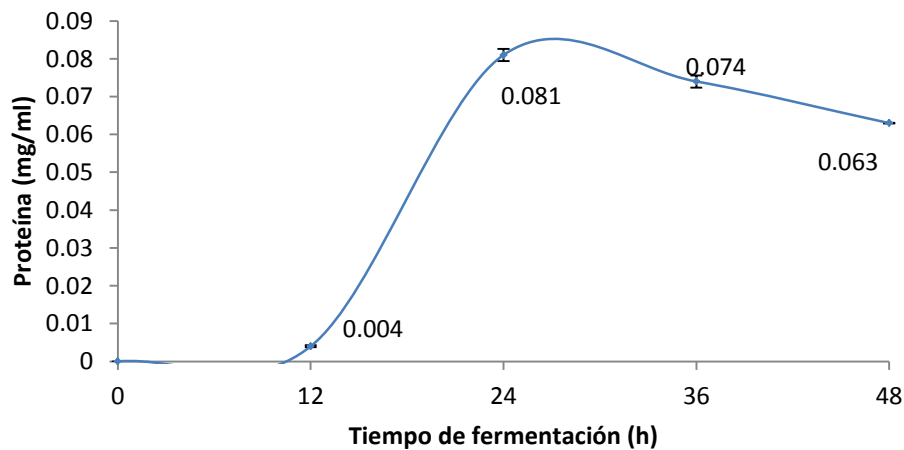
ANCUT1



Gráfica 5. Producción de proteína en el medio con cutícula de manzana para ANCUT1.

La gráfica 5 representa la proteína producida y su comportamiento sugiere que la generación de micelio está relacionada en el aumento de proteína de manera directamente proporcional, ya que aumenta su concentración conforme avanzan las horas. Si bien esto es asumiendo que la concentración de la proteína es en su mayoría ANCUT1, es posible respaldar dicho argumento debido a que los medios de cultivo fueron optimizados por Esqueda (2010) para obtener únicamente ANCUT1.

ANCUT2

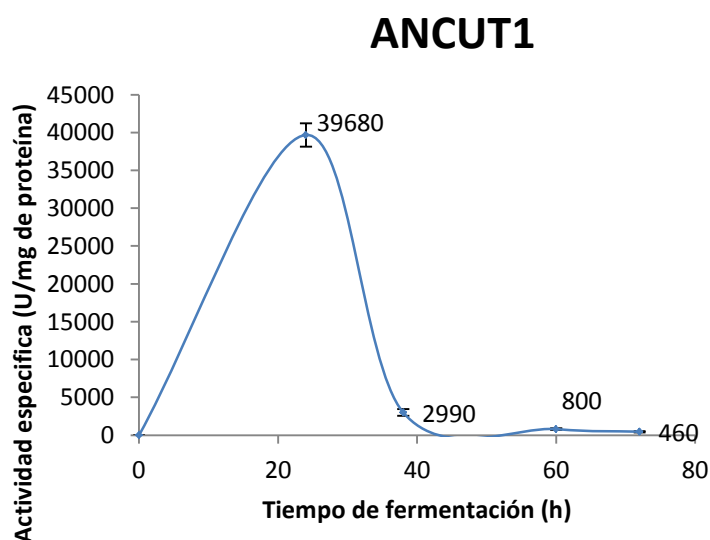


Gráfica 6. Producción de proteína en el medio para ANCUT2.

En el caso de ANCUT2 la producción de proteína coincide con lo reportado por Vergara (2010), como se muestra en la gráfica 6, donde el tiempo de mayor producción es a las 24 h, y la síntesis de proteína llega al punto más alto y luego desciende aproximadamente 30% conforme pasa el tiempo. En este caso la concentración de la proteína está mejor relacionada con el desarrollo de biomasa que en el caso del medio para producir la enzima ANCUT1, pues tanto la curva de crecimiento determinado por peso seco como la proteína extracelular muestran una tendencia muy parecida.

7.1.4 Determinación de actividad enzimática por métodos cualitativo y cuantitativo

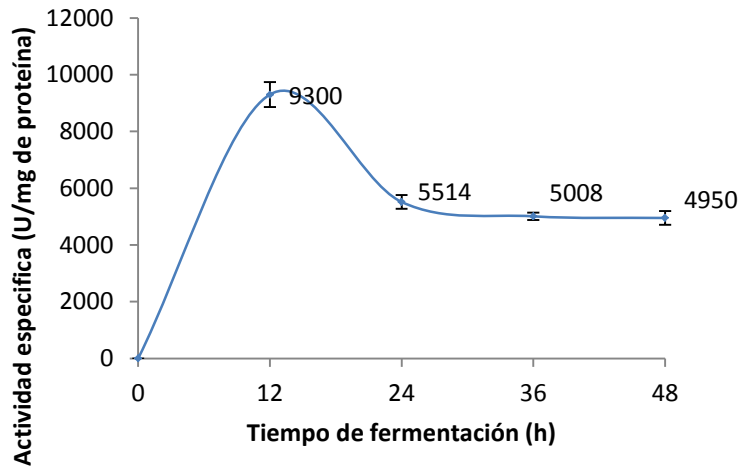
Se calculó la actividad específica de cada enzima. Primero se obtuvo la lectura volumétrica empleando pNPL y haciendo una lectura espectrofotométrica (este valor no se muestra). El resultado se divide entre la concentración de proteína y el valor obtenido muestra unidades de actividad enzimática por miligramo de proteína. Para el caso de ANCUT1 se observa la mayor actividad enzimática a las 24 h (gráfica 7), lo que contrasta con lo reportado por Esqueda (2012), quien encontró que la mayor actividad de la enzima se encuentra a las 48 h.



Gráfica 7. Actividad específica de esterasa encontrada durante los distintos tiempos de la fermentación de ANCUT1.

A partir de estos datos se tomaron los filtrados obtenidos a las 24 y 48 h para ver la actividad catalítica de esterasa en un zimograma y así determinar cuál es el más conveniente para inmovilizar en un soporte y utilizarlo como biocatalizador. En el medio para ANCUT2 se puede apreciar que la mayor actividad a 12 h (Gráfica 8), Vergara (2010) encontró que el mejor resultado se obtenía a las 24 horas, pero no exploró la producción a las 12 h.

ANCUT2



Gráfica 8. Determinación de actividad enzimática específica de esterasa en el medio de cultivo para ANCUT2.

En primera instancia se monitorearon cualitativamente los distintos tiempos de producción a evaluar (24, 48, 60 y 72 h para ANCUT1 y 12, 24, 36 y 48 para ANCUT2) y se demostró que la actividad a 24 y 72 h es baja para ANCUT1, aun después de dejarlo por mucho tiempo (se puede ver que el blanco presenta hidrólisis). Ya que la actividad específica mostró una elevada hidrólisis de pNPL, el resultado que se observa en el ensayo con acetato de α -naftilo puede sugerir que el sustrato de preferencia de esta enzima es de cadena media (de 12 a 14 carbonos). ANCUT2 presentó actividad apreciable a las 12 h y a partir de ahí, todas las muestras tuvieron una alta actividad enzimática. Dado que las determinaciones de actividad enzimática sobre pNPL mostraron que ANCUT1 a las 24 y 48 horas y ANCUT2 a las 12 y 24 horas generan buenos niveles de actividad (figura 8), el siguiente experimento consistió en explorar cuáles eran las enzimas responsables de la actividad hidrolítica mediante un zimograma.

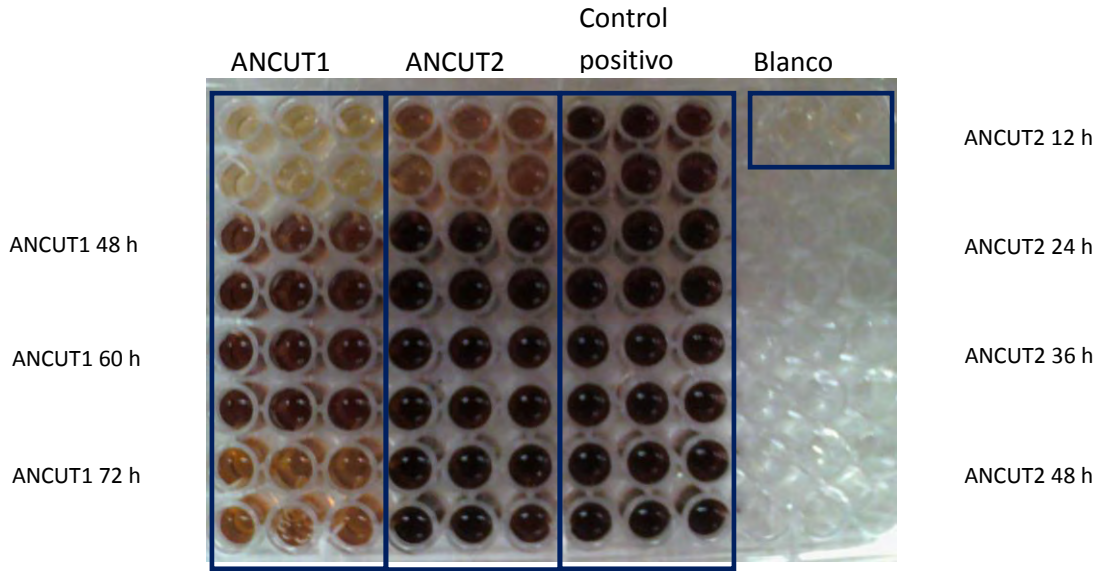


Figura 8. Determinación de actividad hidrolítica de AN CUT1 y AN CUT2 con acetato de α -naftilo y Fast Red. Se realizaron lecturas por duplicado en tiempos y triplicado por muestra. Los tiempos para cada enzima son diferentes: para AN CUT1 24, 48, 60 y 72 h. Para AN CUT2 12 h, 24, 36 y 48 h.

Si bien los metil ésteres que se emplean en las reacciones medidas no son el sustrato específico de las cutinasas ni se parecen a la cutina, son útiles para estimar en aproximado la actividad enzimática de esterasa.

7.2 Identificación de las proteínas con actividad esterasa por geles SDS-PAGE y zimogramas

Las figuras 9 y 10 que se muestran a continuación permiten observar los perfiles proteínicos de los sobrenadantes obtenidos en los medios para la producción de AN CUT1 y AN CUT2, respectivamente.

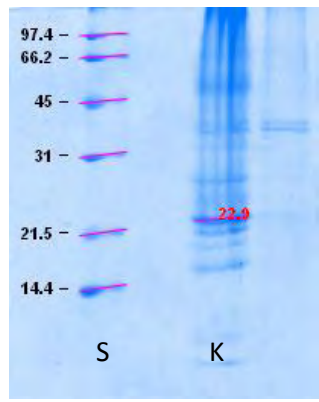


Figura 9. Perfil de proteínas en gel SDS PAGE donde S representa el estándar de bajo peso molecular y K es el extracto crudo (EC) del medio de cultivo para la producción de AN CUT1 (se marca con su peso), la proteína de interés se muestra alrededor de 22 kDa.

