



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

PRODUCCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
CARBOXILESTERASAS DE *Aspergillus nidulans*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Doctora en Ciencias

PRESENTA:
LELIE DENISE CASTRO OCHOA

TUTOR PRINCIPAL
DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARAVIA
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DR. EDGARDO ESCAMILLA MARVAN[†], INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA
CELULAR
DRA. ROMINA RODRIGUEZ SANOJA, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOMÉDICAS

MÉXICO, D. F. Noviembre, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dr. Sergio Sánchez Esquivel

VOCAL: Dr. Roberto Arreguín Espinosa de los Monteros

VOCAL: Dr. Arturo Navarro Ocaña

VOCAL: Dr. Rogelio Rodríguez Sotres

SECRETARIO: Dr. Francisco Ruiz Terán

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

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de los proyectos CONACYT CB 2010 153500 y PAPIIT-DGAPA-UNAM IN2148092. La alumna recibió beca CONACYT registro: 154527.

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

La realización del presente trabajo de investigación fue posible gracias a la colaboración de personas que directa o indirectamente participaron con sus opiniones, revisiones, correcciones, experiencia, dando ánimos en los momentos de difíciles y compartiendo los momentos de felicidad

En primer lugar agradezco al Comité Tutoral que me guio para cumplir satisfactoriamente los estudios. Mi especial agradecimiento a la Dra. Amelia Farrés por brindarme la confianza de pertenecer a su equipo de trabajo. Más que una Tutora fue siempre una amiga dispuesta a apoyarme, un ejemplo de vida para vencer cada obstáculo que se presentó.

A los miembros del Jurado por sus acertados comentarios en la escritura de la Tesis.

A la Dra. Carolina Peña por su valiosa asesoría técnica para la realización de los experimentos, en la escritura de los artículos y, lo más importante por brindarme su cálida amistad. Por abrirme las puertas de su casa y las de su hermosa familia. Muchas gracias Familia Adame Peña y Peña Montes.

A Augusto González Canto por la asesoría técnica brindada para la purificación de la proteína.

A mis compañeros y amigos del Lab. 312, por todos los momentos de alegrías y uno que otro de frustraciones (cuando no salían los resultados) que compartimos. En especial a Vanessa, Alicia, Patty, Gaby, Eliana, Mirna, Abraham, Raúl, Israel, Carlos, Norma, Bele, Katy, Aide y Ana.

A mi familia por apoyarme en todo.

A Dios por ser mi roca fuerte.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	vii
ABREVIATURAS.....	ix
PRESENTACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	x
RESUMEN	xii
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1. Enzimas	1
1.1.1 Generalidades.....	1
1.1.2 Importancia comercial.....	3
1.1.3 Fuentes de enzimas.....	4
1.1.4 Regulación de la producción.....	6
1.1.5 Clasificación.....	12
1.2 Esterasas	13
1.2.1 Hidrolasas de éster carboxílico o carboxilesterasas	14
1.2.1.1 Reacciones catalizadas.....	15
1.2.1.2 Aplicaciones	17
1.2.2 Cutinasas	19
1.2.2.1 Estructura y mecanismo catalítico.....	21
1.2.2.2 Aplicaciones	24
1.3 Proteasas	25
1.3.1 Clasificación.....	25
1.3.2 Mecanismo catalítico de serín proteasas.....	26
1.4 <i>Aspergillus nidulans</i>	30
1.4.1 Descripción general	30
1.4.2 Importancia de <i>A. nidulans</i> como modelo de estudio	33
2. ANTECEDENTES.....	34
2.1 CEH en <i>A. nidulans</i>	34
2.2 Proteasas en <i>A. nidulans</i>	36
2.3 Investigaciones del grupo de trabajo	37
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	40
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIALES Y MÉTODOS	43
5.1 Microorganismo y mantenimiento.....	43
5.2 Condiciones y medios de cultivo	43
5.2.1 Condiciones de cultivo	43
5.2.2 Medio mínimo (MM) (Käfer, 1977)	43
5.2.3 Medio para producción de CEH (CEHM)	44
5.3 Efecto de nutrientes sobre la producción de CEH.....	44
5.3.1 Efecto de triacilgliceroles y ácidos grasos.....	44
5.3.2 Efecto de fuentes de carbono	44

5.3.3	Efecto de la concentración de aceite de oliva	45
5.3.4	Efecto de cutina, cáscara de manzana, tomate y papa.....	45
5.4	Obtención de cutina	45
5.5	Determinación de la actividad enzimática	45
5.5.1	Actividad CEH.....	45
5.5.2	Actividad cutinasa	46
5.5.3	Electroforesis en gel de poliacrilamida y detección de actividad “ <i>in situ</i> ”	46
5.6	Cuantificación de proteína.....	47
5.7	Purificación de CEH de 29 kDa	48
5.8	Identificación de las CEH	48
5.8.1	CEH inducidas por aceite de olivo	48
5.8.2	CEH inducidas con cutina	50
5.9	Recursos bioinformáticos	50
5.10	Caracterización en crudo de la cutinasa AN CUT1	51
5.10.1	Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad	51
5.10.2	Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad	52
5.10.3	Especificidad de sustrato.....	52
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
	CAPITULO 1: Actividad CEH en <i>A. nidulans</i>	54
	CAPITULO 2: Inducción en medio con cutina	74
7.	CONCLUSIONES	85
8.	PERSPECTIVAS	87
9.	BIBLIOGRAFÍA.....	88
10.	ANEXOS.....	102

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

TABLA 1. Fuentes de algunas enzimas de importancia industrial.....	5
TABLA 2. Clasificación de esterases basado en el tipo de enlace éster que rompen.	14
TABLA 3. Fuentes de cutinasas	21
TABLA 4. Secuencias de CEH encontradas en el genoma de <i>A. nidulans</i>	34
TABLA 5. Proteasas purificadas de <i>Aspergillus nidulans</i>	37
TABLA 6. Efecto de triacilgliceroles, ácidos grasos y aceite de oliva en la producción de actividad CEH en <i>Aspergillus nidulans</i>	55
TABLA 7. Efecto de fuentes de carbono sobre la producción extracelular de actividad CEH en <i>A. nidulans</i>	58
TABLA 8. Comparación de las bandas de absorción observadas mediante ATR-FTIR, para la cutina de manzana pura y los polímeros obtenidos después de su hidrólisis.	69
TABLA 9. Comparación de las características de cutinasas ANCUT1 y ANCUT2	83

FIGURAS

FIGURA 1. Diagrama de energía que muestra los cambios de energía libre de una reacción no catalizada y una catalizada.	2
FIGURA 2. Algunas reacciones catalizadas por CEH.	16
FIGURA 3. Modelo de una unidad monomérica de cutina.	20
FIGURA 4. Diagrama del plegamiento α/β de cutinasa.....	23
FIGURA 5. Mecanismo catalítico de las serin proteasas.....	29
FIGURA 6. Ciclos de vida de <i>Aspergillus nidulans</i>	32
FIGURA 7. Zimograma de actividad CEH en medio de cultivo optimizado concentrado.....	39
FIGURA 8. Efecto de triacilgliceroles sobre la producción de actividad CEH.....	56
FIGURA 9. Purificación de cutinasa ANCUT2.....	60
FIGURA 10. Comparación de la secuencia de cutinasa ANCUT2 de <i>Aspergillus nidulans</i> con cutinasas de diferentes microorganismos.	61
FIGURA 11. Análisis filogenético de Cutinasa de <i>Aspergillus nidulans</i> ABF50887.1 (ANCUT2).....	65
FIGURA 12. Espectro ATR-FTIR de cutina natural aislada de manzana (A) y cutina hidrolizada por cutinasa (B).	67
FIGURA 13. Efecto de diferentes solventes orgánico (30% v/v) sobre la estabilidad enzimática.....	68

FIGURA 14. Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de cutina.....	70
FIGURA 15. Comparación de la secuencia completa de la proteasa alcalina PrtA y la secuencia N-terminal identificada	72
FIGURA 16. Cinética de producción de actividad CEH por <i>Aspergillus nidulans</i> , empleando diferentes fuentes de cutina y suberina.	75
FIGURA 17 Efecto diferentes fuentes de inductores sobre la producción de actividad CEH extracelular en <i>A. nidulans</i>	77
FIGURA 18. Secuencia de aminoácidos de la cutinasa AN CUT1.....	78
FIGURA 19. Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de AN CUT1 en extracto crudo.....	80
FIGURA 20. Efecto del pH en la actividad y estabilidad de AN CUT1 en extracto crudo.	81
FIGURA 21. Especificidad de sustrato de AN CUT1 en extracto crudo, hacia ésteres de <i>p</i> -nitrofenilo de diferente longitud de cadena.....	82

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADP	Adenosín difosfato.
AMP	Adenosín monofosfato.
ANCUT1	Cutinasa 1 de <i>Aspergillus nidulans</i> .
ANCUT2	Cutinasa 2 de <i>Aspergillus nidulans</i> .
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ATP	Adenosín trifosfato.
ATR-FTIR	Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada.
CAP	Proteína activadora catabólica.
CCF	Cromatografía en capa fina.
CEH	Hidrolasas de ésteres carboxílicos.
CEHM	Medio para producción de CEH.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
<i>E_a</i>	Energía de activación.
IUBMB	Unión internacional de Bioquímica y Biología Molecular.
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem.
MM	Medio mínimo.
PrtA	Proteasa alcalina de <i>Aspergillus nidulans</i> .
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.
ΔG°	Energía libre estándar.
ΔG^\ddagger	Energía libre de activación.

PRESENTACIÓN Y ESTRUCTURA DE LA TESIS

El presente trabajo de investigación recoge los primeros resultados sobre regulación, identificación y caracterización de las actividades enzimáticas de hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílico (CEH por sus siglas en inglés) por *Aspergillus nidulans* bajo ciertas condiciones de cultivo. Se contribuye a dar la visión del proceso de producción de nuevas enzimas con potencial de aplicación biotecnológica.

La organización de la Tesis se presenta de la manera siguiente, en el primer apartado que corresponde al Marco Teórico, se describen algunos conceptos importantes sobre las enzimas, mecanismo de regulación e importancia en aplicaciones industriales. También, se detallan las propiedades de CEH y proteasas así como las características del microorganismo de estudio, *Aspergillus nidulans*, que facilitarán el seguimiento de la lectura de la Tesis.

A continuación, en los Antecedentes se muestra un esbozo global de las investigaciones que abordan los estudios sobre la producción de CEH y proteasas en *A. nidulans*, incluyendo las realizadas en el grupo y que preceden de manera inmediata este trabajo. A partir del análisis reflexivo de estos antecedentes, se expone mediante el planteamiento de una serie de interrogantes el problema de investigación que se pretende resolver. Enseguida se describen los Objetivos de la Tesis.

En Materiales y Métodos, se describen técnicas tradicionales para el análisis de la producción y caracterización de CEH, así como modernas técnicas bioquímicas y de bioinformática para la identificación de proteínas,

Los Resultados del trabajo de investigación y la Discusión de los mismos se reportan en dos capítulos. El primero comprende los resultados de la identificación de CEH inducidas con aceite de oliva y el segundo la producción y caracterización de CEH inducidas por cutina. Los resultados de mayor impacto de la investigación, así como el logro de los objetivos trazados se señalan en el apartado de Conclusiones.

Finalmente, se incluyen las perspectivas del trabajo de investigación y la bibliografía consultada.

En los Anexos se presentan 3 artículos publicados, producto de la presente Tesis de investigación.

RESUMEN

Los microorganismos saprofiticos producen una amplia gama de enzimas hidroliticas, que son utiles para la hidrolisis completa de sustratos organicos e implica una gran versatilidad genetica y bioquimica. *A. nidulans* presenta en su genoma numerosos genes que codifican para diferentes hidrolasas de ester de acidos carboxilicos (CEH). El interes principal de este trabajo fue la produccion, identificacion y caracterizacion de CEH producidas por este microorganismo.

Si bien, el mecanismo de sintesis de cada enzima es muy variado, algunas obedecen a procesos similares. En el caso de las CEH se suelen inducir en su mayoria por la presencia de compuestos lipidicos.

Bajo las condiciones de analisis realizadas en el presente trabajo, se identificaron 3 actividades CEH producidas por *Aspergillus nidulans*. Dos de estas actividades corresponden a nuevas cutinasas nombradas como ANCUT1 y ANCUT2 y la tercera a la proteasas PrtA

Los resultados demostraron que la cutinasa ANCUT2 es una enzima cuya produccion se favorece principalmente por la presencia en el medio de cultivo de fuentes lipidicas como el aceite de olivo, algunos triacilglicerolos y acidos grasos de cadena larga, mientras que la cutinasa ANCUT1 se induce por la adiccion de polimeros como cutina y suberina. Las secuencias de las cutinasas

ANCUT2 y ANCUT1 presentan homología con otras cutinasas fungales así como nuevas características, que incluyen una región rica en serinas y dos residuos de cisteínas adicionales a los encontrados en la cutinasa de *Fusarium solani*. Las dos cutinasas presentan propiedades catalíticas de interés para su posible aplicación en diferentes áreas de la industria, como son su estabilidad térmica y alcalina.

La proteasa alcalina PrtA es una enzima, al igual que otras serín proteasas, que muestra actividad hidrolítica promiscua de CEH.

1.- MARCO TEÓRICO

1.1. Enzimas

1.1.1. Generalidades

Para que ocurra una reacción química, normalmente se requiere un aporte inicial de energía. A temperaturas por encima del cero absoluto (-273.1°C o 0 K), todas las moléculas poseen energía vibratoria que, aumenta al calentar las moléculas. Al incrementar la temperatura, las moléculas que vibran tienen mayor probabilidad de chocar. Una reacción química ocurre cuando las moléculas poseen una cantidad mínima de energía conocida como energía de activación (E_a) o, también nombrada como energía libre de activación (ΔG^{\ddagger}). La energía libre de activación ΔG^{\ddagger} se define como la cantidad de energía que se requiere para convertir 1 mol de moléculas de sustrato (reactante) desde el estado basal (la forma más estable de baja energía de la molécula) al estado de transición. No todas las colisiones producen reacciones químicas, debido a que sólo una fracción de las moléculas posee la energía suficiente o la orientación correcta para reaccionar (McKee, 2003). El incremento en la temperatura y la concentración de reactivos eleva la probabilidad de las colisiones y, de este modo la formación de producto. Otra estrategia consiste en proporcionar una superficie a la cual las moléculas de reactivo puedan unirse en orientaciones favorables mediante catalizadores (e.g. los catalizadores metálicos en condiciones de laboratorio e industriales). Por definición, un catalizador es una sustancia que aumenta la velocidad de una

reacción química y que no se altera de forma permanente por la reacción. Los catalizadores tienen esta capacidad debido a que disminuyen la energía de activación que se requiere para una reacción química. En otras palabras, los catalizadores proporcionan una vía de reacción alternativa que requiere menos energía (Figura 1).

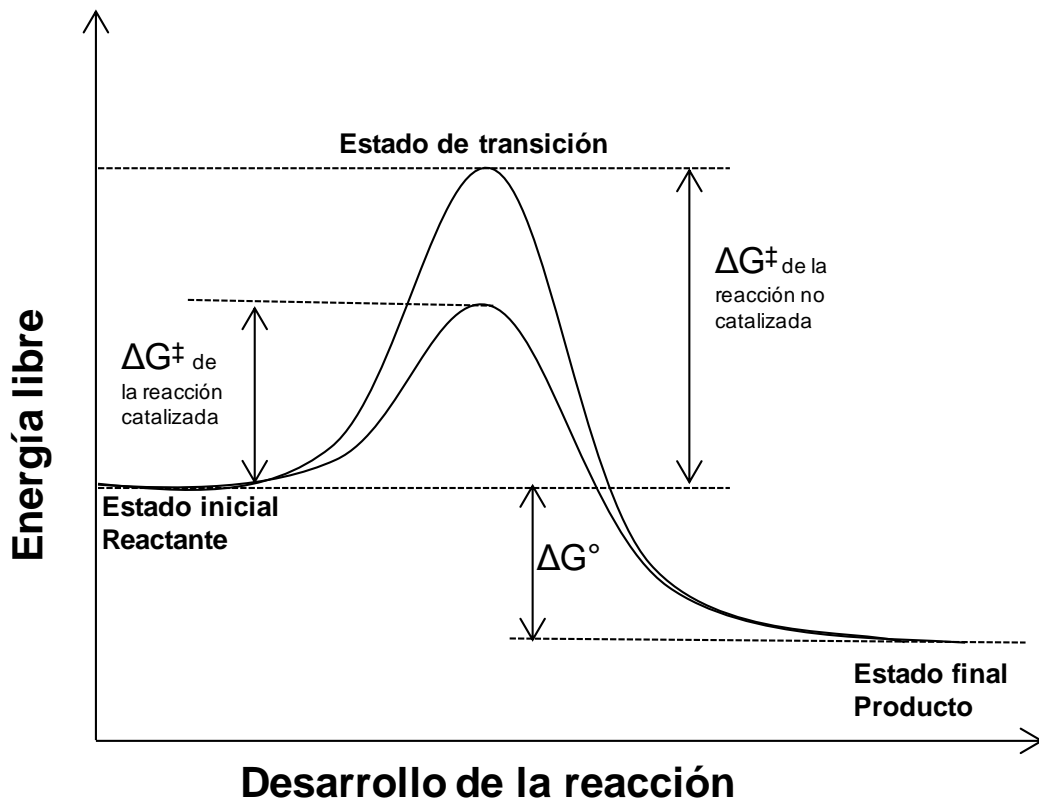


FIGURA 1. Diagrama de energía que muestra los cambios de energía libre de una reacción no catalizada y de una catalizada. Un catalizador reduce la energía de activación de una reacción. Un catalizador altera la energía libre de activación ΔG^\ddagger y no la energía libre estándar ΔG° .

Fuente: Illanes, 2008.

En los seres vivos, generalmente las reacciones químicas son catalizadas por moléculas de naturaleza proteica que reciben el nombre de enzimas. Las

enzimas aumentan la velocidad de las reacciones químicas al reducir la barrera de energía libre que separa los reactivos de los productos por diversos mecanismos, que dependen de la disposición de grupos funcionales en el sitio activo de la enzima, región donde tiene lugar la catálisis (Berg, 2008). Los sustratos se unen al sitio activo de las enzimas, que generalmente es una hendidura o cavidad en una molécula proteínica grande. La forma y distribución de la carga del sitio activo de una enzima limitan los movimientos y las condiciones permitidas del sustrato, haciendo que éste se asemeje más al estado de transición. Es decir, la estructura del sitio activo se utiliza para orientar la forma óptima del sustrato (McKee, 2003). La combinación del sustrato (reactivo) y la enzima crea una nueva vía de reacción cuya energía del estado de transición es menor que la reacción en ausencia de la enzima. Como consecuencia la velocidad de la reacción se incrementa en grado significativo respecto a la de la reacción no catalizada. Las enzimas, como todos los catalizadores, no alteran el equilibrio de la reacción sino que aumenta la velocidad de aproximación hacía el equilibrio (Berg, 2008).

1.1.2. Importancia comercial

Además de su papel fisiológico dentro de las células, las enzimas tienen gran importancia desde el punto de vista comercial. Las eficaces propiedades catalíticas de las enzimas han promovido su introducción en varios productos y procesos industriales (Kirk, *et al.*, 2002). Con el avance de la biotecnología moderna, el empleo de las enzimas ha sido recibido como una alternativa a la tecnología química tradicional remplazando a los catalizadores químicos en muchos de los procesos. Las ventajas de su uso residen en la alta

especificidad y eficiencia en comparación con los procesos químicos no catalizados. Éstos pueden requerir alta presión y alta temperatura mientras que, los enzimáticos se llevan a cabo a presión y temperaturas moderadas. Además, las enzimas son biodegradables y muchas de ellas pueden funcionar en solventes orgánicos, con altas concentraciones de sales y condiciones extremas. Las enzimas se aplican a prácticamente todas las industrias incluyendo la farmacéuticas, alimenticia, química, textil, detergentes, papel, bioremediación, etc. (van Beilen y Li, 2002, Binod *et al.*, 2013).

1.1.3. Fuentes

Las enzimas son producto de las células y, por tanto, pueden obtenerse a partir de cualquier ser vivo. Durante muchos años la fuente principal de enzimas fueron tejidos de plantas y órganos de animales (Illanes, 2008). Actualmente, aunque se siguen empleando algunas de ellas (principalmente proteasas) con gran éxito (Tabla 1), se prefiere el uso de las enzimas producidas por microorganismos, debido que presentan ciertas ventajas. El método de obtención de enzimas a partir del cultivo de microorganismos mediante procesos fermentativos suele ser de menor costo, más rápido y más sencillo que el método para obtener enzimas de fuentes vegetales o animales, ya que está sujeta a una gran variación del rendimiento, lo que no ocurre con las enzimas microbianas. Algunas enzimas de fuentes vegetales están disponibles en ciertas temporadas del año y, por tanto, sujetas a las variaciones estacionales, mientras que las enzimas microbianas se pueden producir durante todo el año sin ninguno de estos obstáculos. Algunos microorganismos son capaces de crecer en condiciones ambientales

extremas, por lo que sus enzimas suelen ser más estables que las de origen vegetal o animal, además los microorganismos son más fáciles de manipular genéticamente, para incrementar el rendimiento de la enzima (Panesar *et al.*, 2010).

TABLA 1. Fuentes de algunas enzimas de importancia industrial.

Enzima	No. E.C.	Fuente
Enzimas microbianas		
α -Amilasa	3.2.1.1	<i>Bacillus licheniformis</i> , <i>B. subtilis</i>
Invertasa	3.2.2.26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
β -galactosidasa	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces fragilis</i>
Celulasa	3.2.1.4	<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Trichoderma sp.</i>
Pectinasa	3.2.1.15	<i>A. niger</i>
Proteasa	3.4.24.4	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Streptomyces griseus</i>
Lipasa	3.1.1.3	<i>Candida sp.</i>
Enzimas de plantas		
Bromelina	3.4.22.4	Piña
Papaina	3.4.22.2	Papaya
Enzimas de animales		
Quimotripsina	3.4.21.1	Pancreas
Lipasa	3.1.1.3	Pancreas
Lisozima	3.2.2.17	Huevo de pollo
Quimosina	3.4.23.4	Estomago de terneros

Fuente: Modificado de Panesar *et al.*, 2010.

Los microorganismos son atractivos como fuentes de enzimas, especialmente porque se puede incrementar los niveles de enzima manipulando los mecanismos que regulan su síntesis mediante distintos procedimientos. La optimización de los parámetros de fermentación, la obtención de cepas mutantes con radiaciones o mutágenos químicos, así como las modernas técnicas de clonación y manipulación genética que han permitido un avance espectacular en este campo, y no solo es posible incrementar la producción

de la enzima deseada mediante sobreexpresión del gen que la codifica, sino que también es posible la modificación racional de la estructura y función de la enzima mediante evolución y mutagénesis dirigida para aumentar su estabilidad o su actividad, variar su especificidad de sustrato o disminuir su dependencia de cofactores, etc. (Castillo, *et al.*, 2005, Strohmeier *et al.*, 2011).

Los microorganismos representan la mayor fuente de recursos de biotecnológicos. Los métodos tradicionales así como las nuevas herramientas como la metagenómica para encontrar actividades nuevas o mejoradas en la biodiversidad, ciertamente impactan en gran medida la biotecnología enzimática actual (Fernández *et al.*, 2010).

1.1.4. Regulación de la producción

Las enzimas son catalizadores esenciales del metabolismo celular. Los procesos catabólicos como anabólicos en los seres vivos son tan eficientes que no se forma un exceso de producto. El metabolismo microbiano está controlado por la regulación tanto de la síntesis como de la actividad enzimática (Crueger y Crueger 1989,). A continuación, se discuten ambos tipos de regulación.

Regulación de la actividad enzimática.

La regulación a este nivel puede producirse, a su vez, a través de distintos mecanismos:

Retro inhibición. Consiste en que uno de los productos de la ruta metabólica actúa como inhibidor de una de las enzimas (por lo general, de las primeras

de la ruta) una vez que alcanza cierta concentración en la ruta. Cuando la ruta es ramificada, entonces puede darse de varias formas:

- El **producto final** de cada ruta “hija” actúa como **inhibidor** de la primera enzima que ya no efectúa una reacción común al resto de las rutas relacionadas.
- La primera etapa de la parte común de la vía metabólica está regulada por distintas **isoenzimas**, que están reguladas de forma independiente.
- En el caso de **inhibición multivalente**, la inhibición de la ruta se consigue sólo cuando todos los productos finales en los que desemboca alcanzan la concentración necesaria.
- En el caso de la **inhibición acumulativa**, la inhibición sobre la ruta se produce también por todos los productos finales, pero no se requiere que todos alcancen la concentración necesaria para detener la ruta, sino que el proceso es más gradual.

Carga energética. La retro inhibición también regula las vías catabólicas en las que el ATP es el producto principal. Se define la carga metabólica como:

$$CE = \frac{ATP + 0.5 (ADP)}{(AMP) + (ADP) + (ATP)}$$

Cuando el valor de este cociente es próximo a 1, indica una gran cantidad de formas energéticas del ATP, por lo que se activan las rutas que lo consumen (anabólicas) al tiempo que se inhiben las que lo producen. Asimismo, cuando el valor se aproxima a 0, se inhiben las rutas anabólicas y se activan las que lo producen (catabólicas).

Degradación de enzimas. Consiste en la degradación de enzimas que no son ya requeridas en el metabolismo por medio de la acción de otras proteasas específicas. Este método de regulación aparece, sobretodo, en células en la etapa de crecimiento estacionario.

Modificación de enzimas. Consiste en la activación o inhibición de una enzima debido a cambios conformacionales reversibles causados por la unión o no de un determinado grupo químico o molécula a la enzima.

Regulación de la síntesis de enzimas.

Hay proteínas que son necesarias en las células en aproximadamente igual cantidad en cualesquiera condiciones de crecimiento. La expresión de estas moléculas se denomina constitutiva. No obstante, es más común que una determinada macromolécula sea necesaria en determinadas condiciones pero no en otras. Por lo tanto, la regulación es un proceso fundamental en todas las células y un mecanismo de conservación de la energía y los recursos (Madigan *et al.*, 2009).

Control negativo de la transcripción: represión e inducción

La transcripción es el primer paso del flujo de la información biológica; por ello, es relativamente fácil influir en la expresión génica en este punto. Se conocen diversos mecanismos para controlar la expresión génica y, en todos ellos, ejerce gran influencia el ambiente en el que está creciendo el organismo.

A menudo, las enzimas que catalizan la síntesis de un producto específico no son sintetizadas si el producto está presente en el medio en la cantidad suficiente. Este proceso recibe el nombre de represión enzimática. La inducción enzimática es conceptualmente opuesta a la represión enzimática. En la inducción una enzima es sintetizada sólo cuando su sustrato está presente. La represión enzimática afecta típicamente a las enzimas biosintéticas (anabólicas); en cambio, la inducción enzimática suele afectar a las enzimas degradativas (catabólicas); (Madigan, *et al.*, 2009).

Inductores y correpresores

La sustancia que induce la síntesis enzimática se llama inductor y la sustancia que reprime la síntesis recibe el nombre de correpresor. Estas sustancias, que normalmente son moléculas pequeñas, tienen el nombre genérico de efectores. No todos los inductores y correpresores son sustratos o productos finales de las enzimas implicadas. Así los análogos estructurales pueden inducir o reprimir una enzima a pesar de no ser sustratos de ésta (Madigan *et al.*, 2009).

Mecanismo de represión e inducción

Los inductores y los correpresores afectan a la transcripción de manera indirecta uniéndose a proteínas específicas de unión al ADN que a su vez afectan a la transcripción. En el caso de un enzima reprimible, el correpresor se une a una proteína represora específica que está presente en la célula. La proteína represora es una proteína alostérica es decir que su conformación se altera cuando el correpresor se une a ella (Alberts *et al.*, 2010).

Al unirse a su afector, la proteína represora se vuelve activa y puede unirse a una región específica del ADN cercana al promotor del gen, el operador. Si el represor se une al operador, la transcripción se bloquea físicamente porque la ARN-polimerasa no puede ni unirse ni realizar la catálisis.

La inducción enzimática también puede estar controlada por un represor. En este caso la proteína represora está activa en ausencia del inductor y bloquea completamente la transcripción. Cuando se añade el inductor, éste se combina con la proteína represora y la inactiva; la inhibición se supera y la transcripción puede proceder (Alberts *et al.*, 2010).

Todos los sistemas reguladores que utilizan represores tienen el mismo mecanismo subyacente: la inhibición de la síntesis de ARNm mediante la actividad de proteínas represoras específicas que se encuentran a su vez bajo el control de pequeñas moléculas afectoras. La regulación por represores recibe el nombre de control negativo.

Por otra parte, en el control positivo de la transcripción, una proteína reguladora activa la unión de la ARN-polimerasa al ADN. Al igual que las proteínas represoras, las proteínas activadoras se unen de manera específica sólo a determinadas secuencias del ADN (centro de unión al activador). La función de la proteína activadora es ayudar a que la ARN-polimerasa reconozca el promotor y empiece la transcripción (Alberts *et al.*, 2010).

Mecanismos reguladores globales

A menudo, un organismo necesita regular simultáneamente muchos genes no relacionados entre sí en respuesta a un cambio en el entorno. Los

mecanismos reguladores que responden a las señales ambientales regulando la expresión de muchos genes diferentes se llama sistema de control global.

Regulación catabólica. La regulación o represión catabólica es un mecanismo regulatorio general que se puede definir como una disminución relativa en la velocidad de síntesis de una enzima específica, como resultado de la exposición a un sustrato asimilable rápidamente. Los sustratos que han sido encontrados que producen regulación catabólica incluyen fuentes de carbono y nitrógeno.

- Fuentes de carbono: la biosíntesis de ciertas enzimas, principalmente catabólicas es inhibida por fuentes de carbono rápidamente asimilable o fermentable, particularmente glucosa. Dependiendo del microorganismo y la enzima, el mecanismo básico de esta regulación catabólica es diferente. Uno es bien conocido como represión catabólica por carbono encontrado en muchas bacterias, levaduras y hongos, que implica una proteína activadora catabólica (CAP) que debe unirse en el sitio promotor antes que la ARN-polimerasa se una a él. La CAP solamente se unirá si está primero unida al adenosin monofosfato cíclico, AMP cíclico. Las fuentes de carbono fácilmente utilizables como la glucosa estimulan una enzima que produce la ruptura de AMP cíclico haciéndose así inactiva a la CAP. Por tanto, la glucosa inhibe la síntesis de ARNm para cualquier enzima que requiera CAP para su formación (Harman, 2001, Lawson *et al.*, 2004).

En *A. nidulans* se han localizado 3 genes involucrados en la represión catabólica por carbono llamados: creA, creB y creC. El producto del gene creA

es un inhibidor que actúa uniéndose al ADN en múltiples zonas capaces de aceptarlo. Este gene se ha identificado en *A. nidulans*, *Neurospora crassa* y *Trichodenna viridae*. La delección o mutación de los sitios de unión a creA en el ADN impide la represión por glucosa del gen en cuestión, sin afectar la regulación de los demás, pero la mutación del gen creA produce mutantes catabólicamente dereprimidas para la síntesis de una amplia variedad de enzimas (Mackenzie *et al.*, 1993, Katz *et al.*, 2008, Culleton *et al.*, 2013).

- Fuentes de nitrógeno. El amonio y otras fuentes rápidamente utilizables de nitrógeno actúan como inhibidores. Los fundamentos de esta regulación al igual que en la regulación por carbono, el mecanismo básico de esta regulación catabólica varía dependiendo del microorganismo y la enzima (Marzluf, 1997).

1.1.5 Clasificación

Muchas de las enzimas recibieron nombres comunes en especial durante los primeros años de la enzimología. Algunos de los nombres, como triosa fosfato isomerasa son descriptivos de la función de la enzima, otros como Tripsina no lo son. Con objeto de reducir la confusión la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (IUBMB por sus siglas en inglés) ha diseñado un sistema lógico de denominación y numeración (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/nomenclature/>).

Las enzimas se dividen en seis grandes clases de grupos y subgrupos que definen sus funciones con mayor precisión. Las principales clases son las siguientes:

1. Oxidoreductasas que catalizan las reacciones de oxidación-reducción.
2. Transferasas que catalizan transferencias de grupos funcionales de una molécula a otra.
3. Hidrólidasas que catalizan ruptura hidrolíticas.
4. Liasas que catalizan eliminaciones de un grupo o adiciones de un grupo a un doble enlace.
5. Isomerasas que catalizan reordenamientos intramoleculares
6. Ligasas que catalizan reacciones en las que se unen dos moléculas.

1.2. Esterasas.

Las esterasas son un grupo extenso de enzimas que catalizan la ruptura del enlace éster. El sistema de clasificación del Comité de Nomenclatura de la IUBMB, divide las esterasas de acuerdo al tipo de enlace éster que hidrolizan en diferentes clases (Tabla 2) que se subdividen a su vez según la naturaleza de sus sustrato(s) preferidos. No obstante, esta forma de clasificación no ha sido del todo satisfactoria por varias razones (Testa y Mayer, 2003).

El sustrato *in vivo* de la mayoría de las esterasas es desconocido, aunque las esterasas tienen amplia especificidad de sustrato, la preferencia se suele traslapar entre las clases definidas. Muchas esterasas son capaces de hidrolizar amidas, tioésteres y fosfatos, así como ésteres de ácidos carboxílicos. Dependiendo del sustrato empleado durante la caracterización o purificación de una enzima, ésta puede ser clasificada como, una esterasa, amidasa, tioesterasa o fosfatasa. Por otra parte, la dificultad para obtener enzimas puras hace problemática la caracterización de esterasas,

considerando, además, que la mayoría de las esterasas son enzimas altamente polimórficas y en muchas ocasiones las esterasas purificadas son mezclas de isoenzimas que tienen especificidad de sustrato diferente. Finalmente, la actividad esterasa puede ser realizada por enzimas e incluso proteínas cuya actividad principal no es la esterasa, como la albúmina sérica. Es claro entonces que el mejoramiento en la clasificación dependerá del progreso en el aislamiento, purificación y secuenciación de estas enzimas (Testa y Mayer 2003).

TABLA 2. Clasificación de esterasas basado en el tipo de enlace éster que rompen.

Enzima	EC Número(s)
Hidrolasas de éster carboxílico	3.1.1
Tioéster hidrolasas	3.1.2
Hidrolasas de monoéster fosfórico	3.1.3
Hidrolasas de diéster fosfórico	3.1.4
Hidrolasas de monoéster trifosfórico	3.1.5
Hidrolasas de éster sulfúrico	3.1.6
Hidrolasas de monoéster difosfórico	3.1.7
Hidrolasas de triéster fosfórico	3.1.8
Nucleasas	3.1.11-31

Fuente: Testa y Mayer, 2003

1.2.1. Hidrolasas de éster carboxílico (CEH) o carboxilesterasas

Las CEH (EC 3.1.1.x) son enzimas que catalizan la ruptura del enlace éster de ácidos carboxílicos. Dentro de este grupo de enzimas se suelen clasificar, carboxilesterasas verdaderas (3.1.1.1), que hidrolizan preferentemente enlaces de ésteres alifáticos con longitud de cadena corta muy solubles en agua, lipasas (3.1.1.3), enzimas que presentan mayor afinidad por sustratos

poco solubles en agua como triacilgliceroles y cutinasas que hidrolizan la cutina (3.1.1.74), entre muchas otras.

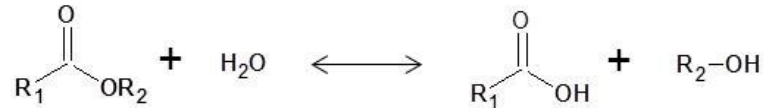
1.2.1.1. Reacciones catalizadas

Hace algunas años, se pensaba que la catálisis enzimática sólo se podía realizar en medios acuosos sin embargo, en la actualidad se ha demostrado que algunas enzimas pueden catalizar reacciones en solventes orgánicos y otros medios no convencionales (Zaks and Klivanov, 1985). En medios acuosos las CEH hidrolizan el enlace éster de diversos sustratos, teniendo como producto final un alcohol y un ácido carboxílico (Figura 2). Ésta es una reacción en equilibrio y, por lo tanto, es posible cambiar la dirección a la síntesis de ésteres modificando las condiciones en las que se lleva a cabo. El equilibrio entre las reacciones directa y reversa es controlado por el contenido de agua en la mezcla de reacción. En condiciones micro acuosas las CEH catalizan eficientemente reacciones de síntesis de ésteres, tioésteres, péptidos, amidas y transesterificaciones, presentando una alta quimio, regio y enantioselectividad (Carvalho *et al.*, 1999, Villeneuve *et al.*, 2000, Bornscheuer, 2002).

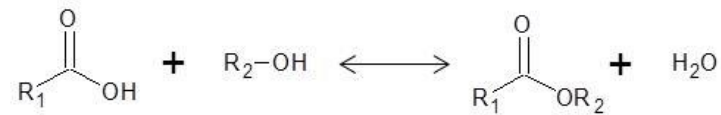
En un sentido amplio, la transesterificación implica tres grupos de reacciones según un éster reaccione con un alcohol (alcoholólisis), con un ácido carboxílico (acidólisis) o con otro éster (interesterificación) (Formo, 1954). La alcoholólisis implica la sustitución del grupo alquilo del éster por otro grupo alquilo, a través de la reacción del éster con un alcohol. La acidólisis es la reacción entre un éster y un ácido carboxílico, implicando el intercambio o sustitución del grupo

acilo del éster. La interesterificación es el intercambio entre los grupos acilo y alquilo de dos ésteres diferentes. La Figura 2 muestra el esquema general de algunas de las reacciones catalizadas por las CEH.