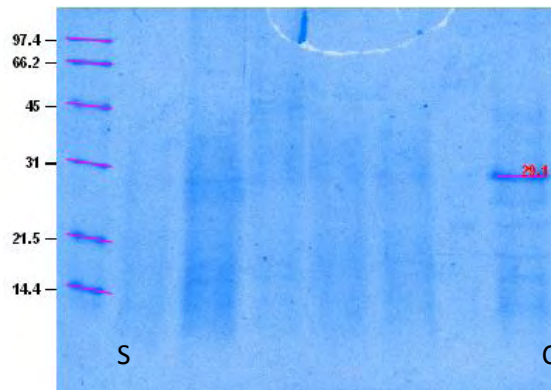


Figura 10. Perfil de proteína en gel SDS PAGE el carril S muestra el estándar de bajo peso molecular y el carril C es el extracto crudo (EC) del medio de cultivo para la producción de ANCUT1 (se marca con su peso), la proteína de interés se muestra alrededor de 22 kDa ANCUT2. La proteína de interés se muestra alrededor de 29 kDa.

Se utilizó el equipo gel doc de Biorad para hacer la lectura de los geles y determinar el peso molecular de las proteínas identificadas con el software Image Lab. Los valores de 22.9 y 29.1 kDa, se encuentran cercanos al peso teórico de 22 y 29 kDa. En el primer carril se cargó un marcador molecular de bajo peso para poder comparar las proteínas del gel, la diferencia que se observa de las proteínas obtenidas comparando con el peso molecular teórico puede deberse a que el alineamiento de la lectura es aproximado y la corrida del gel fue curva.

El zimograma (figura 11) se corrió con dos objetivos: el primero, verificar qué proteína es responsable de la actividad hidrolítica y segundo, definir cuál de las condiciones de producción que se sospechan óptimas (sean las reportadas o las encontradas en las mediciones de este trabajo).

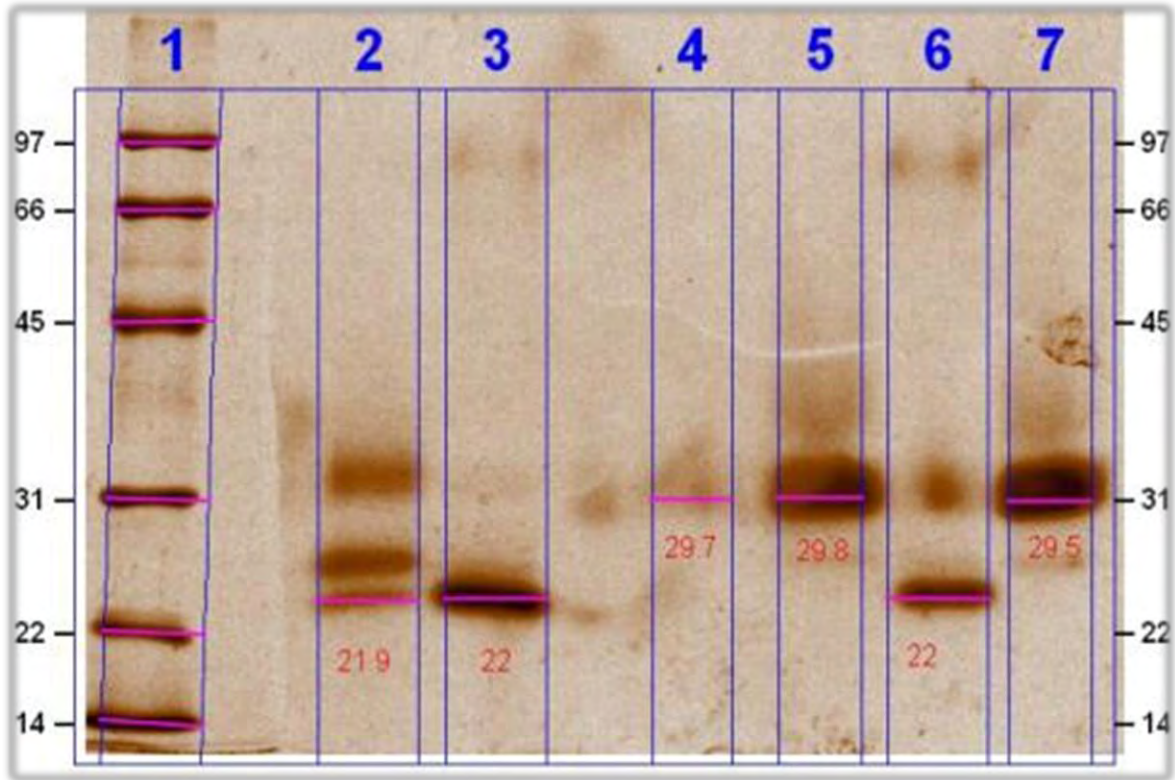


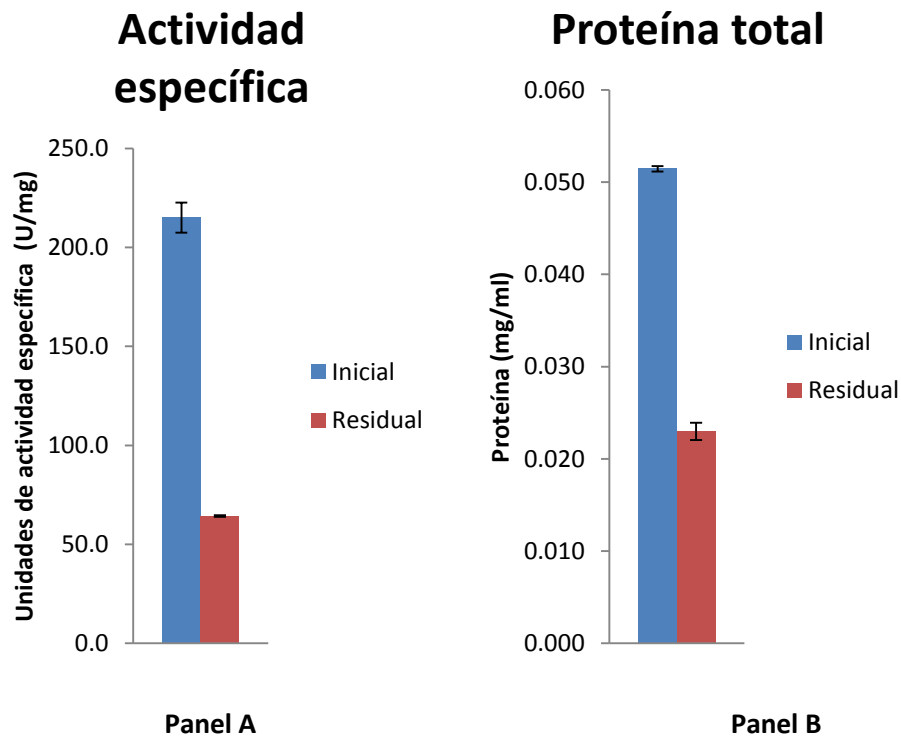
Figura 11. Proteínas con actividad esterasa encontradas en las distintas condiciones de producción de ANCUT1 y ANCUT2. Zimograma obtenido tal y como se describe en la sección de materiales y métodos, empleando α -naftil acetato como sustrato. Carril 1 muestra el marcador de bajo peso molecular, los carriles 2 y 3 muestran condiciones de producción distintas para el E.C. de ANCUT1, los carriles 4 y 5 muestran condiciones de fermentación particulares para el E.C. de ANCUT2 y los carriles 6 y 7 son muestras de ANCUT1 y ANCUT2 de la fermentación de otro lote del grupo de trabajo.

Se empleó el mismo marcador molecular para definir las masas moleculares observadas en las bandas. En la figura 10 los carriles 2 y 3 se cargaron con el extracto enzimático obtenido en el medio de producción de ANCUT1 a las 24 y 48 h, respectivamente. Se aprecia que a las 24 h se produjeron otras enzimas con actividad esterasa, incluso posiblemente ANCUT2, mientras que a las 48 h ya no se visualizan estas proteínas. Esto explica en parte por qué se obtuvo mayor actividad enzimática a las 24 h. Se puede apreciar que la enzima en su estado más puro se obtuvo a las 48 horas, ya que la banda es muy intensa. En el carril 4 y en el 5 se cargó muestra proveniente del medio de cultivo para ANCUT2 cosechada a las 12 y 24 h. Se observa que la condición con mayor actividad hidrolítica fue a las 24 h, lo que contrasta con lo encontrado en la determinación de actividad específica. Los carriles 6 y 7 corresponden a ANCUT1 y ANCUT2, respectivamente, y se trata de muestras proporcionadas por otros miembros del grupo de trabajo para demostrar la similitud de migración en el gel. Dado que las condiciones reportadas en el grupo de trabajo fueron las que obtuvieron mejor rendimiento, son las que se usarán para hacer pruebas de inmovilización y biocatálisis.

7.3 Inmovilización de enzimas

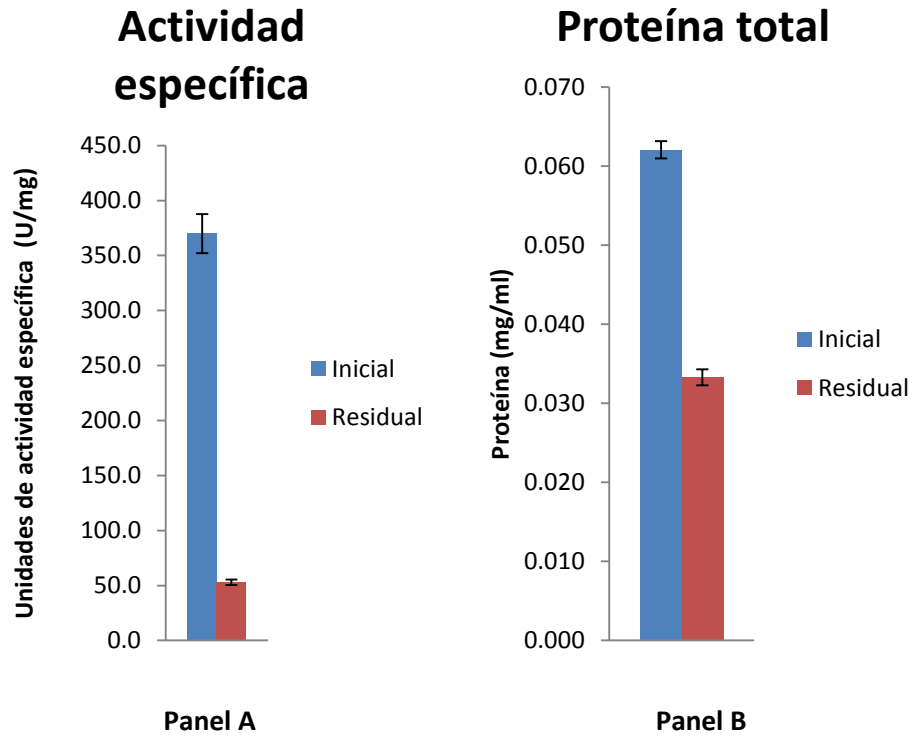
7.3.1 Inmovilización en Accurel MP100

Se realizó el tratamiento previo de Accurel MP1000. Se puso en contacto con el soporte, para ANCUT1, una solución enzimática con 0.051 mg de proteína y 215 unidades de actividad específica. La eficiencia del proceso se ilustra en las siguientes gráficas:



Gráfica 9. Rendimiento de la inmovilización de ANCUT1 en Accurel MP1000. En el panel A se muestra la actividad específica y en el B, la proteína total

Después del proceso de inmovilización se determinó que 0.028 mg de proteína se adhirieron al soporte y 151 unidades de actividad específica, lo que permite un rendimiento adsorción de 55% de proteína (gráfica 9, Panel A) y un 70% de actividad enzimática específica (gráfica 9, Panel B).