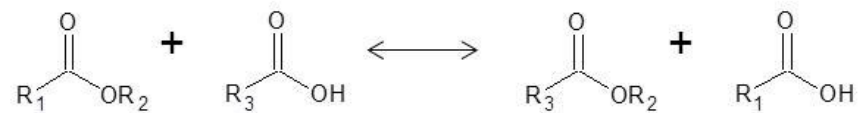
Hidrólisis



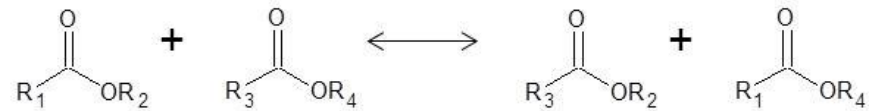
Síntesis de ésteres



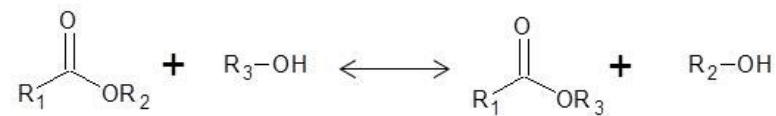
Acidólisis



Interesterificación



Alcoholólisis



Aminólisis

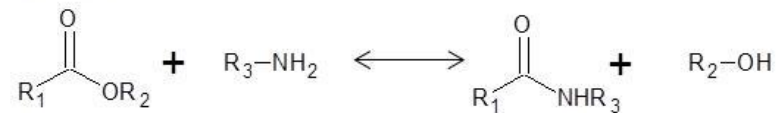


FIGURA 2. Algunas reacciones catalizadas por CEH.

1.2.1.2 Aplicaciones

Las CEH son valiosos catalizadores con incomparables aplicaciones vigentes y potenciales (Dutta *et al.*, 2009, Sharma, *et al.*, 2011, Nagarajan, 2012). Las aplicaciones industriales más importantes de las CEH se han encontrado principalmente en los alimentos, detergentes y productos farmacéuticos. Sin embargo, en los últimos años la sorprendente exploración del uso de estas enzimas ha venido a extender su potencial aplicación en áreas de la salud, química orgánica, biodegradación, bioenergéticos, textil, agroindustrial entre otros. A continuación se describen algunos de las aplicaciones de estas enzimas.

Alimentos. La aplicación de CEH en alimentos es muy amplia. Se utilizan principalmente en la fabricación de quesos y productos lácteos con olores y sabores deseados (Lubary *et al.*, 2012), así como en bebidas, productos horneados y mayonesa (Panda y Gowrishankar, 2005). También, se emplean en la obtención de productos cárnicos con menor contenido de lípidos (Sharma *et al.*, 2011), modificación de grasas y aceites y producción de lípidos estructurados (Rodríguez y Fernandez, 2010). Otras aplicaciones incluyen la biosíntesis o modificación de sustancias que se adicionan a los alimentos con el propósito de incrementar su valor nutritivo, sensorial o económico. Algunos de estos son, ésteres aromáticos (Kuo *et al.*, 2012), biosurfactantes (Karmee, 2009), compuestos bioactivos lipofilizados (Stamatis *et al.*, 1999, Zhang, *et al.*, 2011) y edulcorantes (Yang *et al.*, 2012).

Detergentes y productos de limpieza. Las CEH se adicionan en estos productos para facilitar la remoción de lípidos. Su aplicación en esta área representa el mayor volumen en ventas (Jurado *et al.*, 2011).

Síntesis de productos químicos y farmacéuticos

El estudio de las CEH también ha sido dirigido a la exploración de una serie de aplicaciones en química fina, principalmente en la síntesis y resolución de compuestos quirales de interés farmacéutico. Las normas en la producción de fármacos son muy estrictas y exigen productos ópticamente puros en lugar de mezclas racémicas. Algunos de los procesos eficientes de interés son: preparación de enantiómeros puros del ácido 2-aril-propiónico, como naproxeno e ibuprofeno de utilidad farmacológica como antiinflamatorios no esteroideos (Botta *et al.*, 1997, Azzolina *et al.*, 1995), resolución de antibióticos *e.g.* nitroimidazoles (Skupin *et al.*, 1997), preparación de quinonas diterpenoides en el tratamiento de la artritis (Yamamura *et al.*, 1997), síntesis de productos antitumorales *e.g.* acetomicina (Kinderman y Feringa, 1998), antivirales como el carbovir (que puede emplearse para tratamiento de VIH) (MacKeith *et al.*, 1994), y síntesis enantioespecífica de alcaloides, alcoholes secundarios, inhibidores bioquímicos y profármacos (Pandey *et al.*, 1999).

Síntesis de productos para el cuidado personal. En este campo se han utilizado CEH por su capacidad de síntesis de humectantes y aromas, ingredientes principales en cosméticos y perfumes (Metzger y Bornscheuer, 2006).

Biodegradación. Las CEH se han utilizado con mucho éxito en el tratamiento de aguas residuales y en la bioremediación de desechos de petróleo y aceite (Sharma *et al.*, 2011). Otro uso muy importante de estas enzimas es la degradación de polímeros (plásticos) biodegradables (Sivalingam y Giridhar, 2004, Tokiwa *et al.*, 2009). También, se pueden utilizar para degradar sustancias tóxicas que afectan la salud de humanos como el malatión, insecticida y acaricida (Yoshii, *et al.*, 2007).

Producción de biocombustibles. El biodiesel es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales o grasa animal mediante el proceso de transesterificación. Químicamente se describe como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena corta o larga. Si bien es cierto que a nivel industrial se emplea la catálisis alcalina para la producción de biodiesel, la transesterificación enzimática utilizando CEH ha ganado mucha atención (Tan, *et al.*, 2010).

1.2.2 Cutinasas

Las cutinasas son CEH que catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de cutina, aunque también pueden hidrolizar sustratos de CEH verdaderas y lipasas por lo que se les considera como intermedio entre estas enzimas (Chen *et al.*, 2013).

La cutina es el componente principal de la cutícula, una estructura multicapa que cubre las paredes celulares externas de la epidermis en los órganos aéreos de las plantas. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos

de cadena larga que están unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (Taiz y Zeiger, 2002)

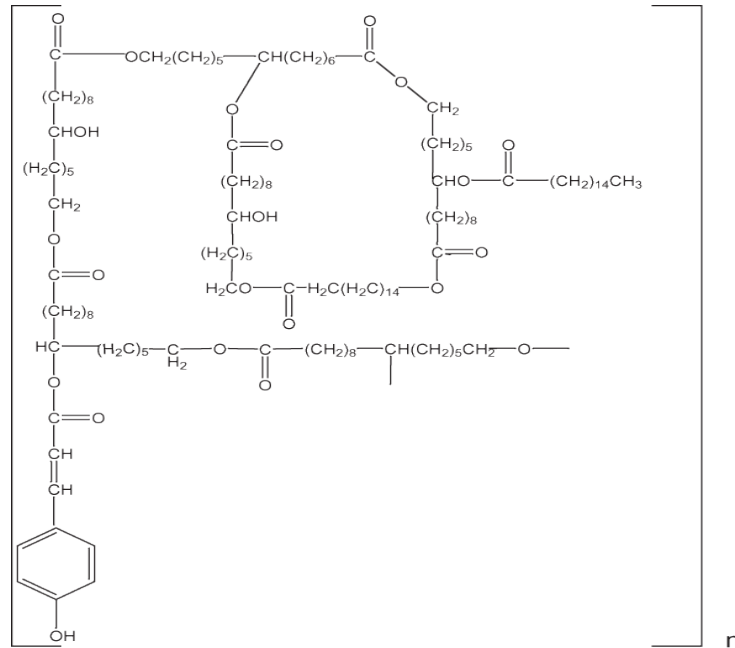


FIGURA 3. Modelo de una unidad monomérica de cutina.
Fuente: Kolattukudy, 2001

Las cutinasas son enzimas inducibles producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Diversas fuentes, entre las cuales se destacan los hongos (principalmente fitopatógenos), han sido reportadas como productoras de cutinasas (Tabla 3). La patogenicidad del microorganismo y su efecto en la invasión al huésped sigue en controversia.

TABLA 3. Fuentes de cutinasas

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Alternaria</i>	<i>Alternata</i>	Tanabe <i>et al.</i> , 1988
		<i>Brassicicola</i>	Koschorreck <i>et al.</i> , 2010
	<i>Aspergillus</i>	<i>Oryzae</i>	Maeda, <i>et al.</i> , 2005
	<i>Botrytis</i>	<i>Cinérea</i>	van Kan, <i>et al.</i> , 1997
	<i>Colletotrichum</i>	<i>Gloesporioides</i>	Dickman, <i>et al.</i> , 1986
		<i>Lagenarium</i>	Bonnen, <i>et al.</i> , 1989
		<i>Lindemuthianum</i>	Rispoli, <i>et al.</i> , 2007
	<i>Fusarium</i>	<i>Solani</i>	Martinez <i>et al.</i> , 1992
		<i>Oxysporum</i>	Kim <i>et al.</i> , 2005
		<i>Glomerella</i>	<i>Cingulata</i>
Bacterias	<i>Trichoderma</i>	<i>Harzianum</i>	Rubio, <i>et al.</i> , 2008
	<i>Venturia</i>	<i>Inaequalis</i>	Köller, <i>et al.</i> , 1995
	<i>Streptomyces</i>	<i>Scabies</i>	McQueen, <i>et al.</i> , 1987
	<i>Pseudomona</i>	<i>putida</i>	Sebastian, <i>et al.</i> , 1987
		<i>aeruginosa</i>	Fett, <i>et al.</i> , 1992
	<i>Thermonospora</i>	<i>fusca</i>	Fett, <i>et al.</i> , 1999
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	Fett, <i>et al.</i> , 2000
Levaduras	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	Du <i>et al.</i> , 2007
	<i>Cryptococcus</i>	sp.	Masaki, <i>et al.</i> , 2005
	<i>Pseudozyma</i>	<i>Jejuensis</i>	Seo, <i>et al.</i> , 2007
Plantas	<i>Tropaeolum</i>	Majus	Shayk, <i>et al.</i> , 1977

Fuente: Castro-Ochoa, *et al.*, 2010.

1.2.2.1 Estructura y mecanismo catalítico de cutinasas

Estructura

Las cutinasas presentan un plegamiento conocido como α/β hidrolasa (Martínez *et al.*, 1992), que es común en varias enzimas hidrolíticas de origen filogenético y función catalítica muy diferentes (Ollis *et al.*, 1992). La estructura central de las α/β hidrolasas está formada principalmente por láminas β -plegadas paralelas conectadas por hélices- α . Los residuos catalíticos constituyen siempre una triada altamente conservada: un nucleófilo (serina, cisteína o ácido aspártico), un residuo ácido y un residuo de histidina totalmente conservado (Nardini y Dijkstra, 1999). La familia del plegamiento

α/β hidrolasa incluye proteasas, lipasas, esterasas, deshalogenasas, peroxidasas y epóxido hidrolasas, siendo uno de los plegamientos de proteínas más versátiles y frecuente (Nardini y Dijkstra, 1999). En la Figura 4 se muestra un diagrama esquemático del plegamiento canónico de las cutinasas, basado en la estructura de la cutinasa de *F. solani* que ha sido la más estudiada. La estructura de ésta cutinasa está compuesta por una lámina- β central de cinco cadenas paralelas cubierta por cuatro hélices- α (Egmond y Vlieg, 2000). El sitio activo consiste en la triada catalítica Ser 120, Asp 175 e His 188. El péptido Gly-Tyr-Ser-Gln-Gly que contiene el aminoácido del sitio activo Ser 120, coincide con la secuencia consenso Gly-(Tyr or His)-Ser-X-Gly comúnmente presente en lipasas. La cutinasa de *F. solani* presenta dos puentes disulfuro, el primero, Cys 31-Cys 109, uniendo el extremo del N-terminal a un giro- β y participa en la estabilización del plegamiento molecular global, el segundo puente disulfuro, Cys 171-Cys 178, se puede asumir que juega un papel importante en la estabilización de dos giros- β consecutivos, los cuales se localizan en el residuo catalítico Asp 175 (Longhi y Cambillau, 1999). Recientemente, la elucidación de la estructura de la cutinasa de *A. oryzae* reveló que esta enzima presenta un plegamiento α/β similar al de la cutinasa de *F. solani*, pero difieren significativamente en varias características estructurales. La estructura de la cutinasa de *A. oryzae* está compuesta de una lámina- β de cinco cadenas paralelas rodeadas por 10 hélices- α y presenta tres puentes disulfuro. Contiene un único puente disulfuro entre Cys63 y Cys76 que no había sido reportado en estructuras de cutinasas (Liu *et al.*, 2009).

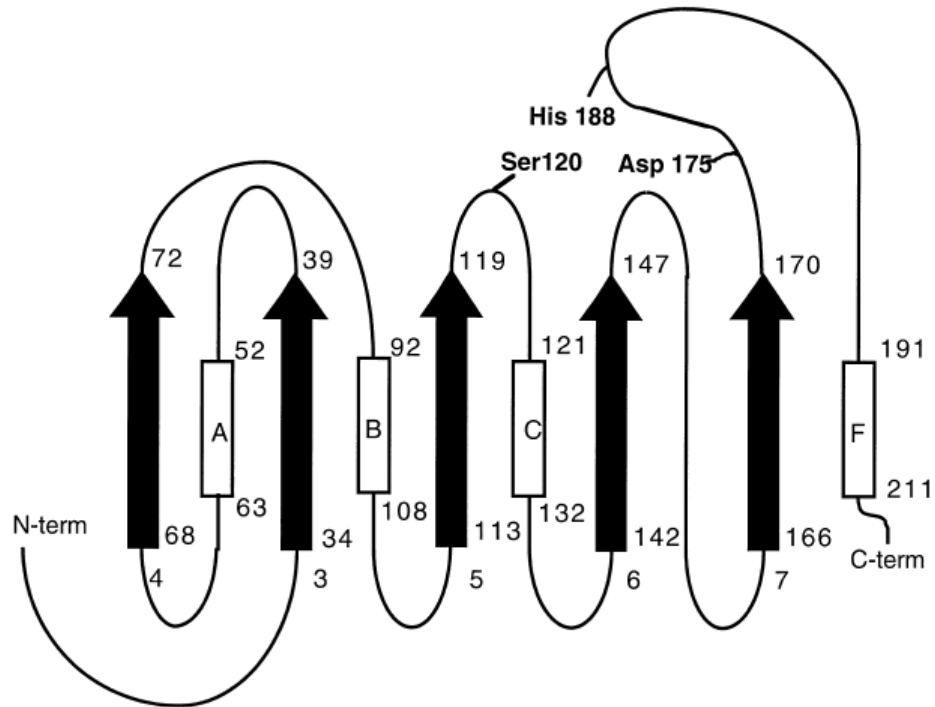


FIGURA 4. Diagrama del plegamiento α/β de cutinasa. Se indica la triada del sitio activo (Ser120, Asp175 e His 188), las cinco cadenas beta (flechas negras numeradas del 3-7) y cuatro hélices (marcadas A, B, C y F). Los números en el lado derecho de los elementos de la estructura secundaria señalan el inicio y final de estos elementos.

Fuente: Egmond M.R. y de Vlieg, 2000.

El sitio activo de las cutinasa presenta cierta flexibilidad que puede explicar la adaptabilidad a diferentes sustratos. Las cutinasas presentan actividad lipolítica pero, difieren de las lipasas clásicas en que no presentan activación interfacial. En la mayoría de las lipasas, el sitio activo se encuentra cubierto por una “tapa” anfipática. La apertura de esta tapa después de la interacción con una interfase hidrofóbica hace el sitio catalítico accesible al sustrato e incrementa la velocidad de hidrólisis (Kazlauskas, 1994). En algunas lipasas, una segunda consecuencia del movimiento de la tapa es la formación de la

cavidad oxianiónica (Jaeger *et al.*, 1999). La cavidad oxianiónica provee un ambiente electrofílico que estabiliza la carga negativa generada durante el ataque nucleofílico del enlace hidrolizable del sustrato. El sitio activo de la cutinasa de *F. solani* no se encuentra cubierto por un lazo (“loop”) o “tapa”, sino que es accesible al solvente además, presenta la cavidad oxianiónica preformada. Lo que podría explicar por qué las cutinasas no presentan activación interfacial (Martínez *et al.*, 1992).

Mecanismo catalítico

El mecanismo catalítico de cutinasas, al igual que otras CEH, es similar al observado en las serín proteasas que se describe en el apartado 1.3.2.1.

1.2.2.2. Aplicaciones

La actividad esterolítica de las cutinasas ha sido ampliamente explorada. Carvalho *et al.*, (1999) discuten en detalle las reacciones de biocatálisis que pueden llevar a cabo las cutinasas. In vitro las cutinasas despliegan actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres, sintéticos solubles (*e.g.*, ésteres de *p*-nitrofenilo) hasta triglicérols de cadena larga insolubles. Además, en medios no acuosos o de baja actividad de agua, pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos. Estas reacciones de hidrólisis y síntesis tienen un uso potencial en la industria de alimentos, en la de lácteos para la hidrólisis de grasa de leche, en la industria de detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicérols estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas, polímeros

sintéticos, y en la producción de biodiesel, entre otras aplicaciones (Pio y Macedo, 2009, Dutta *et al.*, 2009, Chen *et al.*, 2013). En general, las cutinasas tienen un gran potencial de aplicación áreas similares a las de lipasas y esterasas (Castro-Ochoa *et al.*, 2010).

1.3 Proteasas

La reacción catalizada por estas enzimas es la hidrólisis del enlace peptídico sin embargo, la mayoría de las enzimas proteolíticas también cataliza una reacción diferente pero relacionada, es decir la hidrólisis del enlace éster (Berg, 2008). Además, al igual que las CEH, en medios no acuosos o de baja actividad de agua son capaces de realizar reacciones de síntesis como esterificación transesterificación y aminólisis con alta regio y estereo especificidad de sustratos.

1.3.1. Clasificación

Las proteasas se clasifican en el grupo 3, subgrupo 4 (EC 3.4.x.x) sin embargo, estas enzimas no cumplen fielmente con el sistema general de nomenclatura de enzimas debido a su inmensa diversidad en mecanismos de catálisis y estructura (Rao *et al.*, 1998, Velloorvalappil *et al.*, 2013). Actualmente, las proteasas se clasifican en base a diferentes criterios: la posición del enlace a escindir, el tipo de reacción catalizada, la naturaleza química del sitio catalítico, homología entre secuencias de aminoácidos y relación evolutiva con respecto a su estructura. Basados en la naturaleza química del sitio catalítico tradicionalmente, se clasifica a las proteasas en cuatro grupos principales:

- **Serín proteasas** (EC 3.4.21), se caracterizan por la presencia de un residuo de serina en su sitio activo.
- **Cistín proteasas** (EC 3.4.22), su actividad depende de una díada catalítica que consta en un residuo de cisteína y uno de histidina.
- **Aspartil proteasas** (EC 3.4.23), dependen de residuos de ácido aspártico para su actividad catalítica.
- **Metalo proteasas** (EC 3.4.24), se caracterizan por el requerimiento de cationes metálicos divalentes para su actividad.

No obstante, en los últimos años el avance en el estudio de las proteasas ha permitido la identificación de nuevas enzimas que se caracterizan por la presencia de residuos como: treonina, ácido glutámico y asparagina en su sitio activo. Existen también bases de datos como MEROPS, que clasifica las proteasas en una estructura jerárquica de familias y clanes. Cada enzima es asignada a una familia en base a similitudes (estadísticamente significativas) en las secuencias de aminoácidos y las familias que se consideran homologas se agrupan en un clan (Rawlings *et al.*, 2012).

1.3.2. Mecanismo catalítico de las serín proteasas

Los estudios del mecanismo catalítico de las proteasas han revelado que estas enzimas exhiben diversos tipos, cada uno basado en la configuración del sitio activo. Las serín proteasas presentan un mecanismo catalítico bien conocido, compartido por otras enzimas no necesariamente proteolíticas como lipasas y cutinasas. Esta clase de proteasas tienen un centro activo formado por tres aminoácidos absolutamente conservados, Serina, Histidina y

Aspartato, que puede encontrarse por lo menos en cuatro diversos contextos estructurales manteniendo su orientación geométrica en la estructura de la proteína (Voet *et al.*, 2009).

La estructura del centro activo explica la reactividad especial de la serina. La disposición de los residuos de la triada catalítica se presenta de la siguiente manera: la cadena lateral de la serina forma un puente de hidrógeno con el anillo imidazol de la histidina. El grupo $-NH$ de este anillo imidazol se encuentra a su vez, formando un puente de hidrógeno con el grupo carboxilato del ácido aspártico (Figura 4). El residuo de histidina se encuentra próximo a la posición de la cadena lateral de la serina para polarizar a su grupo hidróxilo dejándolo preparado para la desprotonización. En presencia del sustrato la histidina acepta el protón del grupo hidroxilo de la serina. Actuando así, el residuo funciona como un catalizador básico general. La retirada del protón del grupo hidroxilo genera un ion alcóxido que tiene mucho mayor poder nucleófilo que un alcohol. El residuo de aspartato ayuda a orientar al residuo de histidina y lo convierte, a través de efectos electrostáticos en un mejor aceptor del protón.

Después de la unión del sustrato (Figura 5), el átomo de oxígeno de la cadena lateral de la serina 195 lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el átomo del carbono carbonilo del enlace peptídico, lo que lleva a tener cuatro átomos enlazados al carbono carbonilo, formando un tetraedro, en vez de tres átomos en una disposición plana. La inestabilidad inherente al intermediario tetraédrico formado mantiene una carga negativa formal sobre el átomo de oxígeno derivado del grupo carbonilo. Esta carga se estabiliza mediante

interacciones con grupos $-NH$ de la proteína en un centro denominado cavidad del oxianión. Estas interacciones ayudan también a estabilizar el estado de transición que precede a la formación del intermediario tetraédrico. Después, este intermediario tetraédrico se colapsa para generar el acilo enzima (paso 2). Este paso se facilita mediante la transferencia de un protón desde el residuo de histidina cargado positivamente al grupo amino formado por la ruptura del enlace peptídico.

El componente amino se encuentra ahora libre para apartarse de la enzima completando la primera etapa de la reacción hidrolítica o acilación de la enzima. El siguiente paso, la desacilación, comienza cuando una molécula de agua se sitúa en el lugar ocupado anteriormente por el componente amina del sustrato (paso 3). El grupo éster del acil enzima se hidroliza ahora mediante un proceso donde la histidina 57 actúa como un catalizador básico general, separando el protón de la molécula de agua. El ion hidróxido resultante ataca al átomo del carbono carbonilo del grupo acilo, formando un intermediario tetraédrico (paso 4). Esta estructura se descompone para formar el producto ácido carboxílico. Finalmente, la liberación del producto ácido carboxílico (paso 5) pone a punto a la enzima para desarrollar otro ciclo catalítico.

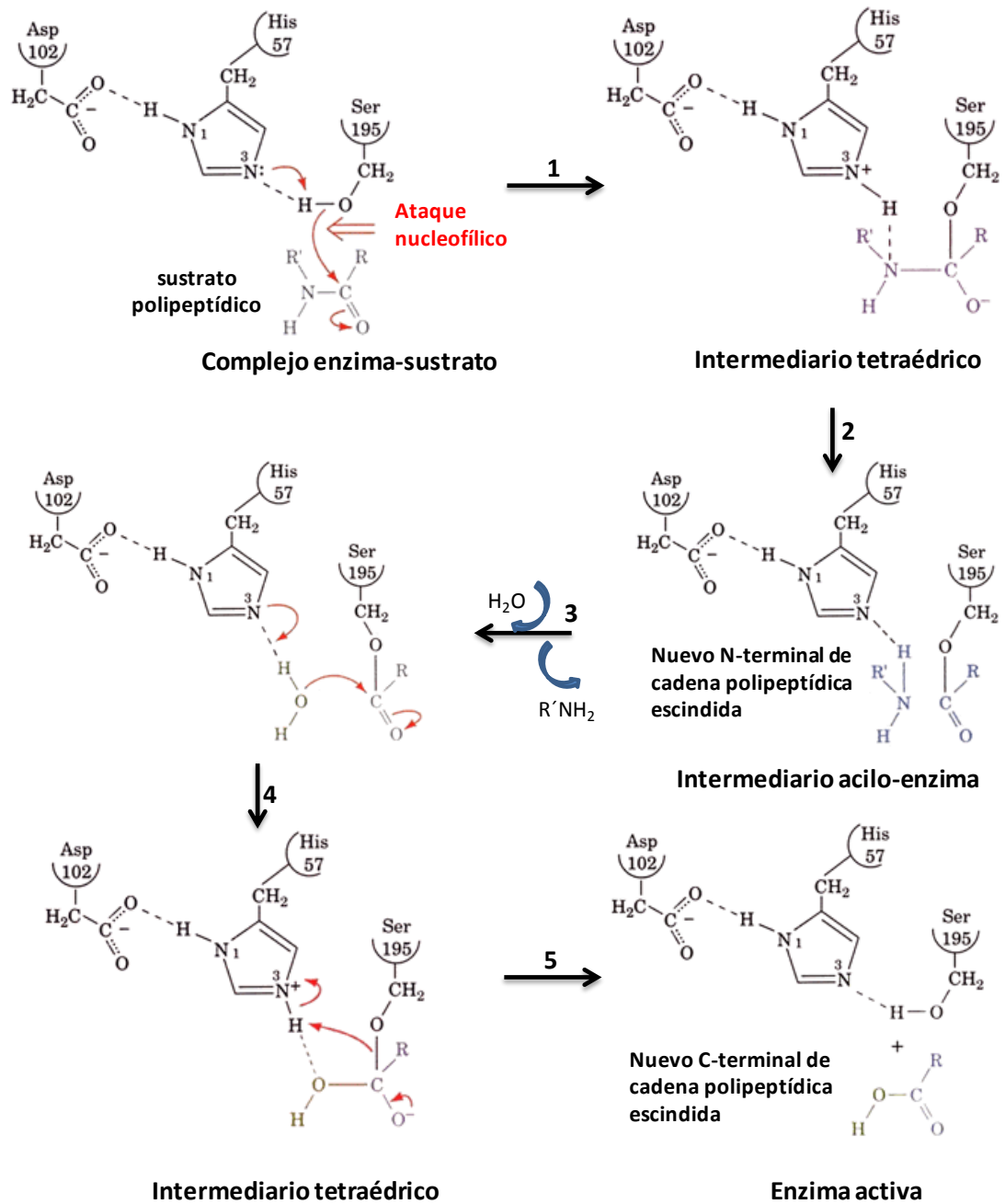


FIGURA 5. Mecanismo catalítico de las serín proteasas. La reacción comprende 1) el ataque nucleofílico de la Ser del sitio activo en el átomo de carbono carbonilo del enlace peptídico escindible, para formar el intermediario tetraédrico; 2) descomposición del intermediario tetraédrico en el intermediario acilo-enzima mediante catalisis ácida general por el sitio activo His polarizado por Asp; 3) seguido de la pérdida del producto amino y su reemplazo por una molécula de agua; 4) la reversión del paso 2 para formar un segundo intermediario tetraédrico y 5) la inversión del paso 1 para obtener el producto carboxilo de la reacción y la enzima activa.

Fuente: Voet *et al.*, 2009.

1.4. *Aspergillus nidulans*

1.4.1. Descripción general

Aspergillus nidulans, también conocido como *Emericella nidulans* cuando se refiere a su forma perfecta o sexual (teleomorfo), es un hongo filamentoso perteneciente a la familia Trichocomaceae, filo Ascomycota.

Es un microorganismo saprófito que posee una gran capacidad para adaptarse y vivir en ambientes muy diversos tanto en el aspecto físico-químico como en el biológico. Esta extrema variabilidad de nichos se corresponde con la elevada versatilidad metabólica de este hongo filamentoso.

El ciclo de vida de *A. nidulans* se caracteriza por la presencia de cuatro estadios bien definidos: crecimiento vegetativo, reproducción asexual, reproducción sexual y el ciclo parasexual. El crecimiento vegetativo de *A. nidulans* como en otros hongos, inicia con la germinación de una espora con el establecimiento de la polaridad. Esta puede ser un conidiospora (espora asexual) o una ascospora (espora sexual). Generada la polaridad emerge el tubo de la germínula, la hifa tubular crece por extensión apical y ramificación lateral, formando un entramado de hifas interconectadas denominado micelio (Adams *et al.*, 1998). Las hifas están divididas por septos perforados a través de los cuales se produce el intercambio de nutrientes y efectores entre los diferentes compartimentos o células.

Aproximadamente 16 horas después de la germinación, algunas hifas que emergen al micelio aéreo muestran las primeras evidencias fenotípicas de especialización, diferenciándose los primeros conidióforos. A medida que la

colonia se expande radialmente, nuevas hifas van emergiendo al medio aéreo, produciéndose la consiguiente generación de nuevos conidióforos. Así, el inicio de la diferenciación asexual va dejando los conidióforos más antiguos en el centro y los más recientes en los extremos (Adams *et al*, 1998). La finalización de la reproducción asexual inicia en el centro de la colonia y es seguida por el inicio de otro proceso claramente reconocible, la formación de esporas sexuales. Esta etapa involucra la formación de los cuerpos fructíferos denominados cleistotecios, que están rodeados por células especializadas llamadas células de Hülle. En el interior de cada cleistotecio se encuentran una gran cantidad de sacos denominados ascas, que contienen las esporas sexuales o ascosporas. Las ascosporas son siempre haploides y contienen dos núcleos idénticos que proceden de una mitosis sin división celular (Todd *et al*, 2007a). El ciclo parasexual en *A. nidulans* se caracteriza por la fusión de hifas maduras durante la fase vegetativa, dando lugar a un intercambio de material celular por anastomosis. En el caso de que las hifas fusionadas pertenezcan a cepas genéticamente diferentes, se generaran individuos heterocariontes que presentan núcleos haploides con distinta dotación genética (Pontercorvo *et al*, 1953; Glass *et al.*, 2004).

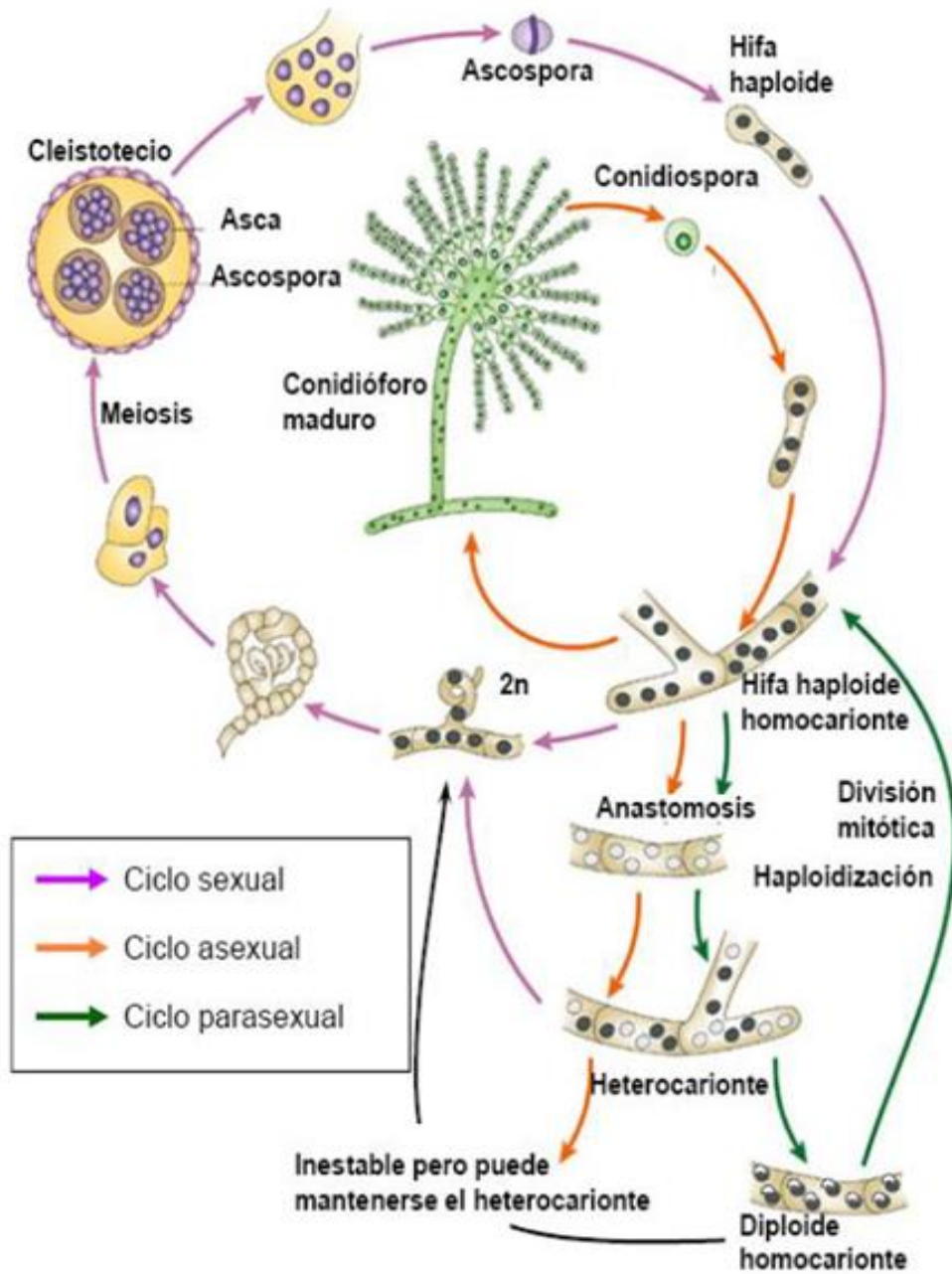


FIGURA 6. Ciclos de vida de *Aspergillus nidulans*
Fuente: Cobeño, 2011.

1.4.2. Importancia de *Aspergillus nidulans* como modelo de estudio

La secuencia del genoma de *A. nidulans* se publicó en diciembre de 2005. Contiene 30 Mpbs organizadas en ocho cromosomas y se ha estimado un número de 10.000 genes (Galagan, *et al.*, 2005). La disponibilidad de dicha información es una importante herramienta de trabajo y supone un avance significativo que permitirá seguir utilizando *A. nidulans* como organismo modelo, genéticamente manipulable, en estudios de genética y biología celular y molecular en eucariotas. Como organismo homotálico, con un ciclo sexual bien caracterizado, constituye el modelo genético de referencia para otras especies asexuales y heterotálicas del género *Aspergillus* de gran interés en industria, como *A. oryzae* o *A. flavus*, o en medicina, como *A. fumigatus*.

A esta característica se une su enorme versatilidad metabólica, que ha permitido identificar numerosas rutas del metabolismo primario y secundario. Los hongos filamentosos y en particular los del género *Aspergillus*, son los principales productores de actividades enzimáticas que tienen importantes aplicaciones en la industria alimentaria y de bebidas. *Aspergillus nidulans* no se utiliza industrialmente, sin embargo, es capaz de producir una amplia variedad de actividades enzimáticas extracelulares industrialmente útiles. Algunas de las actividades referidas son: celulasas, proteasas, xilanasas y CEH (Fernández-Espinar, *et al*, 1992, Jabasingh y ValliNachiya, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 CEH en *Aspergillus nidulans*

Un análisis de las secuencias de CEH en la base de datos del genoma de *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) reveló que existen más de 40 genes que codifican para la producción de esta clase de enzimas (Peña, 2009). En esta base de datos, las enzimas están clasificadas de acuerdo al dominio que la proteína presenta en la base de datos Pfam (Protein families database of alignments y HMMs). Se encontraron 18 secuencias de genes que codifican para carboxilesterasas 4 secuencias de genes que codifican para cutinasas, 1 gen de esterasa y el resto diferentes tipos de lipasas y otras enzimas (Tabla 4).

TABLA 4. Secuencias de CEH encontradas en el genoma de *A. nidulans*

Dominio	Secuencias
Lipasas 3	4
Lipasa	4
Lipasa con motivo GDSL	9
Lipasa secretoria	2
Esterasa	1
Cutinasa	4
Carboxilesterasas	18
α/β hidrolasa asociada a lipasa	1
Otras	2
Total	45

Fuente: Peña-Montes, 2009.

No obstante la existencia de todas estas secuencias de CEH hipotéticas en el genoma de *A. nidulans*, existen pocos reportes sobre la producción de las enzimas por el microorganismo.

Ogundero V.W (1982) reportó el aislamiento de una cepa de *A. nidulans* de Palma Nigeriana. El microorganismo presentó capacidad para degradar aceites vegetales y triacilgliceroles. La caracterización de los extractos enzimáticos extracelulares reveló que la enzima mostró mayor actividad a pH 6.5 y 45°C.

García-Lepe y colaboradores (1997) reportaron la producción actividad de lipasa y cutinasa en cultivos autolisados (20 días de cultivo en medio mineral suplementado con extracto de levadura 1%) de diferentes hongos filamentosos incluyendo, cepas de *Aspergillus nidulans*. La actividad lipolítica y cutinolítica se determinaron empleando como sustrato Tween-80 y cutina, respectivamente.

St. Leger y colaboradores (1997) reportaron la producción de actividad cutinasa en *Aspergillus nidulans*. La actividad se detectó empleando medio mínimo (pH 6) suplementado con extracto de levadura 0.1% y policaprolactona (0.5%) como fuente de carbono e inductor.

Posteriormente, Mayordomo *et al.*, (2000) reportaron la purificación de una lipasa de 29 kDa que mostraba actividad alta a bajas temperaturas (0-20 °C). La producción de la proteína se indujo con aceite de oliva. La temperatura y pH óptimos para la enzima fueron de 40°C y 6.5. La enzima mostró

preferencia por ésteres de ácidos grasos con longitud de cadena corta y mediana. No se obtuvo la secuencia de la proteína.

Algunas de las CEH hipotéticas de *A. nidulans* que han sido clonadas y expresadas como enzimas recombinantes son: cutinasas AN7541.2 y AN7180.2 (Bauer *et al.*, 2006) expresadas en *P. pastoris*, feruloil esterasa tipo B (AN1772.2), expresada en *S. cerevisiae* (Shin y Chen, 2007) y esterasa Stc1 (enzima involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina) expresada en *P. pastoris* (Peña, *et al.*, 2009)

2.2 Proteasas en *Aspergillus nidulans*

La producción de proteasas en *A. nidulans* ha sido ampliamente estudiada. En el filtrado del medio de cultivo de *A. nidulans* Cohen (1973b) identificó tres proteasas extracelulares (α , γ , ϵ) y una proteasa (β) que es estrictamente intracelular.

Estudios realizados han revelado que en *A. nidulans* las enzimas proteolíticas extracelulares se producen en respuesta a condiciones limitantes de carbono, nitrógeno o sulfuro, independientemente de la presencia o ausencia de proteína en el medio de cultivo (Cohen, 1973a, Katz *et al.*, 2008).

Algunas de las proteasas extracelulares de *A. nidulans* ha sido purificadas y caracterizadas (Tabla 5). Dos de la proteasas (30 y 42 kDa) pertenecen a la clase serín y la de menor peso molecular (19 kDa) al tipo metalo proteasa.

TABLA 5. Proteasas de *Aspergillus nidulans* purificadas.

Clase de proteasa	Gen	Peso molecular (kDa)	Referencia
Serín	-	30	Ansary y Stevens 1983b
Serín	-	42	Charles, P. <i>et al.</i> , 2008
Metalo	PepJ	19	Emri T. <i>et al.</i> , 2009

Se han aislado 3 genes *prtA*, *prtB* y *pepJ* que codifican para la producción de proteasas *A. nidulans* (vanKuyk, *et al.* 2000, Katz *et al.* 2008). La principal actividad proteolítica producida por el hongo es atribuida a la enzima codificada por el gen *prtA*.

2.3. Investigaciones del grupo de trabajo

Considerando la importancia y potencial de aplicación de las enzimas CEH en diferentes áreas de la biotecnología, en el grupo de trabajo se inició una línea de investigación para buscar la producción de estas enzimas en diferentes cepas de hongos filamentosos. Particularmente, los estudios se enfocaron en *A. nidulans*, un microorganismo modelo en investigación, del cual existe poca información sobre la producción de esta clase de enzimas.

Kawasaki *et al.*, (1995) reportaron la producción de actividad lipolítica en la cepa PW1 de *A. nidulans*. Encontraron que la actividad lipolítica producida por el hongo (cuando se cultiva en medio conteniendo aceite de olivo como inductor) es inhibida por glucosa mediante un mecanismo independiente del gen *creA* e identificaron una banda única de 37 kDa con actividad CEH sobre laurato de *o*-nitrofenilo.

Posteriormente, Peña (2001) analizó diferentes nutrientes y condiciones de cultivo para optimizar la producción de actividad CEH en *A. nidulans*. Encontró que la mayor producción de la actividad se obtenía al emplear aceite de olivo (1%) como inductor, almidón (1.5%) como fuente de carbono y extracto de levadura (0.5%) como fuente de nitrógeno. También, purificó y caracterizó una enzima con actividad CEH de 37 kDa producida en este medio (Peña-Montes *et al.*, 2008).

En experimentos previos a la purificación de esta CEH, se había cultivado al microorganismo en medio mínimo con cutina como única fuente de carbono y se determinó actividad cutinolítica (Peña, 2001). Los resultados indicaban que probablemente, la enzima realizaba las actividades de lipasa, esterases y cutinasa sin embargo, en una prueba inicial de identificación de la proteína mediante secuenciación de péptidos internos, el resultado obtenido mostraba que la secuencia correspondía a una proteasa alcalina.

Con el propósito de continuar el trabajo de Peña-Montes, se realizaron pruebas preliminares con la finalidad de identificar la, o las enzimas, con actividad CEH producida por *A. nidulans* en el medio de cultivo optimizado (CEHM). Después de realizar una separación electroforética de las proteínas presentes en el filtrado (concentrado) del medio de cultivo, se observaron 3 bandas con dicha actividad catalítica empleando como sustrato acetato de α -naftilo (Figura 7). Las enzimas presentaron los siguientes pesos moleculares de acuerdo a su movilidad en SDS-PAGE, 37, 29 Y 24 kDa. La actividad de 37 kDa se asumió que correspondía a la enzima purificada por Peña-Montes, la de 29 kDa, por semejanza en el peso molecular (30 kDa) pudiera relacionarse

a la lipasa reportada por Mayordomo *et al.*, (2000), mientras que la de 24 kDa era la primera vez que se observaba.

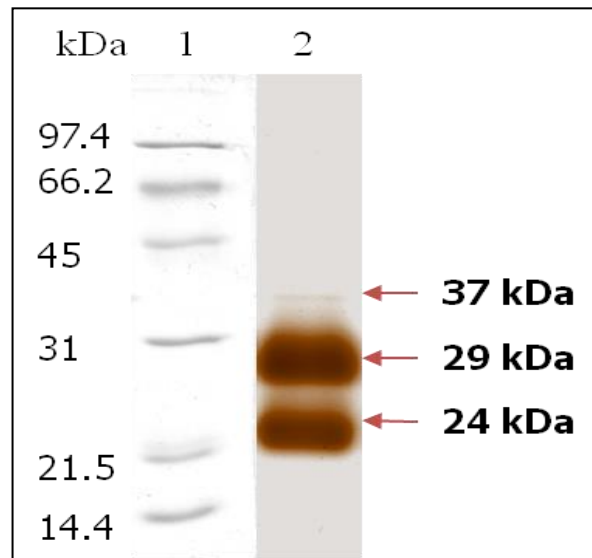


FIGURA 7. Zimograma de actividad CEH en medio de cultivo optimizado concentrado. 1, marcador de peso molecular, extracto concentrado medio de cultivo CEHM. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE, y la actividad enzimática se realizó empleando acetato de α -naftilo como sustrato.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La demanda de preparaciones altamente activas de CEH ha dirigido las investigaciones hacia la búsqueda de microorganismos productores así como en las estrategias de su cultivo para la obtención de las enzimas.

El genoma de *A. nidulans* se tiene un gran número de genes que codifican para diversas esterasas hipotéticas, incluyendo CEH pero, solo algunas de éstas han sido descritas a detalle y son muy pocos los estudios sobre la regulación de su producción. Por lo cual, sería de gran importancia avanzar en el estudio de estos temas, con el fin de la obtención de enzimas para aplicación industrial y/o estudios.

En el grupo de trabajo se ha observado que *A. nidulans* produce 3 proteínas que presentan actividad de CEH cuando cultiva en un medio con aceite de olivo como inductor. Una de estas proteínas (37 kDa) se purificó y caracterizó sin embargo, considerando que la actividad CEH es realizada no sólo por CEH, se tienen las siguientes interrogantes por resolver:

- Las tres actividades CEH detectadas en el extracto de *A. nidulans*, ¿son una sola o son enzimas diferentes?, ¿se clasifican como CEH o pertenecen a otra clase?

- La secuencia del gen que codifica la enzima CEH (37 kDa) de *A. nidulans*, ¿es la misma que la reportada para el gen de la serín proteasa (PrtA) hipotética de *A. nidulans*?

- Si se cultiva a *A. nidulans* en presencia de inductores diferentes al aceite de olivo, ¿qué clase de CEH producirá?, ¿cómo será la regulación de su producción?, ¿qué características de interés presentarán estas enzimas?

Para dar respuesta a estas interrogantes, en la presente Tesis, se planteó el cumplimiento de los siguientes objetivos:

4.- OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las actividades CEH producidas en diferentes condiciones de inducción por *Aspergillus nidulans*.

Objetivos específicos

- Analizar el efecto inductor de diferentes compuestos sobre la producción de CEH: triacilgliceróles, ácidos grasos, cutina pura y cutícula de vegetales.
- Evaluar el efecto de fuentes de carbono sobre a producción de CEH: almidón, glucosa, sacarosa y glicerol.
- Purificar e identificar las CEH producidas bajo diferentes condiciones de cultivo.
- Realizar la caracterización bioquímica de las CEH.

5.- MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismo y mantenimiento

Aspergillus nidulans PW1 (*biA1*, *argB2*, *methG1*, *veA1*) fue proporcionado por el Dr. Jesús Aguirre, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Las esporas de *A. nidulans* se cosecharon en placas con medio mínimo (Käfer, 1977). Se colectaron en solución de NaCl (0.1%) y se conservaron a 4 °C en silica gel (Kawasaki *et al.*, 1995).

5.2 Condiciones y medios de cultivo

5.2.1. Condiciones de cultivo

Los experimentos se realizaron en matraces Erlenmeyer conteniendo 50 mL de medio de cultivo estéril. El medio se inoculó con 1×10^6 esporas/mL. Los matraces se incubaron con agitación (300 rpm) a 37 °C durante 24 h.

5.2.2. Medio mínimo (MM) (Käfer, 1977).

La concentración de los componentes que se utilizaron para preparar un litro de medio mínimo fue la siguiente: NaNO₃, 6.0 g, KCl, 0.52 g, MgSO₄ · 7H₂O, 0.52 g, KH₂PO₄, 1.52 g, glucosa, 10 g, 1 mL de solución de elementos traza (H₂O, 100 mL, ZnSO₄ · 7H₂O, 2.2 g, H₃BO₃ 1.1 g, MnCl₂ · 4H₂O, 0.5 g, FeSO₄ · 7H₂O, 0.5 g, CoCl₂ · 5H₂O, 0.16 g, CuSO₄ · 5H₂O, 0.16 g, (NH₄)₆-Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 0.11 g, EDTA, 5.0 g.), metionina, 0.011 g, arginina, 16.8% (p/v), biotina

(disuelta en etanol), 0.0025% (p/v). Para la elaboración de placas se agregaron 15.0 g de agar. El pH del medio se ajustó a 6.5 con NaOH.

5.2.3. Medio para producción de CEH (CEHM)

El CEHM se preparó de manera similar al medio mínimo con las modificaciones siguientes: se agregó almidón (1.5%) como fuente de carbono en lugar de glucosa, extracto de levadura (0.5%) se usó como fuente de nitrógeno orgánica y aceite de oliva (0.5%), como inductor (Peña, 2001).

5.3. Efecto de nutrientes sobre la producción de CEH

Los medios de cultivo CEHM Y MM se emplearon como base para analizar el efecto de diferentes nutrientes e inductores sobre la producción extracelular de CEH por *A. nidulans*, las modificaciones a los medios para analizar cada caso se describen a continuación.

5.3.1 Efecto de triacilgliceroles y ácidos grasos

El aceite de oliva en el medio CEHM se sustituyó con triacilgliceroles y ácidos grasos con diferente largo de cadena (C₂-C₁₈) a una concentración final de 0.1 ó 0.5 %. El medio CEHM sin aceite de oliva se empleó como control.

5.3.2. Efecto de fuentes de carbono

En el medio CEHM, la fuente de carbono (almidón 1.5%) fue sustituida por las siguientes fuentes: glucosa, sacarosa, glicerol y almidón a concentraciones de 0.5 ó 1%. El medio CEHM sin almidón fue el control.

5.3.3. Efecto de la concentración de aceite de oliva

Se analizaron diferentes concentraciones del aceite de oliva en el medio CEHM: 0.1%, 0.5% y 1% (v/v) manteniendo sin modificaciones los demás componentes del medio.

5.3.4. Efecto de cutina, cáscara de manzana, tomate y papa

Se preparó el medio mínimo como lo describió Käfer (1977), reemplazando la fuente de carbono (glucosa 1%w/v) por cutina de manzana, cáscaras de manzana, tomate y papa a una concentración del 0.4 % p/v.

5.4. Obtención de cutina

La cutina se aisló a partir de la cáscara de manzanas Golden Delicious y se preparó de acuerdo al protocolo descrito por Walton y Kolattukudy (1972). La estructura de la cutina se confirmó por espectroscopia de infrarojo.

5.5. Determinación de actividad enzimática

5.5.1. Actividad CEH

Se determinó de acuerdo al método de Nawani *et al.*, (1998). Se emplearon 0.1 mL de enzima, 0.8 mL de amortiguador de fosfatos (pH 7.5, 0.05 M), y 0.1 mL de 0.01M laurato de *p*-nitrofenilo (*p*-NPL) en etanol. La reacción hidrolítica se realizó a 25°C por 5 minutos después de los cuales se adicionaron 0.25 mL de NaCO₃ 0.1 M. La mezcla se centrifugó y enseguida se midió la absorbancia a 420 nm. Una unidad de actividad CEH se define como la cantidad de enzima que libera 1 μ mol de *p*-nitrofenilo (*p*-NP) por minuto bajo las condiciones del ensayo. Se usó una curva de calibración de densidad óptica contra

concentración de *p*-nitrofenilo para estimar la formación del éste producto. Todos los resultados se presentaron como la media aritmética de 3 ensayos.

5.5.2. Actividad cutinasa

Reacción de hidrólisis de cutina. Se tomaron 700 μ L de la enzima diluida en buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.5, después se adicionó 5 mg de cutina previamente suspendida en 300 μ L de tolueno (100%). La reacción se incubó a 72 h a 37 °C, a 100 rpm. Un blanco sin la muestra de enzima se evaluó en las mismas condiciones.

Evaluación de la hidrólisis de cutina por cromatografía en capa fina (CCF). Los productos de la hidrólisis fueron sometidos a una cromatografía en capa fina empleando sílica 60 y un indicador fluorescente. Como disolvente de desarrollo se empleó una solución de éter dietílico, éter y ácido acético (60:40:1 v/v). Los productos fueron visualizados en una cámara de luz ultravioleta (CAMAG) para CCF a 254 nm empleando como revelador una solución de diclorofluoresceína (0.1%) en spray.

Identificación de los productos de hidrólisis. La fase orgánica se extrajo con cloroformo y se filtró empleando un embudo Büchner con membrana de nylon (Whatman[®]) de 0.45 μ m (17). El solvente fue removido por succión y las muestras fueron analizadas por espectroscopia de infrarrojo.

5.5.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida y detección de actividad “*in situ*”.

Los geles de poliacrilamida se prepararon al 12 % como se describe en Laemmli (1970). Se utilizó el equipo de electroforesis Mini Protean[®] II (Bio-

Rad). La tinción de las proteínas se realizó con plata (Silver stain kit, Fermentas) o azul de Coomassie. Los pesos moleculares de las proteínas se determinaron por comparación de su movilidad con una mezcla de proteínas con un rango de 14.4 kDa a 116 kDa (*Fermentas*).

Después de la separación electroforética de las proteínas, la actividad esterasa se determinó por zimografía. Las proteínas fueron renaturalizadas de acuerdo al siguiente procedimiento: el gel se lavó con Buffer de fosfatos (pH 7.5, 0.05 M) por 30 min con agitación constante a temperatura ambiente, después se realizó un segundo lavado en el mismo buffer conteniendo Tritón X-100 (5 %) bajo las mismas condiciones y se finalizó con la repetición del primer lavado.

Para el desarrollo de la actividad CEH, el gel se incubó por 15 min a temperatura ambiente en Buffer A (buffer de fosfatos pH 7.5, 0.05 M y acetato de α -naftilo 3 mM), enseguida se añadió el buffer B (buffer de fosfatos pH 7.5, 0.05 M y Fast Red 1 mM). La reacción se incubó hasta la detección de bandas de color rojo oscuro en el gel indicando la actividad enzimática.

5.6. Cuantificación de proteína

La concentración de proteína se determinó empleando el método de Bradford (1976). Se usó un kit comercial (Bio-Rad Protein Assay) y se siguieron las instrucciones del fabricante. La albúmina de suero bovina se empleó como proteína estándar para construir la curva patrón.

5.7. Purificación de la CEH de 29-kDa

La purificación de la enzima se realizó por medio de electroforesis preparativa usando el sistema Pre-Cell[®] (Bio Rad). Para la resolución de la proteínas se preparó un gel de acrilamida al 10% (0.1% SDS p/v). Se cargaron 2 mL (1 mg/mL de proteína) del extracto concentrado previamente tratado con buffer de carga (conteniendo SDS y β -mercaptoetanol) y calentado por 2-3 min. Se colectaron 80 fracciones secuenciales de 5 mL. Cada una de las fracciones se concentró en una celda de ultrafiltración Amicon[®] hasta un volumen de 500 μ L con una membrana de corte nominal de 10 kDa y después se analizaron por SDS-PAGE y zimografía. Las proteínas se visualizaron por tinción de Coomassie o tinción con plata (Silver stain kit, Fermentas). Las fracciones conteniendo la enzima pura fueron reunidas y concentradas de nuevo mediante ultrafiltración.

5.8. Identificación de las CEH

5.8.1 CEH inducidas por aceite de olivo

Proteína de 37 kDa

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore) mediante el dispositivo de electrotransferencia Mini Trans-Blot[®] (Bio-Rad), se siguieron las condiciones descritas en el manual del fabricante. Posteriormente, la banda de la proteína con peso molecular de 37 kDa se cortó y se envió (Proteómica, Torre de Investigación, Facultad de Medicina UNAM) para la secuenciación del amino terminal mediante el procedimiento de degradación de Edman (1950). Una

vez obtenida la secuencia N-terminal de la proteína, ésta se comparó con las secuencias reportadas en las bases de datos para su identificación.

Proteína de 29 kDa

Una vez obtenida la enzima pura, ésta se digirió enzimáticamente y la mezcla resultante fue separada y analizada mediante el sistema LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrómetros de masas capaces de producir espectros en tándem) en la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT). Después de extraer los péptidos, éstos se analizaron por espectrometría de masas (Accela High Speed liquid chromatography system, mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos, Thermo Scientific Co.). Los péptidos precursores ionizados fueron aislados y fragmentados para la realización de un segundo espectro de masas que generaron los datos necesarios para el establecimiento de la secuencia de cada péptido precursor. El análisis se realizó manualmente y, además, se emplearon el software SEQUEST (<http://fields.scripps.edu/sequest/>) y el programa Matrix science (Mascot Search Result) (<http://www.matrixscience.com>). Finalmente, las secuencias de estos péptidos se sometieron a una búsqueda y comparación por homología en las bases de datos de proteínas, lo que llevó a la identificación de la enzima.

Proteína de 24 kDa

Después de la separación electroforética e identificación de la proteína mediante zimograma, las bandas se cortaron del gel y se digirieron

enzimáticamente en péptidos pequeños. La mezcla resultante fue separada y analizada por LC-MS/MS como se describe para la proteína de 29 kDa.

5.8.2 CEH inducidas con cutina

Proteína de 22 kDa

Se cultivó al hongo por 48 h en el medio mínimo con cutina, posteriormente, el medio de cultivo se filtró a través de una gaza, el extracto crudo obtenido se concentró mediante ultrafiltración en una celda Amicon[®], empleando una membrana con un tamaño de corte nominal de 10 kDa. La mezcla de proteínas concentradas se sometieron a separación electroforética y posteriormente se identificó la enzima mediante zimograma. La banda de la proteína se cortó del gel y se digirió enzimáticamente en péptidos pequeños; la mezcla resultante fue separada y analizada por LC-MS/MS en la unidad de proteómica del IBT, UNAM.

5.9. Recursos bioinformáticos

Se emplearon diferentes recursos bioinformáticos disponibles en los siguientes sitios de internet: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.expasy.ch> y <http://www.ebi.ac.uk>. La identificación del péptido señal se realizó usando el programa "SignalP" v3 (Nielsen *et al.*, 1997). La predicción del sitio de fosforilación se hizo con el programa "NetPhos" 2 (Blom *et al.*, 1999). Las secuencias de cutinasas se obtuvieron de la base de datos "Genbank" Operado por el NCBI (Centro Nacional Estadounidense para la información sobre Biotecnología), los número de acceso son listados en la Figura 10. La similitud de las secuencias se determinó por búsqueda contra las bases de

datos usando el programa "FASTA3" (Pearson y Lipman, 1988), y el alineamiento múltiple de secuencias se obtuvo con el "CLUSTAL" W2 (Higgins y Sharp, 1988) utilizando los parámetros predeterminados. Para el análisis filogenético se utilizó el programa "MEGA" versión 4 (Tamura *et al.*, 2007), con el método "Neighbor-Joining" (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de evolución Jones-Taylor-Thornton (JTT) (1992). Se realizó una prueba "bootstrap" con 1000 réplicas para obtener un árbol filogenético consenso. Como unidad de medida de distancia evolutiva se utilizó el número de sustituciones de aminoácidos por sitio, que se calculó utilizando la matriz JTT.

5.10. Caracterización en crudo de la cutinasa ANCUT1

5.10.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad y estabilidad

Para la determinación del efecto de la temperatura sobre la actividad CEH del extracto concentrado, se tomaron alícuotas de éste y se incubaron por 5 min en regulador de fosfato de potasio (pH 7.5, 0.05 M), a diferentes temperaturas: 20, 25, 30, 40 y 50 °C. La actividad se expresó en porcentajes, considerando como 100% el valor de actividad más alto en la serie de ensayos.

El efecto de la temperatura sobre la estabilidad del extracto enzimático se determinó tras preincubar la muestra en regulador de fosfato de potasio (pH 7.5, 0.05 M) a diferentes temperaturas: 20, 30, 40 y 50 °C, durante 1 hora. En seguida se realizó la actividad CEH residual por el método espectrofotométrico empleando laurato de *p*-nitrofenilo como sustrato a 25 °C. La actividad CEH residual se expresó en porcentajes, considerando como 100% el valor de la actividad enzimática sin tratamiento térmico.

5.10.2 Efecto del pH sobre la actividad y estabilidad

El efecto del pH en la actividad CEH se analizó incubando el extracto a diferentes valores de pH, los buffers que se emplearon fueron los siguientes: fosfato de potasio (pH 6.0 y 7.0) Tris- HCl (pH8.0), CHES (pH 9.0 y 10.0), a una concentración de 0.05 M. La actividad CEH se midió con el método de Nawani descrito en la sección 5.5.1, solo variando el buffer empleado. La reacción se realizó por 5 min a 25 ° C. La actividad se expresó en porcentajes, considerando como 100% el valor más alto en la serie de ensayos.

Para determinar el efecto del pH en la estabilidad del extracto enzimático, la muestra se preincubó en buffers a diferentes pHs: fosfato de potasio (pH 6.0 y 7.0) Tris- HCl (pH 8.0), CHES (pH 9.0 y 10.0), a 4 °C durante 24 h. Enseguida, se realizaron ensayos para analizar la actividad CEH residual en cada prueba, empleando laurato de *p*-nitrofenilo como sustrato, en buffer de fosfatos, pH 7.5 a 25°C por el método espectrofotométrico. La actividad CEH residual se expresó en porcentajes, considerando como 100% el valor de la actividad enzimática del extracto sin el tratamiento de preincubación.

5.10.3 Especificidad de sustrato

La especificidad del extracto enzimático hacia diferentes ésters de *p*-nitrofenilo fue analizada por el método descrito en la sección 5.5.1. Los sustratos que se analizaron fueron: acetato de *p*-nitrofenilo (C₂), caprilato de *p*-nitrofenilo C₁₀), laurato de *p*-nitrofenilo (C₁₂), miristato de *p*-nitrofenilo (C₁₄), palmitato de *p*-nitrofenilo (C₁₆), esterato de *p*-nitrofenilo (C₁₈). Los resultados se expresaron

como porcentaje de actividad relativa, se asignó el 100% al sustrato con mayor actividad.

6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 1.

CEH PRODUCIDAS EN MEDIO CON ACEITE DE OLIVA COMO INDUCTOR (CEHM)

Efecto de triacilglicerolos y ácidos grasos en la producción de actividad de CEH

Los lípidos y algunas sustancias relacionadas con ellos, comúnmente inducen la producción de CEH. En *A. nidulans* se encontró un incremento en la producción de actividad CEH con la adición de triacilglicerolos de cadena mediana y larga comparada con la adición de triacilglicerolos de cadena corta. La máxima actividad enzimática se obtuvo con trioleína (Tabla 6). Cuando se adicionaron ácidos grasos, las producciones más altas de actividad CEH se obtuvieron con los ácidos araquídico, (C₂₀) y ácido esteárico, (C₁₈).

Para la identificación de la enzima, se analizaron los patrones de las proteínas producidas en los diferentes extractos crudos mediante SDS-PAGE y zimogramas. En el extracto del medio adicionado con triacetina se observó un mayor número de bandas de proteínas comparado con los medios restantes. En los medios con trioleína y aceite de oliva el patrón observado fue muy similar. Asimismo, se encontró que la intensidad de las bandas de proteínas con pesos moleculares de 29 y 20 kDa se incrementa de acuerdo con el largo

de cadena del ácido graso esterificado al triacilglicerol. Mediante zimograma de cada extracto crudo (sin concentrar) se observó que sólo la proteína de 29 kDa desarrolla la actividad CEH (Figura 8B) no obstante, en el extracto de CEHM concentrado 20 veces, se detectaron tres bandas con la actividad CEH (37, 29 y 22 kDa) coincidiendo con resultados previos del grupo de trabajo (Peña-Montes, et al; 2008). En el presente estudio estas proteínas son identificadas como la proteasa alcalina PrtA, una nueva cutinasa (ANCUT2) y su producto de procesamiento pos-traduccional respectivamente. Los detalles sobre estos resultados se muestran más adelante.

TABLA 6. Efecto de triacilgliceroles, ácidos grasos y aceite de oliva en la producción de actividad CEH en *Aspergillus nidulans*.

Fuente analizada		Actividad CEH (U/mL)	Proteína (µg/mL)	Actividad específica CEH (U/mg)
Ninguna	Aceite de oliva 0%	0.085±0.025	14.3±1.3	5.97±1.77
Concentración de aceite de olive	Aceite de oliva 0.1%	1.624±0.183	22.3±0.9	72.76±8.18
	Aceite de oliva ^a 0.5%	1.181±0.321	21.7±1.1	54.34±14.77
	Aceite de oliva 1%	0.709±0.066	20.6±1.0	34.45±3.19
Triacilglicerol	Triacetina 0.5%	0.042±0.001	26.3±0.6	1.58±0.09
	Tributirina 0.5%	0.019±0.004	13.1±1.2	1.47±0.27
	Tricaprina 0.5%	0.043±0.001	22.0±1.7	1.94±0.10
	Trioctanoína 0.5%	0.095±0.009	20.2±1.1	4.71±0.54
	Tricaprina 0.5%	0.111±0.002	23.4±1.1	4.71±0.13
	Tripalmitina 0.5%	0.016±0.025	21.6±1.4	7.60±1.18
	Tristearina 0.5%	0.164±0.009	21.0±1.8	11.72±0.73
	Trioleína 0.5%	0.367±0.021	19.7±1.4	18.66±1.20
Ácido graso	Mirístico 0.1%	0.176±0.025	25.5±0.7	6.50±1.02
	Palmitico 0.1%	0.242±0.023	26.1±0.6	9.27±0.91
	Esteárico 0.1%	0.476±0.009	24.4±2.4	19.53±0.47
	Araquidico 0.1%	0.320±0.037	20.2±1.7	21.86±2.89
	Oleico 0.1%	0.057±0.007	24.7±2.2	2.31±0.27

^aEl microorganismo se cultivó en CEHM. El aceite de olivo se sustituyó por el compuesto indicado a la concentración mencionada.

La actividad CEH se determinó como se describe en la sección 4.5.1. Todos los resultados se representan como la media aritmética ± DS de tres determinaciones separadas

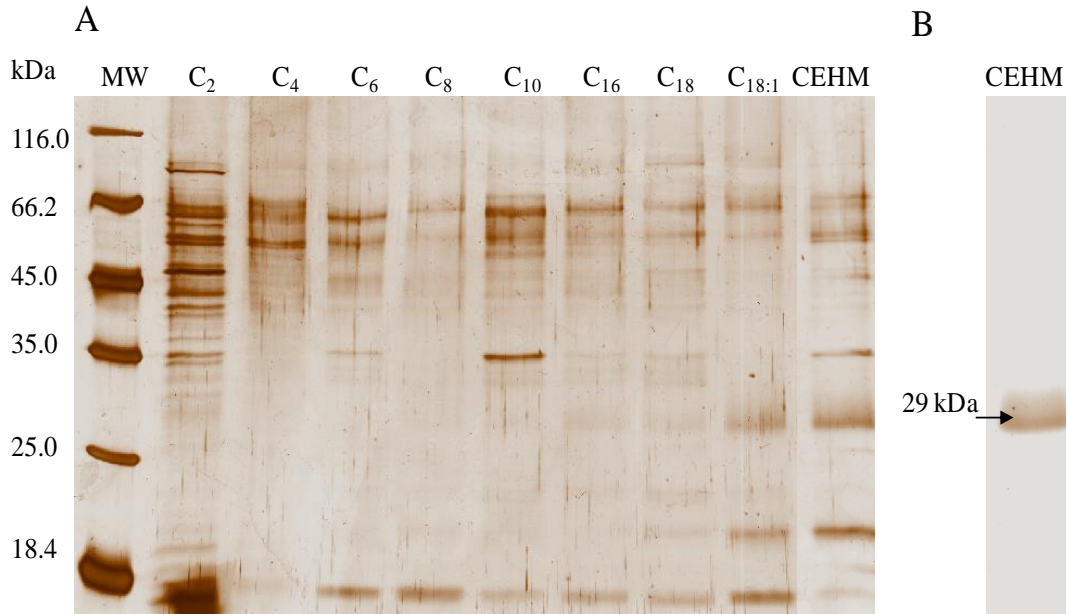


FIGURA 8. Efecto de triacilgliceroles sobre la producción de actividad CEH. A) Análisis SDS-PAGE de las proteínas en los extractos crudos. Carril 1, MP, marcador de peso molecular, carril 2-8, extractos de los medios conteniendo triacilgliceroles de diferente largo de cadena, los números arriba de cada carril representan el largo de cadena del ácido del triacilgliceroles (C₂-C₁₈), carril 9 contiene el sobrenadante del cultivo del CEHM. Las proteínas fueron visualizadas después de la tinción con plata. B) Zimograma revelando la actividad CEH en el sobrenadante del cultivo de CEHM. Se empleó como sustrato acetato de α -naftilo.

El efecto inductor de ciertos aceites sobre la producción de CEH del tipo lipasas y carboxilesterasas verdaderas ha sido ampliamente reportado, no así en la obtención de cutinasas. Comúnmente, se suele utilizar la cutina o sus hidrolizados como inductores principales de estas enzimas. Los resultados presentados aquí muestran que el aceite de oliva al igual que algunos triacilgliceroles y ácidos grasos inducen la producción de la CEH de 29 kDa en *A. nidulans*. Pio y Macedo (2007) reportaron la producción de una cutinasa en *Fusarium oxysporum* empleando diversos aceite entre ellos, aceite de linaza y aceite de oliva además de ácidos grasos como el palmítico, oleico y esteárico.

En contraste, la adición de aceite de olivo en el medio de cultivo de *Thermomonospora fusca* y *Thermoactinomyces vulgaris* inhibe por completo el crecimiento y la producción de cutinasas en estos microorganismos (Fett *et al.*, 1999, Fett *et al.*, 2000).

Efecto de la concentración de aceite de oliva

La concentración del inductor es un factor importante a considerar cuando se estudia la regulación de la producción de enzimas. En *A. nidulans*, el aceite de oliva a una concentración de 0.1% resultó el mejor inductor de CEH, mientras que concentraciones mayores al 1% inhibieron la producción de la actividad enzimática (Tabla 6).

En el caso de la cutinasa de *F. oxysporum* se observaron resultados similares, se obtuvo una mayor producción de la actividad enzimática cuando se empleó aceite de oliva a una baja concentración (0.5%) y un efecto negativo por la adición de aceite al 1% (Pio y Macedo, 2007). Algunos autores han atribuido este efecto inhibitorio a la presencia de productos de hidrólisis generados durante el cultivo (Sharkar *et al.*, 1998), a la retroinhibición (Henriette *et al.*, 1993) y a la interferencia en la transferencia de oxígeno (Martinez *et al.*, 1993).

Efecto de fuentes de carbono

Con la finalidad de mejorar el medio de cultivo para la producción CEH (CEHM), se buscó sustituir o disminuir la concentración de la fuente de carbono (almidón 1.5%) debido a que causa gelatinización, provocando problemas en el manejo del medio de cultivo. La actividad CEH se disminuyó

en el CEHM sin almidón, empleando aceite de oliva como única fuente de carbono (Tabla 7). Al eliminar el almidón y emplear el aceite de oliva como única fuente de carbono en CEHM, se disminuye la producción de la actividad CEH. Diferentes fuentes de carbono se adicionaron al 0.5%, y se encontró que cuando glucosa, sacarosa y almidón fueron empleadas, la actividad y el patrón de proteínas producidas por el hongo fueron conservadas, mientras que la producción de la enzima disminuyó cuando glicerol (0.5%) o glucosa (1%) fueron usadas como fuentes de carbono (Tabla 7).

TABLA 7. Efecto de fuentes de carbono sobre la producción extracelular de actividad CEH en *A. nidulans*.

Fuente de carbon	Actividad CEH (U/mL)	Proteína (µg/mL)	Actividad específica CEH (U/mg)
Almidón 0%	0.105±0.011	18.79±1.2	5.59±0.5
Almidón 0.5%	1.444±0.075	24.4±0.4	59.22±3.0
Glucosa 0.5%	1.376±0.110	16.2±0.8	84.95±6.7
Glucosa 1%	0.181±0.032	22.1±1.5	8.19±1.4
Sacarosa 0.5%	1.353±0.046	17.5±0.4	77.43±2.6
Glicerol 0.5%	0.874±0.067	18.3±0.9	47.83±3.6

Aspergillus nidulans se cultivó en CEHM (almidón 1.5%, extracto de levadura 0.5%, aceite de levadura 0.5%), el almidón se sustituyó por el compuesto indicado a la concentración indicada. La actividad CEH se determinó como se describe en sección 4.5.1. Todos los resultados representan la media aritmética ± SD de tres determinaciones separadas.

Este efecto de represión por fuentes fácilmente asimilables como la glucosa se ha reportado en otras cutinasas y lipasas (Lin y Kolattukudy, 1978, Henriette *et al.*, 1993). En *A. nidulans*, la actividad CEH en medio mínimo es reprimida por glucosa a través de un mecanismo independiente de creA (Kawasaki *et al.*, 1995).

Purificación de la CEH de 29 kDa y su identificación por análisis de la secuencia interna de aminoácidos.

Después de la separación de proteínas por electroforesis preparativa en el sistema Prep-Cell® se colectaron en total 80 fracciones. El análisis SDS-PAGE y la zimografía revelaron que 15 fracciones (numeradas del 27-42) contenían la proteína de 29 kDa (Figura 9). La proteína pura se encontró en las fracciones 30-40. El procedimiento de purificación de esta proteína se realizó 5 veces sin variaciones significativas, demostrando la reproducibilidad del método.

La banda conteniendo la enzima pura se cortó y se sometió a LC-MS/MS para su identificación. En la Figura 10 se muestran las secuencia (en color azul) de los tres péptidos obtenidos y su ubicación en la proteína. Todos los péptidos coincidieron con la secuencia de la proteína ABF50887.1 (código de acceso del GenBank), que codifica para una cutinasa de *A. nidulans* FGSC A4 (Bauer *et al.*, 2006) con código de acceso AN7541.2 en la base del genoma de *Aspergillus* y que en este estudio se designó como ANCUT2.

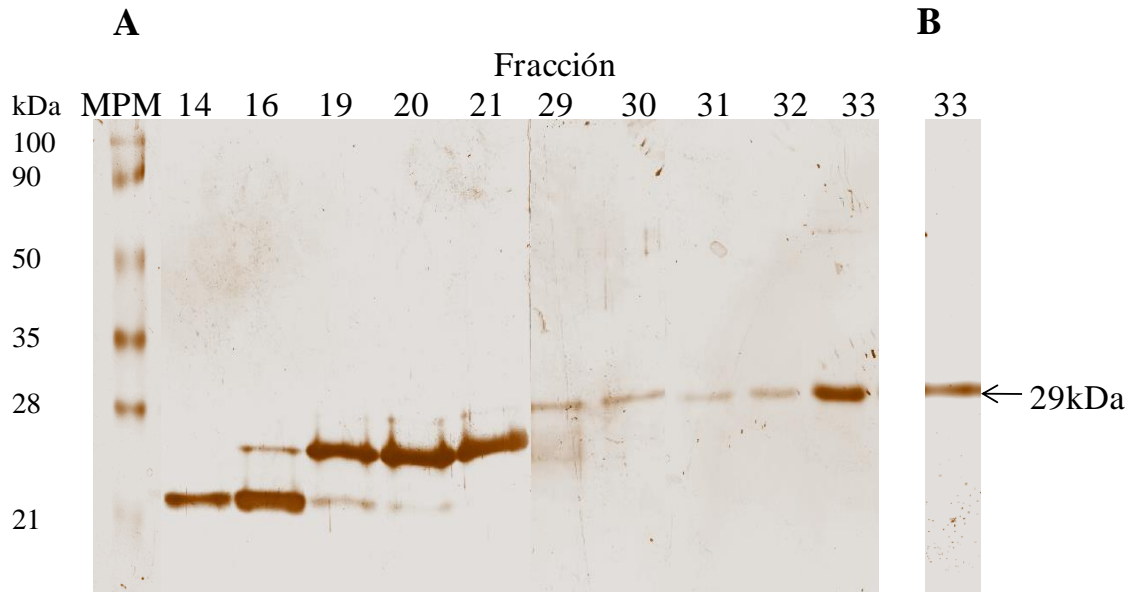


FIGURA 9. Purificación de cutinasa ANCUT2. A) Análisis SDS-PAGE en fracciones colectadas numeradas (carriles 2-11) y marcadores de peso molecular MPM (carril 1). B) Identificación de actividad CEH en la fracción pura 33, usando zimografía con acetato de α -naftilo como sustrato realizada en gel SDS-PAGE.