Gráfica 10. Rendimiento de la inmovilización de ANCUT2 en Accurel MP1000. En el panel A se muestra la actividad específica y en el B, la proteína total

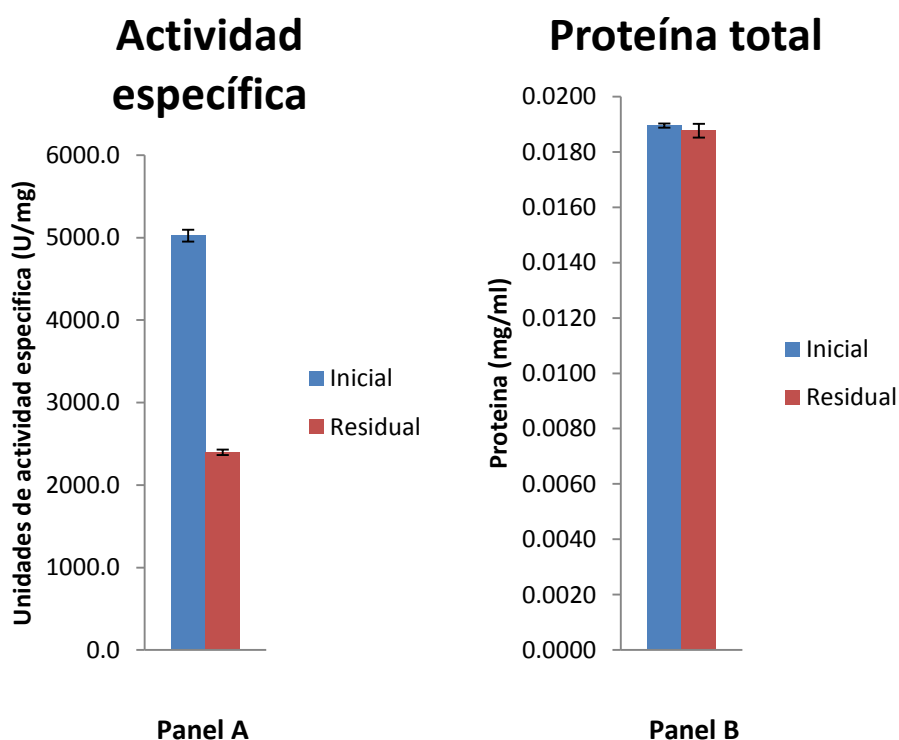
En el caso de ANCUT2 se utilizó una solución con 0.093 mg de proteína y 724 unidades de actividad específica, de los cuales 0.029 mg de proteína quedaron inmovilizados en el soporte y 317 unidades de actividad enzimática específica quedaron adheridas al soporte, por lo que el rendimiento final de inmovilización para ANCUT2 se ubicó en 46% de la proteína total (gráfica 10, panel A) y 85% de actividad enzimática (gráfica 10, panel B).

Estos datos son parecidos a los obtenidos por Vergara (2010) quien registró un 92% de actividad perdida en el medio durante la inmovilización de la misma enzima en Accurel, aunque se siguieron las mismas condiciones de inmovilización. Esto puede deberse a que el proceso de inmovilización se afecta en varios aspectos y da como resultado un sistema de inmovilización heterogéneo. Se pueden presentar partículas de soporte con saturación máxima de enzima, partículas que poseen una saturación parcial del soporte y partículas sin enzima inmovilizada (Chen 2000, Mateo 2007 y Oliveira et al., 2006). Los motivos pudieran ser que no hubo una exposición suficiente de parte de la enzima al soporte, la temperatura de reacción, ya que contribuye a la conformación enzimática (Severac, 2011 e Iyer, 2000) que puede favorecer o inhibir la actividad del catalizador. Cabe la probabilidad de que el lavado con éter de petróleo al medio haya sido incompleto, pues se sabe que el aceite de olivo remanente en el medio pudiera interactuar con el soporte y disminuir la posibilidad de adsorción del Accurel, resultando en un proceso de inmovilización ineficiente pero

la diferencia del 7% comparado con lo obtenido por Vergara (2010) permite que el biocatalizador se pueda emplear en diversas reacciones

7.3.2 Inmovilización en Nylon 6

Con la enzima ANCUT1 se obtuvo un rendimiento muy pobre de inmovilización al tratar de unirla a Nylon 6, pues fue menor al 1% tanto en la proteína unida al soporte como en la actividad enzimática detectada, por lo que no se tienen resultados cuantificables. En contraste, con ANCUT2 se obtuvo una retención apreciable en actividad inmovilizada. El resultado se muestra en los paneles de la siguiente gráfica:



Gráfica 11. Rendimiento de la inmovilización de ANCUT2 en Nylon 6.

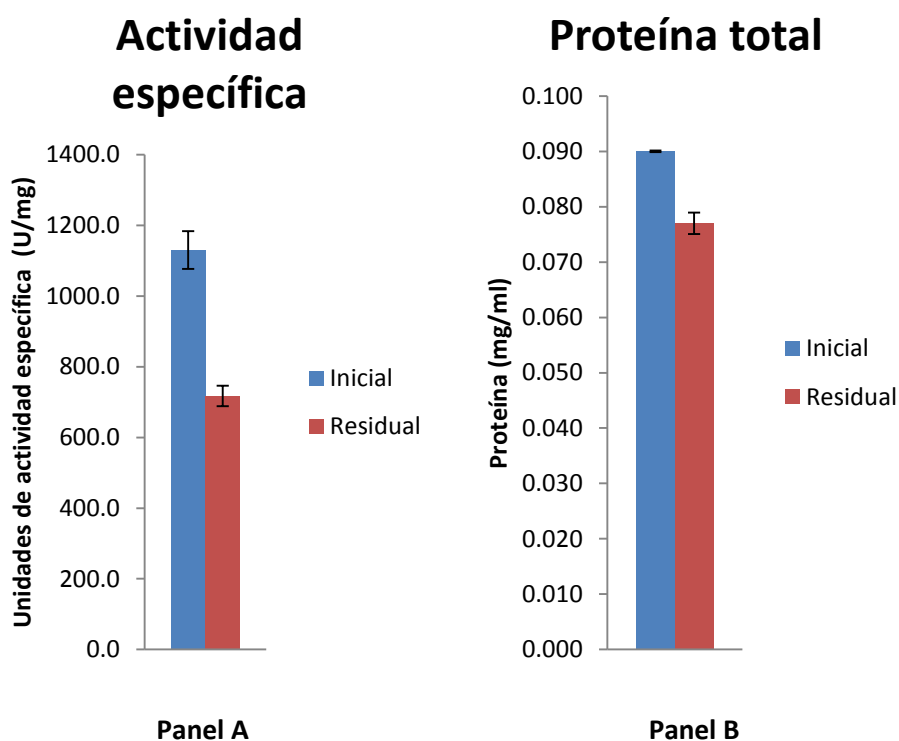
Se partió de una solución con 0.0190 mg/mL de proteína y 5023 unidades de actividad específica, de las cuales 0.0002 mg/mL de proteína y 2624 unidades de actividad específica quedaron en el biocatalizador final. El rendimiento final de inmovilización para ANCUT2 fue menor al 1% de eficiencia (gráfica 11 panel A) de la proteína total y 52% de actividad enzimática (gráfica 11 panel B). Donde cada unidad de actividad específica es el número de unidades de enzima por miligramo de proteína.

El proceso de inmovilización de enzimas en Nylon 6 depende de la presencia de glutaraldehído, el cual tiene como función ser enlazante entre el soporte y las lisinas de la proteína. Está establecido que no hay una lisina en la tríada catalítica (Esqueda 2012 y Castro-Ochoa 2010). Aunque no hay datos para comprobar la teoría, es posible que ANCUT1 tenga lisinas determinantes para su

conformación activa, que puedan verse involucradas en el proceso de inmovilización y el fijarlas al soporte genera una inactivación por interferir con la conformación activa de la proteína y dado que no todas las cutinasas son iguales, es posible que esto no afecte a ANCUT2 (se sabe que ANCUT1 y ANCUT2 no sólo tienen diferencia de peso molecular, sino que también poseen distinta afinidad de largo de cadena en ácidos grasos, e incluso ANCUT1 no es capaz de hidrolizar la cutícula de manzana en las condiciones de trabajo ensayadas reportadas en el grupo de trabajo). Barbosa et al. (2012) encontró que, además de los enlaces entre el soporte y la enzima, hay enlaces entre otras moléculas de glutaraldehído, de la misma enzima y entre el mismo soporte, lo que puede causar que en el biocatalizador ocurran puntos de unión a proteína con grupos amino indeseables (de otras proteínas) y por lo tanto, bajo rendimiento en el proceso de inmovilización. El enlazante pudiera actuar también como un inactivante por causar interferencia directa con la enzima (Shae, 1998).

7.3.3 Inmovilización en Celite 545

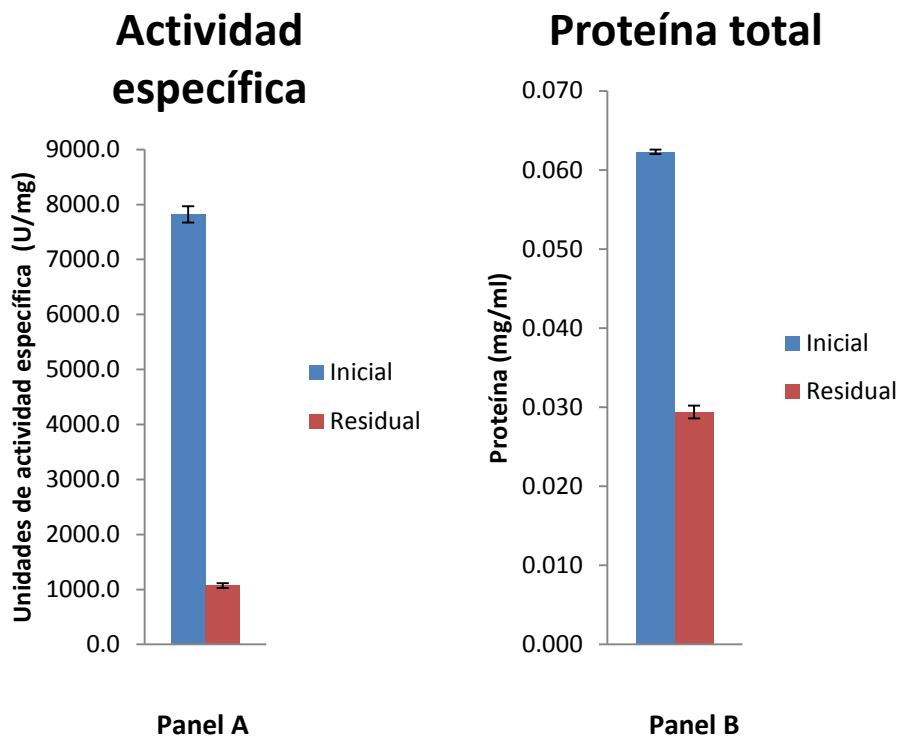
La adsorción en el soporte fue aceptable tanto para ANCUT1 como para ANCUT2. Los siguientes resultados representan la eficiencia de ANCUT1 para este soporte:



Gráfica 12a y b. Rendimiento de la inmovilización de ANCUT1 en Celite 545.

El ensayo consistió en usar una solución con 0.09 mg/mL de proteína y 7820 unidades de actividad específica. El proceso se condujo durante 3 horas y al final del ensayo se inmovilizó 0.013 mg/mL de proteína (gráfica 12, panel A) y 413 unidades de actividad (gráfica 12, panel B), es posible extender el tiempo de exposición para mejorar el rendimiento y tener un biocatalizador con mayor

cantidad de enzima inmovilizada. El rendimiento de inmovilización para este soporte es de 14% de proteína y 37% de actividad enzimática en el caso de ANCUT1.



Gráfica 13a y b. Rendimiento de la inmovilización de ANCUT2 en Celite 545.

Para ANCUT2 se empleó una solución con 0.062 mg/mL de proteína y 7820 unidades de actividad específica. Luego de 3 horas de agitación y contacto entre el soporte y la solución enzimática, se inmovilizó 0.033 mg/mL de proteína (gráfica 13, panel A) y 6748 unidades de actividad específica (gráfica 13, panel B). El rendimiento final fue del 52% de la proteína y 86% de actividad enzimática inmovilizados en el soporte.

A pesar de que la adsorción registrada no es del 100%, se obtuvo un inmovilizado estable. Según lo reportado por Shah et al. (2007), Verma (2009) y Kumar et al. (2011) es posible mejorar el proceso de inmovilización si se procede a variar las condiciones de adsorción al soporte. Algunos ejemplos de dichas variantes son el tiempo de reacción de inmovilización por más de 3 h (que fue el tiempo objetivo de la metodología utilizada), la velocidad de agitación, que debe ser suficiente para mantener el soporte suspendido en la solución enzimática ya que es común que la matriz de inmovilización sedimente y haya porciones del biocatalizador sin enzima lo que contribuirá a tener un inmovilizado heterogéneo y el tiempo de inmovilización, que favorece la interacción del soporte con la enzima aunque el mantener una agitación excesiva por mucho tiempo contribuirá a la desorción de la enzima del soporte según Mateo (2007) e Iyer (2008).

7.3.4 Formación de Agregados Enzimáticos Entrecruzados (AEE)

El proceso de formación de agregado se tiene que analizar en 2 partes: la primera es el agregado enzimático, donde la concentración de sulfato de sodio es vital para el precipitado de la proteína. El control de temperatura y la concentración del precipitante contribuyen a la solvatación de la enzima. La enzima precipitó adecuadamente al llegar al adicionar un 65% de sal en relación al volumen de la solución enzimática (el sobrenadante no presentó actividad). La adición del glutaraldehído causó la insolubilidad del agregado y por tanto la formación exitosa del AEE para ambas enzimas. No hay datos de análisis cuantitativo usando AEE debido a que las lecturas espectrofotométricas del método usado para medir actividad enzimática no mostró hidrólisis del sustrato pNPL. Según lo descrito por Sheldon (2000) y Gupta et al. (2011) los agregados enzimáticos pueden presentar la misma actividad enzimática que la enzima libre después de mantener contacto con el sustrato por períodos largos, lo que pudiera explicar por qué los AEE de ANCUT1 y ANCUT2 no mostraron hidrólisis de pNPL. Shae (1998) también concluye que el glutaraldehído ejerce un efecto negativo sobre las enzimas, que es un factor que pudiera influir también en este caso.

El hecho de que mostraron actividad enzimática en la reacción de α -NA y Fast Red concuerda con la afinidad de las enzimas por sustratos de cadena corta, mostrando que la técnica de inmovilización efectivamente unió las proteínas con actividad hidrolítica entre sí para formar el biocatalizador de interés (figura 12).

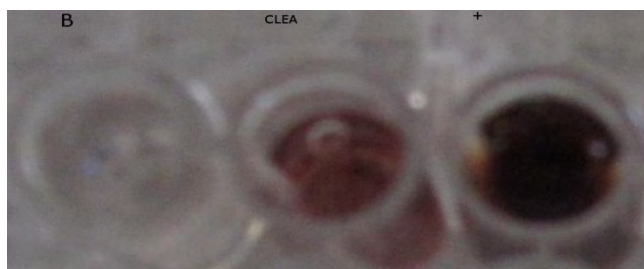


Figura 12. Aplicación de AEE's de ANCUT1 y sometido al ensayo con α naftil acetato y fast red. La coloración rosácea demuestra actividad hidrolítica débil.

7.3.5 Cuantificación de actividad del biocatalizador

Luego del proceso de inmovilizado cada biocatalizador se puso a prueba de hidrolisis usando pNPL

Tabla 12. Actividad hidrolítica de cada catalizador obtenido para ANCUT1. Los AEE no se incluyeron debido a que no mostraron una hidrolisis considerable.

Biocatalizador	Unidades hidrolíticas (U/g)
Accurel MP 1000	4026
Nylon 6	2170
Celite 545	4260

Para ANCUT1 los biocatalizadores con mejores resultados fueron los de adsorción en comparación con los que emplearon glutaraldehído (tabla 12). Se usaran tanto Accurel como Celite para el proceso de transesterificación.

Tabla 13. Actividad hidrolítica de cada catalizador obtenido para ANCUT2. No hay datos sobre la reacción con AEE pues no se consiguió hidrólisis apreciable.

Biocatalizador	Unidades hidrolíticas (U/g)
Accurel MP 1000	112
Nylon 6	128
Celite 545	463

La actividad hidrolítica de los biocatalizadores de ANCUT2 demuestra que el mejor biocatalizador para usar en la síntesis de metil ésteres es Celite 545, pero se correrán pruebas con los otros catalizadores (Tabla 13).

7.4 Síntesis de metil ésteres

Para elegir el soporte de inmovilización más apropiado se probaron los 4 en las condiciones reportadas por Shah et al. (2007), sin embargo no se obtuvo resultados positivos. Esto se debió a que el Nylon 6 y el Accurel, posterior a la reacción se agregaron en grumos y fue muy difícil separarlos además de que registraron una pérdida de actividad medida por pNPL. El aspecto de los biocatalizadores sugirió que el aceite se adhirió a los soportes y se adsorbió, como se ve en la figura 13, probablemente debido a la naturaleza hidrófoba de las matrices de inmovilización.

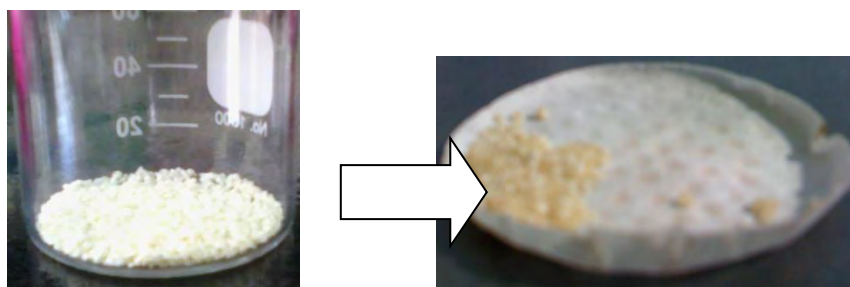


Figura 13. Nylon 6 posterior a una reacción de transesterificación. a pesar de haber hecho repetidos lavados con terbutanol, el soporte no recuperó ni coloración ni actividad enzimática inicial.

A pesar de que el biocatalizador Celite-cutinasas también sufrió una disminución en su actividad enzimática, no fue tan drástica como en los otros soportes, ni se formaron los agregados presentes en las otras condiciones. Dado que no hubo éxito en los ensayos de cuantificación de actividad específica con los C.L.E.A. y que el Nylon 6 y el Accurel MP1000 mostraron el comportamiento de agregación en grumos, se optó por utilizar Celite 545 para probar las reacciones de transesterificación.

Se evaluaron las condiciones para determinar la mejor producción en un diseño matricial. Nunca hubo una producción apreciable de biodiesel y, de acuerdo a los resultados obtenidos en las

placas cromatográficas, solo hubo éxito en tiempo 48 h, relación molar 1:6 y agitación constante a 300 rpm.

Se consideró que la adición de distintos aceptores de acilo pudiera generar una inactivación en la enzima, sin embargo se realizó un experimento donde se mantuvo el biocatalizador agitando durante 24 y 48 h en metanol, etanol y terbutanol (Azócar et al., 2011 y Li, 2006). Se compararon resultados con la medición inicial de actividad del biocatalizador y la actividad residual se mantuvo arriba del 60% para etanol y terbutanol, mientras que para el metanol la enzima perdió el 50% de su actividad hidrolítica.

7.5 Determinación de metil ésteres

7.5.1 Cromatografía de capa fina

En la figura 14 se puede observar que la reacción con AN CUT2 generó un producto con el patrón de migración parecido al estándar y distinto al blanco de reacción. Del mismo modo, en la figura 15 se puede ver en el carril K que hubo una mancha que migro casi a la altura del estándar, y que la reacción en este carril pudiera tener metil ésteres.