Análisis de la secuencia de aminoácidos de ANCUT2

La secuencia de la proteína consta de 255 residuos de aminoácidos (Figura 10) con un peso molecular teórico de 26.07 kDa y el punto isoeléctrico (pI) de 5.19. La secuencia de un posible péptido señal también fue identificada, la máxima probabilidad del corte se localizó entre las posiciones 17 y 18 de la secuencia de la proteína. El peso molecular experimental de ANCUT2 (29 kDa) difiere levemente del peso teórico, lo que puede ser debido a modificaciones postraduccionales. No se encontraron sitios potenciales de glicosilación en la secuencia de la proteína con el programa de predicción NetNGlyc 1.

A. nid	---MHFKLLSLAALAGLSVASP-LNLDER QLGSSSGN DLRDG--- DKPVTFFIFARASTE 53
A. nig	---MKLPYFLLG-LAGLAAASP-MGLAERQL--SDGNELRDG--- SKPIIFIFARASTE 50
A. ory	---MHLRNIVIA-LAATAVASP-VDLQDRQL--TGGDELRDG--- PKPITFFIFARASTE 50
F. sol	MKFFALTTLAATASALPTS ^Q NP ^A Q ^E LEAR ^Q LGR ^T TR ^{DD} LINGNSASCRD ^V IF ^I YARGSTE 60
C. sp.	---MLVSALALAVLSAASLGRAAPT ^P ESAE ^A HE ^E LEARATSS--- ACPQYVLINTRGTGE 53
S. sca	---MRIRLYLAA---IPLVGG-AGLAAVATPTATAA----- ACTDIDVVSARGTFE 44
	: * . . : : * : *
A. nid	PGLLGMSTGPAVCNDL KADASLGVA CQ VGPKY YTAGLAENALPQGTSSAAINEAKELFE 113
A. nig	PGLLGI STGPAVCNDL KMAKA-GQVLC Q GVGPAYTADLMSNALPDNTSPAAISESESLFK 109
A. ory	PGLLGI STGPAVCNRL KLARS-GDVA CQ GVGPRYTADLPSNALPEGTSQAAIAEAQGLFE 109
F. sol	TGNLG-TLGPSIASNLES ^A FGKDG ^V W ^I Q ^V GGAYRATLGDNALPRG ^T SSAAIREMLGLFQ 119
C. sp.	P-- Q QSAGFR ^T MNSQ ^I TAALS ^G GT ^I Y---NTVYTADFSQNSAAG-----TADIIRRIN 102
S. sca	P G T L G F I V G D P V Y A A L Q K V A G K S L S S Y K V N --Y P A D L S P T S A A Q G N -----ADLVNHVR 97
	. * * . . . * * : : . : . .
A. nid	LAASKC PDTRIVAGGY SQ GF AVM HGAI-----PDL S DEIKDK IAGV VLF GD 159
A. nig	LAASKC PNSQILAGGY SQ GF AVM DDSI-----K Q L P DD V KDK IKG VVLF GY 155
A. ory	Q AVSK C PDTQIVAGGY SQ GF AVM NGAI-----K R L S AD V QDK IKG VVLF GY 155
F. sol	Q ANT K C P DATLIAGGY SQ GA ALAA ASI-----E D L S A I RDK IAG TVLF GY 165
C. sp.	S GLAANPNV C YI LQ GY SQ GA AA T V VAL Q -----Q L G T S G A A F N AV K G V FL IGN 150
S. sca	S QAAS C PNQRFVLV GY SQ GAN V VDNSIGISSAGAVVGSPIVATLPAALEPRVSAVLLFGN 157
	: * : : ***** : : : . . . * *
A. nid	TRNKQ -----DGGQIKNF PKDKIKIYCATG DLV CD GTL-- VV 194
A. nig	TRNAQ -----EGGQIGN FPKDKVKIYCAMG DLV CD GTL-- IV 190
A. ory	TRNAQ -----ERGQIAN FPKDKVKVYCAVG DLV CL GTL-- IV 190
F. sol	TKNLQ -----NRGRI PNYPADRTKVFCNTG DLV CT GSL-- IV 200
C. sp.	PDHKSGLTCNVDSNGGTTTRNVNGLSVAYQGSVPSGWVSKTLDVCAYGDGVCDTAHGFGI 210
S. sca	PIRAI -----GKSV T G T Y Q S-RTID FCAAGD P V CE NGG -- GD 191
 : * * * *
A. nid	TAAHFTYVANT -GEASKWLE Q QLASMPASTSTSSSSSSSSSAP-----AS Q TS Q SS G LS- 247
A. nig	TAAHFTYVMNT -GEAS Q WLES K LSDTTSSLTGSSSDTSSSTSTGDSSSESSAAG L GG 249
A. ory	APP H F S Y LS D T-GDAS D FL S Q L G----- 213
F. sol	AAP H L AY G PDARG P A E FL I E K VRA V R G SA----- 230
C. sp.	NAQ H L S Y PS D Q-GV Q TM G Y K FA V N K LG G SA----- 239
S. sca	VGA H L GYRANA-DAAAFA A TK I ----- 213
	* : * : . . . :
A. nid	- SW F S GL G N----- 255
A. nig	L S G L T G L G S S T S G G F P S L A S L F 271
A. ory	-----
F. sol	-----
C. sp.	-----
S. sca	-----

FIGURA 10. Comparación de la secuencia de cutinasa ANCUT2 de *Aspergillus nidulans* con cutinasas de diferentes microorganismos (A.nid-cutinasa de *A. nidulans*, A. nig-cutinasa putativa de *A. niger*, A ory-cutinasa putativa de *A. oryzae*; F. sol-cutinasa de *Fusarium solani*; C.cp-cutinasa de *Cryptococcus sp*; S. sca-cutinasa de *Streptomyces scabiei*). Los aminoácidos de la triada catalítica putativa se muestran en rojo (Ser- 130, Asp- 185, e His- 198). Las secuencias de aminoácidos de los péptidos deducidas por LC-MS/MS se muestran en rosa, azul y verde. La secuencia pentapéptido consenso en el recuadro. Las seis cisteínas conservadas que pueden formar enlaces disulfuro se muestran en amarillo.

Es altamente probable que otras modificaciones estén involucradas; el N-terminal de la enzima podría estar bloqueado por glucuronidación como ha sido reportado en la cutinasa de *Fusarium solani* (Lin y Kolattukudy 1980). La fosforilación de la proteína es otra posible razón para la diferencia en el peso molecular debido que todas las cutinasas fungales conocidas tienen al menos un sitio de fosforilación (Wang *et al.*, 2002). La secuencia de la cutinasa ANCUT2 contiene 23 sitios potenciales de fosforilación en los residuos de serina, treonina, y tirosina como predijo el servidor del programa NetPhos 2. ANCUT2 contiene una región rica en serina localizada entre los aminoácidos 218-251 (Figura 10), una característica que ha sido ligada a fosforilación en otras proteínas (Kanazawa *et al.*, 1994). Esta región rica en serina ha sido localizada solamente en la secuencia de aminoácidos de dos cutinasas putativas de *A. niger* (GenBank accession no. CAK41954.1) y en una cutinasa de *A. flavus* (GenBank accesión no. EED52785.1).

El análisis comparativo de la secuencia usando el programa FASTA reveló que los residuos de aminoácidos de ANCUT2 tiene un alto grado de identidad y similitud (>60%) con las secuencias de otras cutinasas fungales, particularmente con las del género *Aspergillus*. Los valores de similitud más elevados se obtuvieron con las secuencias de las cutinasas de *A. oryzae* (88.7%), *A. fumigatus* (88.1%), *A. flavus* (86.8%), y *A. niger* (85.5%) (GenBank números de acceso: BAA07428.1, EDP50786.1, EED5278.1, y CAK48244.1, respectivamente).

El alineamiento múltiple de ANCUT2 construido con cutinasas de origen fungal y bacteriano reveló residuos conservados en las secuencias de aminoácidos (Figura 10). Los residuos de serina, ácido aspártico e histidina

que conforman la triada catalítica característica de la familia de serin proteasas y CEH están completamente conservados en estas cutinasas. Los aminoácidos: Ser 130, Asp 185 e His 198 fueron identificados como los posibles residuos del sitio catalítico. El residuo de la serina catalítica se encontró en la secuencia consenso del pentapéptido GTSQG que corresponde a los residuos localizados en las posiciones 128-132.

La mayoría de las secuencias de cutinasas suelen presentar 4 residuos de cisteína, los cuales forman dos puentes disulfuro que le brindan estabilidad a la estructura de la proteína. En la secuencia de ANCUT2 se encontraron seis residuos de cisteínas, que se conservan solo en otras cutinasas de género *Aspergillus* (Figura 10). Liu y colaboradores (2009) reportaron por primera vez la presencia de estas dos cisteínas adicionales en la secuencia de la cutinasa de *Aspergillus oryzae*. Las cisteínas forman un puente disulfuro adicional que le proporciona una mayor estabilidad térmica a esta proteína comparada con la cutinasa de *F. solani* que sólo presenta 2 puentes disulfuro.

Una búsqueda en la base de datos de la secuencia genómica de *A. nidulans* mostró que además del gen AN7145.2 que codifica a la cutinasa ANCUT2, existen otros tres genes que codifican para supuestas cutinasas, estos son: AN5309.2, AN7180.2 y AN10346.4 (Galagan *et al.*, 2005). Las secuencias de las cutinasas AN5309.2, AN7180.2 presentan también los 6 residuos de cisteína, mientras que la cutinasa AN10346.4 sólo tiene 4.

Identificación de CEH 22 kDa por secuenciación de aminoácidos internos

La banda de 22 kDa que también presentaba actividad de CEH e identificada en los geles SDS-PAGE, de extractos crudos del medio CEHM concentrado, fue cortada del gel e identificada mediante LC-MS/MS. El análisis mostró como resultado la secuencia de tres péptidos: ASTEPGLLGMSTGPAVCNDLK, YTAGLAENALPQGTSSAAINEAKELFELAASK, y IAGVVLFGDTR, los cuales coincidieron nuevamente con partes de la secuencia de aminoácidos de la cutinasa ABF50887.1 de *Aspergillus nidulans* FGSC A4 (ANCUT 2).

La secuencia del primer péptido que se muestra en color verde fue identificada por análisis LC-MS/MS solamente en la proteína de 22 kDa, pero no en la de 29 kDa, los otros dos péptidos, que se muestran en azul. se identificaron en ambas proteínas (Figura 10) y el péptido en color rosa que se encuentra antes del marcado en color en verde, únicamente se encontró en la proteína de 29 kDa. Estos resultados indican que la proteína de 22 kDa probablemente sea un producto de procesamiento post-traducciona l de la cutinasa de 29 kDa ANCUT2. Considerando que el peso molecular (estimado experimentalmente) de ésta proteína es menor se sugiere, que pudiera ser un producto de degradación proteolítica de la cutinasa de 29 kDa ANCUT2. Más aún, si se estima el peso molecular teórico de la proteína considerando la secuencia del péptido ASTEPGLLGMS... como la región N-terminal de la proteína, el peso correspondería a 20.81 kDa que concuerda con el estimado experimentalmente de 22 kDa. La presencia de isoenzimas es común en hongos patógenos de plantas como el *Molinia fructicola* (Wang *et al.*, 2000).

Análisis del árbol filogenético de las cutinasas de *A. nidulans*

Usando las secuencias de cutinasas obtenidas del GenBank, se construyó un árbol filogenético para investigar las relaciones evolutivas entre las cutinasas de *A. nidulans* y las de otros microorganismos. El resultado reveló que las cutinasas se agruparon en dos ramas principales: en una de ellas, las cutinasas de mohos y en la otra las de bacterias y levaduras (Figura 11).

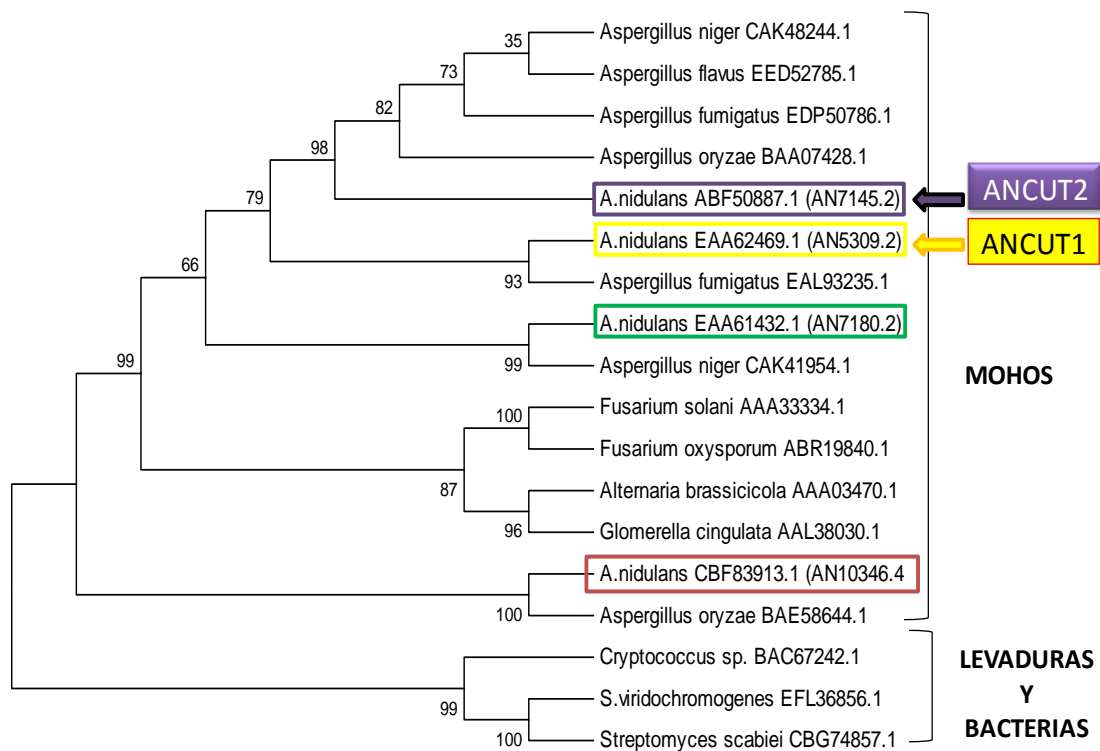


FIGURA 11. Análisis filogenético de las cutinasas de *Aspergillus nidulans*. ABF50887.1 (ANCUT2) en gris claro y EAA62469.1 (ANCUT1) en recuadro. La relación evolutiva fue inferida mediante el método neighbor-joining. El porcentaje de réplicas de los árboles en los que los taxa asociados fueron agrupados (Bootstrap 1, 000 repeticiones) se muestran al lado izquierdo de las ramas. Las distancias evolutivas fueron calculadas utilizando el método Jones-Taylor-Thornton, tomando como medida el número de sustituciones de aminoácidos por sitio. La construcción del árbol se realizó en el programa MEGA 4.0.

Las cutinasas de *Aspergillus* forman dos subgrupos separados: un subgrupo lo conforman las que poseen seis residuos del aminoácido cisteína y el segundo las que solo poseen cuatro residuos de cisteína. Las cutinasas de *Fusarium*, *Glomerella* y *Alternaria* se conocen por poseer también 4 residuos de cisteína sin embargo, estas constituyen un subgrupo diferente (Figura 11).

El análisis mostró que tres de las cuatro secuencias de las cutinasas de *Aspergillus nidulans* guardan una relación filogenética más estrecha, AN7145.2 (ANCUT2), AN5309.2 y AN7180.2, mientras que la AN10346.4 está más alejada.

Determinación de actividad cutinasa de ANCUT2

Obtención de cutina

El método desarrollado para la obtención de cutina a partir de muestras de cáscara de frutos de manzana Golden Delicious comprende varios pasos propuestos por Walton y Kolattukudy (1972). Se partieron de 12 Kg de manzana para obtener 38 g cutícula y solo 15 g de cutina pura después del protocolo descrito.

Al ser la cutina un polímero amorfo e insoluble, solamente un limitado número de métodos pueden emplearse para investigar la estructura de este polímero. El grado de pureza de la extracción realizada en este trabajo se comprobó mediante espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). En trabajos previos, se ha reportado que las bandas de absorción características de la estructura de la cutina (obtenida de diversos frutos) ocurren a 3300 cm^{-1} (grupos hidroxilo), 2924 cm^{-1} y 2852 cm^{-1} (estiramientos alifáticos C-H), 1731

cm^{-1} (grupo carbonilo del enlace), 3300 y 1640 cm^{-1} (agua) y 1167 cm^{-1} (éster C-O); (Pacciano *et al.*, 1993). En la Figura 12 se presenta el espectro ATR-FIRT (Espectrometría infrarroja por transformada de Fourier mediante reflectancia total atenuada) obtenido para la cutina aislada en este trabajo, que concuerda con el patrón de bandas esperado.

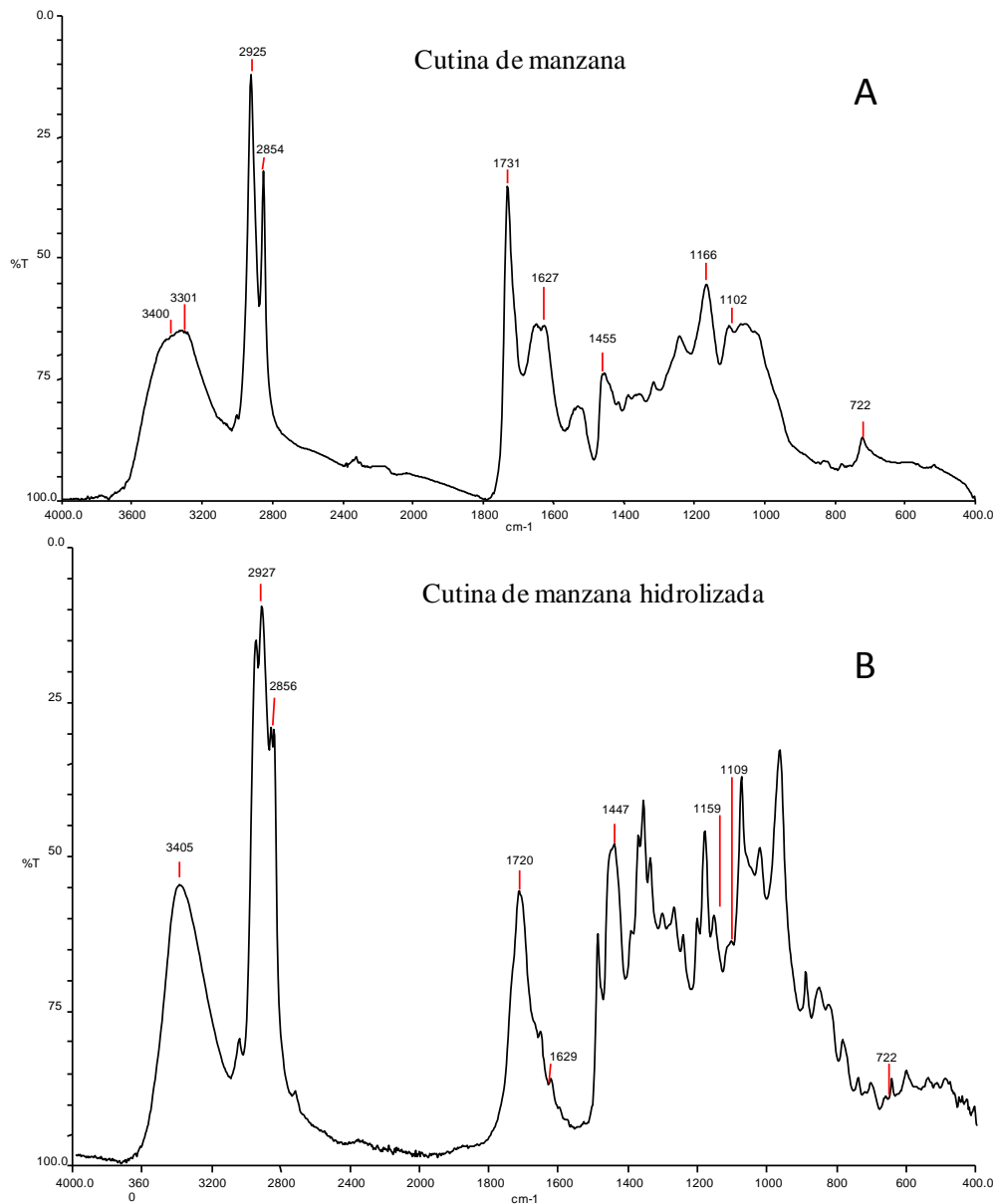


FIGURA 12. Espectro ATR-FTIR de cutina natural aislada de manzana (A) y cutina hidrolizada por cutinasa (B). Las bandas principales son señaladas. Los valores obtenidos fueron observados en dos experimentos separados.

La cutina es un polímero complejo con baja solubilidad en agua. Para facilitar las reacciones de hidrólisis y mejorar la disponibilidad del sustrato, se evaluaron diferentes solventes. Los mejores resultaron tolueno, DMSO y mezclas 1:1 de etanol-glicerol y terbutanol-agua. La cutina no fue totalmente solubilizada, pero se mantuvo en suspensión. El efecto de estos solventes sobre la cutinasa (extracto concentrado) fue analizado. La enzima tolera solventes polares miscibles en agua con bajo log P (1.37) como el DMSO así como también solventes moderadamente hidrofóbicos (no polares) con elevados valores de log P (2.5) como el tolueno (Figura 13) . El tolueno permitió la estabilidad de la enzima y la suspensión de la cutina, por lo que se eligió este solvente para la reacción de hidrólisis de cutina.

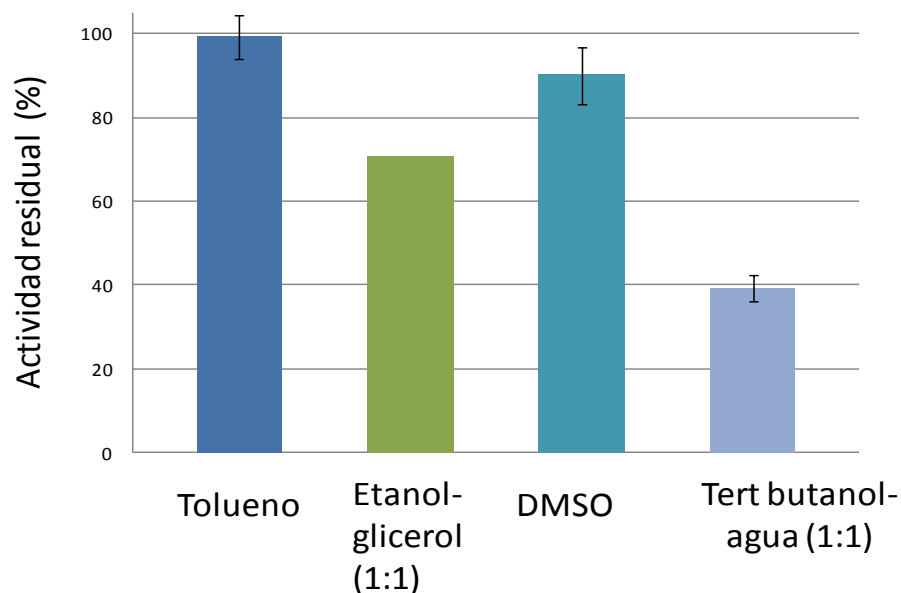


Figura 13. Efecto de diferentes solventes orgánico (30% v/v) sobre la estabilidad enzimática. Los valores obtenidos son el promedio de tres mediciones.

Una vez finalizada la reacción de hidrólisis, se llevó a cabo el análisis de los productos de reacción. Nuevamente mediante ATR-FIRT se obtuvo el patrón de bandas de la muestra de cutina después de la hidrólisis.

El resultado se muestra en la Figura 12. Se observa la aparición de las bandas de absorción del ácido carboxílico ($1,720\text{ cm}^{-1}$) y la ausencia de la banda a $1,731\text{ cm}^{-1}$, asignada a la vibración C=O del grupo carbonilo del enlace éster que une los hidroxiácidos grasos que forman el entramado de cutina. Además, la banda típica de grupo hidroxilo (3000-3700) fue mayor en el hidrolizado de cutina, debido a que estos grupos son generados después de la hidrólisis éster en cutina. Los principales picos del ATR-FTIR son compilados en la Tabla 8 para ambas sustancias cutina pura y cutina después de la hidrólisis.

TABLA 8. Comparación de las bandas de absorción observadas mediante ATR-FTIR, para la cutina de manzana pura y los polímeros obtenidos después de su hidrólisis.

Asignación ^a	Frecuencia (cm^{-1})		(Intensidad ^b)
	Cutina		Cutina hidrolizada
H ₂ O	3400(m)	-	
V(O-H...O)	3301(m, br)		3405 (s)
V _a (CH ₂)	2925(s)		2927(s)
V _s (CH ₂)	2854(s)		2856 (s)
V(C=O)	1731(s) éster	1720 (m) ácido carboxílico	
H ₂ O	1627(m)		1629 (v, w)
δ(CH ₂) tijera	1455(w)		1447 (m)
V _a (C-O-C)	1166(m)		1159 (w)
V _s (C-O-C)	1102(w)		1109 (v, w)
δ(CH ₂) balanceo	722(w)		-

a V: estiramiento, δ: deformación, a: asimétrica, s: simétrica. b s: fuerte, m: media, w: débil, v: muy, br: amplio.

Del Rio y Hatcher (1998) detectaron los ácidos 8,16-,9,16-, 10 y 16-dimetoxi-hexadecanoico e hidroxi-metoxi hexadecanoico como los productos principales de hidrólisis de cutina de tomate. En este trabajo se observó la existencia de ácidos grasos libres por TLC solamente en la presencia de AN CUT2, lo que confirma la degradación de la cutina por esta enzima (Figura 14).

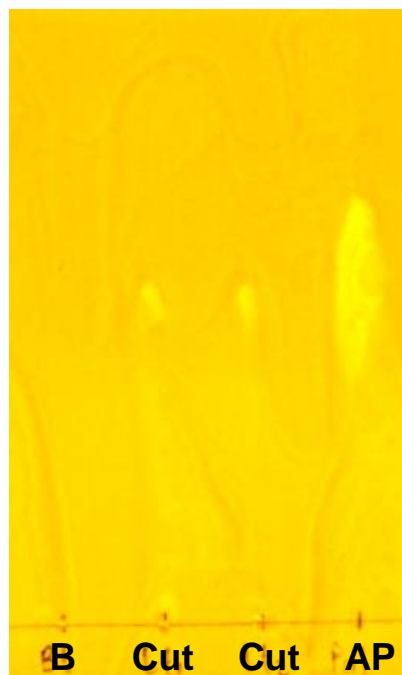


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los productos de hidrólisis de cutina. B, blanco (sin cutinasa); Cut (productos de la cutina hidrolizada); AP (estándar de ácido palmítico).

Identificación de la CEH de 37 kDa

La banda restante de 37 kDa con actividad de CEH también fue identificada. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF. La banda de 37 kDa se cortó y se sometió al procedimiento de Degradación de Edman para determinar los aminoácidos que conforman el N-

terminal de la proteína. Se obtuvo una secuencia N-terminal de 10 aminoácidos: ALTSQSGAPW, la cual se comparó con las secuencias en las bases de datos del "Aspergillus genome database". Esta secuencia coincidió 100% con una región de la proteína hipotética AN5558.1 de *A. nidulans*, que corresponde a la proteasa alcalina codificada por el gen *prtA*. Estos resultados concuerdan con los del grupo de trabajo, en los que se reporta la purificación y caracterización de dicha proteína (Peña-Montes, *et al*; 2008).

La secuencia nucleotídica (Figura 15) del gene que codifica para esta proteína fue reportada inicialmente por Katz *et al.* (1994), quienes aislaron y caracterizaron el gen *prtA* a partir de una librería de ADNc de *A. nidulans*. La secuencia de aminoácidos deducida del producto del gen *prtA* presenta homología con las proteasas de *A. oryzae*, *A. fumigatus* y *A. flavus*. Al realizar un análisis detallado de comparación de las secuencias, se encontró que las proteínas (incluida la PrtA) presentan un dominio similar al de las subtilisinas, la familia de serin proteasas tipo subtilisina. (Siezen y Leunissen, 1997). En muchos hongos saprófitos, las subtilasas son las principales proteasas de amplio-espectro ya que muestran actividad sobre diversos sustratos (Hu y Leger, 2004). Aun cuando el sustrato clásico de las subtilasas son los péptidos, es ampliamente reconocida su capacidad para hidrolizar una variedad de enlaces éster (Liu y Tamp, 2001; Murayama *et al.*, 2002; Sroga y Dordick, 2001; Klibanov, 2001).

```

MHSFKRSLLLLGALLPAVFGAPVEPRRAAEKVPKGYIVTFKSGLNVDQIDAHTSWASNVH 60
-----
Péptido señal          Propéptido

KRNLERRGLAERDQYSGIEKKNYKINKFAAYS GSFDDATIEEIRNSADVAHVEEDQIWIYID 120
-----

ALTSQSGAPWGLGAI SHKGEASTTYVYDTSAGEGTYAYVVD TGINADHEEFGGRASLAYN 180
ALTSQSGAPW----- 10
*****
N-terminal          Proteína madura

AVGGQHVD SVGHGTHVAGTIGGETYGVSKKANLLSVKVFQGESSTSIILDGFNWAANDI 240
-----

VSKGRIGKSAINMSLGGGYSYAFNQAVEDAYDEGVLSVVAAGNDNIDASDSSPASAPNAL 300
-----

TVAASTKSNTRASF SNYGSVVDIFAPGQDILSAWIGSTTATNTISGTSMATPHVVGLSLY 360
-----

LIALEGLSSASAVVSR IKELATQGVLSNVQSPNLLAYNGADE 403
-----

```

FIGURA 15. Comparación de la secuencia completa de la proteasa alcalina PrtA y la secuencia N-terminal identificada. La secuencia N-terminal se indica con estrellas, el péptido señal probable se muestra subrayado y la región propéptido de la proteína se presenta sombreada. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa “Clustal” W.

La mayoría de las subtilasas son sintetizadas como pre-pro-enzimas, subsecuentemente translocadas a través de la membrana celular vía el propéptido (o péptido señal) y, finalmente, activadas por eliminación del propéptido (Siezen y Leunissen, 1997). La secuencia completa de la proteasa PrtA consta de 403 aminoácidos sin embargo, la secuencia N-terminal (ALTSQSGAPW) coincide con los aminoácidos 121-130, por lo que, la proteína madura sólo posee 283 aa (de Ala-121 a E-403) con un correspondiente peso molecular de 28.6 kDa. Basados en la predicción del sitio de ruptura del péptido señal en la secuencia de la proteasa PrtA, la

localización más probable se da entre los aminoácidos Gly-20 y Ala-21, por lo que la región pro-peptido de esta proteína parece ser de 100 aminoácidos (aminoácido 21 al 120).

Aunque el peso molecular teórico de la proteasa PrtA difiere del estimado experimentalmente que es de 37 kDa, resultados similares se han reportado para otras proteasas fungales. La proteasa elastinolítica de *A. flavus* migra a 36 kDa en SDS-PAGE, sin embargo, su peso molecular teórico es de 29.1 kDa. Esta diferencia también ha sido observado para las proteasas de *A. oryzae* y *A. fumigatus* y parece ser una característica común de serin proteasas de especies de *Aspergillus*, aunque la razón de esta diferencia no ha sido aclarada (Ramesh, *et al.*, 1994; Frosco, *et al.*, 1992).

Algunos autores han reportado un incremento en la producción de proteasas cuando se añade aceites o ciertos ácidos grasos en el medio de cultivo (Yang y Lin, 1998, Fukushima *et al.*, 1991) sin embargo, en estudios realizados dentro del grupo de trabajo no se encontró relación entre la adición del aceite o ácidos grasos al medio de cultivo y la presencia de la proteasa PrtA (Alva-Gasca, Tesis en escritura). Es muy probable que la presencia de la enzima se deba a la inducción por agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo.

CAPÍTULO 2. CEH INDUCIDAS POR CUTINA.

La cutina es un polímero de ácidos grasos de diferente longitud de cadena que es hidrolizado por cutinasas. De acuerdo a los resultados mostrados en el capítulo anterior, cuando *A. nidulans* es cultivado bajo ciertas condiciones empleando aceite de oliva como inductor, es capaz de producir esta clase de enzimas.

Debido que el método de obtención de la cutina es muy laborioso y de bajo rendimiento, se decidió analizar la inducción de cutinasas empleando como fuentes de carbono, residuos agroindustriales de fácil obtención y bajo costo para la fermentación como son: la cutícula de manzana, tomate y papa, ricos en los polímeros cutina y suberina

En este capítulo se exponen los resultados obtenidos al analizar el efecto de diferentes fuente de cutina sobre la producción de cutinasas en *A. nidulans*.

Producción de cutinasas

El hongo se cultivó en medio mínimo conteniendo cutina de manzana pura (0.4%) como única fuente de carbono. Después de 24 horas de fermentación la actividad CEH producida fue muy baja (Figura 16) no obstante, durante el transcurso de la fermentación la actividad fue incrementando, obteniéndose la mayor producción (1.3 U/mL) a las 72 h. La actividad producida empleando cutina fue muy aproximada a la obtenida con aceite de oliva (1.6 U/mL).

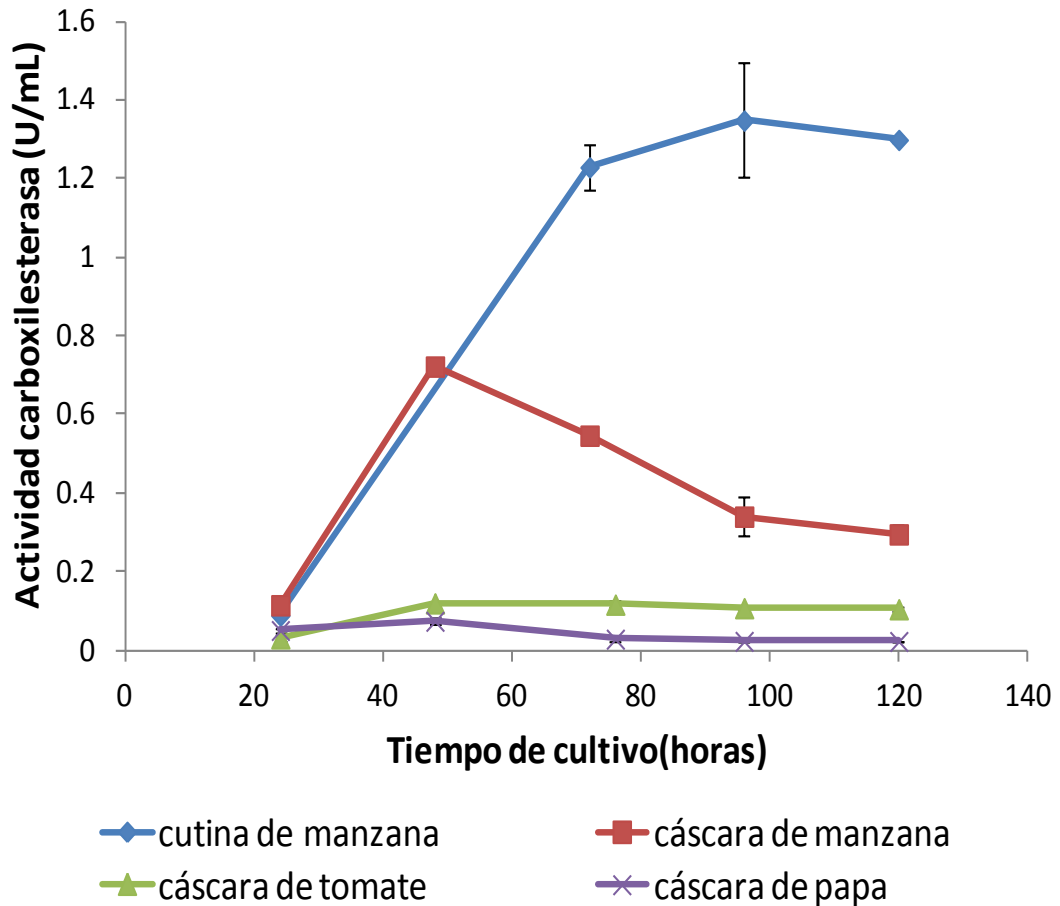


FIGURA 16. Cinética de producción de actividad CEH por *Aspergillus nidulans*, empleando diferentes fuentes de cutina y suberina.

La adición de cáscara de manzana, tomate ó papa al medio de cultivo también indujo la producción de actividad CEH sin embargo, la producción fue menor que la obtenida con la cutina pura (Figura 16). La cáscara de manzana fue la mejor fuente alterna para la producción de cutinasa (0.722 U/mL), seguida de la de tomate (0.119 U/mL). La menor producción se obtuvo con la cáscara de papa (0.074 U/mL). La preferencia sobre la fuente de cutina para la inducción de cutinasas varía en cada microorganismo. Hawthorne y colaboradores

(2001) evaluaron 3 tipos de cutina (cutina de *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* y manzana “Grannysmith”), para la producción de cutinasas en dos cepas de *Fusarium solani* f. sp. Una de las cepas (SAM410) produjo mayor actividad cutinasa con la cutina obtenida a partir de *C. moschata*, mientras que la otra cepa (PGB153) alcanzó una mayor producción de actividad con cutina de *C. maxima*.