El aceite con el que se ensayaron las condiciones de transesterificación fue de ajonjolí. Se emplearon las mismas condiciones de síntesis para el aceite de coco y la única enzima que mostró indicios de transesterificación fue AN CUT1. Los resultados obtenidos para el aceite de pepita de uva y de jatrofa no mostraron producción de metil ésteres, lo que sugiere que tal vez se necesiten condiciones de reacción distintas para cada aceite.



Figura 14. Síntesis de metil ésteres con metanol y aceite de ajonjolí, AN CUT2 y las condiciones indicadas. El carril C indica una reacción con AN CUT2, N muestra una reacción con una esterasa, S es el estándar de metil ésteres y B el blanco de reacción.

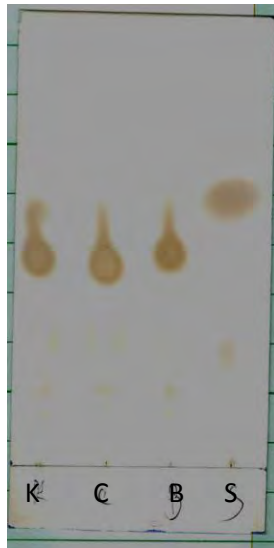


Figura 15. Síntesis de metil ésteres con metanol y aceite de ajonjolí, ANCUT1 y las condiciones indicadas. El carril con la reacción con ANCUT1 (K), reacción con ANCUT2 (C), el blanco de reacción (B) y el estándar de metil ésteres (S).

La presencia de estas manchas en cromatografía de capa fina supone la presencia de metil ésteres. Badenes et al.(2010) sintetizó biodiesel a partir de una cutinasa encapsulada en un sistema de micela inversa por lo que podemos asumir que las cutinasas de *A. nidulans* también poseen la capacidad de producir metil ésteres empleando los ácidos grasos del aceite de ajonjolí. Se emplearon aceites de jatrofa (figura 16) y de coco (figura 17) para descartar la posibilidad de que éste sea un factor determinante. A continuación se muestran las placas:



Figura 16. Reacciones de transesterificación con aceite de jatrofa. K representa la reacción con ANCUT1, C la reacción con ANCUT2, S es un estándar preparado por reacción química y B es el blanco de reacción.

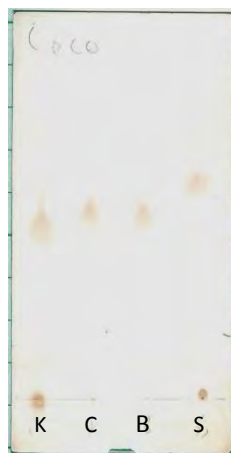


Figura 17. Reacciones de transesterificación con aceite de coco. K representa la reacción con ANCUT1, C la reacción con ANCUT2, B es el blanco de reacción y S es un estándar preparado por reacción química.

6.5.2 Cuantificación de productos por cromatografía de gases

A partir de las muestras que resultaron positivas en el ensayo de cromatografía de capa fina se procedió a cuantificar el producto obtenido por cromatografía de gases, Los picos del cromatograma resultante se compararon con un estándar de metil ésteres de ácidos grasos con distinta longitud de cadena. Los cromatogramas se muestran en los anexos C, D, E, F y G.

Tabla 14. Concentración de metil ésteres producidos en la reacción de transesterificación.

Tiempo de retención (m)	Concentración (mg/ml)		
	Estándar	ANCUT1	ANCUT2
Oleato de metilo(7.076)	8.22	0.029	0.093
Linoleato de metilo (7.468)	3.39	0.023	0.066

Según lo reportado por Were et al. (2006) y Ahmad et al.(2010) los ácidos grasos predominantes en el aceite de ajonjolí son el ácido linoleico (linoleato de metilo) y el ácido oleico (oleato de metilo), aunque no se descarta la presencia de otros metil ésteres. Los productos de reacción coincidieron con el pico del oleato de metilo y el linoleato de metilo, pero su rendimiento es muy bajo comparado con el del estándar y apenas si hubo una síntesis apreciable en las condiciones referidas. Comparado con el rendimiento encontrado por Badenes et al.(2010), que alcanzó el 80% de síntesis con metanol, la producción de biodiesel con las cutinasas de este trabajo es deficiente, ya que está por debajo del 1% de rendimiento para ANCUT1 y ANCUT2. No se descarta que bajo otras condiciones se pueda mejorar el rendimiento. Los productos de reacción se identificaron por espectrometría de masas.

7.5.3 Identificación del producto de reacción por Espectrometría de masas

El producto de reacción con ANCUT2 fue el que tuvo mayor rendimiento, por lo que es el que se utilizó esta muestra para la espectrometría de masas. Este análisis se realizó en la USAI, Facultad de Química. Ahmad et al.(2010) reporta la cromatografía de gases acoplada a masas para identificar los productos obtenidos y cotejar sus datos con cromatogramas preexistentes de los ésteres de metilo. Los cromatogramas se compararon con la base de datos del National Institute

of Standards and Technology (NIST database) y la base de datos de lípidos de la American Oil Chemists Society (AOCS Database) para encontrar similitudes entre los cromatogramas, asegurando que los productos obtenidos en la transesterificación son los del linoleato de metilo (figura 18) y el oleato de metilo (figura 19) cuyas masas moleculares esperadas son 294 y 296 respectivamente.

Aunque no se encuentran en una proporción comparada con lo reportado en la literatura, los resultados permiten afirmar que las enzimas de interés tienen potencial catalítico como enzimas productoras de biodiesel.

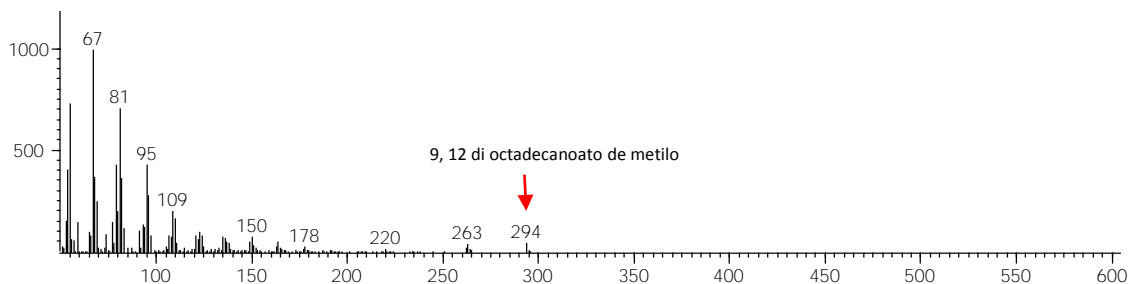
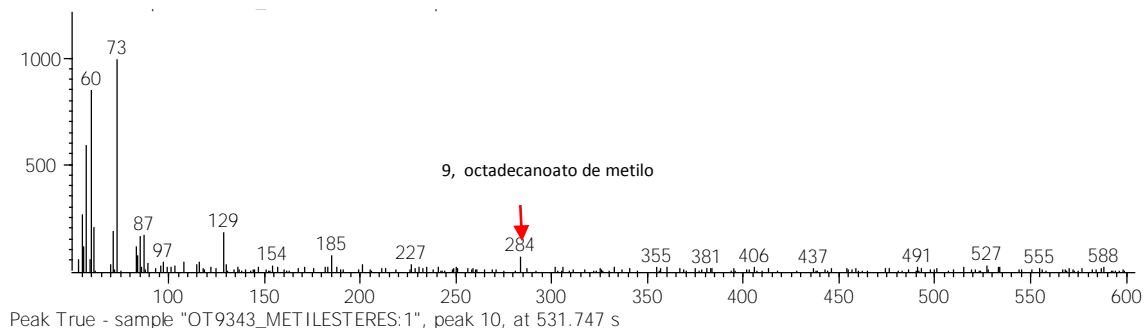


Figura 18. Cromatograma de espectrometría de masas. El pico señalado representa la molécula de 9,12 di octadecanoato (linoleato de metilo)



Peak True - sample "OT9343_METILESTERES:1", peak 10, at 531.747 s

Figura 19. Cromatograma de espectrometría de masas. Se puede apreciar que la molécula del 9 octadecanoato de metilo (oleato de metilo) en el pico indicado.

8. Conclusiones

- Se obtuvieron las enzimas ANCUT1 y ANCUT2 en los medios optimizados descritos en el grupo de trabajo. La máxima producción de ANCUT1 ocurre a las 24 h y se generan 39680 U/mg de proteína al inicio de la fase estacionaria. En el caso de ANCUT2 la producción se asocia a las etapas iniciales de crecimiento y el máximo de actividad específica ocurre a las 12 h, con un nivel de producción de 9300 U/mg de proteína. Cabe señalar que si bien las cutinasas de 22 y 29 kDa son las enzimas preponderantes en los medios específicos diseñados para cada una, se alcanza a detectar por zimografía la presencia de otras bandas tenues con actividad de esterasa, que podrían corresponder a productos de degradación o a otras esterasas, cuya naturaleza debe demostrarse.
- Tras evaluar cuatro métodos de inmovilización para cada una de las dos enzimas a evaluar, se concluyó que para ambas el uso de Celite 545 resultó en la mayor actividad y estabilidad.
- Se logró la producción de metil ésteres en las condiciones de reacción ensayadas: a 30°C, en condiciones anhidras, tiempo 48 h, relación molar 1:6, agregando metanol en 3 partes, sin terbutanol y agitación constante a 300 rpm. Los productos de reacción se caracterizaron por espectrometría de masas, resultando ser oleato de metilo y linoleato de metilo. Los rendimientos fueron muy bajos. Esto indica que aún queda mucho por explorar en la determinación de las condiciones óptimas de reacción.
- La naturaleza del aceite incide en la generación de metil ésteres por vía enzimática.



9. Perspectivas

- Plantear la posibilidad de escalar la producción de las proteínas y optimizar el rendimiento para su aplicación a nivel industrial.
- Probar el biocatalizador con otros aceites vegetales como sustratos
- Inmovilizar la enzima en otros soportes para poder abarcar todas las posibilidades disponibles para las cutinasas en el ámbito de la biocatálisis.
- Realizar ensayos de inactivación de la enzima por fosfolípidos para descartar la posibilidad de interferencia en las reacciones donde el sustrato sea aceite con dichas impurezas.
- Ensayar nuevas condiciones de catálisis de biodiesel (tomando en cuenta la más favorable en rendimiento).
- Emplear los nuevos biocatalizadores tanto para la reacción de transesterificación como para la producción de otros productos de interés industrial.

10. Bibliografía

Ahmad M., Khan M., Zafar M., Sultana S. (2010). Environment-friendly renewable energy from sesame biodiesel. *Energy Sources Part A: Recovery* 32:189-196.

Ahmad M., Ullah K., Khan M. A., Ali S., Zafar M., S. Sultana. (2011). Quantitative and Qualitative Analysis of Sesame Oil Biodiesel. *Energy Sources Part A: Recovery* 33:1239-1249.

Al-Zuhair S., (2007). Production of biodiesel: possibilities and challenges. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 1:57-66.

Antolin G., et al. (2002). Optimisation of biodiesel production by sunflower oil transesterification. *Bioresource Technology* 83:111-114.

Arroyo M. (1998). Immobilized enzymes: theory, methods of study and applications. *Ars Pharmaceutica* 39:23-39.

Aurilia V., Parracino A., Auria S. (2008). Microbial carbohydrate esterases in cold adapted environments. *Gene* 410:234-240.

Atadashi I., Aroua M., Abdul Aziz A. (2011). Biodiesel separation and purification: A review. *Renewable Energy* 36:437-443.

Azócar L., Ciudad G., Heipieper H., Muñoz R., Navia R. (2011). Lipase-catalyzed process in an anhydrous médium with enzyme reutilization to produce biodiesel with low acid value. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 112:583-589.

Badenes S., Lemos F., Cabral J. (2010). Assessing the use of cutinase reversed micellar catalytic system for the production of biodiesel from triglycerides. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85:993-998.

Barbosa O., Torres R., Ortiz C., Fenrnandez-Lafuente R. (2012). The slow down of the CALB immobilization rate permits to control de inter and intra molecular modification produced by glutaraldehyde. *Process Biochemistry*. 47:766-774.

Behnia M. et al. (2011). A simple safe method for preparation of biodiesel. *Journal of Chemical Education* 88:1290-1292.

Bermúdez E. (2012). Bases moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinolítico de *Aspergillus nidulans*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química. U.N.A.M.

Bermudez Garcia, E., Peña-Montes, C., Castro-Rodríguez, A., Gonzalez Canto, A., Navarro-Ocaña, A., Farrés, A. (2017) AN CUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and Its potential applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 182 (3), 1014-1036.

Brady D., Jordaan J. (2009). Advances in Enzyme Immobilization. *Biotechnology Letters* 31:1639-1650.

Brena B., Batista-Viera F. (2006). Immobilization of enzymes A literature survey, *Methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*. 2° Edición. Totowa NJ. Humana Press Inc 15-30.

Bornscheuer U. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26:73-81.

Cardoso J., Costa-Ferreira. (1994). Aspergilli and lignocellulosics: Enzymology and biotechnological applications. *FEMS Microbiology Reviews*13:377-386.

Cao L. (2005). Carrier-bound immobilized enzymes principles, applications and design. Wiley-VCH. Netherlands 1-551.

Carta G., Gainer J., Benton A. (1991). Enzymatic synthesis of esters using a immobilized lipase. *Biotechnology and Bioengineering* 37:1004-1009.

Carta G., Gainer J., Gibson M. (1992). Synthesis of esters using a nylon-immobilized lipase in a batch and continuous reactors. *Enzyme Microbiology Technology* 14:904-910.

Carvalho C., Aires-Barros M., Cabral J. (1998). Cutinase structure, function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology* 1:1-14.

Castro J.A., (2013) inmovilización y caracterización bioquímica de carboxilesterasas de *Aspergillus nidulans* PW1, Tesis de licenciatura, Químico de Alimentos, Facultad de química, U.N.A.M.

Castro L. (2012) Estudio de la producción de actividad carboxil esterasa en *Aspergillus nidulans*. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química. U.N.A.M.

Chongkhong S., Tongurai C., Chetpattananondh. (2009). Biodiesel production by esterification of palm fatty acid distillate. *Renewable Energy* 34:1059.

Clark, D. P. (2009). *Biotechnology: applying the genetic revolution*. Londres. Elsevier Academic Press 1-56.

Daka J., Laidler K., Sipehia R., Chang T. (1988). Immobilization and kinetics of lactate dehydrogenase at rotating nylon disk. *Biotechnology and Bioengineering* 32:213-219.

David H., Özçelik I., Hofmann G., Nielsen J. (2008). Analysis of *Aspergillus nidulans* metabolism at the genome-scale. *BMC Genomics* 9:163.

Demirbaş A. (2002). Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. *Energy Conversion and Management* 43:2349-2356.

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

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

Enweremadu C., Mbarawa M. (2009). Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil- A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:2205-2224.

Esqueda K. (2012) Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de maestría en ciencias bioquímicas. Facultad de Química. U.N.A.M.

Fan H., Wang B., Yun Z. (2012). The determination of fatty acid methyl esters in biodiesel from rapeseed oil by gas chromatography with a packed column. *Energy Sources Part A* 34:2084-2091.

Farres A., Peña-Montes C., Dominguez E., Sanchez M., Morales S., Solis I. 2016 Cutinasas recombinantes para la degradación de poliésteres. Solicitud de patente MX/A/2016/006869.

Fokina O, Fenchel A, Winandy L, Fischer R. (2016). Immobilization of LccC laccase from *Aspergillus nidulans* on hard surfaces via fungal hydrophobins. *Applied and Environmental Microbiology* 82:6395–6402.

Fontes T., Alves G. (2009). Cutinasas: properties and industrial applications. *Advances in Applied Microbiology* 66:78-91.

Galvis M., et al. (2012). Chemical amination of lipase B from *Candida antartica* is an efficient solution for the preparation of Cross Linked Enzyme Aggregates. *Process Biochemistry* 12:2373-2378.

Ghanem A. (2007). Trends in lipase catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron Report Number* 786 63:1721-1724.

Guan G., Kutsakabe K., Sakurai N., Moriyama K. (2009). Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using acid catalysts in the presence of dimethylether. *Fuel* 88:81-86.

Gupta M., Raghaya S. (2011). Enzyme stabilization via cross-linked enzyme aggregates. *Enzyme Stabilization and Immobilization Methods in Molecular Biology* 679:133-145.

Hamdy H., Abo-Tahon M. (2012). Extracellular lipase of *Aspergillus terreus* var. *africanus* (CBS 130.55): production, purification and characterization. *Annals of Microbiology* 62:1723-1736.

Hayyan A. et al. (2011). Reduction of high content of free fatty acid in sludge palm oil via acid catalyst for biodiesel production. *Fuel Processing Technology* 92:920-924.

Hernández K., Fernandez-Lafuente R. (2011). Control of protein immobilization: coupling immobilization and site directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. *Enzyme and Microbial Technology* 48:107-122.

Hormigo D., Garcia-Hidalgo J., Acebai C., de la Mata I., Arroyo M. (2012). Preparation and characterization of Cross-Linked Enzyme Aggregates (C.L.E.A.s) of recombinant poly-3-hydroxybutirato depolimerase of *Streptomyces exfoliatus*, *Bioresource Technology* 115:117-182.

Huang Y., Zheng H., Yan Y. (2010). Optimization of lipase-catalyzed transesterification of lard for biodiesel production using response surface methodology. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 160:504-515.

Illanes A. (2008). *Enzyme Biocatalysis: Principles and applications*. Netherlands. Springer 1-378.

Jaeger, K., Dijkstra B., Reetz M. (1999). Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Reviews Microbiology* 53:315-351.

Jain S., Sharma M.P. (2010). Biodiesel production from *Jatropha curcas* oil. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:3140-3147.

Jegannathan K, Nielsen P. (2013). Environmental assessment of enzyme use in industrial production- a literature review. *Journal of Cleaner Production* 42 228-240.

Jegannathan K., Abang S., Poncelet D., Chan E., Ravindra P., (2008). Production of biodiesel using immobilized lipase- A critical review, *Critical reviews in biotechnology* 28 253-264

Jun S., et al. (2012), Highly efficient enzyme immobilization and stabilization within meso-structured onion-like silica for biodiesel production, *Chemistry of Materials*, 924-929.

Käfer E. y TW Hill. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* minimal medium: trace element and minimal medium salt stock solutions. *Fungal Genetics Newsletter* 48:20-21.

Kapoor M., Gupta M. (2012). Obtaining monoglycerides by esterification of glycerol with palmitic acid using some high activity preparations of *Candida antarctica* lipase B. *Process Biochemistry* 47:503-508.

Kartal F., Janssen M., Hollmann F., Sheldon R., Kilinc A. (2011). Improved esterification activity of *Candida rugosa* lipase in organic solvent by immobilization as Cross Linked Enzyme Aggregates. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 71:85-89.

Kirk O., Borchert T, Fuglsang C. (2002). Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13:345-351.

Kolattukudy P.E. (1970). Biosynthesis of a lipid polymer, cutin: the structural component of plant cuticle. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 41:299-305.

Kondamudi N., Strull J., Misra M., Mohapatra S. (2009). A green process for producing biodiesel from feather meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57:6163-6166.

Knothe G. (2013). Avocado and olive oil methyl esters. *Biomass and Bioenergy* 58:143-148.

Kumar A., Kanwar S. (2011). Synthesis of ethyl ferulate in organic medium using Celite-immobilized lipase. *Bioresource Technology* 102:2162-2167.

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

Lai J., Hu Z., Sheldon R., Yang Z. (2012). Catalytic performance of cross linked enzyme aggregates of *Penicillium expansum* lipase and their use as catalyst for biodiesel production. *Process Biochemistry* 47:2058-2063.

Lam M., Lee K., Mohamed A. (2010). Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: A review. *Biotechnology Advances* 28:500-518.

Lee M. et al. (2011). Improvement of enzymatic biodiesel production by controlled substrate feeding using silica gel in solvent free system. *Enzyme and Microbial Technology* 49:402-406.

Liu C., Huang C., Wang Y., Lee D., Chang J. (2012). Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. *Applied Energy* 100:41-46.

Liu, T., Hou, J., Wang, Y., Wang Y., Jin Y., Borth W., Zhao F., Liu Z., Hu J., Zuo Y. (2016). Genome wide identification, classification and expression analysis in fungal-plant interactions of cutinase gene family and functional analysis of a putative CICUT7 in *Curvularia lunata*. *Mol Genet Genomics* (2016) 291: 1105.

Longhi S., et al. (1997). Crystal structure of cutinase covalently inhibited by a triglyceride analogue. *Protein Science* 6:275-286.

Lu J., Nie K., Xie F., Wang F., Tan T. (2007). Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp* 99-125. *Process Biochemistry* 42:1367-1370.


Meher L., Vidya Sagar D., Naik S. (2006). Technical aspects of biodiesel production by transesterification-a review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 10:248-268.

Mendes A., Oliveira P., de Castro H. (2012). Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 78:119-134.

Miletić N., Nastasović A., Loos K. (2012). Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. *Bioresource Technology* 115:126-135.

Oliveira L., Cavalcanti M., Fernandes M., Lima D. (2013). Diversity of filamentous fungi isolated from the soil in the semiarid area. *Journal of Arid Environments* 95:49-54.