Análisis por SDS-PAGE y zimogramas de las proteínas en los extractos crudos obtenidos en medios con: cutina, cáscara de manzana, tomate y papa

El patrón de proteínas secretadas por *Aspergillus nidulans* cuando se cultivó empleando cutina de manzana, cáscara de manzana y papa, como única fuente de carbono fue muy similar (Figura 17). Con la cáscara de tomate, se produjo un patrón un poco diferente (más proteínas secretadas). En los cuatro casos analizados se encontró una banda mayoritaria con un peso molecular aproximado de 21 kDa. El zimograma por su parte reveló que ésta misma proteína era la única que mostraba actividad de CEH (Figura 17). La comparación de estos resultados con los obtenidos previamente con el medio de cultivo CEHM, indicaron que probablemente la proteína de 21 kDa inducida con cutina, sería una enzima diferente a la CEH inducida por aceite de oliva.

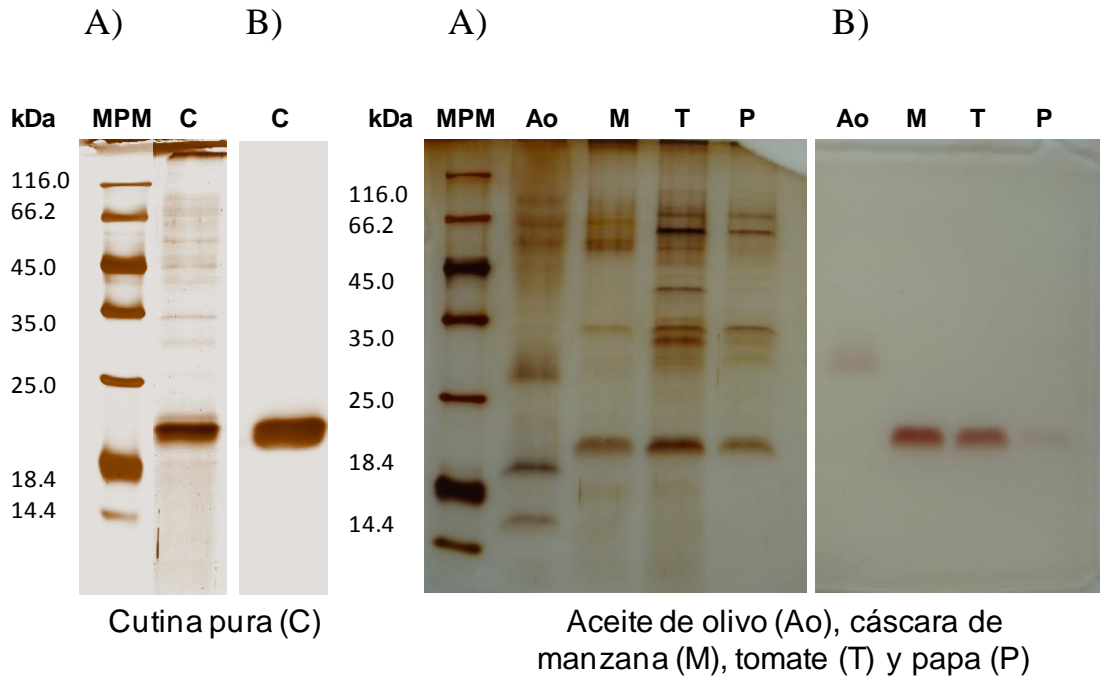


FIGURA 17. Efecto diferentes fuentes de inductores sobre la producción de actividad CEH extracelular en *A. nidulans*. A) Análisis SDS-PAGE de las proteínas en los extractor crudos, tinción de proteínas con nitrato de plata, B) zimograma empleando acetato de α -naftilo como sustrato.

Identificación de la CEH de 21 kDa.

Mediante LS/MS.MS se obtuvieron las secuencias de 3 péptidos que, de acuerdo al análisis en las bases de datos coincidieron con la secuencia de la cutinasa hipotética AN5334 de *A. nidulans*. Esta nueva cutinasa es inducida por la presencia de cutina en el medio de cultivo de *A. nidulans* y se nombró como ANCUT1.

La mayoría de los microorganismos productores de cutinasas suelen producir de 2 a 3 enzimas de este tipo, lo cual también fue observado para *A. nidulans*. Algunas de ellas se producen al inicio del ataque del microorganismo sobre el polímero y se inhiben por la liberación de los ácidos grasos producto de la

acción enzimática. Las otras enzimas se inducen por los ácidos grasos libres y continúan con la hidrólisis total del polímero.

La supervivencia de un saprofítico como *A. nidulans* es más favorable al tener una maquinaria enzimática que le permita utilizar diferentes sustratos. Esta versatilidad de los microorganismos puede no resultar de una adaptación específica sino que refleja la capacidad de explotar los recursos disponibles en el medio ambiente.

1	MKLQL	HLALS	LLAAI	VAANP	IRLDQ	RQITG	NELRD	GSCHD	VTFIF	ARGST
51	ELGYL	GSTVG	PATCN	VLKLR	KPGQV	ACQGV	APAYI	ADLAS	NFLPQ	GTNQI
101	AINEA	KSLFE	LAASK	CPNTK	IVAGG	YSQGA	AVMHA	AISTL	SSTVQ	DQIKG
151	VVLFQ	DTRNK	QDGGR	IPNFP	TDKTK	IICAF	GDLVC	EGTLV	ITAAH	LSYID
201	DVPDA	ADFLV	GKL							

Figura 18. Secuencia de aminoácidos de la cutinasa ANCUT1. Se marcan en rojo los péptidos identificados por degradación interna.

La secuencia de aminoácidos de la proteína consta de 213 residuos (Figura 18) sin embargo, se identificó un posible péptido señal con el sitio de ruptura más factible entre los aminoácidos 18 y 19 mediante el programa de predicción SignalP. Considerando el péptido señal, la proteína madura sería de 195 aminoácidos con un peso molecular teórico de 20.5 kDa, muy cercano al determinado experimentalmente (21 kDa). Al igual que ANCUT2 posee 6 residuos de histidina que probablemente formen 3 puentes disulfuro como se

ha reportado en otras cutinasas (Liu *et al.*, 2009). La secuencia de ANCUT1 no presenta la secuencia rica en serinas encontrada en ANCUT2.

En la Figura 11 se observa que de la cutinasa ANCUT1 presenta una relación filogenética muy cercana con la ANCUT2 del mismo microorganismo sin embargo, la proteína ANCUT1 se encuentra filogenéticamente, más relacionada con la cutinasa putativa EAL933235.1 de *Aspergillus fumigatus*.

Caracterización del extracto crudo con ANCUT1

Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad

Como se puede observar en la Figura 19, el extracto de cutinasa ANCUT1 presentó una mayor actividad CEH a 30 °C. Estos resultados concuerdan con lo reportado para otras cutinasas, Speranza *et al.*, (2011) reportaron una temperatura óptima de 30 °C para las cutinasas (en extracto crudo), producidas por *Fusarium sp.* en cultivos con semillas de arroz y *Jatropha curcas*. El extracto crudo (obtenido de CEHM) de ANCUT2 de *A. nidulans* presenta temperatura óptima en el rango de 30-40 °C (Ballesteros, 2006, Vergara, 2010). En general, las cutinasas presentan una temperatura óptima entre los 30 y 45 °C. Con respecto a la estabilidad térmica, se encontró que el extracto enzimático crudo de ANCUT1 conserva cerca del 85% de su actividad, después de ser incubada durante 1 hora a 40 °C y poco más del 50%, a la temperatura de 50 °C. Resultados similares se reportaron para la ANCUT2 en extracto crudo (Ballesteros, 2006, Vergara, 2010) y para otras cutinasas de origen fungal como la cutinasa de *A. oryzae*, que es estable hasta los 45 °C, manteniendo cerca del 80% de su actividad después de ser

incubada durante 30 min a la temperatura mencionada (Liu *et al.*, 2009). Sebastian y colaboradores (1987) compararon la estabilidad térmica de cutinasas fugales y bacterianas, encontrando que las cutinasas fungales son inestables por arriba de los 45 °C, mientras que las bacterianas presentaban estabilidad a temperaturas mayores de hasta 70 °C.

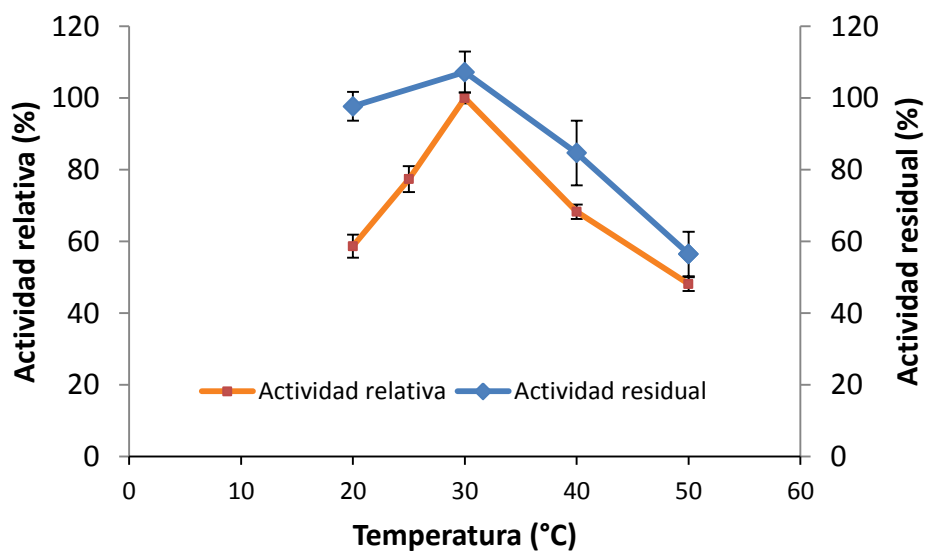


FIGURA 19. Efecto de la temperatura en la actividad y estabilidad de ANCUT1 en extracto crudo.

Efecto del pH en la actividad y estabilidad

El extracto crudo de ANCUT1 mostró mayor actividad CEH a pH 9 (Figura 20). Este resultado coincide con el observado para la mayoría de las cutinasas de origen fungal que presentan actividad a pH básico aunque, se han reportado algunas cutinasas con un pH óptimo por debajo de 7: la cutinasa de *Venturia*

inaequalis tiene pH óptimo de 6 (Köller y Parker, 1989), mientras que la enzima de *Alternaria brassicola* de 6.5 (Trail y Köller, 2002).

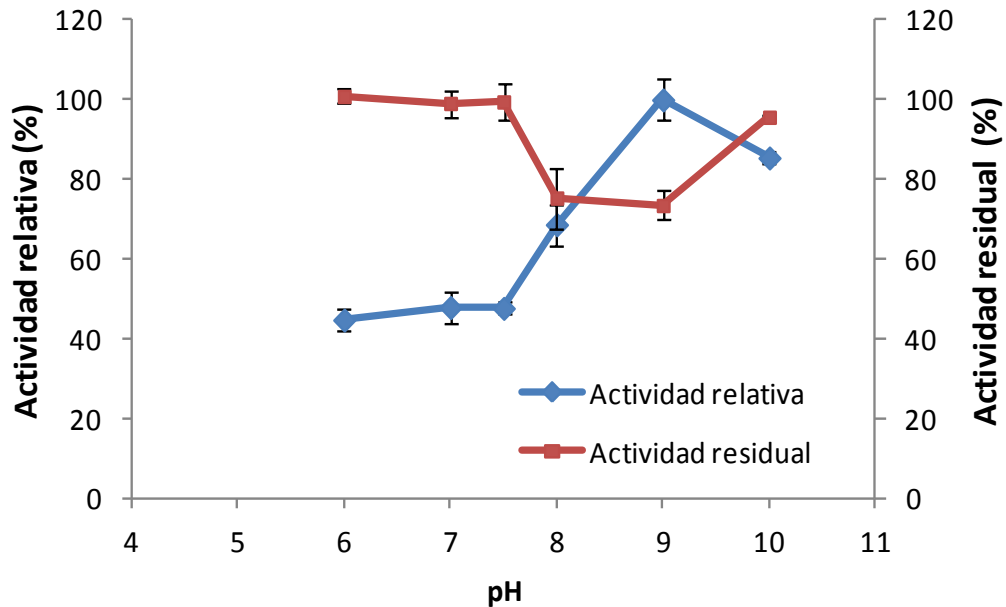


Figura 20. Efecto del pH en la actividad y estabilidad de ANCUT1 en extracto crudo.

La cutinasa ANCUT2 (extracto crudo obtenido de CEHM) de *A. nidulans* presenta mayor actividad a pH 8 (Ballesteros, 2006, Vergara, 2010). El ensayo de estabilidad al pH reveló que el extracto crudo de ANCUT1 es estable a pH de 6, 7 y 10. (Figura 20). Este resultado coincide con el reportado por Speranza *et al*, (2011) para la cutinasa (cruda) producida por *Fusarium* sp. cultivado en granos de arroz. Por su parte, el extracto de ANCUT2 de *A. nidulans* es estable en el rango de pH de 6-9, a pH de 10 la enzima se inactiva (Ballesteros, 2006, Vergara, 2010).

Especificidad de sustrato

Una de las características de interés en las cutinasas es la especificidad por los sustratos, debido a que el enfoque de su posible aplicación depende en gran parte de ello. Se investigó la especificidad del extracto de ANCUT1 sobre sustratos análogos con diferente longitud de cadena del grupo acilo. Los sustratos analizados fueron ésteres de *p*-nitrofenilo, los ensayos se realizaron a 25°C y pH 7.5.

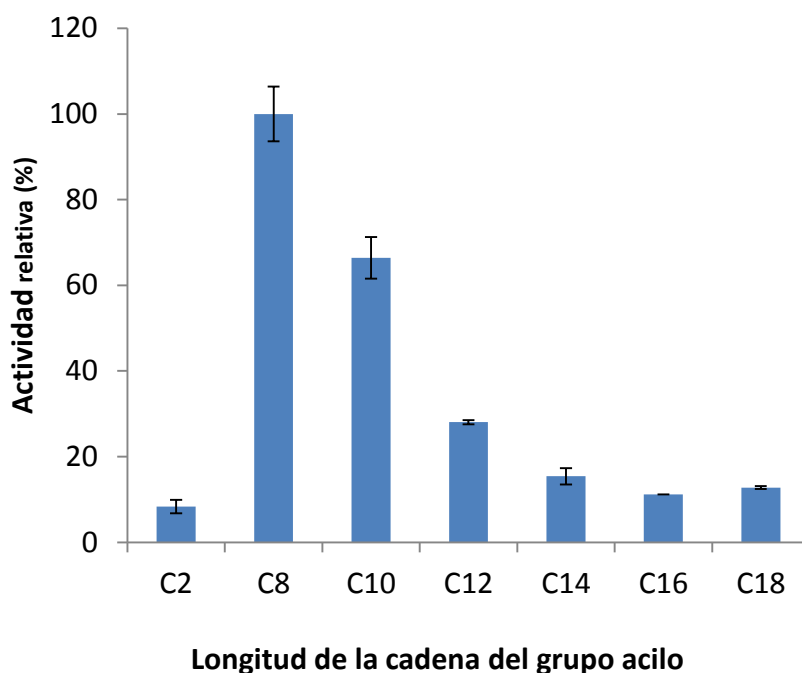


Figura 21. Especificidad de sustrato de ANCUT1 en extracto crudo, hacia ésteres de *p*-nitrofenilo de diferente longitud de cadena.

En la Figura 21 se observa que la enzima (en crudo) mostró mayor actividad con los ésteres de *p*-nitrofenilo de cadena media: C₈ a C₁₂, sin embargo

también hidrolizó los sustratos de cadena corta y larga La enzima actuó de forma más eficiente sobre el caprilato de *p*-nitrofenil (C₈), seguido del decanoato *p*-nitrofenilo (C₁₀) y laurato *p*-nitrofenilo (C₁₂). Esto coincide con lo reportado en la literatura, las cutinasas pueden actuar sobre sustratos con cadena corta, mediana y larga, aunque en general muestran mayor especificidad por los sustratos de cadena mediana y corta (Kolattukudy, 1985). En la Tabla 9 se presenta la comparación de las características de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 de *A. nidulans*.

TABLA 9. Comparación de las características de cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 de *A. nidulans*

CARACTERÍSTICA	ANCUT1	ANCUT2 ^a
Peso molecular	22	29
Temperatura óptima	30 °C	40 °C
pH óptimo	9	8
Estabilidad a la temperatura	50°C (56%)	50°C (30%)
Estabilidad al pH	6-10 (73%)	6-9 (80%)
Especificidad de sustrato	C ₈	C ₄
Compuesto inductor	cutina y suberina	Aceite de oliva, triacilglicerol y ácidos grasos

^aVergara, 2010.

En estudios paralelos del grupo de trabajo donde se caracterizaron las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 purificadas, se corroboraron la estabilidad térmica y alcalina de las enzimas (Bermudez, 2013, Vega, 2013). Los extractos enzimáticos de las enzimas previamente inmovilizadas en diferentes

soportes han sido analizados en reacciones de síntesis de gran interés industrial como son, la lipofilización de antioxidantes (síntesis de 7-O-lauroilo de ácido kójico, ANCUT2 y cumarato de butilo, ANCUT1), así como la producción de biodiesel (ANCUT2) y degradación de policaprolactona (ANCUT1) (Esquivel, 2011, Esqueda, 2012, Rivera, Tesis en revisión, Sánchez, comunicación personal).

7.- CONCLUSIONES

Las CEH son enzimas muy versátiles con importante aplicación en diversas áreas de la industria. Es por ello que la obtención de enzimas con características novedosas resulta de gran interés.

En el presente trabajo, se logró la producción, identificación y caracterización de 3 actividades CEH con pesos moleculares de 37, 29 y 24 kDa, en *Aspergillus nidulans*.

La identificación de actividades fue posible combinando técnicas como la purificación y secuenciación de las proteínas además, de la demostración de la actividad hidrolítica sobre su sustrato principal.

La identificación de la CEH de 37 kDa mediante secuenciación de la región N-terminal permitió corroborar que esta actividad pertenece a la proteasa alcalina PrtA. Ésta, al igual que otras enzimas de su clase (subtilasa) es una proteasa de amplio espectro que presenta la actividad CEH

Las actividades con pesos moleculares de 29 y 24 kDa corresponden a dos cutinasas nombradas como: ANCUT1 y ANCUT2. Es la primera vez que se identifica su producción en *A. nidulans*.

Las secuencias de las cutinasas ANCUT2 y ANCUT1 presentan homología con otras cutinasas fungales así como nuevas características, que incluyen

una región rica en serinas y dos residuos de cisteínas adicionales a los encontrados en la cutinasa de *Fusarium solani*.

Los mejores inductores para la producción de las cutinasas fueron aceite de oliva (ANCUT2) y cutina de manzana (ANCUT1). La producción de ambas cutinasas se reprime por la adición de sustratos fácilmente asimilables como la glucosa (1%).

El medio de cultivo para la obtención de ANCUT2 fue mejorado cambiando la fuente de carbono original (almidón 1.5%) por sacarosa o glucosa (0.5%), de esta forma se evitó la represión de la producción de la enzima y los problemas por la gelatinización del almidón que dificultaban las operaciones de recuperación de la enzima a partir del medio de fermentación.

Las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 de *A. nidulans* presentan propiedades catalíticas de interés como son la especificidad sobre diferentes sustratos, estabilidad térmica y alcalina, para su posible aplicación en diferentes áreas de la industria.

8.-PERSPECTIVAS

Mediante la realización del presente trabajo de investigación, se logró avanzar en la identificación de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos en *Aspergillus nidulans*. Sin embargo, aún se tienen ciertas áreas de interés para seguir ahondando en el estudio de estas enzimas. A continuación se mencionan algunas de ellas.

Estudiar el mecanismo de regulación de las cutinasas producidas por *Aspergillus nidulans*.

Lograr una mayor producción de las enzimas AN CUT1 y AN CUT2, mediante la optimización del medio de producción o, mediante clonación y expresión de las proteínas en sistemas heterólogos.

Realizar estudios estructurales de las cutinasas (AN CUT1 y AN CUT2) y, comparar con los reportados para otras cutinasas. Analizar las diferencias en cuanto a especificidad de sustrato y termoestabilidad.

Realizar la inmovilización de las cutinasas para mejorar su potencial biocatalítico.

Analizar las posibles áreas de aplicación industrial de las cutinasas mediante la realización de ensayos de biocatálisis con sustratos de interés particular.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- Adams, T. H., J. K. Wieser, y J. H. Yu. 1998. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62 (1): 35-54.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 2010. Capítulo 7, El control de la expresión génica. En: *Molecular Biología molecular de la célula*. (5ª ed). Ediciones Omega. Madrid,
- Ansari, H., Stevens, L. 1983. Purification and properties of two neutral proteinases from *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 129 (6): 1637–1644.
- Azzolina, O., Vercesi, D. Collina, S., Ghislandi, V. 1995. Chiral resolution of methyl 2-aryloxypropionate by biocatalytic stereoespecific hydrolysis. *// Farmaco.* 50: 221-226.
- Ballesteros, N.E. 2006. Caracterización de la esterasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bauer, S., Vasu, P., Persson, S., Mort, A.J., Somerville, C.R. 2006. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (30):11417–11422.
- Berg, J.M., Tymoczko, J. L. Strayer. 2008. Enzimas: conceptos básicos y cinética. En: *Bioquímica*. Barcelona (España): Reverté. pp. 205-215.
- Bermudez, E. P. 2013. Bases moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinolitico de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Binod, P., Palkhiwala, P., Gaikawai, R., Nampoothiri, K. M., Duggal, A., Dey, K., Pandey, A. 2013. Industrial Enzymes-Present status and future perspectives for India. *J Sci Ind Res.* 72(5), 271-286.
- Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S. 1999. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol.* 294 (5): 1351-1362.
- Bonnen, A.M., Hammerschmidt, R.N. 1989. Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 35(6): 475-481.

- Bornscheuer, U.T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.* 26 (1): 73-81.
- Botta, M., Cernia, E., Corelli, F., Manetti, F. and Soro, S. 1997. Probing the substrate specificity for lipases. II: Kinetic and modelling studies on the molecular recognition of 2-arylpropionic esters by *Candida rugosa* and *Rhizomucor miehei* lipases. *Biochim Biophys Acta.* 1337 (2): 302-310.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72 (2): 248-54.
- Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R., Cabral, J.M.S. 1999. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol Bioeng.* 66 (1): 17-34.
- Castro-Ochoa, D., Peña-Montes, C., Farrés, A. 2010. Producción y características de cutinasas: Una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Tip.* 13 (1): 16-25.
- Castillo, R.F., Roldán, R.M.D., Blasco, P.R., Huertas, R. M. J., Moreno-Vivián, C., Martínez, M. 2005. Tecnología enzimática. En *Biotecnología ambiental*. Madrid: Tébar. S.L. pp.303-304.
- Charles, P., Devanathan, V., Anbu, P., Ponnuswamy M.N., Kalaichelvan, P.T., Hur, B.K. 2008. Purification, characterization and crystallization of an extracellular alkaline protease from *Aspergillus nidulans* HA-10. *J Basic Microbiol.* 48 (5): 347-352.
- Chen, S., Su, L., Chen, J., Wu, J. 2013. Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnol Adv.* 31 (8):1754-1767.
- Choi Y.J., Lee, B.H. 2001. Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL 96. *Bioprocess Biosyst.* 24: 59–63
- Cobeño, L. 2011. Identificación de la quinasa HalA y el estudio de su papel en la regulación de la homeostasis de cationes en "*Aspergillus nidulans*". Tesis de Doctorado. Universidad Complutense de Madrid
- Cohen BL. 1972. Ammonium repression of extracellular protease in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol.* 71: 293-299.
- Cohen, B. L. 1973a. The Neutral and Alkaline Proteases of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology* . 77 (2): 521-528.
- Cohen, B.L. 1973b. Regulation of Intracellular and Extracellular Neutral and Alkaline Proteases in *Aspergillus nidulans*. *Microbiology.* 79 (2): 311-320.

- Crueger, W., Crueger, A. 1989. Desarrollo de cepa. En: Biotecnología: manual de microbiología industrial. Trad. Liras, P. P. Zaragoza (España): Acribia. pp 39-41.
- Culleton, H., McKie, V., & de Vries, R. P. 2013. Physiological and molecular aspects of degradation of plant polysaccharides by fungi: what have we learned from *Aspergillus*?. *Biotechnol J.* 8 (8): 884-894.
- Del Rio, J.C., Hatcher, P. G. 1998. Analysis of aliphatic biopolymers using thermochemolysis with tetramethylammonium hydroxide (TMAH) and gas chromatography–mass spectrometry. *Org Geochem.* 29 (5-7): 1441-1445.
- Dickman, M.B., Patil, S.S. 1986. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. *Physiol Mol Plant Pathol.* 28: 235-142.
- Du, G.C. Zhang, S.L., Hua, Z.Z., Zhu, Y., Chen, J. 2007. Enhanced cutinase production with *Termobifida fusca* by two-stage pH control strategy. *Biotechnol J.* 133: 942-951.
- Dutta, K., Sen, S., Veeranki. 2009. Production, characterization and applications of microbial cutinase. *Process Biochem.* 44:127-134.
- Edman, P. 1950. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta chem Scand.* 4: 283-293.
- Egmond, M.R., de Vlieg, J. 2000. *Fusarium solani* cutinase. *Biochimie.* 82: 1015-1021.
- Emri, T., Szilágyi, M., László, K., M-Hamvas, M., Pócsi, I. 2009. PepJ is a new extracelular proteinase of *Aspergillus nidulans*. *Folia Microbiol.* 54 (2):105-109.
- Esqueda, K. 2012. Producción, identificación y caracterización de una cutinasa de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Esquivel, R. 2011. Producción regioselectiva de 7-O-lauroilo de ácido kójico por carboxilesterasas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Farah, D.A.B., Murad, A.M., Hamid, A.A., Zamrod, Z, Mahadi, N.M., Sullivan, P. 2005. Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *As Pac J Mo. Biol Biotechnol.* 13 (2): 63-69.
- Fernández-Espinar, M.T., Ramón, D., Piñaga, F. Vallés, S. 1992. Xylanase production by *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol Lett.* 91 (2): 91-96.

- Fernández-Arrojo, L., Guazzaroni, M. E., López-Cortés, N., Beloqui, A., Ferrer, M. 2010. Metagenomic era for biocatalyst identification. *Curr Opin Biotechnol.* 21 (6): 725-733.
- Fett, W.F., Gerard, H.C., Moreau, R.A., Osman, S.F., Jones, L.E. 1992. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin degrading enzymes. *App Environ Microbiol.* 58 (7): 2123-2130.
- Fett, W.F., Wijey, V., Moreau, R.A., Osman, S.F. 1999. Production of cutinase by *Thermonospora fusca* ATCC 27730. *J Appl Microbiol.* 86: 561-568.
- Fett, W.F., Wijey, V., Moreau, R.A., Osman, S.F. 2000. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Lett Appl Microbiol.* 31:25-29.
- Formo, M.W. 1954. Ester reactions of fatty materials. *J Amer Oil Chem Soc.* 31: 548.
- Frosco, M., Chase, T., Macmillan, J.D. 1992. Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 60: 728-734.
- Fukushima, Y., Itoh, H., Fukase, T., Motai, H. 1991. Stimulation of protease production by *Aspergillus oryzae* with oils in continuous culture. *Appl Microbiol Biotechnol.* 34 (5): 586-590.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Baştürkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Peñalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A., Birren, B.W.. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature.* 438 (7071): 1105-1115.
- García-Lepe, R., Nuero, O.M., Reyes, F., Santamaría, F. 1997. Lipases in autolysed cultures of filamentous fungi. *Lett Appl Microbiol.* 25 (2): 127-30.
- Glass, N.L., Rasmussen, C., Roca, M.G., Read N.D. 2004. Hyphal homing fusion and mycelia interconnectedness. *Trends in Microbiology.* 12 (3):135-141.
- Guo, J.P., Ma, Y. 2007. High-level expression, purification and characterization of recombinant *Aspergillus oryzae* alkaline protease in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 58 (2):301-8.
- Gupta, R., Beg, Q. K., Lorenz, P. 2002. Bacterial alkaline protease: molecular approaches and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 59: 15-32.

- Harman, J.G. 2001. Allosteric regulation of the cAMP receptor protein. *Biochim Biophys Acta*. 154 (1): 1-17.
- Hawthorne, B.T., Rees-George, J., Crowhurst, R.N. 2001. Induction of cutinolytic esterase activity during saprophytic growth of cucurbit pathogens, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race one and two (*Nectria haematococa* MPI and MPV, respectively). *FEMS Microbiol Lett*. 194: 135-141.
- Hedstrom, L. 2002. Serine protease mechanism and specificity. *Chem Rev*. 102: 4501-4523.
- Henriette, C., Zinebi, S., Aumaitre, M.F., Petitdemange, E., Petitdemange, H. 1993. Protease and lipase production by a strain of *Serratia marcescens*. *J Ind Microbiol*. 12: 129-135.
- Higgins, D.G., Sharp, P.M. 1988. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene*. 73: 237-244.
- Hu, G., Leger, R.J. 2004. A phylogenomic approach to reconstructing the diversification of serine proteases in fungi. *J Evol Biol*. 17 (6): 1204-1214.
- Illanes, A. 2008. Enzyme production. En Enzyme biocatalysis: principles and applications. Springer. pp. 57-89
- Jabasingh, S.A., ValliNachiyar, C. 2011. Optimization of cellulase production by *Aspergillus nidulans*: application in the biosoftening of cotton fibers. *World J Microbiol Biotechnol*. 27 : 85-97.
- Jaeger, J.E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. 1999. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu Rev Microbiol*. 53: 315-351.
- Jones, D.T., Taylor, W.R., Thornton, J.M. 1992. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci*. 8 (3): 275-82.
- Jurado, E., García-Román, M., Luzón, G. Altmajer-Vaz, D., Jimenez-Pérez, J.L. 2011. Optimization of Lipase Performance in Detergent Formulations for Hard Surfaces. *Ind Eng Chem Res*. 50 (20):11502–11510
- Käfer, E. 1977. Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus nidulans* and its chromosomal aberrations. *Adv Genetics*. 19:133-131.
- Kajilal, S., Prasad, R.B.N., Kaimal, T.N.B., Raosh, G. 1999. Synthesis and estimation of caloric value of structured lipid potential reduced calorie fat. *Lipids*. 34 :1045-1055.
- Kanazawa, T., Keeler, M., Vartikovski, L. 1994. Serine-rich region of the IL-2 receptor beta-chain is required for activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell Immunol*. 156 (2): 378-388.

- Karmee, S.K. 2009. Biocatalytic synthesis of ascorbyl ester and their biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 81 (6): 1013-1022.
- Katz, M.E., Bernardo, S.M., Cheetham, B.F. 2008. The interaction of induction, repression and starvation in the regulation of extracellular proteases in *Aspergillus nidulans*: evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation evidence for a role for CreA in the response to carbon starvation. *Curr Genet.* 54: 47-55.
- Katz, M.E., Rice, R. N., Cheetham, B.F. 1994. Isolation and characterization of an *Aspergillus nidulans* gene encoding an alkaline protease. *Gene.* 150, 287-292.
- Kawasaki, L., Farrés, A., Aguirre, J. 1995. *Aspergillus nidulans* mutants affected in acetate metabolism isolated as lipid nonutilizers. *Exp Mycol.* 19 (1):81-5.
- Kazlauskas, R.J. 1994. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *BIBTECH.* 12: 464-472.
- Kim, Y.H., Ahn, J.Y., Moon, S.H., Lee, J. 2005. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere.* 60: 1349-1355.
- Kinderman, S.S., Feringa, B. 1998. Asymmetric synthesis of acetomycin. *Tetrahedron: Asymetry.* 9: 1215-1222.
- Kirk, O., Borchert, T.V., Fuglsang, C.C. 2002. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 13 (4): 345-351.
- Klibanov, A.M. 2001. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* 409: 241–246
- Kolattukudy, P.E. 1985. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. *Ann Rev Phytopathol.* 23: 223-250.
- Kolattukudy, P.E. 2001. Polyesters in higher plants. *Adv Biochem Enginen Biotechnol* 71: 1-49.
- Köller, W., Parker, D.M., Becker, C.M. 1995. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology.* 81: 1375-1379.
- Köller, W., Parker, D.M. 1989. Purification and characterization of cutinase from *Venturia inaequalis*. *Phytopathology.* 79, 278-283.
- Koschorreck, K., Liu, D., Kazenwadel, C., Schmid, R.D., Hauer, B. 2010. Heterologous expression, characterization and site-directed mutagenesis of

cutinase CUTAB1 from *Alternaria brassicicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87: 991-997.

Kumar, C.G., Takagi, H. 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. *Biotechnol Adv.* 17 (7): 561–594.

Kuo, C.H., Chiang, S.H, Ju, H.Y., Chen, Y.M., Liao, M.Y., Liu, Y.C., Shieh, C.J. 2012. Enzymatic synthesis of rose aromatic ester (2-phenylethyl acetate) by lipase. *Sci Food Agric.* 92 (10): 2141-2147.

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

Lawson, C.L., Swigon, D., Murakami, K.S., Darst, S.A. Berman, H.M., Ebright, R.H. 2004. *Curr Opin Struct Biol.* 14 (1): 10-20.

Lin, T., Kolattukudy, P.E. 1980. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel aminoacids and glucuronic acid amide at the N terminus. *Eur. J. Biochem.* 106: 341-351.

Lin, T.S., Kolattukudy, P.E. 1978. Induction of a Biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani f. sp. Pisi J Bacteriol.* 133 (2): 942-951.

Liu, C.F., Tam, J.P. 2001. Subtilisin-Catalyzed Synthesis of Amino Acid and Peptide Esters. Application in a Two-Step Enzymatic Ligation Strategy. *Org Lett.* 3 (26): 4157-4159.

Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P.J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., Li, H., Butterfoss, g.I., Kong, X.P., Gross, R., Montclare, J.K. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J Am Chem Soc.*131 (43): 15711-15716.

Longhi, S., Cambillau, C. 1999. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim Biophys Acta.*1441: 185-196.

Lubary, M., Hofland, G.W. ter Horst, J.H. 2011. The potential of milk fat for the synthesis of valuables derivatives. *Eur Food Res Technol.* 232:1-8.

Macedo, G.A., Pio, T.F. 2007. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol.* 41: 613-619.

MacKeith, R.A., McCague R., Olivo, H.F., Robert,s S.M., Taylor, S.J., Xiong, H. 1994. Enzyme-catalysed kinetic resolution of 4-endo-hydroxy-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-one and employment of the pure enantiomers for

the synthesis of anti-viral and hypocholesteremic agents. *Bioorg Med Chem.* 2 (6): 387-394.

MacKenzie, D.A., Jeenes, D.J., Belshaw, N.J. Archer, D.B. 1993 Regulation of secreted proteins production by filamentous fungi: Recent developments and perspectives. *J Gen Microbiol.* 193 (10): 2295-2307

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. 2009. Capítulo 9, Regulación de la expresión génica. En: Brock, Biología de los microorganismos (12^a ed). Madrid: Pearson.

Maeda, H., Yamagata, Y., Abe, K., Hasegawa, F., Machida, M., Ishioka, R., Gomi, K., Nakajima, T. 2005. Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67 (6): 778-788.

Martínez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G., Cambillau, C. 1992. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature.* 356: 615-618.

Martinez, P., Christen, P., Farrés, A., 1993. Medium optimization by fractional factorial design for lipase production by *Rhizopus delemar*. *J Ferment Bioengineering;* 76 (2): 94-97.

Marzluf, G.A.1997. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61 (1):17-32.

Masaki, K., Kamini, N.R., Ikeda, H., Lefuji, H. 2005. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus sp.* strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and others biodegradable plastics. *Appl Environ Microbiol.* 71 (11):7548-7550.

Mayodormo, I., Randez-Gil, F., Prieto, J.A. 2000. Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J Agric Food Chem.* 48 (1): 105-9.

McKee, T., McKee, J. 2003. Bioquímica: la base molecular de la vida (3^aed)., Madrid: McGraw-Hill/Interamericana de España.

McQueen, D.A., Schottel, J.L. 1987. Purification and characterization of a novel extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *Bacteriol.* 169 (5): 1967–1971.

Metzger, J.O., Bornscheuer, U. 2006. Lipids as renewable resources: Current state of chemical and biotechnological conversion and diversification. *Appl Microbiol Biotechnol.* 71: 13-22.

Murayama, T., Nagasawa, S., Goto, M. 2002. Enzymatic synthesis of sugar amino acid esters in organic solvents. *J Biosci Bioeng* 94 (4): 357–36.