Ognjanovic N., Bezbradica D., Knezevic-Jugovic Z. (2009). Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. *Bioresource Technology* 100:5146-5154.



Pahujani S., Kanwar S., Ghanshyam C., Gupta R. (2008). Glutaraldehyde activation of polymer Nylon 6 for lipase immobilization: Enzyme characteristics and stability. *Bioresource Technology* 99:2566-2570.

Sabudak T., Yildiz M. (2010). Biodiesel production from waste frying oils and its quality control. *Waste Management* 30:799-803.

Sanchez, M. (2015). Aplicacion de las cutinasas de *A. nidulans* recombinantes AN CUT1 y AN CUT2 en la degradación de poliésteres. Tesis, Química de alimentos. Facultad de Química.U.N.A.M.

Saydut A., Zahir M., Kaya C., Beycar A., Hamamci C. (2008). Transesterified sesame (*Sesamum indicum* L.) seed oil as a biodiesel fuel. *Bioresource Technology* 99:6656-6660.

Sampaio J., Avila E., Gomes D., Guimarães D. (2010). Application of lipase from the physic nut (*Jatropha curcas* L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65:133-137.

Shah S., Gupta M. (2007). Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatrofa* oil in a solvent free system. *Process Biochemistry* 42:409-414.

Sharma Y., Singh B. (2009). Development of biodiesel: current scenario. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 13:1646-1651.

Sheldon R. (2011). Cross Linked Enzyme Aggregates as industrial biocatalysts. *Organic Process Research and Development* 15:213-223.

Shirke A., Su A., Jones A., Butterfoss G., Koffas M., Kim J., Gross R. (2017). Comparative thermal inactivation analysis of *Aspergillus oryzae* and *Thievallia terrestris* cutinase: role of glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering* 114:63-73.

Singh S., Singh D. (2010). Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 14:200-216.

Suppes G., Dasari M., Dorskocil E., Mankidy E., Goff M. (2004). Transesterification of soybean oil with zeolite and metal catalysts. *Applied catalysis A: General* 257:213.

Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F. (2010). Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances* 28:628-634.

Urban J., Svec F., Fréchet J. (2012). A monolithic lipase reactor for biodiesel production by transesterification of triacylglycerides into fatty acid methyl esters. *Biotechnology and Bioengineering* 109:371-380.

Vasconcellos A., et al. (2012). Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. *Microporous and mesoporous materials* 163:343-355.

Vega F. (2013) Purificación y caracterización de la cutinasa ANCUT1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de licenciatura, Química de Alimentos. Facultad de Química. U.N.A.M.

Vergara P. (2010) Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de maestría en ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. U.N.A.M.

Ward O., Qin W., Dhanjoon J., Ye J., Singh A. (2006). Physiology and biotechnology of *Aspergillus*. *Advances in Applied Microbiology* 58:1-75

Watanabe Y., Nagao T., Nishida Y., Takagi Y., Shimada Y. (2007). Enzymatic production of fatty acid methyl esters by hydrolysis of acid oil followed by esterification. *Journal of American Oil Chemistry Society* 84:1015-1021.

Were, B.; et al. (2006). Seed oil content and fatty acid composition in east African sesame (*Sesamum indicum L.*) accessions evaluated over 3 years. *Field Crops Research* 97:254-260.

Yadav A. K., Khan M. E., Dubey A.M., Pal A. (2016) Performance and emission characteristics of a transportation diesel engine operated with non- edible vegetable oils biodiesel. *Case studies in thermal engineering* 8:236-244

Yang X., Zheng P., Ni Y. Sun Z. (2012). Highly efficient biosynthesis of sucrose-6-acetate with cross-linked aggregates of Lipozyme TL 100 L. *Journal of Biotechnology* 161:27-33.

Zabeti M., Daud W., Aroua M. (2010). Biodiesel production using alumina supported calcium oxide: An optimization study. *Fuel Processing Technology* 91:243-248.

Zaidi A., et al. (2002). Esterification of fatty acids using nylon-immobilized lipase in *n*-hexane: kinetic parameters and chain-length effects. *Journal of Biotechnology* 93:209-216.

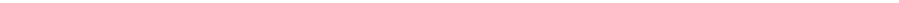
Zhang K., Lai J., Huang Z., Yang Z. (2011). *Penicillium expansum* lipase-catalyzed production of biodiesel in ionic liquids. *Bioresource Technology* 102:2767-2772.

Enzyme Nomenclature <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>

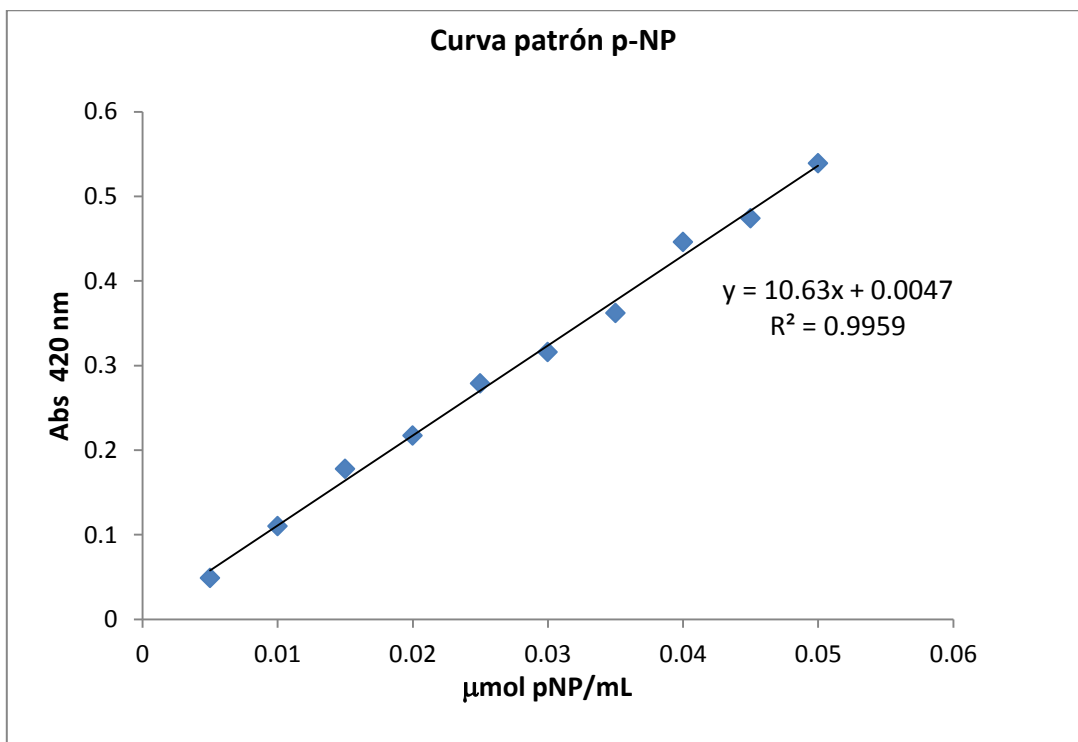
***Aspergillus* Database** www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group

Lipid Chemistry, Biology, Technology & Analysis <http://lipidlibrary.aocs.org/>

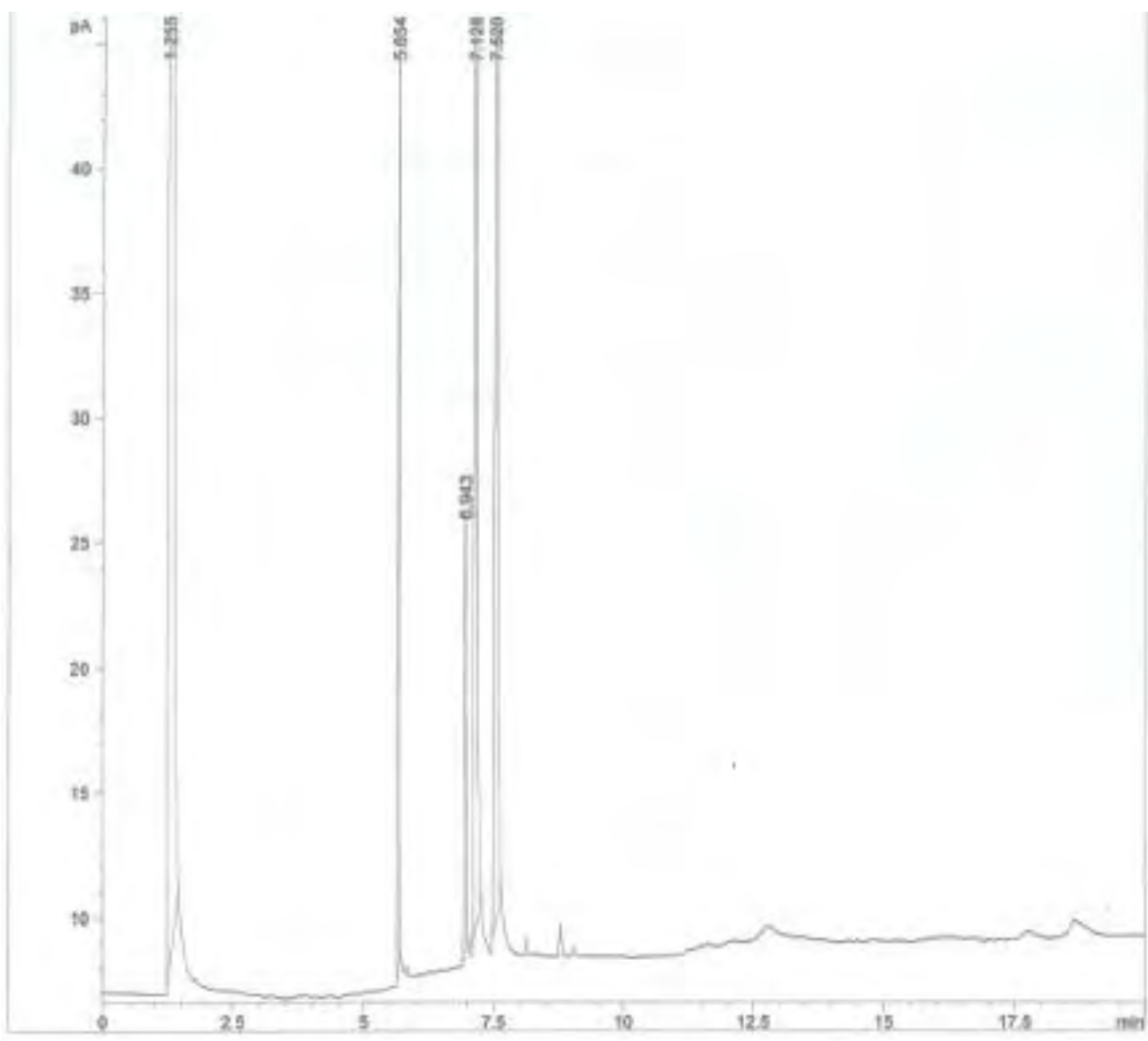
Base de Datos de Referencia Estándar del N.I.S.T. <http://webbook.nist.gov/chemistry>