- Nagarajan, S. 2012. New tools for exploring “old friends-microbial lipases”. *Appl Biochem Biotechnol.* 168 (5): 1163-1196.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W. 1999. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr Opin Struct. Biol.* 9: 732-737.
- Nawani, N., Dosanjh, N., Kaur, J. 1998. A novel thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus* sp.: characterization and esterification studies. *Biotechnol Lett.* 20 (10): 997-1000.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G. 1997. A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst.* 8 (5-6): 581-99.
- Ogundero, V.W. 1982. Hydrolysis of vegetable oils and triglycerides by thermotolerant and zoopathogenic species of *Aspergillus* from Nigerian palm produce. *Mycopathologia.* 77 (1): 43-46.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J. 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* 5 (3), 197-211.
- Pacchiano, R. A., Sohn, W., Chlanda, V.L., Garbow, J.R. Stark, R.E. 1993. Isolation and spectral characterization of plant-cuticle polyesters. *J Agric Food Chemistry.* 41:78-83.
- Panda, T., Gowrishankar, B.S. 2005. Production and applications of esterases. *App Microbiol Biotechnol.* 67: 160-169.
- Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C. R., Nigman, P., Krieger N., Soccol, V.T. 1999. The realm of microbial lipase in biotechnology. *Biotechnol App Biochem.* 29: 119-31.
- Panesar, P.S., Marwaha, S.S., Chopra, H.K. 2010. Fundamentals of enzymes. En: *Enzymes in Food processing, fundamentals and potential applications.* New Delhi: I.K. International Publishing House Pvt. Ltd. pp.23-24.
- Pearson, W.R., Lipman, D.J. 1988. Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85 (8): 2444-2448.
- Peña-Montes, C. 2001. Producción, purificación y caracterización bioquímica de una enzima con actividad lipolítica en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Peña-Montes, C. 2009. Análisis de la expresión y caracterización de la esterasa StcI involucrada en la biosíntesis de esterigmatocistina en *Aspergillus nidulans*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Peña-Montes, C., Gonzalez, A., Castro-Ochoa, D., Farrés, A. 2008. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 78 (4): 603-612.
- Pio, T.F., Macedo, G.A. 2007. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme Microb Technol.* 41 (5): 613-619.
- Pio, T.F., Macedo, G.A. 2009. Cutinases: properties and industrial applications. *Adv. App. Microbiol.* 66: 77-95.
- Pontecorvo, G., Roper, J.A., Hemmons, L.M. Macdonald, K.D. Bufton, A.W..1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet.* 5 :141-238.
- Ramesh, M.V., Sirokova, T., Kolattukudy, P.E. 1994. Isolation, characterization, and cloning of cDNA and the gene for an elastinolytic serine proteinase from *Aspergillus flavus*. *Infect immun.* 62: 78-85.
- Rao MB, Tanksale A.M, Ghatge MS, Deshpande VV 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 62: 597–635.
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J., Bateman, A. 2012. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acid Res.* 40: D343-D350.
- Redmore, F.H. 1981. Cinética. En: Fundamentos de química. Trad. López, L.A., Gil, L. Naucalpan de Juaréz (México): Prentice Hall hispanoamericana, S.A. pp.355.
- Rispoli, F.J., Shan, V. 2007. Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34: 349-355.
- Rivera, I. Reacciones de transesterificación empleando cutinasas producidas por *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. (Tesis en revisión).
- Rodrigues, R.C., Fernandez-Lafuente, R. 2010. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. *J Mol Catal B: Enzym.* 66 (1-2): 15-32.
- Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Hermosa, R., Gutiérrez, S., Monte, E. 2008. Cloning and characterization of the Thcut1 gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr Genet.* 54: 301-312.

- Sarkar, S., Sreekanth, B., Kant, S., Banerjee, R., Bhattacharyya, B.C. 1998. Production and optimization of microbial lipase. *Bioprocess Engineering*. 19: 29-32.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4 (4): 406-25.
- Sebastian, J., Chandra, A.K., Kolattukudy, P.E. 1987. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *J Bacteriol*. 169 (1): 131-136.
- Seo, H.S., Um, H.J. Min, J., Rhee, S.K., Cho, T.J. Kim, Y.H., Lee, J. 2007. *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Res*. 7 (6):1035-1045.
- Sharma, D., Sharma, B., Shukla. 2011. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. *Biotechnology*. 10 (1): 23-40.
- Shayk, M., Kolattukudy, P.E. 1977. Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiol*. 60: 907-915.
- Shin, H.D., Chen, R.R. 2007. A type B feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* with broad pH applicability. *Appl Microbiol Biotechnol*. 73 (6): 1323-1330.
- Sienze, R.J., Leunissen, J.A.M. 1997. Subtilases: The superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci*. 6: 501-523.
- Sivalingam, G., Giridhar, M. 2004. Dynamics of lipase catalyzed enzymatic degradation of poly(bisphenol-A carbonate). *J Appl Polym Sci*. 91: 2391–2396.
- Skupin, R., Cooper, T.G., Fröhlich, Prigge, J., Haufe, G. 1997. Lipase-catalyzed resolution of both enantiomers of ornidazole and some analogues. *Tetrahedron: Asymmetry*. 8 (14): 2453-2464.
- Speranza, P., Carvalho, P., Macedo, G.A. 2011. Effects of different solid state fermentation substrate on biochemical properties of cutinase from *Fusarium* sp. *J Mol Catal B: Enzym*. 72: 181-186.
- Sroga, G.E., Dordick, J. 2001. Generation of a broad esterolytic subtilisin using combined molecular evolution and periplasmic expression. *Protein Eng*. 14 (11): 929-937.
- Stamatis, H., Sereti, V., Kolisis, F.N. 1999. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J Am Oil Chem Soc*. 76 (12).

- St-Leger, R.J. Joshi, L., Roberts D.W. 1997. Adaptation of proteases and carbohydrates of saprophytic, phytopathogenic and entomopathogenic fungi to the requirements of their ecological niches. *Microbiology*.143: 1983-1992.
- Strohmeier, G. A., Pichler, H., May, O., Gruber-Khadjawi, M. 2011. Application of designed enzymes in organic synthesis. *Chem Rev.* 111 (7): 4141-4164.
- Taiz, L., Zeiger, 2002. E. Plant physiology (3^a ed). Sunderland: Sinauer Associates.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol.* 24: 1596-1599.
- Tan, T., Lu, J., Nie, K., Deng, L., Wang, F. 2010. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnol Adv.* 28 (5): 628-34.
- Tanabe, K., Nishimura, S., Kohmoto, K. 1988. Pathogenicity of cutinase and pectic enzymes-deficient mutants of *Alternaria alternata* japanese pear pathotype. *Ann Phytopathol Soc Jpn.* 54. 552-555.
- Testa, B., Mayer, J.M. 2003. Classification, localization, and some physiological roles of hydrolytic enzymes. En: Hydrolysis in Drug and Prodrug Metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology. Zurich: Wiley-Vch.
- Timberlake, W.E. 1990. Molecular genetics of *Aspergillus* development. *Annu Rev Genet.* 24: 5-36.
- Todd, R.B., M.A. Davis, M.J. Hynes. 2007a. Genetic manipulation of *Aspergillus nidulans*: meiotic progeny for genetic analysis and strain construction. *Nat Protocols.* 2: 811-821.
- Tokiwa, Y., Calabia, B.P., Ugwu, C.U., Aiba, S. 2009. Biodegradability of Plastics. *Int J Mol Sci.* 10 (9): 3722-3742.
- Trail, F., Köller, W. 2002. Diversity of cutinase from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinase from *Alternaria brassicicola*. *Physiol Mol Plant Pathol.* 42 (3), 205-220.
- van Beilen, J.B., Li, Z. 2002. Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol.* 13 (4): 338-344.
- vanKan, J., van'tKlooster, J., Wagemakers, C., Dees, D., van der Vlugt-Bergmans, C. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and potato. *Mol Plant-Microbe Interact.* 10 (1): 30-38.
- vanKuyk, P.A., Cheetham, B.F., Katz, M.E. 2000. Analysis of two *Aspergillus nidulans* genes encoding extracellular proteases. *Fungal Genet Biol.* 29 (3): 201-10.

- Vega, F. 2013. Purificación y caracterización de la cutinasa ANCUT1 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vergara, P. 2010. Inmovilización de esterasas a partir de un extracto crudo de *Aspergillus nidulans* PW1. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Villeneuve, P., Muderhwa, J.M. , Graille, J., Haas, M.J. 2000. Customizing lipase for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzym.* 9: 113-148.
- Voet, D., Voet, J.G., Pratt, C. 2009. Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Buenos Aires, Médica Panamericana. 2^a ed.
- Velloorvalappil, N. J., Robinson, B. S., Selvanesan, P., Sasidharan, S., Kizhakkepawothail, N. U., Sreedharan, S., Sailas, B. 2013. Versatility of microbial proteases. *Adv Enzym Res.* 1 (3): 39-51.
- Walton, T.J., Kolattukudy, P.E. 1972. Determination of the structure of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry.* 11 (10): 1885-1897.
- Wang, G.Y., Michailides, T.J., Hammock B.D., Lee, Y.M., Bostock, R.M. 2002. Molecular cloning characterization and expression of a redox responsive cutinase from *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. *Fungal Genet Biol.* 35 (3): 261-276.
- Wang, G.Y., Michailides, T.J., Hammock, B.D., Lee, Y.M., Bostock, R.M. 2000. Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. *Arch Biochem Biophys.* 382 (1).
- Yamamura, I., Fujiwara, Y., Yamato, T., Irie, O., Shishido, K. 1997. Enantiocontrolled total synthesis of the diterpenoids, triptoquinone B, C and triptocallol. *Tetrahedron Lett.* 38 (23): 4121-4124.
- Yang, F.C., Lin, I. 1998. Production of acid protease using thin stillage from a rice-spirit distillery by *Aspergillus niger*. *Enzyme Microb Technol.* 23 (6): 397-402.
- 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. *J Biotechnol.* 161 (1): 27-33.
- Yoshii, K., Tonogai, Y., Katakawa, J., Ueno, H., Nakamuro, K. 2007. Kinetic analysis for hydrolysis of malathion by carboxylesterase in wheat kernels. *J Health Sci.* 53: 507-513.

Zaks, A., Klianov, A.M. 1985. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82 (10): 3192–3196.

Zhang, D.H., Lv, Y.Q., Zhi, G.Y., Yuwen, L.X. 2011. Kinetic biosynthesis of L-ascorbyl acetate by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase (Lipozyme TLIM). *Bioprocess Biosyst Eng.* 34 (9):1163-1168.

10. - ANEXOS

PRODUCCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE CUTINASAS: UNA ALTERNATIVA INTERESANTE PARA BIOCATÁLISIS A NIVEL INDUSTRIAL

Denise Castro-Ochoa, Carolina Peña-Montes y Amelia Farrés

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior
Universitario s/n, Coyoacán, C.P. 04510, México, D.F.
E-mail: fares@servidor.unam.mx

RESUMEN

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son enzimas que catalizan la hidrólisis del polímero lipídico cutina, un componente estructural de la cutícula de las plantas. Estas enzimas muestran propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, debido a que pueden hidrolizar ésteres solubles y triacilgliceroles, además de las reacciones inversas de síntesis en medios con baja actividad de agua. Esa versatilidad ha promovido su aplicación en áreas como la industria de alimentos, detergentes, producción de biodiesel, degradación enzimática de sustancias tóxicas y polímeros sintéticos. Las cutinasas han sido aisladas principalmente de hongos, siendo la más estudiada la cutinasa de *Fusarium solani*. Sin embargo, en los últimos años ha habido un mayor interés por la búsqueda de catalizadores con nuevas propiedades, por lo cual se han aislado y estudiado cutinasas en otras fuentes. En este trabajo se analizan la clasificación y estructura de estas enzimas, fuentes y medios de producción, y se profundiza en algunas áreas de aplicación con mayor auge en la actualidad.

Palabras Clave: Biocatálisis, biodiesel, cutin, cutinasa, esterasa, lipasa.

ABSTRACT

Cutinases (EC 3.1.1.74) are enzymes that catalyze hydrolysis of lipidic polymer cutin, a structural component of plant cuticles. These enzymes display catalytic properties of esterases and lipases, as they can hydrolyze soluble esters and triacylglycerols, besides the reverse reactions of synthesis in a low-water environment. Such versatility has promoted their application in areas such as the food industry, detergents, biodiesel production, enzymatic degradation of toxic substances and synthetic polymers. Cutinases have been isolated mainly from fungi, being *Fusarium solani* cutinase the most studied. Nevertheless, there has been an increasing interest in the search of biocatalysts with new interesting properties in the last years, thus cutinases have been isolated and studied from other sources. In this review the classification, structures, sources and production of these enzymes are discussed, and applications in emergent areas are detailed.

Key Words: Biocatalysis, biodiesel, cutin, cutinase, esterase, lipase.

INTRODUCCIÓN

Las cutinasas son enzimas muy versátiles que pueden catalizar, además de la ruptura del enlace éster de la cutina, reacciones de hidrólisis y síntesis *in vitro* de una amplia variedad de sustratos¹. Estas propiedades

catalíticas de las cutinasas tienen un uso potencial en diferentes industrias, por ejemplo, en alimentos, detergentes, producción de biodiesel, entre otras aplicaciones¹⁻⁵. Asimismo, la elucidación de su estructura ha sido objeto de intensa investigación, nuevas estructuras tridimensionales y nuevas técnicas de biología molecular han provisto de herramientas para adaptar a las cutinasas a diferentes usos⁶⁻⁹.

Nota: Artículo recibido el 29 de abril de 2010 y aceptado el 27 de mayo de 2010.

La cutina es el componente principal de la cutícula, una estructura multicapa que cubre las paredes celulares externas de la epidermis en los órganos aéreos de las plantas, cuya función es brindar protección contra la pérdida de agua y el ataque de microorganismos¹⁰. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos de cadena larga que están unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida¹⁰. Está formada principalmente por ácidos grasos 16:0 y 18:1 con grupos hidroxilo o epóxidos situados en la parte media de la cadena o al final, en el lado opuesto al grupo carboxilo, aunque la composición precisa varía dependiendo de la especie¹¹. El modo de penetración de esta barrera por microorganismos patógenos ha sido un tema polémico durante mucho tiempo. Mientras algunos reportes sugieren que la penetración puede ser por mera fuerza física debido al crecimiento del patógeno, otros autores presentan evidencias de que la degradación enzimática de la cutícula por cutinasas es esencial para la penetración en al menos algunas interacciones planta-hongo¹².

Las cutinasas son enzimas inducibles producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de cutina¹³. Las cutinasas han sido encontradas en diversas fuentes¹⁴⁻¹⁷, muchos hongos (principalmente patógenos) han sido reportados como productores de cutinasas, las cuales pueden asistir en la penetración de la cutícula de la planta. A partir de los trabajos pioneros de la actividad cutinasa del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *pisi*^{14,18} y, de la demostración de la actividad cutinasa en otros hongos también patógenos, ha habido un especial interés en el papel de las cutinasas como determinantes de patogenicidad o virulencia en estos microorganismos. Evidencia del papel crítico de las cutinasas en la penetración de tejido sano del huésped ha sido demostrada en algunos hongos incluyendo *Alternaria alternata*¹⁹, *Colletotrichum gloeosporioides*²⁰, *Mycosphaerella* sp.²¹ y *Venturia inaequalis*²², sin embargo, en estudios con otros hongos como *Alternaria brassicicola*²³, *Botrytis cinerea*²⁴ y *Colletotrichum lagenarium*²⁵, en los cuales la patogenicidad se conservó intacta aun después de suprimir la actividad cutinasa por interrupción del gen de la enzima, han generado evidencia contradictoria, sugiriendo que las cutinasas no son requeridas para la patogenicidad del hongo.

CLASIFICACIÓN

Históricamente las enzimas suelen clasificarse con base en la especificidad de sustrato o reacción química que catalizan. De acuerdo con la nomenclatura de La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular²⁶, las cutinasas reciben el número de clasificación EC 3.1.1.74, el cual las permite identificar como hidrolasas que actúan sobre enlaces ésteres de ácidos carboxílicos del polímero cutina.

El sistema de clasificación con base en la especificidad del

sustrato en ocasiones presenta ciertos problemas. En el caso de las carboxilesterasas (3.1.1.x) la preferencia de sustratos frecuentemente se traslapa entre las clases definidas²⁷, por lo que se considera a las cutinasas como intermedio entre lipasas y estererasas⁶. Asimismo, se ha observado que algunas amonías que no están dentro de esta clasificación también pueden llevar a cabo la ruptura del enlace éster, como es el caso de algunas proteasas e incluso proteínas que no están clasificadas como enzimas (e.g. albúmina sérica) que también pueden llevar a cabo esta reacción^{28,29}. Debido a la disponibilidad cada vez mayor de la información de secuencias en bases de datos públicas, una alternativa complementaria para la clasificación e identificación de enzimas ha sido la comparación de secuencias de aminoácidos, que además puede proporcionar un cuadro más claro sobre la relación evolutiva entre enzimas de diferente origen³⁰.

APLICACIONES DE CUTINASAS

En años recientes, la actividad esterolitica de las cutinasas ha sido ampliamente explorada. Carvalho *et al.*¹ discuten a detalle las reacciones de biocatálisis que pueden llevar a cabo las cutinasas. *In vitro* las cutinasas despliegan actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres, desde ésteres sintéticos solubles (e.g., p-nitrofenil ésteres) a triglicéridos de cadena larga insolubles^{31,32}. Además en medios no acuosos o de baja actividad de agua, pueden catalizar reacciones de síntesis como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos³³. Estas reacciones de hidrólisis y síntesis tienen un uso potencial en la industria de alimentos, en la de lácteos para la hidrólisis de grasa de leche, en la industria de detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel, entre otras aplicaciones¹⁻⁵. A continuación se detallan algunas de las aplicaciones importantes.

Alimentos

Modificación de grasas y aceites

Las grasas y aceites son constituyentes importantes de los alimentos. El valor nutricional, sensorial y las propiedades físicas de un triglicérido son influenciados enormemente por factores tales como la posición estereoespecífica del ácido graso en el glicerol, el largo de cadena del ácido graso, y su grado de insaturación³⁴. La estructura básica de grasas y aceites puede ser modificada de diferentes maneras: modificación química del ácido graso (hidrogenación), ruptura del enlace éster (hidrólisis), y reorganización de ácidos grasos en la cadena principal del triglicérido (interestificación)³⁵. De esta manera, un lípido poco deseable y de bajo costo puede ser modificado en un producto con aplicaciones importantes con un alto valor.

La transesterificación de grasas y aceites, así como la esterificación selectiva de alcoholes, se puede obtener empleando cutinasa en bajas actividades de agua¹.

La hidrólisis parcial de las grasas en la leche es una transformación típica mediada por enzimas endógenas de productos lácteos. Este proceso se puede realizar por enzimas de la microflora nativa en el producto o la adición intencional de enzimas exógenas³⁵. Dependiendo del grado y especificidad de la hidrólisis, la grasa de leche modificada enzimáticamente exhibirá distintas notas de sabor, mantequilla, queso, crema, etc. Las grasas de leche hidrolizada por enzimas lipolíticas o grasas de leche lipolizada (LMF) ha llegado a ser por consiguiente un importante ingrediente en la industria alimentaria³⁶. Algunos de sus usos actuales y potenciales son adición a los productos de panadería, cereales, dulces, productos lácteos, palomitas de maíz saborizadas, aderezos de ensaladas, botanas, etc. Regado *et al.*³⁶ realizaron un análisis de la hidrólisis parcial de grasas de leche de vaca, ovejas y cabras empleando lipasas microbianas y la cutinasa de *Fusarium solani pisi*. Los ácidos grasos liberados fueron analizados por HPLC. El grado de hidrólisis y el perfil de los ácidos grasos de los productos finales fueron similares a los reportados en varios productos LMF.

Síntesis de aromas

Los ésteres de ácidos grasos son componentes importantes de aromas naturales usados en la industria de los alimentos. Por ejemplo, etil butirato e isoamil acetato son compuestos encontrados en el aroma de fresas y bananas, respectivamente³⁷. Estos ésteres son obtenidos tradicionalmente por extracción de fuentes naturales, fermentación o síntesis química³⁸. Sin embargo, estos métodos suelen ser costosos o de bajo rendimiento. Con el creciente interés por los productos "naturales", la industria del sabor está cada vez más interesada en el empleo de la biotecnología para la producción de estos compuestos, particularmente por métodos enzimáticos. La síntesis de ésteres mediante reacciones de síntesis directa en solventes orgánicos o transesterificación catalizadas por enzimas lipolíticas ha sido ampliamente reportada³⁴. La cutinasa recombinante de *F. solani pisi* fue empleada para catalizar la reacción de transesterificación de butil acetato con hexanol para la obtención de hexil acetato, un éster de cadena corta con aroma frutal. Algunos parámetros relevantes para la actividad de la enzima como el contenido de agua, temperatura, molaridad del buffer, pH, surfactantes y concentraciones de hexanol y butil acetato fueron analizados mediante diseño factorial³³. El empleo de cutinasas en reacciones de transesterificación de etanol y ácidos grasos de cadena corta (C2-C6) en medio orgánico también ha sido estudiada³⁹.

Lipofilización de antioxidantes naturales

Los antioxidantes en alimentos retardan la rancidez causada por oxidación atmosférica protegiendo así a los lípidos y los compuestos liposolubles como vitaminas o carotenoides. Muchos compuestos han sido usados como antioxidantes en alimentos, incluyendo principalmente sustancias fenólicas artificiales como el butilhidroxianisol (BHA) y butilhidroxitolueno (BHT), los cuales se ha reportado pueden producir carcinogénesis⁴⁰. Por ello ha habido un gran interés por el uso

de antioxidantes naturales. Los ácidos fenólicos son antioxidantes naturales que están presentes en frutas, vegetales, hierbas aromáticas y especias. Son de interés particular debido a sus propiedades potenciales como antioxidantes, quelantes, antiinflamatorios, antialérgicos, antivirales y anticarcinógenos⁴¹. Los ácidos fenólicos (ferúlico, caféico, cumárico, etc.) generalmente son solubles en agua, por lo que su carácter hidrofílico reduce su efectividad en la estabilización de grasas y aceites⁴⁰. Por lo tanto, la lipofilización o modificación de estos compuestos vía esterificación con moléculas alifáticas (ácidos grasos o alcoholes) se puede emplear como una herramienta para modificar su solubilidad en interfases agua-aceite, aire-aceite manteniendo sus propiedades funcionales originales⁴¹. La esterificación química y enzimática de compuestos fenólicos ha sido reportada por diversos autores⁴². Stamatis *et al.*⁴³ estudiaron la esterificación enzimática de antioxidantes fenólicos naturales como los derivados del ácido benzoico y cinámico con alcoholes alifáticos, monosacáridos y alquilglucósidos empleando varias lipasas, esterasas y cutinasas en medios no acuosos.

Detergentes

La fabricación de detergentes biológicos es una tecnología en rápido crecimiento. Las lipasas, proteasas, amilasas y celulasas son enzimas que se añaden a las formulaciones de detergentes para la remoción de grasas, proteínas, carbohidratos, etc.³⁴ El uso de cutinasas en formulaciones de detergentes para lavandería y lavaplatos ha sido evaluado^{44,45}. La cutinasa presentó algunas ventajas en comparación con la lipasa comercial (LipolaseTM) en la remoción de triacilgliceroles en un solo proceso de lavado, así como en la hidrólisis de grasas en ausencia de calcio⁴⁵.

Degradación de insecticidas, ftalatos y polímeros sintéticos

Insecticidas

El malatión es un insecticida y acaricida organofosforado sintético utilizado para el control de insectos en campos de cultivo, frutas, vegetales y ganado, y también ampliamente usado como sustituto del DDT⁴⁶. Éste, o sus residuos expuestos en el ambiente son absorbidos rápidamente por prácticamente todas las rutas incluyendo el aparato gastrointestinal, la piel, las membranas mucosas y los pulmones⁴⁷. A partir de pruebas en animales y por la práctica en su uso se ha demostrado que afecta el sistema nervioso central de invertebrados, sistema inmune de cierta fauna vertebrada, y las glándulas suprarrenales, hígado y sangre de pescados^{48,49}. El malatión también puede ocasionar mutaciones perceptibles en diversos tipos de células humanas cultivadas, incluyendo glóbulos blancos y células linfáticas⁵. El empleo de cutinasas y esterasas en la degradación de malatión ha sido evaluado. Kim *et al.*² reportaron que la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisii* degradó 50 y 60% de la cantidad inicial de malatión en 15 y 30 minutos de reacción respectivamente.

Ftalatos

Los ftalatos son compuestos químicos usados principalmente en la fabricación de cloruro de polivinilo y a menudo en pinturas, lacas y cosméticos⁵. El dihexil ftalato (DHP), uno de los ftalatos más usados, también se utiliza en la elaboración de juguetes, guantes de vinilo, collares, zapatos y bandas transportadoras que se utilizan en operaciones del envasado de alimentos^{50,51}. Los ftalatos han sido encontrados en sedimentos, agua y aire, y también en alimentos, ya que ellos pueden migrar del material de empaque^{51,52}. El di-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP), *n*-benzil butil ftalato (BBP) y DHP son ésteres ftálicos que están presentes principalmente en los materiales de empaquetado (papeles, cartulinas) para alimentos acuosos grasos y secos^{51,52}. Durante los últimos años, los ftalatos de ocurrencia más común incluyendo el DHP, fueron clasificados como contaminantes y compuestos interruptores endocrinos (EDCs) conocidos por su efecto potencial sobre la salud humana al interferir con las hormonas endógenas del cuerpo⁵³. Considerando la importancia de la búsqueda de biocatalizadores que sean efectivos en la degradación de ftalatos presentes en el ambiente y la estimación de la toxicidad de sus productos de degradación, se ha investigado la eficacia de la cutinasa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* en la degradación de los ftalatos DEHP, DHP, BBP, DPePy y DPRP^{50-52,54,55}.

Polímeros sintéticos

Los polímeros son de gran importancia y su producción ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, el excesivo consumo de plásticos sintéticos derivados del petróleo ha tenido un impacto adverso en el medio ambiente debido a que la mayoría de estos plásticos sintéticos no se degrada en el ambiente⁵⁶. Por esta razón, el desarrollo de polímeros o compuestos biodegradables, se presenta como una solución a la conservación del medio ambiente y al impulso de nuevas aplicaciones. A la fecha, se han desarrollado algunos tipos de poliésteres biodegradables como el poli-(ácido láctico) (PLA), poli(butileno-succinato) (PBS), poli-(butileno succinato-co-adipato) (PBSA) y poli-(caprolactona) (PCL), sin embargo, su costo de producción sigue siendo elevado comparado con los plásticos sintéticos no degradables^{4,57}. Una comprensión de los mecanismos por los cuales los polímeros sintéticos naturales o sintéticos son degradados por las enzimas microbianas sería útil en el diseño de nuevos plásticos degradables. Las cutinasas son enzimas capaces de hidrolizar una amplia variedad de ésteres sintéticos; la degradación de plásticos biodegradables ha sido reportada para las cutinasas de los microorganismos *F. solani* f. sp. *pisi*, *Pseudozyma jejuensis* sp. nov., *Aspergillus oryzae* y *Cryptococcus* sp.^{4,16,57,58}.

Producción de biodiesel

El biodiesel se ha convertido en un combustible alternativo en lo referente a los recursos energéticos tradicionales basados en combustibles fósiles, debido a la disminución de las reservas y aumento en el precio del petróleo, así como su contribución a la

conservación del medio ambiente⁵⁹. El biodiesel es un combustible renovable, biodegradable y no tóxico que se obtiene principalmente a partir de aceites vegetales o grasa animal mediante el proceso de transesterificación. Químicamente se describe como ésteres monoalquílicos de ácidos grasos de cadena corta o larga⁶⁰. Se obtiene por transformación de triacilglicerol en alquil ésteres de ácido graso en presencia de un alcohol^{59,60}. A la fecha se han desarrollado varios procesos para la producción de biodiesel empleando ácidos, álcalis o enzimas como catalizadores de la reacción de transesterificación. Si bien es cierto que a nivel industrial se emplea la catálisis alcalina para la producción de biodiesel, hoy en día la catálisis enzimática ha ganado mucha atención⁵⁹. Se han reportado diversos estudios empleando enzimas lipolíticas, principalmente lipasas en reacciones de transesterificación para la producción de biodiesel⁶⁰. Sin embargo, las reacciones de transesterificación también se han evaluado usando esterases y cutinasas empleando varios sistemas⁶¹. La cutinasa de *F. solani pisi* fue usada para catalizar la reacción de transesterificación entre una mezcla de triacilglicéridos y metanol en micelas reversas de bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) en isooctanato con el propósito de producir biodiesel⁵. Los estudios se realizaron por lotes en pequeña escala, se estudió la influencia de la concentración inicial de enzima y alcohol, y la relación molar del sustrato. Conversiones de 75 % fueron obtenidas con tiempos de reacción de 24 horas, lo cual hace el proceso enzimático altamente competitivo cuando se compara con reacciones similares catalizadas por lipasas para la producción de biodiesel empleando metanol.

PRODUCCIÓN

Microorganismos productores

Las cutinasas son enzimas hidrolíticas cuya producción se descubrió en hongos fitopatógenos que crecían en medios conteniendo cutina como única fuente de carbono¹⁸. Las primeras cutinasas que se aislaron fueron del hongo fitopatógeno *F. solani* f. sp. *pisi*¹⁴. Posteriormente, se reportó la producción de cutinasas en polen de plantas¹⁷, bacterias¹⁵, levaduras¹⁶ e incluso en hongos no patógenos^{62,63}, sin embargo, a la fecha los hongos fitopatógenos se siguen considerando como los principales productores de cutinasas. Algunos de los microorganismos productores de cutinasas son listados en la Tabla I.

Medio y condiciones de producción

La producción de enzimas es afectada por diversos factores como concentración y tipo de nutrientes, así como condiciones de crecimiento del microorganismo (temperatura, pH, velocidad de agitación, etc.). Las cutinasas microbianas son producidas en su mayoría en medios de cultivos sumergidos, sin embargo, también se ha empleado el método de fermentación en estado sólido⁶⁴. El efecto de la fuente de carbono, nitrógeno, así como iones divalentes ha sido analizado en la producción de cutinasas⁶⁵⁻⁶⁷. En general, éstas suelen ser inducidas cuando se usa cutina o hidrolizado de ésta como fuente de carbono, e inhibidas por glucosa¹³. Con respecto a las condiciones de

cultivo del microorganismo, se han evaluado temperatura⁶⁸ y pH⁶⁹, aunque existen muy pocos reportes en la literatura.

Efecto de nutrientes sobre la producción de enzimas

Las cutinasas son enzimas extracelulares generalmente inducidas por la presencia de cutina, monómeros de cutina o análogos de éstos en el medio de cultivo^{13,14} sin embargo, esto varía dependiendo del microorganismo analizado. *F. solani* f. sp. *pisi* produce una cutinasa extracelular cuando se cultiva empleando cutina o hidrolizado de cutina¹³. Cuando la cutinasa se indujo empleando el hidrolizado, se observó que los α -hidroxi ácidos grasos fueron más eficientes en la inducción que los ácidos más polares de la cutina. Los alcoholes primarios *n*-alifáticos con 14 o más átomos de carbono también indujeron a la enzima¹³. Las cutinasas de *Glomerella cingulata*¹⁵ y *Botrytis cinerea*²⁰ también fueron expresadas después del crecimiento del microorganismo en presencia de cutina o monómeros de cutina como inductores. Por el contrario, las cutinasas de *Pseudomonas putida*¹⁵, *Thermonospora fusca* ATCC 27730⁶⁸ y *Thermoactinomyces vulgaris* NRLL B-16117⁷¹ sólo se producen en presencia de cutina debido a que, los hidrolizados de cutina o ácidos grasos individuales fueron inactivos como inductores de la producción de la enzima y en algunos casos inhibidores del crecimiento del microorganismo. En el hongo *Alternaria brassicicola* se encontraron dos clases de cutinasas^{23,72}. La primera solamente fue expresada por contacto con cutina y no fue inducida por cera superficial o monómeros de cutina, en contraste, la segunda clase únicamente fue inducida por monómeros de cutina o por una prolongada exposición a la cutina intacta^{23,72}. La cantidad de cutinasa producida también es afectada por la fuente y concentración de cutina. La cutina de las frutas *Cucurbita maxima*, *Cucurbita moschata* y manzana "Grannysmith" fueron usadas para inducir la actividad cutinolítica en dos cepas de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*⁷³. La actividad fue inducida a diferentes niveles por las tres cutinas en cada cepa. La cepa que produjo mayor actividad fue la SAM410 con cutina de *C. moschata*, mientras que la cepa PGB153 alcanzó su máxima actividad con cutina de *C. maxima*. En ambos casos la menor actividad se obtuvo empleando la cutina de manzana como inductor⁷³. Con respecto a la concentración de cutina, se analizaron concentraciones de 0.1, 0.5, 2.5 y 5 g/L, observando un incremento en la actividad producida con el aumento de concentraciones de cutina de hasta 2.5 g/L⁷³.

Una de las principales desventajas del empleo de cutina como inductor de cutinasas es el alto consumo de tiempo y bajo rendimiento del proceso de producción, por lo que se han buscado alternativas a la cutina en la producción de cutinasas⁷⁴. Se han explorado varias fuentes de carbono como glúcidos, ácidos grasos, aceites, así como fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas. Se ha observado que la adición de glucosa al

Fuente	Género	Especie	Referencia
Hongos	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>	19
		<i>brassicicola</i>	8
	<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i>	57
	<i>Botrytis</i>	<i>cinerea</i>	24
	<i>Colletotrichum</i>	<i>gloeosporioides</i>	20
		<i>lagenarium</i>	25
		<i>lindemuthianum</i>	66
	<i>Fusarium</i>	<i>solani</i>	6
		<i>oxysporum</i>	2
	<i>Glomerella</i>	<i>cingulata</i>	12
<i>Trichoderma</i>	<i>harzianum</i>	63	
<i>Venturia</i>	<i>inaequalis</i>	22	
Bacterias	<i>Streptomyces</i>	<i>scabies</i>	67
	<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	15
		<i>aeruginosa</i>	68
	<i>Thermonospora</i>	<i>fusca</i>	65
	<i>Thermoactinomyces</i>	<i>vulgaris</i>	71
	<i>Thermobifida</i>	<i>fusca</i>	69
Levaduras	<i>Cryptococcus</i>	sp.	58
	<i>Pseudozyma</i>	<i>jejuensis</i>	16
Plantas	<i>Tropaeolum</i>	<i>majus</i>	17

Tabla 1. Algunas fuentes de cutinasas.

medio de cultivo inhibe la producción de las cutinasas^{12,13,65}, sin embargo, para la cutinasa de *Colletotrichum lindemuthianum* se obtuvieron concentraciones óptimas de glucosa para la máxima producción de la enzima⁶⁶. La adición de glúcidos como fructosa, maltosa, galactosa, lactosa y sacarosa disminuyeron la producción de cutinasa de *Fusarium oxysporum*⁷⁴, mientras que los ácidos y aceites analizados incrementaron la actividad de la cutinasa secretada por el hongo, el mejor resultado se obtuvo empleando aceite de linaza, cuyo valor fue incluso más alto que el obtenido con cutina. En el caso de la cutinasa de *Thermonospora fusca*, la adición de ácidos grasos o aceite provocó la inhibición del crecimiento del microorganismo⁶⁵. Con respecto a la fuente de nitrógeno, se han obtenido buenos resultados empleando extracto de levadura en la producción de las cutinasas de *F. oxysporum*⁷⁴ y *C. lindemuthianum*⁷⁵.

Del mismo modo, se ha explorado con éxito el empleo de pulpa de manzana, cáscaras de tomate y papa en la producción de cutinasas^{65,71}. Éstos se consideran subproductos agrícolas usados principalmente para alimentación animal, por lo que representan un potencial como inductores de bajo costo para la producción comercial de cutinasas microbianas vía fermentación.

Finalmente, además de las desventajas del uso de cutina como inductor antes mencionadas, en algunas ocasiones la producción

durante el ciclo catalítico la cutinasa experimenta un cambio conformacional orientando a la His 204 de una conformación inactiva a una conformación activa, en la cual la triada asume una configuración clásica⁷⁹.

La reactividad, estabilidad y estructura de la cutinasa de *Aspergillus oryzae* fue comparada con la de *F. solani*⁸¹. La cutinasa de *A. oryzae* es una proteína monomérica con un plegamiento α/β compuesto de una lámina- β de cinco cadenas paralelas rodeadas por 10 hélices- α . Esta enzima posee un sitio activo compuesto de los residuos Ser 126, Asp 181, e His 194 de la triada catalítica⁸¹. La comparación de las estructuras reveló que ambas cutinasas tienen un plegamiento similar. Sin embargo, la enzima de *A. oryzae* presenta varias características estructurales que difieren significativamente de la de *F. solani*. La estructura de la cutinasa de *A. oryzae* contiene un único puente disulfuro entre Cys63 y Cys76 que enlaza la hélice 2 con la cadena 2 de la lámina- β central. Este puente disulfuro no había sido reportado previamente en ninguna estructura de cutinasas⁸¹. Los otros dos enlaces disulfuro que presenta la estructura de la cutinasa de *A. oryzae* entre Cys37-Cys115 y Cys177-Cys184 se conservan en las estructuras de las otras cutinasas reportadas^{6,79,81}. Además se encontró que las enzimas de *A. oryzae* y *F. solani* presentan diferencias en la actividad y especificidad, lo cual se esclareció mediante el detalle molecular provisto por la estructura. La cutinasa de *A. oryzae* hidroliza preferentemente sustratos de cadena larga lo cual se debe a un surco profundo continuo que se extiende a través del sitio activo, mientras que la de *F. solani* que tiene mayor preferencia por sustratos de cadena corta presenta un surco bajo e interrumpido⁸¹. En la comparación de termorresistencia, los experimentos de termoactividad y termodinámica mostraron mayor termorresistencia de la cutinasa de *A. oryzae*, atribuida al puente disulfuro adicional que presenta la estructura de esta enzima comparada con la de *F. solani*⁸¹.

CONCLUSIONES

Las cutinasas son enzimas producidas principalmente por hongos fitopatógenos, cuya relación con la patogenicidad del microorganismo y su efecto en la invasión al huésped sigue en controversia.

Las cutinasas tienen propiedades catalíticas muy versátiles con un gran potencial en aplicaciones biotecnológicas. El uso de estas enzimas en biocatálisis es un área emergente que ha generado resultados interesantes, por lo que resulta necesaria la búsqueda de nuevas enzimas, así como profundizar en el estudio de sus aplicaciones a nivel industrial y generar rutas alternativas para la producción de compuestos químicos interesantes con el uso de éstas. Por otra parte, es importante también estudiar la inmovilización de cutinasas con el fin de obtener biorreactores enzimáticos que puedan ser escalables a nivel industrial.

La aplicación industrial de las cutinasas requiere la sobreexpresión

de la proteína, ya sea en la cepa silvestre o bien en un sistema heterólogo. Por lo que es necesario intensificar los estudios sobre desarrollo de procesos y sistemas de biorreactores para la producción de estas enzimas.

El conocimiento de las relaciones estructura-función de enzimas permite, a través de técnicas de mutagénesis o evolución dirigida, la generación de nuevos biocatalizadores adaptados a las condiciones utilizadas en los procesos industriales. Existen pocas estructuras elucidadas de cutinasas, por lo que la resolución de la estructura tridimensional de nuevas enzimas es una herramienta muy importante y necesaria para tal efecto.

AGRADECIMIENTOS

PAPIIT-DGAPA-UNAM: Proyecto IN2148092 por los recursos financieros otorgados para la realización de investigación en esta área.

REFERENCIAS

1. Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R. & Cabral, J.M.S. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* **66**(1), 17-34 (1999).
2. Kim, Y.H., Ahn, J.Y., Moon, S.H. & Lee, J. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Chemosphere* **60**, 1349-1355 (2005).
3. Kim, H.Y., Lee, J., Ahn, J.Y., Gu, M.B. & Moon, S.H. Enhanced degradation of an endocrine-disrupting chemical, butyl benzyl phthalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**(9), 4684-4688 (2002).
4. Murphy, C.A., Cameron, J.A., Huang, S.J. & Vinopal, R.T. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**(2), 456-460 (1996).
5. Badenes, S.M., Lemos, F. & Cabral, J.M.S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnol. Lett.* **32**, 399-403 (2010).
6. Martínez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Mathyssens, G. & Cambillau, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. *Nature* **356**, 615, 618 (1992).
7. Araujo, R. et al. Tailoring cutinase activity towards polyethylene terephthalate and polyamide 6, 6 fibers. *J. Biotechnol.* **128**, 849-857 (2007).
8. Koschorreck, K., Liu, D., Kazenwadel, C., Schmid, R.D. & Hauer, B. Heterologous expression, characterization and site-directed mutagenesis of cutinase CUTAB1 from *Alternaria brassicicola*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **87**, 991-997 (2010).
9. Brissos, V., Eggert, T., Cabral, J.M. & Jaeger, K.E. Improving activity and stability of cutinase towards the anionic detergent AOT by complete saturation mutagenesis. *Protein Eng. Des. Sel.* **21**, 387-393 (2008).
10. Taiz, L. & Zeiger, E. *Plant physiology* (Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 2002).
11. Walton, T.J. & Kolatukudy, P.E. Determination of the structure of cutin monomers by a novel depolymerization procedure and combined gas chromatography and mass spectrometry. *Biochemistry* **11**(10), 1885-1897 (1972).

12. Farah Diba, A.B. *et al.* Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*. *Asia Pacific J. Biol. Biotechnol.* **13**(2), 63-69 (2005).
13. Lin, T.S. & Kolattukudy, P.E. Induction of a Biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisi*. *J. Bacteriol.* **133**(2), 942-951 (1978).
14. Purdy, R.E. & Kolattukudy, P.E. Hydrolysis of plant cuticle by plant pathogens. Purification, aminoacid composition, and molecular weight of two isozymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani* f. *pisi*. *Biochemistry* **14**(13), 2824-2831 (1975).
15. Sebastian, J., Chandra, A.K., Kolattukudy, P.E. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in the phyllosphere. *J. Bacteriol.* **169**(1), 131-136 (1987).
16. Seo, H.S. *et al.* *Pseudozyma jajuensis* sp. nov., a novel cutinolytic ustilaginomycetous yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Res.* **7**(6), 1035-1045 (2007).
17. Shayk, M. & Kolattukudy, P.E. Production of a novel extracellular cutinase by the pollen and the chemical composition and ultrastructure of the stigma cuticle of nasturtium (*Tropaeolum majus*). *Plant Physiol.* **60**, 907-915 (1977).
18. Purdy, R.E. & Kolattukudy, P.E. Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. *pisi* isolation and some properties of the enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* **159**, 61-69 (1973).
19. Tanabe, K., Nishimura, S. & Kohmoto, K. Pathogenicity of cutinase and pectic enzymes-deficient mutants of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **54**, 552-555 (1988).
20. Dickman, M.B. & Patil, S.S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are nonpathogenic to papaya fruit. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **28**, 235-242 (1986).
21. Dickman, M.B., Podila, G.K. & Kolattukudy, P.E. Insertion of cutinase gene into a wound pathogen enables it to infect intact host. *Nature* **342**, 446-448 (1989).
22. Köller, W., Parker, D.M. & Becker, C.M. Role of cutinase in the penetration of apple leaves by *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **81**, 1375-1379 (1995).
23. Yao, C. & Köller, W. Diversity of cutinase from plant pathogenic fungi different cutinases are expressed during saprophytic and pathogenic stages of *Alternaria brassicicola*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**, 122-130 (1995).
24. van Kan, J., van 't Klooster, J., Wagemakers, C., Dees, D. & van der Vlugt-Bergmans, C. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and potato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**(1), 30-38 (1997).
25. Boumen, A.M. & Hammerschmidt, R.N. Role of cutinolytic enzymes in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **35**(6), 475-481 (1989).
26. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
27. Fojan, P., Jounson, P.H., Petersen, M.T.N. & Petersen, S.B. What distinguishes an esterase from a lipase: a novel structural approach. *Biochimie* **82**, 1033-1041 (2000).
28. Peña-Montes, C., González, A., Castro-Ochoa, D. & Farrés, A. Purification and biochemical characterization of a broad substrate specificity thermostable alkaline protease from *Aspergillus nidulans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**(4), 603-612 (2008).
29. Córdova, J., Ryan, J.D., Boonyaratanakornkit, B.B. & Clark, D.S. Esterase activity of bovine serum albumin up to 160 °C: a new benchmark for biocatalysis. *Enzyme Microb. Technol.* **42**, 278-283 (2008).
30. Bomscheuer, W.T. Microbial carboxyl esterase: classification, properties and applications in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 73-81 (2002).
31. Flipsen, J.A.C., van der Hijden, H.T.W.M. & Verheij, H.M. Action of cutinase at the triolein-water interface. Characterization of interfacial effects during lipid hydrolysis using the oil-drop densitometer as a tool to lipase kinetics. *Chem. Phys. Lipids* **84**, 105-115 (1996).
32. Gonçalves, A.M. *et al.* Stability studies of a recombinant cutinase immobilized to dextran and derivatized silica supports. *Enzyme Microb. Technol.* **24**(1-2), 60-66 (1999).
33. Carvalho, C.L.M., Serralheiro, M.L.M., Cabral, J.M.S. & Aires-Barros, M.R. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. *Enzyme Microb. Technol.* **21**(2), 117-123 (1997).
34. Sharma, R., Chisti, Y. & Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol. Adv.* **19**(8), 627-662 (2001).
35. Pio, T.F. & Macedo, G.A. Cutinases: properties and industrial applications. *Adv. App. Microbiol.* **66**, 77-95 (2009).
36. Regado, M.A. Flavour development via lipolysis of milkfats: changes in free fatty acid pool. *Int. J. Food Sci. Technol.* **42**, 961-968 (2007).
37. Langrand, G., Triantaphylides, C. & Barrati, J. Lipases catalyzed formation of flavour esters. *Biotechnol. Lett.* **10**(8), 549-554 (1988).
38. Welsh, W.W., Murray, W.D. & Williams, R.E. Microbiological and enzymatic production of flavor and fragrance chemicals. *Crit. Rev. Biotechnol.* **9**, 105-169 (1989).
39. Barros, D.P.C., Fonseca, L.P. & Cabral, J.M.S. Cutinase-catalyzed biosynthesis of short chain alkyl esters. *J. Biotechnol.* **131**, 109-110 (2007).
40. Stamatis, H., Sereti, V. & Kolisis, F.N. Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **76**(12), 1505-1510 (1999).
41. Figueroa-Espinoza, M.C. & Villeneuve, P. Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2779-2787 (2005).
42. Peña-Montes, C. *et al.* Differences in biocatalytic behavior between two variants of StcI esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **61**(3-4), 225-234 (2009).
43. Stamatis, H., Sereti, V. & Kolisis, F.N. Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **11**, 323-328 (2001).
44. Kolattukudy, P. *et al.* Cutinase cleaning compositions. US patent 4,981,611 (1991).
45. Flipsen, J.A.C., Appel, A.C.M., van der Hijden, H.T.W.M. & Verrips, C.T. Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. *Enzyme Microb. Technol.* **23** (3-4), 274-280 (1998).
46. Rettich, F. Residual toxicity of wall-sprayed organophosphates, carbamates, and pyrethroids to mosquito. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **24**, 110-117 (1980).

47. Indeerjeet, K., Mathur, R.P., Tandon, S.N. & Prem, D. Identification of metabolites of malathion in plant, water and soil by GC-MS. *Biomed. Chromatogr.* **11**, 352-355 (1997).
48. Senanayake, N. & Karalliedde, L. Neurotoxic effects of organophosphorus insecticides. *N. Engl. J. Med.* **316**, 761-763 (1987).
49. El-Dib, M.A., El-Elaimy, I.A., Korb, A. & Elowa, S.H. Activation of in vivo metabolism of malathion in male *Tilapia nilotica*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **57**, 667-674 (1996).
50. Kavlock, R. *et al.* NTP Center for the evaluation of risks to human reproduction: phthalates expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of di-*n*-hexyl phthalate. *Reprod. Toxicol.* **16**, 709-719 (2002).
51. Kim, Y.H. *et al.* Enhanced degradation and toxicity reduction of dibexyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *J. Appl. Microbiol.* **102**, 221-228 (2007).
52. Kim, H.Y., Lee, J. & Moon, S.H. Degradation of an endocrine disrupting chemical, DEHP (di-2-ethylhexyl)-phtalate, by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**(1), 75-80 (2003).
53. Sung, H.H., Kao, W.Y. & Su, Y.J. Effects and toxicity of phthalate esters to hemocytes of giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquat. Toxicol.* **64**, 25-37 (2003).
54. Ahn, J.Y., Kim, Y.H., Min, J. & Lee, J. Accelerated degradation of dipentyl phthalate by *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase and toxicity evaluation of its degradation products using bioluminescent bacteria. *Curr. Microbiol.* **52**(5), 340-344 (2006).
55. Kim, H.Y., Min, J., Bae, K.D., Gu, M.B. & Lee, J. Biodegradation of dipropyl phthalate and toxicity of its degradation products: a comparison of *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* cutinase and *Candida cylindracea* esterase. *Arch. Microbiol.* **184**(1), 25-31 (2005).
56. Huang, S.J. Polymer waste management-biodegradation, incineration, and recycling. *J. Macromol. Sci. Pure A* **32**, 593-597 (1995).
57. Maeda, H. *et al.* Purification and characterization of a biodegradable plastic-degrading enzyme from *Aspergillus oryzae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**, 778-788 (2005).
58. Masaki, K., Kamini, N.R., Ikeda, H. & Iefuji, H. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and others biodegradable plastics. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(11), 7548-7550 (2005).
59. Vasudevan, P.T. & Briggs, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 421-430 (2008).
60. Jeong, G-T. & Park, D-T. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oil for biodiesel production with tert-butanol. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **148**, 131-139 (2008).
61. Cambou, B. & Klibanov, A. Preparative production of optically active esters and alcohols using esterase-catalyzed stereospecific transesterification in organic media. *J. Am. Chem. Soc.* **106**(9), 2687-2692 (1984).
62. Ohnishi, K., Toida, J., Nakazawa, H. & Sekiguchi, J. Genome structure and nucleotide sequence of lipolytic enzyme gene of *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 145-150 (1995).
63. Rubio, M.B., Cardoza, R.E., Hermosa, R., Gutiérrez, S. & Monte, E. Cloning and characterization of the *Thc1J* gene encoding a cutinase of *Trichoderma harzianum* T34. *Curr. Genet.* **54**, 301-312 (2008).
64. Macedo, G. & Fraga, L. Production of cutinase by *Fusarium oxysporum* in solid-state fermentation using agro-industrial residues. *J. Biotechnol.* **131**(2), S212 (2007).
65. Fett, W.F., Wijey, C., Moreau, R.A. & Osman, S.F. Production of cutinase by *Thermospora fusca* ATCC 27730. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 561-568 (1999).
66. Rispoli, F.J. & Shanb, V. Mixture design as a first step for optimization of fermentation medium for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 349-355 (2007).
67. McQueen, D.A.R. & Schottel, J.L. Purification and characterization of a novel Extracellular esterase from pathogenic *Streptomyces scabies* that is inducible by zinc. *J. Bacteriol.* **169**(5), 1967-1971 (1987).
68. Fett, W.F., Gerard, H.C., Moreau, R.A., Osman, S.F. & Jones, L.E. Screening of nonfilamentous bacteria for production of cutin-degrading enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(7), 2123-2130 (1992).
69. Du, G.C. Zhang, S.L., Hua, Z.Z., Zhu, Y. & Chen, J. Enhanced cutinase production with *Terrobifida fusca* by two-stage pH control strategy. *Biotechnol. J.* **133**, 942-951 (2007).
70. van der Vlugt-Bergmans, C.J.B., Wagemakers, C.A.M. & van Kan, J.A.L. Cloning and expression of the Cutinase A gene of *Borytis cinerea*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**(1), 21-29 (1997).
71. Fett, W.F., Wijey, C., Moreau, R.A. & Osman, S.F. Production of cutinolytic esterase by filamentous bacteria. *Let. Appl. Microbiol.* **31**, 25-29 (2000).
72. Fan, C-Y. & Köller, W. Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression if cutinolytic esterase by *Alternaria brassicicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* **158**, 33-38 (1998).
73. Hawthorne, B.T., Rees-George, J. & Crowhurst, R.N. Induction of cutinolytic esterase activity during saprophytic growth of cucurbit pathogens, *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* races one and two (*Nectria haematococca* MPI and MPV, respectively). *FEMS Microbiol. Lett.* **194**, 135-141 (2001).
74. Pio, T.F. & Macedo, G. A. Optimizing the production of cutinase by *Fusarium oxysporum* using response surface methodology. *Enzyme Microb. Technol.* **41**, 613-619 (2007).
75. Rispoli, F. & Shanb, V. Optimization of the media ingredients for cutinase production from *Colletotrichum lindemuthianum* using mixture design experiments. *Biotechnol. Prog.* **24**, 648-654 (2008).
76. Griswold, K.E., Mahmood, N.A., Iverson, B.L. & Georgiou, G. Effects of codon usage versus putative 5'-mRNA structure on the expression of *Fusarium solani* cutinase in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Protein Exp. Purif.* **27**, 134-142 (2003).
77. Calado, C.R., Almeida, C., Cabral, J.M. & Fonseca, L.P. Optimisation of culture conditions and characterization of cutinase produced by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* **31**, 161-170 (2002).
78. <http://www.pdb.org>
79. Nyon, M.P. *et al.* Catalysis by *Glomerella cingulata* cutinase requires conformational cycling between the active and inactive states of its catalytic triad. *J Mol Biol* **385**, 226, 235 (2009).
80. Kodama, *et al.* Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. strain S-2. *Proteins* **77**, 710-717 (2009).
81. Liu, *et al.* Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of

- synthetic ester and polyester degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **131**(43), 15711-15716 (2009).
82. Longhi, S., Czjzek, M., Lamzin, V., Nicolas, A. & Cambillau, C. Atomic Resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. *J. Mol. Biol.* **268**, 779-799 (1997).
83. Ollis, D.L. et al. The α/β hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**(3), 197-211 (1992).
84. Nardini, M. & Dijkstra, B.W. α/β hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 732,737 (1999).
85. Egmond, M.R. & de Vlieg, J. *Fusarium solani* cutinase. *Biochimie* **82**, 1015-1021 (2000).
86. Longhi, S. & Cambillau, C. Structure-activity of cutinase, a small lipolytic enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* **1441**, 185-196 (1999).
87. Kazlauskas, R.J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. *BIBTECH* **12**, 464-472 (1994).
88. Jaeger, J.E., Dijkstra, B.W. & Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315-351 (1999).
89. Kraut, J. Serine proteases: structure and mechanisms of catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 331-358 (1977).

Appl Biochem Biotechnol (2012) 166:1275–1290
DOI 10.1007/s12010-011-9513-7

ANCUT2, an Extracellular Cutinase from *Aspergillus nidulans* Induced by Olive Oil

Denise Castro-Ochoa · Carolina Peña-Montes ·
Augusto González-Canto · Ana Alva-Gasca ·
Ricardo Esquivel-Bautista · Arturo Navarro-Ocaña ·
Amelia Farrés

Received: 3 October 2011 / Accepted: 20 December 2011 /
Published online: 12 January 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract Cutinases are versatile carboxylic ester hydrolases with great potential in many biocatalytic processes, including biodiesel production. Genome sequence analysis of the model organism *Aspergillus nidulans* reveals four genes encoding putative cutinases. In this work, we purified and identified for the first time a cutinase (ANCUT2) produced by *A. nidulans*. ANCUT2 is a 29-kDa protein which consists of 255 amino acid residues. Comparison of the amino acid sequence of ANCUT2 with other microbial cutinase sequences revealed a high degree of homology with other fungal cutinases as well as new features, which include a serine-rich region and conserved cysteines. Cutinase production with different lipidic and carbon sources was also explored. Enzyme activity was induced by olive oil and some triacylglycerides and fatty acids, whereas it was repressed by glucose (1%) and other sugars. In some conditions, a 22-kDa post-translational processing product was also detected. The cutinase nature of the enzyme was confirmed after degradation of apple cutin.

Keywords Carboxylesterases · Cutinase · Production · Cutin · *Aspergillus nidulans*

Abbreviations

CEH	Carboxylic ester hydrolase
CEHM	Carboxylic ester hydrolase medium
h	Hours
RT	Room temperature

D. Castro-Ochoa · C. Peña-Montes · A. Alva-Gasca · R. Esquivel-Bautista · A. Navarro-Ocaña ·
A. Farrés (✉)
Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria,
Mexico City D.F. 04510, Mexico
e-mail: farres@unam.mx

A. González-Canto
Department of Experimental Medicine, Faculty of Medicine,
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Hospital General de México,
Dr. Balmis, 148, México City D.F. 06726, Mexico

ATR	Attenuated total reflectance
DMSO	Dimethyl sulfoxide
NMWCO	Nominal molecular weight cut-off
TLC	Thin-layer chromatography
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS–PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	Polyvinylidene fluoride

Introduction

Carboxylic ester hydrolases (EC 3.1.1.x) (CEH) are a diverse group of hydrolases which split carboxylic acid ester present in different types of molecules and include carboxylesterases (EC 3.1.1.1), lipases (EC 3.1.1.3), and cutinases (EC 3.1.1.74) besides other enzymes [1]. Cutinases are enzymes that catalyze the degradation of the insoluble biopolyester cutin, a structural component of plants formed primarily from C₁₆ and C₁₈ hydroxy and epoxy fatty acids [2]. These enzymes are also able to hydrolyze a wide variety of synthetic esters (e.g., *p*-nitrophenylesters) and triacylglycerols. Thus, cutinases have common features both with esterases and lipases [3].

CEH are extremely versatile because they catalyze not only hydrolysis reactions in aqueous media but they can also catalyze synthesis reactions in non-conventional media. They exhibit interesting properties including substrate, stereo-, region, and chemoselectivity, making them useful as biocatalysts in several industrial processes [3–6]. Their major application in terms of volume is as additives for laundry detergents. However, CEH have also been used in the food and flavor industry, in the biocatalytic resolution of pharmaceuticals, synthesis of ester and amino acid derivatives, the production of fine chemicals, and agrochemicals; they have also been used in biosensors, in bioremediation, and in the cosmetics and fragrances sector [3–6]. Furthermore, in the last few years, several works that illustrate the importance of transesterification reactions catalyzed by lipases and cutinases for biodiesel production have been published [7–9]. The demand for highly active preparations of CEH enzymes has led to focus research on the producer microorganisms, including culture strategies. *Aspergillus nidulans* is a saprophytic filamentous fungus that has been used as a model organism in genetics and is able to conduct a wide variety of extracellular enzymatic activities. The *A. nidulans* genome contains many putative CEH (*Aspergillus* comparative genome database); however, only a few enzymes have been described in detail [10–13]. Little is known about how CEH production is regulated, their physiological importance, or the overall features of these enzymes. We have previously reported that *A. nidulans* produces three proteins that have CEH activity when grown in a medium with olive oil (CEHM) that was designed to induce lipase production. One of these enzymes had a molecular weight of 37 kDa, and was purified and identified as the alkaline protease encoded by the *prtA* gene while the other two esterases remained unidentified [14].

In this study, we analyzed the effects of olive oil, triacylglycerides, fatty acids, and carbon and nitrogen sources on CEH production by *A. nidulans* in the extracellular medium. We report that lipidic compounds can induce CEH production in *A. nidulans*. A novel *A. nidulans* cutinase, AN CUT2, was purified and determined to be the primary CEH produced by the fungus under the conditions we tested. Additionally, we identified a post-translational processing product of AN CUT2 in the same culture media, a 22-kDa protein.

Materials and Methods

Microorganism and Maintenance

A. nidulans PW1 (*bia1*, *argB2*, *methG1*, *veA1*) was donated by Dr. Jesús Aguirre (Institute of Cell Physiology, UNAM) and maintained in silica gel stocks. Conidial suspensions were generated after growth on minimal nitrate agar with the appropriate supplements, as previously described by Käfer (1977) and Kawasaki et al. (1995) [10, 15].

Media and Culture Conditions

Minimal Nitrate Medium (MM)

The composition of basal medium was 1.0% glucose, 0.6% NaNO₃, 0.052% KCl, 0.052% MgSO₄·7H₂O, 0.152% KH₂PO₄, 0.0025% biotin, methionine, 0.084% arginine and a trace elements solution. The pH was adjusted to 6.5 [15].

Carboxylic Ester Hydrolase Medium (CEHM)

CEHM was prepared as a minimal nitrate medium with the following modifications: 1.5% starch was added as a carbon source instead of glucose, 0.5% yeast extract was used as an organic nitrogen source, and 0.5% olive oil was added as an inducer [14].

Culture Conditions

All experiments were conducted in 250-mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of sterile culture medium. The medium was inoculated with 1×10^6 spores/mL. The flasks were incubated at 37°C for 24 h on a rotary shaker (300 rpm).

Nutritional Factors Affecting Carboxylic Ester Hydrolase Production

To determine the effects of triacylglycerides and fatty acids on extracellular CEH production, the olive oil in the CEHM was substituted with triacylglycerides and fatty acids with chain lengths of C₂–C₁₈, at a final concentration of 0.1% or 0.5% (w/v). CEHM without olive oil was used as a control.

To determine the optimal inducer concentration, CEHM medium was modified with olive oil at different concentrations, keeping all other components at the same concentration. The inducer was added at 0.1%, 0.5%, and 1% (v/v).

The effect of carbon sources on CEH production was also analyzed. To accomplish this, starch (1.5% w/v) in CEHM, which serves as the carbon source, was substituted with glucose, sucrose, glycerol, and starch at 0.5% or 1% (w/v). CEHM medium without starch was used as a control.

Enzymatic Assays

Carboxylic Ester Hydrolase Activity

Activity was assayed using 0.1 mL of enzyme (suitably diluted), 0.8 mL of 0.05 M phosphate buffer (pH 7.5), and 0.1 mL of 0.01 M *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL) in ethanol

as substrate. The hydrolytic reaction was carried out at 25°C for 5 min, after which 0.25 mL of 0.1 M Na₂CO₃ was added. The mixture was centrifuged and the released *p*-nitrophenol (*p*-NP) was immediately quantified by measuring absorbance at 420 nm. One unit of esterase activity was defined as the amount of enzyme that liberated 1 μmol *p*-NP per minute under assay conditions. A calibration curve of optical density against *p*-NP concentration was used to estimate the formation of *p*-NP. All results are presented as the mean of three assays.

Cutinase Activity

Isolation of Cutin Golden Delicious apple cutin was prepared as described by Walton and Kolattukudy (1972) [16]. Cutin structure was confirmed by infrared spectroscopy. FTIR spectral measurements were conducted at RT with a FTIR Spectrum™ 400 (Perkin Elmer) coupled with ATR. Data were collected at 4 cm⁻¹ resolution.

Cutin Suspension Cutin (0.5 mg) was added to 500 μL of pure different solvents (methanol, acetone, dimethyl formamide, toluene, DMSO) and in 500 μL of the following mixtures 1:1 v/v: water/glycerol, water/butanol, water/*tert*-butanol, ethanol/glycerol, and acetic acid/DMSO. They were incubated in a water bath at 40°C, and mixing was done in vortex before and after incubation. Solubility was evaluated after 1 h by assessing the disappearance of cutin powder.

Enzyme Conditioning for Hydrolysis Reaction Cutinase was produced after the growth of *A. nidulans* in CEHM, according to culture conditions described in “Culture Conditions” section. The crude extract was concentrated 20-fold by ultrafiltration (Amicon, Millipore, MA, USA) using a membrane with NMWCO of 10 kDa. Enzyme activity was evaluated as described in “Carboxylic Ester Hydrolase Activity” section.

Cutinase Stability in Solvents Concentrated cutinase was incubated for 3 h at 37°C, at 100 rpm, in different solvents, each one at 30%, to verify stability before the hydrolysis reaction. Residual enzyme activity was determined as described in “Carboxylic Ester Hydrolase Activity” section.

Cutin Hydrolysis Reaction The cutinase was diluted 2.5-fold in phosphate buffer 0.05 M, pH 7.5. Seven hundred microliters of this solution was used for reactions, and then 5 mg of cutin previously suspended in 300 μL of toluene (100%) was added to achieve a final reaction volume of 1 mL. A blank where cutinase was not added was also evaluated in the same conditions. Reactions were incubated for 72 h at 37°C, at 100 rpm.

Cutin Hydrolysis Evaluation by TLC The hydrolysis products were chromatographed on silica gel 60 with a fluorescent indicator. A petroleum ether–diethyl ether–acetic acid system (60:40:1 v/v) was used as developing solvent. Products were visualized in an UV chamber for TLC at 254 nm (CAMAG) and by spraying with 0.1% solution of dichlorofluorescein.

Identification of Hydrolysis Products The organic phase was extracted with chloroform and filtrated by suction filtration on a Büchner funnel through a 0.45-μm nylon membrane (Whatman) [17]. The solvent was removed by suction and the samples were analyzed by infrared spectroscopy as described above.

Gel Electrophoresis and “In Situ” Activity Detection

SDS–PAGE was carried out using 12% acrylamide gels, as described by Laemmli (1970) [18]. The molecular weight of the proteins was determined by comparing their mobility with that of a mixture of seven proteins ranging in size from 14.4 kDa to 116 kDa (Fermentas).

After protein samples were separated by SDS–PAGE, esterase activity was detected using zymography. The enzymes were renatured by washing the acrylamide gel with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) for 30 min with constant agitation at room temperature. A second wash was performed in same phosphate buffer containing 5% Triton X-100 under the same conditions, and the initial wash step was repeated.

To monitor esterase activity, the gel was submerged for 15 min at room temperature in buffer A [50 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 3 mM α -naphthyl acetate] and then buffer B [50 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 1 mM Fast Red TR base] was added. The reaction was incubated until dark red bands indicating carboxylic ester hydrolase activity appeared in the gel.

Protein Concentration

Protein concentration was determined using the Bradford method (1976) [19] with a commercial protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA), according to the manufacturer’s instructions. Bovine serum albumin was used as the protein standard to construct the calibration curve.

Purification of 29-kDa Carboxylic Ester Hydrolase

A. nidulans was cultivated for 24 h in CEHM and the culture broth was filtered through nylon gauze to remove mycelia. The crude extract was then concentrated by ultrafiltration and stirring in an Amicon Ultrafiltration Cell using an Amicon YM-10 membrane (NMWCO 10 kDa). Enzyme purification was performed by preparative gel electrophoresis using the Prep-Cell system (model 491, Bio-Rad). A 10% acrylamide resolving gel [0.1% (wt/vol) SDS] was prepared and loaded with 2 mL (1 mg/mL protein) of concentrated extract treated with SDS (made up in loading buffer with mercaptoethanol and boiled in water for 2–3 min). Eighty sequential 5-mL fractions were collected; each one was concentrated in an Amicon cell as described above and then analyzed by SDS–PAGE. Proteins were visualized by Coomassie blue staining (0.1% wt/vol) and/or silver staining.

Protein Identification by LC–MS/MS

After the fraction containing the purified carboxyl ester hydrolase was identified, the protein was enzymatically cleaved into small peptide fragments, and the resulting mixture was separated and analyzed by LC–MS system at the Proteomics Unit of the Biotechnology Institute, UNAM. All fractions obtained from the separation were applied into an LC–MS system constituted by an Accela High Speed liquid chromatography system (Thermo Scientific Co.) and a mass spectrometer LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Scientific Co.). The fluid flow speed was maintained to 10 mL/min and reduced to 500 nL by means of a flow splitter, before the nanoelectrospray ionization system (ESI). The applied ionization voltage was 1.7 kV and the temperature of the heating capillary was maintained at 130°C. For the CID and HCD (high-energy collision dissociation), the protein digestion mixture was loaded in a nanospray capillary PicoFrit column (5 mm Biobasic C18, 300 Å pore) from New

Objective (Woburn, MA, USA). The fragmentation source was set at 25 V and the collision energy normalized between 35% and 45%. All the experiments were performed with the wide band activated and the ion detection in the positive mode. The MS/MS spectra from peptides enzymatically generated were analyzed manually and by the SEQUEST software (<http://fields.scripps.edu/sequest/>) and program Matrix science (Mascot Search Result) (<http://www.matrixscience.com>).

Identification of 22-kDa Protein Using Mass Spectrometry

After SDS–PAGE, the protein of 22 which had esterase activity in CEHM was excised from the gel, and the protein was enzymatically cleaved into small peptide fragments; the resulting mixture was separated and analyzed by LC–MS/MS as described above.

Multiple Alignment and Bioinformatics

Comparative and bioinformatics analyses were carried out using the websites <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, <http://www.expasy.ch>, and <http://www.ebi.ac.uk/>. Signal peptide identification was accomplished using SignalPv3 [20]. Prediction of phosphorylation sites was done with NetPhos2 server program [21]. The sequences of cutinases were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database (accession or genomic locus numbers are listed in Fig. 4). Sequence similarity was determined by searching against known protein databases using FASTA3 [22], and multiple sequence alignments were obtained with CLUSTAL W2 [23] using default parameters. A phylogenetic tree was constructed from the CLUSTAL W2 alignments using MEGA, version 4 [24–27].

Results and Discussion

Effects of Triacylglycerides and Fatty Acids on CEH Activity

Lipid and some related lipidic sources usually induce CEH production. In *A. nidulans*, an increase in CEH activity was observed with the addition of middle and long-chain triacylglycerides when compared to the addition of short-chain triacylglycerides. Maximum enzyme activity was obtained with triolein (Table 1). When fatty acids were added, the highest CEH production was obtained with arachidic (C_{20}) and stearic acid (C_{18}). If olive oil was used as inducer, CEH specific activity was 3.2-fold higher, than the activity obtained after addition of triolein at the same concentration (both supplied at 0.5%). Even if triolein is the main component of olive oil, other components, such as palmitic and stearic fatty acids, may also affect enzyme production (Table 1).

In order to identify which proteins were responsible for the CEH activity found in the crude extracts, protein patterns and zymograms obtained from crude extracts were developed. More proteins bands appeared in the medium with triacetin, while crude extracts of the media containing higher triglycerides or olive oil had a similar protein pattern. The intensity of the bands corresponding to 20- and 29-kDa proteins increased with the length of fatty acid chains esterified to triacylglycerides and with the presence of a double bond (Fig. 1a), a result normally observed in the case of lipase induction. However, in native and SDS–PAGE zymograms of crude extracts from media with triolein or olive oil (CEHM), we observed a unique band of 29 kDa, which showed carboxylic ester hydrolase activity (Fig. 1b). The 20-fold concentrated crude extract of CEHM displayed more protein bands, but only three

Table 1 Effect of triacylglycerols, fatty acids, and olive oil on carboxylic ester hydrolase activity production by *Aspergillus nidulans*

Analyzed sources		CEH activity (U/mL)	Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Specific CEH activity (U/mg)
None	Olive oil 0%	0.085 \pm 0.025	14.3 \pm 1.3	5.97 \pm 1.77
Olive oil concentration	Olive oil 0.1%	1.624 \pm 0.183	22.3 \pm 0.9	72.76 \pm 8.18
	Olive oil ^a 0.5%	1.181 \pm 0.321	21.7 \pm 1.1	54.34 \pm 14.77
	Olive oil 1%	0.709 \pm 0.066	20.6 \pm 1.0	34.45 \pm 3.19
Triacylglyceride	Triacetin 0.5%	0.042 \pm 0.001	26.3 \pm 0.6	1.58 \pm 0.09
	Tributyrin 0.5%	0.019 \pm 0.004	13.1 \pm 1.2	1.47 \pm 0.27
	Tricaprin 0.5%	0.043 \pm 0.001	22.0 \pm 1.7	1.94 \pm 0.10
	Trioctanoin 0.5%	0.095 \pm 0.009	20.2 \pm 1.1	4.71 \pm 0.54
	Tricaprin 0.5%	0.111 \pm 0.002	23.4 \pm 1.1	4.71 \pm 0.13
	Tripalmitin 0.5%	0.016 \pm 0.025	21.6 \pm 1.4	7.60 \pm 1.18
	Tristearin 0.5%	0.164 \pm 0.009	21.0 \pm 1.8	11.72 \pm 0.73
	Triolein 0.5%	0.367 \pm 0.021	19.7 \pm 1.4	18.66 \pm 1.20
	Fatty acid	Myristic 0.1%	0.176 \pm 0.025	25.5 \pm 0.7
Palmitic 0.1%		0.242 \pm 0.023	26.1 \pm 0.6	9.27 \pm 0.91
Stearic 0.1%		0.476 \pm 0.009	24.4 \pm 2.4	19.53 \pm 0.47
Arachidic 0.1%		0.320 \pm 0.037	20.2 \pm 1.7	21.86 \pm 2.89
Oleic 0.1%		0.057 \pm 0.007	24.7 \pm 2.2	2.31 \pm 0.27

The carboxylic ester hydrolase (CEH) activity was performed as described in “Materials and Methods”. All results were represented as the mean \pm SD of three separate determinations

^aThe microorganism was grown in CEHM. Olive oil was substituted by the indicated compound at indicated concentration

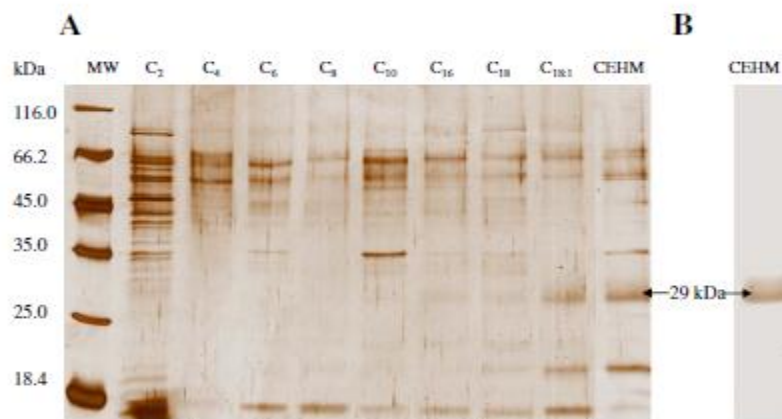


Fig. 1 Effect of triacylglycerides on extracellular carboxylic ester hydrolase activity. **a** SDS-PAGE analysis of proteins in crude extracts. Lane 1, molecular weight marker (MW); lanes 2–8 are extracts from media containing triglycerides with fatty acids of different chain lengths, where the numbers above the gel image represent the chain length of the triacylglyceride fatty acids (C₂–C₁₈); lane 9 contains the culture supernatant of the CEHM. Proteins were visualized after silver staining. **b** Zymogram revealing carboxylic ester hydrolase activity in the CEHM culture supernatant supplemented with α -naphthyl acetate

bands showed CEH activity (37, 29, and 22 kDa). These results correspond to those previously reported [14], where it was also stated that the 37-kDa protein corresponds to the alkaline protease PrtA. In the present study, the use of mass spectrometry allowed the identification of the other two bands, which correspond to new cutinases: ANCUT2 and its post-translational processing product, as described in detail below.

Cutin and cutin hydrolysate have been considered as the best substrates to induce cutinase activity, and some analogs are inducers too [28]. The results presented here show that olive oil and some triacylglycerols and fatty acids induce ANCUT2. Other reports indicate that the cutinase from *Fusarium oxysporum* can be induced by oils similar to olive oil, as well as by fatty acids such as palmitic, oleic, and stearic acids [29]. In contrast, the cutinases from *Thermomonospora fusca* and *Thermoactinomyces vulgaris* are not induced by olive oil, which actually inhibits the growth of these microorganisms [30, 31].

Effects of Olive Oil Concentration on CEH Activity

The concentration of the inducer is an important factor to consider when studying the regulation of enzyme production. In *A. nidulans*, olive oil at a concentration of 0.1% results in the best induction of CEH, while a higher concentration (1%) can inhibit their production (Table 1). In the case of *F. oxysporum* cutinase, similar results have been observed; higher activity was obtained with a low olive oil (0.5%) concentration, while 1% had a negative effect on cutinase production [29]. Some authors have attributed this inhibitory effect to the presence of hydrolysis products generated during culturing [32], to feedback inhibition [33], and to the interference in the transfer of oxygen [34].