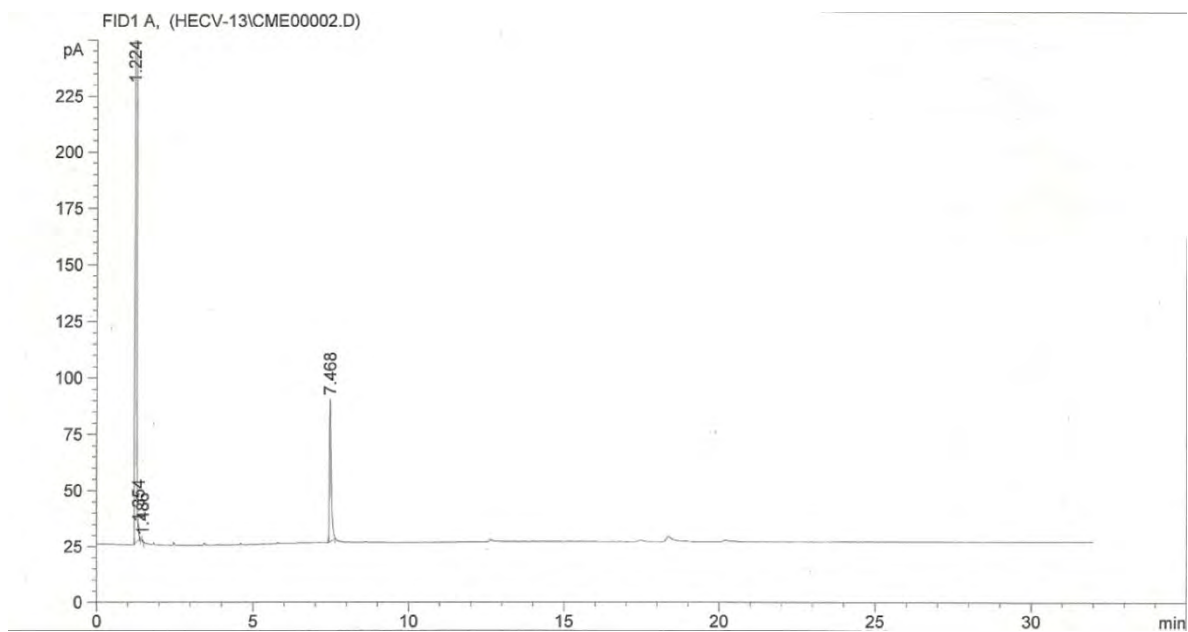
Anexo B: Curva patrón de pNP para la determinación de actividad de hidrolasa.



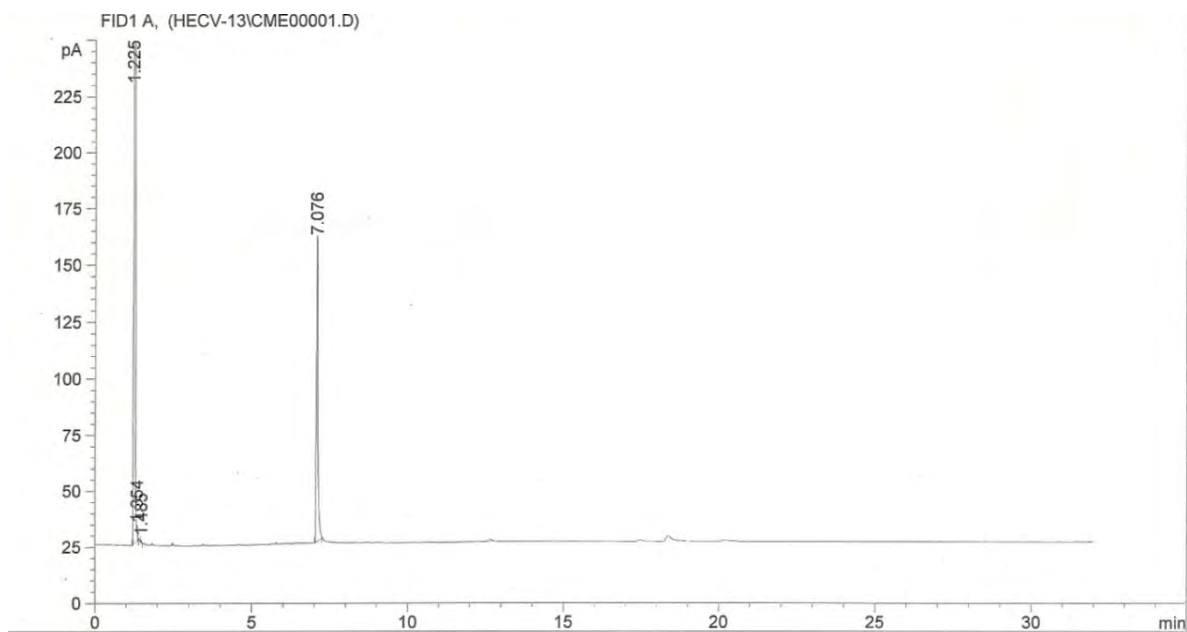
Anexo C: Estándar de biodiesel a partir de transesterificación química de aceite de ajonjolí para cromatografía de gases.



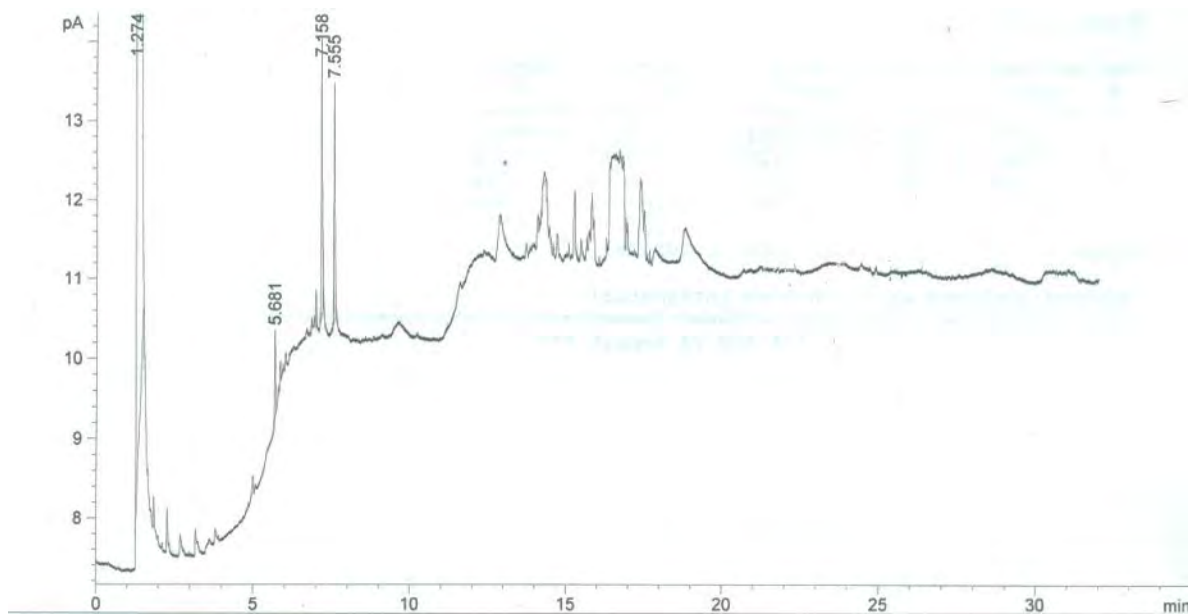
Anexo D: Cromatograma de análisis del estándar de oleato de metilo en cromatografía de gases.



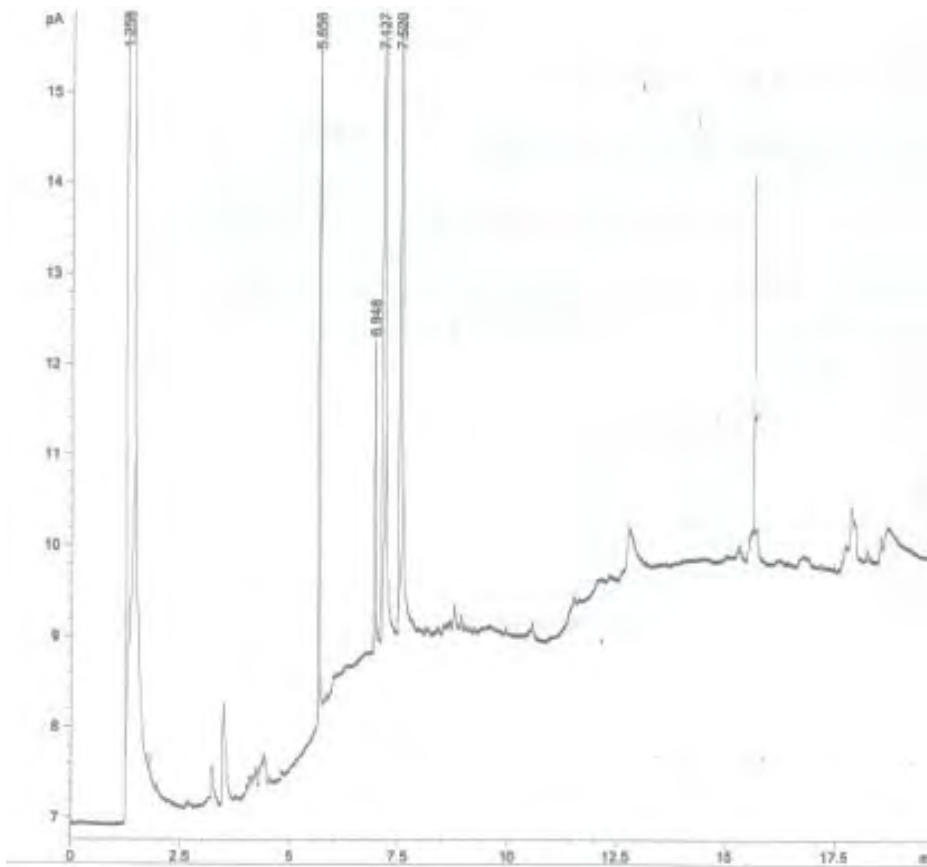
Anexo E: Cromatograma de análisis del estándar de linoleato de metilo en cromatografía de gases.



Anexo F: Cromatograma resultante de la determinación del producto generado por ANCUT 1 a través de cromatografía de gases.



Anexo G: Cromatograma resultante de la determinación del producto generado por ANCUT 2 a través de cromatografía de gases.



Anexo H: Cromatograma resultante de la determinación del producto en espectrometría de masas.