Effect of Carbon Sources on Carboxylic Ester Hydrolase Activity

To improve the culture medium for carboxylic ester hydrolase production (CEHM), we attempted to substitute or diminish the concentration of the carbon source (1.5% starch) since it can cause gelatinization and culture handling may be problematic. The CEH activity was decreased in CEHM without starch if olive oil was the sole carbon source (Table 2). Different carbon sources were added at 0.5%, and we found that when glucose, sucrose, and even starch were used, the activity and protein patterns (data not shown) produced by the fungus are preserved, while enzyme production decreased when glycerol (0.5%) or glucose

Table 2 Effect of carbon sources on extracellular carboxylic ester hydrolase activity production by *Aspergillus nidulans*

Carbon source	CHE activity (U/mL)	Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Specific CHE activity (U/mg)
Starch 0%	0.105 \pm 0.011	18.79 \pm 1.2	5.59 \pm 0.5
Starch 0.5%	1.444 \pm 0.075	24.4 \pm 0.4	59.22 \pm 3.0
Glucose 0.5%	1.376 \pm 0.110	16.2 \pm 0.8	84.95 \pm 6.7
Glucose 1%	0.181 \pm 0.032	22.1 \pm 1.5	8.19 \pm 1.4
Sucrose 0.5%	1.353 \pm 0.046	17.5 \pm 0.4	77.43 \pm 2.6
Glycerol 0.5%	0.874 \pm 0.067	18.3 \pm 0.9	47.83 \pm 3.6

Aspergillus nidulans was grown in CEHM (starch 1.5%, yeast extract 0.5%, and olive oil 0.5%) where starch was substituted by the indicated compound at indicated concentration. The carboxylic ester hydrolase (CEH) assay was performed as described in "Materials and Methods". All results represent the mean \pm SD of three separate determinations

(1%) were used as carbon sources (Table 2). Similar results have been reported for other cutinases and lipases [28, 33]. In *A. nidulans*, extracellular carboxylesterase activity in minimal medium is repressed by glucose through a *creA*-independent mechanism [10].

Purification of the 29-kDa Carboxylic Ester Hydrolase and Identification by Internal Amino Acid Sequence Analysis

A total of 15 out of the 80 fractions (numbered 27–42) collected from the Prep-Cell system contained the 29-kDa protein, as determined by SDS-PAGE and zymography (Fig. 2a, b). The pure protein was found in fractions 30–40. The purification of this protein was repeated five times with no significant variation, demonstrating the reproducibility of the method. The band containing the purified protein was excised and subject to LC-MS/MS for identification. The three obtained peptide sequences are shown in Fig. 3, and they are highlighted in blue color within the protein sequence in which they were found. All peptides matched protein ABF50887.1 (GenBank accession code) encoding the AN7541.2 cutinase gene from *A. nidulans* FGSC A4 [35], which we have designated ANCUT2.

Amino Acid Sequence Analysis of ANCUT2

ANCUT2 consists of 255 amino acid residues with a theoretical molecular weight of 26.07 kDa and an isoelectric point (*pI*) of 5.19. A possible signal peptide sequence was also identified where the maximum probability for cleavage was found to be located between positions 17 and 18. The experimental molecular weight of ANCUT2 (29 kDa) differs slightly from theoretical weight (26 kDa), a difference that may be due to post-translational modifications. No potential sites for glycosylation were found in the amino acid sequences predicted by the NetNGlyc 1 server program. It is possible that other modifications may be involved; one possibility is that the N terminus of this cutinase may be blocked by glucuronidation, as has been reported in some cutinases from *Fusarium solani* [36]. Protein phosphorylation is another possible reason for the weight difference because all known fungal cutinases contain at least one phosphorylation site [37]. The amino acid

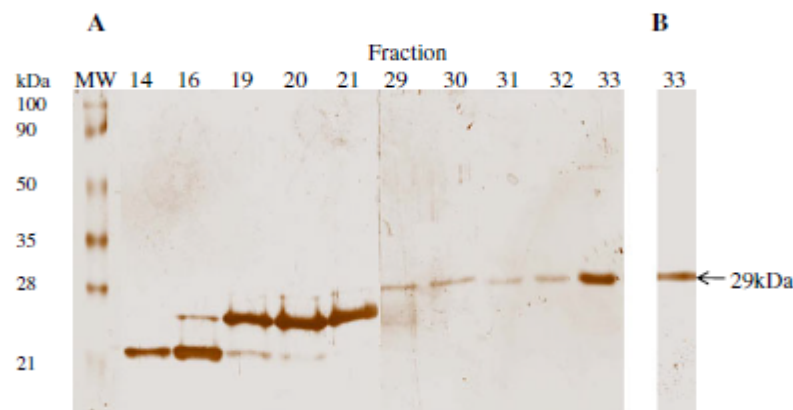


Fig. 2 Purification of cutinase ANCUT2. **a** SDS-PAGE analysis of proteins in numbered collected fractions (lanes 2–11) and a molecular weight marker (*MW*) (lane 1). **b** Identification of carboxyl ester hydrolase activity in pure fraction 33 using zymography with α -naphthyl acetate as a substrate, performed on a SDS-PAGE gel

A. nid	---MHFKLLSLAALAGLSVASP-LNLDERQLGSSSGNDLRDG---DCKPVTFIFARASTE	53
A. nig	---MKLPYFLLG-LAGLAAASP-MGLAERQL--SDGNELRDG---SCKPIIFIFARASTE	50
A. ory	---MHLRNIVIA-LAATAVASP-VDLQDRQL--TGGDELRDG---PCKPITFIFARASTE	50
F. sol	MKFFALTTLLAATASALPTSNPAQELEARQLGRTRDDLINGNSASCRDVIIFIYARGSTE	60
C. sp.	---MLVSALALAVLSAASLGRAAPTPEAEAEHELEARATSS---ACPQYVLIINTRGTGE	53
S. sca	---MRIRLYLAA----IPLVGG-AGLAAVATPTATAA-----ACTDIDVVSARGTPE	44
	:	* . . : * : *
A. nid	PGLLGMSTGPAV ^{CND} LKADASLGGVAC ^Q GVGPKYTAGLAENALPQGTSSAAINEAKELFE	113
A. nig	PGLLGI STGPAV ^{CND} LKMAKA-GQVLC ^Q GVGPAYTADLMSNALPONTSPAASESESLFK	109
A. ory	PGLLGI STGPAV ^{CNR} LKLARS-GDVA ^C GVGPRYTADLPSNALPEGTSSQAAIAEAQGLFE	109
F. sol	TGNLG-TLGPSIASNLESAPGKDG ^V W ^Q GVGGAYRATLGDNALPRGTSSAAIREMLGLFQ	119
C. sp.	P--QGQSAGFRIMNSQITAAISGGTIY---MFVYTADFSQNSAAG-----TADIRRIN	102
S. sca	PGLTGFIVGD ^P VYAAL ^Q KKVAGKSLSSYKVN--YPADLSPTSA ^Q GN-----ADLVNHVR	97
	. * * * * : . . .
A. nid	LAASK ^C PDTRIVAGGYS ^Q GFVVMHGAI-----PDLSEIKDKIAGVVLFGD	159
A. nig	LAASK ^C PNSQIILAGGYS ^Q GFVVMDSI-----KQLPDDVKDKIKGVVLFY	155
A. ory	QAVSK ^C PD ^T QIVAGGYS ^Q GFVVMHGAI-----KRLSADVDKIKGVVLFY	155
F. sol	QAMTK ^C PDATLIAGGYS ^Q GAALAAASI-----EDLDSAIRDKIAGTVLFGY	165
C. sp.	SGLAAN ^R V ^C YILQGY ^S QGAATVVALQ-----QLGTSGAAPNAVKGVFLIGN	150
S. sca	SQMAS ^C PNQR ^F VLVGY ^S QGANVVVNSIGISSAGAVVGSPIVATLPAALEPRVSAVLLFGN	157
	: * : : ***** : :	: . . . * :
A. nid	TRNQ-----DGGQIRNFPKDKIKIY ^{CATG} LVCDGTL--W	194
A. nig	TRNAQ-----EGGQIGNFPKDKVKIY ^{CAMG} LVCDGTL--IV	190
A. ory	TRNAQ-----ERGQIANFPKDKVKIY ^{CAVG} LVCLGTL--IV	190
F. sol	TKNLQ-----NRGRI ^P NPADRTKVF ^{NTG} LVCTGSL--IV	200
C. sp.	PDHKSGLTCNVDSNGGTTTRNVNGLSVAYQGSVPSGWVSKTLDVCA ^{YG} GVCDTAHGFGI	210
S. sca	PIRAI-----GKSVTGYQS-RTID ^{FCAAGD} VCENG--GD	191
	: * * * *
A. nid	TAAH ^F TYVANT-GEASKWLE ^Q QLASMPASTSTSSSSSSSSAP-----ASQTSQSSGLS-	247
A. nig	TAAH ^F TYVMNT-GEASQWLESKLSDTTSSLTGSSSDTSSSTSTGDSSESSAAGLGG	249
A. ory	APP ^H FYSLSDT-GDASDFLLS ^Q LG-----	213
F. sol	AAPH ^L AYGPDARGPAPEFLIEKVRVARGSA-----	230
C. sp.	NAQH ^L SYPSDQ-GVQ ^T MGYKFAVNKLGSSA-----	239
S. sca	VGM ^L LYRANA-DAAAFAATKI-----	213
	* : * :	:
A. nid	-SWFSGLGN-----	255
A. nig	LSGLTGLGSSSTSGGFPSLASLF	271
A. ory	-----	
F. sol	-----	
C. sp.	-----	
S. sca	-----	

Fig. 3 Comparison of amino acid sequences of the ANCUT2 cutinase from *A. nidulans* (*A. nid*) and cutinases from other microorganisms (*A. nig*—putative *A. niger* cutinase; *A. ory*—putative *A. oryzae* cutinase; *F. sol*—*Fusarium solani* cutinase; *C. sp*—*Cryptococcus sp.* cutinase; *S. sca*—*Streptomyces scabiei* cutinase). They are numbered on the right side. The amino acids of the putative catalytic triad are shown in red (Ser-130, Asp-185, and His-198). The LC-MS/MS deduced peptide sequences are shown in blue and green. The conserved pentapeptide sequence is enclosed. The six conserved cysteines that can form disulfide bonds are shown in yellow

sequence of this protein contains 23 potential phosphorylation sites on serine, threonine, and tyrosine amino acid residues, as predicted by the NetPhos 2 server program. ANCUT2 contains a serine-rich region located between amino acids 218–251 (Fig. 3), a feature that has been previously linked to phosphorylation in other proteins [38]. This serine-rich region has been identified only in the amino acid sequence of two putative cutinases from *A. niger* (GenBank accession no. CAK41954.1) and in one cutinase from *A. flavus* (GenBank accession no. EED52785.1). Sequence analysis using FASTA revealed that ANCUT2 had high sequence identity and similarity (>60%) to that of other fungal cutinases, particularly

those from the genus *Aspergillus*. The highest percentages of similarity in amino acid residues were obtained when the sequences were compared to cutinases from *A. oryzae* (88.7%), *A. fumigatus* (88.1%), *A. flavus* (86.8%), and *A. niger* (85.5%) (GenBank accession numbers BAA07428.1, EDP50786.1, EED52785.1, and CAK48244.1, respectively).

Multiple alignments of ANCUT2 constructed with cutinases of both fungal and bacterial origins revealed conserved residues in the amino acid sequences (Fig. 3). The serine, aspartic acid, and histidine residues, which are part of the catalytic triad, are completely conserved in these cutinases, and the consensus pentapeptide, GTSQG, contains the active serine residue. In ANCUT2, this consensus sequence was found at positions 128–132, and Ser130, Asp185, and His198 were identified as the amino acids most likely to be involved in the active site (Fig. 3).

The predicted sequence shows six cysteine residues in ANCUT2. They are conserved in cutinases from the genus *Aspergillus*, but not in other fungal or bacterial cutinases, which contain only four cysteine residues (Fig. 3). The structure of the cutinase from *A. oryzae* reveals an additional disulfide bond, which might be responsible for the thermotolerance of this enzyme when compared to that of other fungal cutinases [39].

Phylogenetic Tree Analysis of ANCUT2

A database search of the *A. nidulans* genome sequence shows that in addition to the AN7145.2 gene, which encodes ANCUT2 cutinase, three other genes encoding putative cutinase (AN5309.2, AN7180.2, and AN10346.4) are present [40].

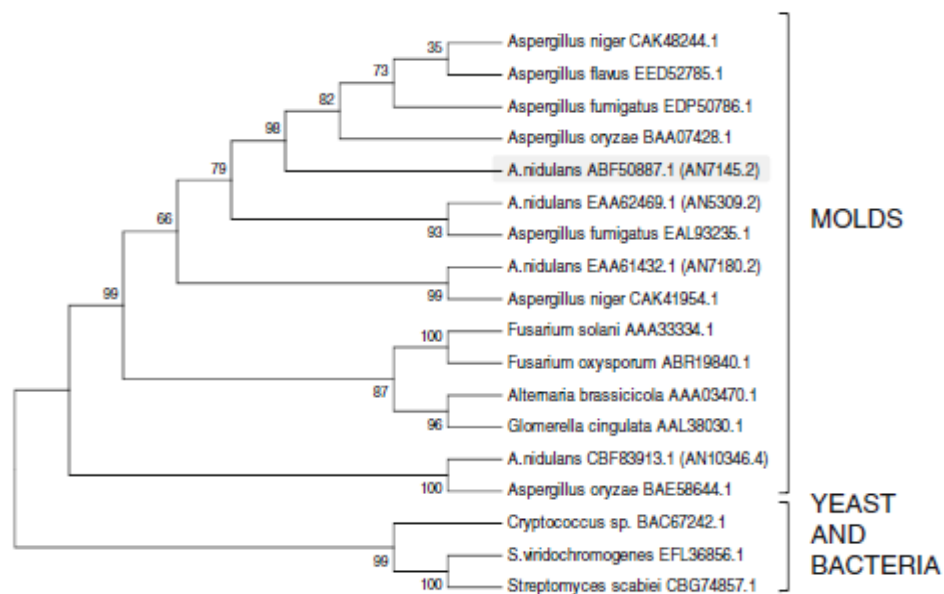


Fig. 4 Phylogenetic analysis of *Aspergillus nidulans* cutinase ABF50887.1 (ANCUT2) and other species. The evolutionary history was inferred using the neighbor-joining method [24]. The optimal tree, with a branch-length sum of 5.97188236, is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1,000 replicates) are shown next to the branches [25]. The evolutionary distances were computed using the JTT matrix-based method [26] and are in the units of the number of amino acid substitutions per site. All positions containing gaps and missing data were eliminated from the dataset. There were a total of 164 positions in the final dataset. Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 4 [27]

A phylogenetic tree was constructed using the cutinase sequences retrieved from GenBank to investigate the evolutionary relationship between *A. nidulans* cutinases and others from different microorganisms. The results revealed that the cutinases are clustered in two main branches: those from molds and those from yeast and bacteria. *Aspergillus* cutinases form two separate subgroups: those that possess six cysteine amino acid residues, which include *A. nidulans* AN7145.2, AN5309, and AN7180, form one subgroup. The second one includes cutinases that possess only four cysteine amino acid residues, *A. nidulans* AN10346.4 gene and

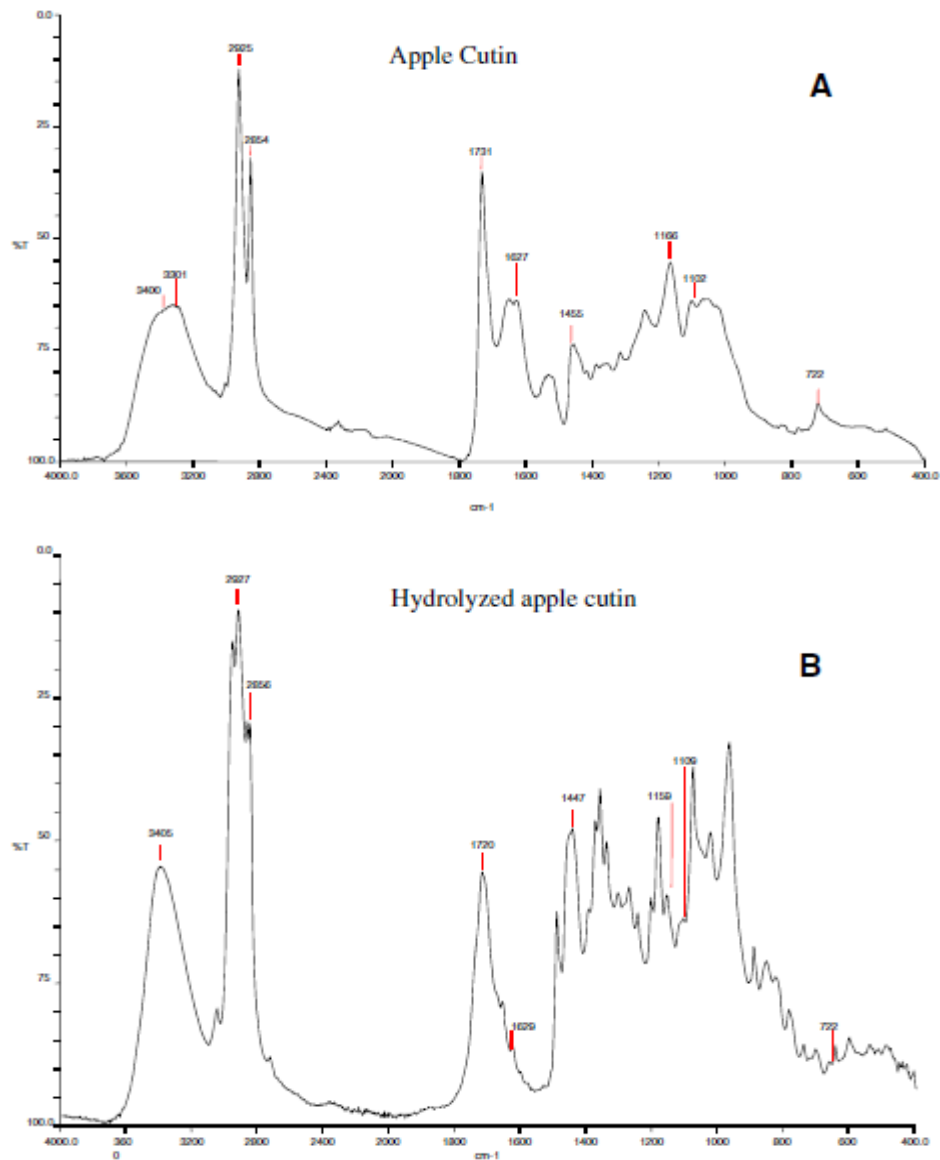


Fig. 5 ATR-FTIR spectrum of isolated natural cutin from apple fruit cuticles (a) and hydrolyzed apple cutin by cutinase (b). Main bands are signaled and described in Table 3. Obtained values were observed in two separate experiments

other aspergilli are members of this one. While *Fusarium*, *Glomerella*, and *Alternaria* cutinases that are known also possess four cysteine residues, they constitute a different subgroup (Fig. 4). Cutinases from yeast and bacteria were the most divergent, forming a small, less related group.

Identification by Internal Amino Acid Sequencing of 22-kDa Protein

The 22-kDa band identified in the SDS–PAGE gels of the concentrated crude extracts of CEHM medium that had also CEH activity was excised and identified using LC–MS/MS. The analysis revealed the presence of three peptide sequences: ASTEPGLLG MSTG PAVCNDLK, YTAGLAENALPQGTSSAAINEAKELFELAASK, and IAGVVVLF GDTR, which are also found in cutinase ABF50887.1 from *A. nidulans* FGSC A4 (ANCUT2). The first peptide sequence is shown in green in Fig. 4 because it was identified by LC–MS analysis only in the 22-kDa but not in 29-kDa cutinase; however, it is also found in cutinase ABF50887.1. The other two peptides were identified for both proteins. This result indicates that this protein is a post-translational processing product of the 29-kDa ANCUT2. Considering that the experimental molecular weight is lower than the theoretical molecular weight (26 kDa), we propose that this protein may be a product of the proteolytic degradation of the 29-kDa ANCUT2. Furthermore, it might be considered that the first peptide could correspond to the N-terminal region of the 22-kDa protein, as the initial amino acids could not be found in this protein but they were identified in the 29-kDa one, a proposal that has to be corroborated. If the theoretical molecular mass of the smaller protein is estimated considering the start of the peptide sequence as ASTEPG..., it corresponds to 20.85 kDa, in accordance with the mass experimentally found (22 kDa). The presence of isozymes is common among fungal plant pathogens, such as *Molinitia fructicola* [41, 42].

Cutinase Activity

The cutin from apple cuticle isolated in this work has a structure similar to that of lime cutin, as their IR spectra displayed the same bands [43]. We did not observe the three additional bands that Pacchiano and co-workers (1993) found in lime cutin and which correspond to oxalate contamination, produced after using the same extraction process [43]. We observed differences in IR spectra with those of tomato and apple cutin already reported. In contrast to

Table 3 Comparison of ATR–FTIR absorption bands observed for natural apple cutin and hydrolyzed cutin polymers

Assignment ^a	Wavenumber (cm ⁻¹) (intensity ^b)	
	Cutin	Hydrolyzed cutin
H ₂ O	3,400 (m)	–
V (O–H...O)	3,301 (m, br)	3,405 (s)
V _a (CH ₂)	2,925 (s)	2,927 (s)
V _s (CH ₂)	2,854 (s)	2,856 (s)
V (C=O)	1,731 (s)ester	1,720 (m)carboxylic acid
H ₂ O	1,627 (m)	1,629 (v, w)
δ(CH ₂) scissoring	1,455 (w)	1,447 (m)
V _a (C–O–C)	1,166 (m)	1,159 (w)
V _s (C–O–C)	1,102 (w)	1,109 (v, w)
δ(CH ₂) rocking	722 (w)	–

^aV stretch, δ deformation, a asymmetric, s symmetric

^bs strong, m medium, w weak, v very, br broad

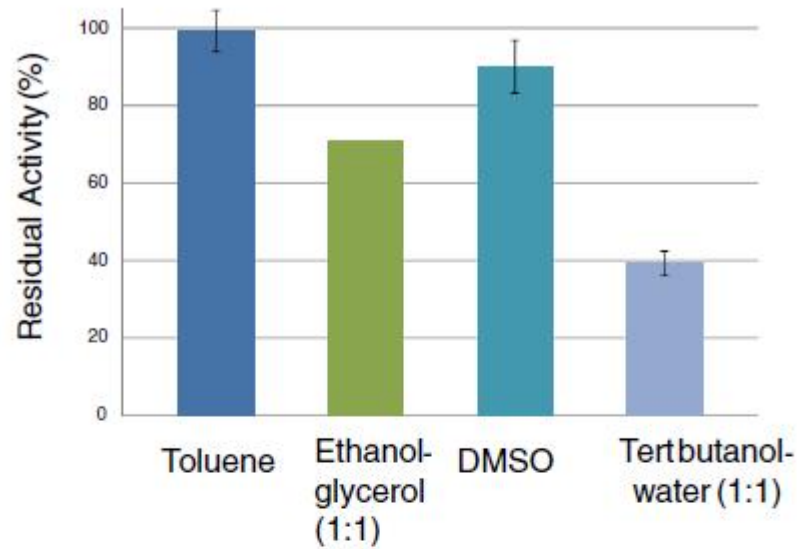
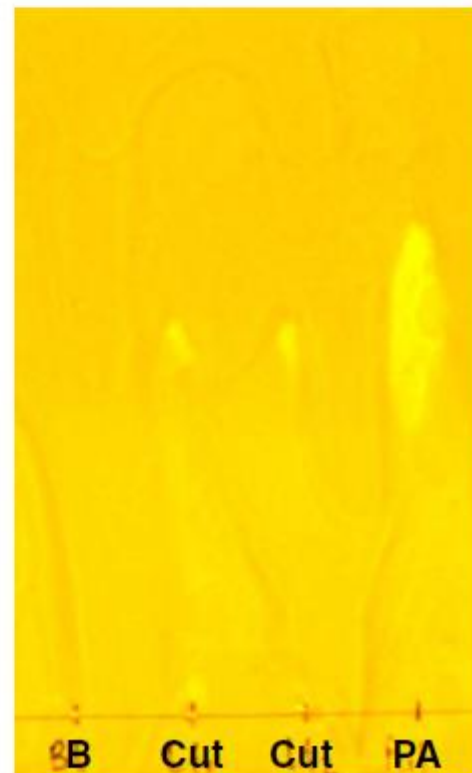


Fig. 6 Effect of different organic solvents on enzyme stability at 30% (v/v). Obtained values are average of three measurements

apple, tomato cutin has a very weak band in $3,444\text{ cm}^{-1}$ which is the typical absorption region of hydroxyl group ($3,000\text{--}3,700\text{ cm}^{-1}$) [44] (Fig. 5A, Table 3).

Fig. 7 TLC of products of hydrolyzed cutin. *B*—blank (no cutinase added); *cut*—products of hydrolyzed cutin; *PA*—palmitic acid (standard)



Cutin is a complex polymer with low water solubility. In order to facilitate the hydrolysis reactions and to improve substrate availability, different solvents were evaluated to suspend it. The best ones were toluene, DMSO and mixtures 1:1 of ethanol–glycerol and *tert*-butanol–water. Cutin was not completely solubilized, but it could be suspended. The effect of these solvents on crude cutinase was tested. The enzyme tolerates water-miscible polar solvents with low log P (−1.37) like DMSO as well as moderate hydrophobic (non polar) solvents with higher log P (2.5) like toluene (Fig. 6) [45]. In fact, toluene allowed cutinase stability and also cutin suspension, so cutin hydrolysis was performed in this solvent. After 72 h, the results confirmed the nature of the enzyme as a cutinase, as it successfully hydrolyzed cutin. This can be observed in Fig. 5B and Table 3 where the common absorption bands of carboxylic acid appeared ($1,720\text{ cm}^{-1}$) while an ester band displayed in cutin ($1,731\text{ cm}^{-1}$) disappeared (Fig. 5A). Moreover, typical bands for hydroxyl group ($300\text{--}3,700\text{ cm}^{-1}$) were higher in hydrolyzed cutin, a result that can be explained because hydroxyl groups are generated after ester hydrolysis in cutin. Pacchiano and co-workers state that cutin has the ability to absorb 20% water by weight [43], a statement that agrees with the findings of this work, as we observed the common bands of water in cutin IR spectra ($3,400$ and $1,627\text{ cm}^{-1}$). Interestingly, the $1,627\text{ cm}^{-1}$ band strongly decreased after cutin hydrolysis, which can be due to polymer disintegration.

Del Río and Hatcher (1998) detected 8-, 16-, 9-, 16-, 10-, 16-dimethoxy-hexadecanoic acid and hydroxy-methoxy hexadecanoic acid as major products of tomato cutin hydrolysis [46]. We observed the existence of free fatty acids by TLC only in the presence of ANCUT 2, which confirms cutin degradation (Fig. 7).

The results presented in this work allow the identification of the first reported cutinase produced by *A. nidulans*, which seems to belong to a different group of fungal cutinases and which may be a useful enzyme for industrial applications. Its properties, as well as those of its lower molecular weight processing product, remain to be investigated. As the results shown here indicate, the proper handling of the nutrient constituents in the culture medium is important to achieve cutinase expression. ANCUT2 production appears to be regulated by carbon catabolite repression and is induced by lipidic substrates, such as olive oil (0.1%).

Acknowledgments Financial support for this project was obtained from PAPIIT–DGAPA–UNAM IN2148092. Denise Castro received a scholarship from CONACyT. We thank Dr. César Batista, from the Proteomics Unit, Biotechnology Institute, UNAM for LC–MS/MS Analysis and USAI Department, Chemistry Faculty, UNAM for infrared spectroscopy analysis. We appreciate the help of C. Warden for his assistance with the English revision of this manuscript.

References

1. Webb, E. C. (1992). In *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, (Eds). San Diego: Academic. 0–12: 227164–227165.
2. Purdi, R. E., & Kolattukudy, P. E. (1975). *Biochemistry*, *14*(13), 2824–2831.
3. Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. (1999). *Biotechnology and Bioengineering*, *66*(1), 17–34.
4. Panda, T., & Gowrishankar, B. S. (2005). *Applied Microbiology and Biotechnology*, *67*, 160–169.
5. Sharma, R., Chisti, Y., & Banerjee, U. C. (2001). *Biotechnology Advances*, *19*(8), 627–662.
6. Dutta, K., Sen, S., & Veemanki, V. D. (2009). *Process Biochemistry*, *44*(2), 127–134.
7. Badenes, S. M., Lemos, F., & Cabral, J. M. (2010). *Biotechnology Letters*, *32*, 399–403.
8. Badenes, S. M., Lemos, F., & Cabral, J. M. (2011). *Biotechnology and Bioengineering*, *108*(6), 1279–1289.
9. Wang, X., Liu, X., Zhao, C., Ding, Y., & Xu, P. (2011). *Bioresour Technol*, *102*(10), 6352–6355.

10. Kawasaki, L., Farrés, A., & Aguirre, J. (1995). *Experimental Mycology*, 19(1), 81–85.
11. García-Lepe, R., Nuero, O. M., Reyes, F., & Santamaría, F. (1997). *Letters in Applied Microbiology*, 25, 127–130.
12. Leger, R. J., St. Joshi, L., & Roberts, D. (1997). *Microbiology*, 143, 1983–1992.
13. Mayordomo, I., Randez-Gil, F., & Prieto, J. (2000). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 105–109.
14. Peña-Montes, C., Gonzalez, A., Castro-Ochoa, D., & Farrés, A. (2008). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 603–612.
15. Käfer, E. (1977). *Advances in Genetics*, 19, 33–131.
16. Walton, T. J., & Kolattukudy, P. E. (1972). *Biochemistry*, 11(10), 1885–1897.
17. Järvinen, R., Silvestre, A. J., Holopainen, U., Kaimainen, M., Nyssölä, A., Gil, A. M., Pascoal-Neto, C., Lehtinen, P., Buchert, J., & Kallio, H. (2009). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9016–9027.
18. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.
19. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
20. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997). *Protein Engineering*, 10, 1–6.
21. Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). *Journal of Molecular Biology*, 294(5), 1351–1362.
22. Pearson, W. R. (1990). *Methods in Enzymology*, 183, 63–98.
23. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thomson, J. D., Gibson, T. J., & Higgings, D. G. (2007). *Bioinformatics*, 23, 2947–2948.
24. Saitou, N., & Nei, M. (1987). *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
25. Felsenstein, J. (1985). *Evolution*, 39, 783–791.
26. Jones, D. T., Taylor, W. R., & Thornton, J. M. (1992). *CABIOS*, 8, 275–282.
27. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., & Kumar, S. (2007). *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596–1599.
28. Lin, T. S., & Kolattukudy, P. E. (1978). *Journal of Bacteriology*, 133(2), 942–951.
29. Pio, T. F., & Macedo, G. A. (2007). *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 613–619.
30. Fett, W. F., Wijey, C., Moreau, R. A., & Osman, S. F. (1999). *Journal of Applied Microbiology*, 86, 561–568.
31. Fett, W. F., Wijey, C., Moreau, R. A., & Osman, S. F. (2000). *Letters in Applied Microbiology*, 31, 25–29.
32. Sarkar, S., Srekanth, B., Kant, S., Banerjee, R., & Bhattacharyya, B. C. (1998). *Bioprocess Engineering*, 19, 29–32.
33. Henriette, C., Zinebi, S., Aumaitre, M. F., Petitdemange, E., & Petitdemange, H. (1993). *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 129–135.
34. Martínez, P., Christen, P., & Farrés, A. (1993). *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 76(2), 94–97.
35. Bauer, S., Vasu, P., Person, S., Mort, A. J., & Somerville, C. R. (2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(30), 11417–11422.
36. Lin, T., & Kolattukudy, P. E. (1980). *European Journal of Biochemistry*, 106, 341–351.
37. Wang, G. Y., Michailides, T. J., Hammock, B. D., Lee, Y. M., & Bostock, R. M. (2002). *Fungal Genetics and Biology*, 35(3), 261–276.
38. Kanazawa, T., Keeler, M., & Vartikovski, L. (1994). *Cell Immunology*, 156, 378–388.
39. Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P. J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., Li, H., Butterfoss, G. L., Kong, X. P., Gross, R., & Montclare, J. K. (2009). *Journal of the American Chemical Society*, 131(43), 15711–15716.
40. Galagan, J. E., et al. (2005). *Nature*, 438, 1105–1115.
41. Wang, G. Y., Michailides, T. J., Hammock, B. D., Lee, Y. M., & Bostock, R. M. (2000). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382, 31–38.
42. Fan, C.-Y., & Köller, W. (1998). *FEMS Microbiology Letters*, 158, 33–38.
43. Pacchiano, R. A., Sohn, W., Chlanda, V. L., Garbow, J. R., & Stark, R. E. (1993). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 78–83.
44. Heredia-Guerrero, J. A., Heredia, A., García-Segura, R., & Benitez, J. J. (2009). *Polymer*, 50, 5633–5637.
45. Li, S., He, B., Bai, Z., & Ouyang, P. (2009). *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 56(2–3), 85–88.
46. Del Rio, J. C., & Hatcher, P. G. (1998). *Organic Geochemistry*, 29(5–7), 1441–1451.

Appl Biochem Biotechnol (2013) 169:1672–1682
 DOI 10.1007/s12010-013-0091-8

Evaluation of Strategies to Improve the Production of Alkaline Protease PrtA from *Aspergillus nidulans*

Denise Castro-Ochoa · Carolina Peña-Montes ·
 Amelia Farrés

Received: 4 October 2012 / Accepted: 1 January 2013 /
 Published online: 19 January 2013
 © Springer Science+Business Media New York 2013

Abstract *Aspergillus nidulans* produces several proteases. The *prtA* gene encodes a major protease, and two approaches were explored to achieve the overproduction of this enzyme. Molecular cloning of the mature form of this enzyme in *Pichia pastoris* resulted in the production of an inactive form. In addition, the presence of this enzyme was toxic for the host and resulted in cell lysis. The modification of the culture medium constituents resulted in a 6.4-fold increase in enzyme production. The main effect was achieved through the use of organic nitrogen sources. Although it was previously shown that the PrtA protease shows promiscuous esterase activity, the production of this enzyme was not induced by lipidic sources.

Keywords Protease · Production · *Aspergillus nidulans* · Cloning · *Pichia*

Abbreviations

dNTPs	Deoxynucleotide triphosphates
PCR	Polymerase chain reaction
DNA	Deoxyribonucleic acid
OD	Optical density
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
PVDF	Polyvinylidene fluoride
AP-conjugated anti-His (C-term)	Alkaline phosphatase (AP)-conjugated antibodies that recognizes a polyhistidine amino acid sequence at the carboxy-terminus of protein

D. Castro-Ochoa · C. Peña-Montes · A. Farrés (✉)
 Department of Food Science and Biotechnology, Faculty of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Ciudad Universitaria, México City, DF 04510, Mexico
 e-mail: farres@unam.mx

D. Castro-Ochoa
 e-mail: lelie_denise@yahoo.com

C. Peña-Montes
 e-mail: carolpm@unam.mx

 Springer

Introduction

Proteases are a group of hydrolytic enzymes with physiological and commercial importance that are used in a wide variety of applications in several industrial processes [1]. Alkaline proteases are of particular interest due their activity and stability at alkaline pH [2]. Alkaline proteases are most widely used in detergents and have great importance in the dairy, food, feed, and leather industries. Other successful commercial applications of alkaline proteases include the management of industrial and household wastes, silver recovery, medical usage, the catalysis of peptide synthesis, and the resolution of racemic mixtures of amino acids from natural wastes [2–4].

The filamentous fungi of the genus *Aspergillus* have evolved highly diverse biochemical and enzyme systems that enable them to survive in exceptional and diverse habitats. These organisms are recognized as one of the major producers of enzymatic activities with important industrial applications [5]. *Aspergillus nidulans* is one of the best characterized filamentous fungi and has been used as a classical model organism for studies of developmental biology and gene regulation for over 50 years [6].

In a previous study, we reported the purification and characterization of the broad substrate-specific alkaline protease (product of the *prtA* gene) from *A. nidulans* PW1 [7]. The deduced amino acid sequence of the *prtA* gene shows a high degree of similarity to proteases from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, and *Aspergillus oryzae* [8]. An analysis of sequence homology indicates that the alkaline protease from *A. nidulans* (PrtA), similar to other fungal proteases, belongs to the subtilase family of serine proteases [9]. The alkaline protease from *A. nidulans* is initially synthesized as a 403-residue pre-pro-protein, which is subsequently cleaved to produce the 282-residue active mature protease [7, 8]. PrtA is an interesting and promising enzyme for biotechnological application because it is thermostable and shows activity and stability at a broad alkaline pH range [7]. However, large amounts of this protease are required for both theoretical research and industrial use. Thus, many approaches, including cloning and overexpression, fed batch, chemostat fermentations, and optimization of the fermentation medium, have been used to increase the yield of this protease from different organisms.

In recent years, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* has been developed into a highly successful system for the production of a variety of heterologous proteins, including alkaline proteases [10, 11]. Generally, this expression system uses a methanol-inducible alcohol oxidase 1 (*AOX1*) promoter to generate high cell density cultures using methanol-regulated expression cassettes [11].

Generally, microbial proteases are constitutive or partially inducible in nature and under most culture conditions. Media components, e.g., variations in the C/N ratio and the presence of rapidly metabolized sugars, such as glucose, and metal ions strongly influence extracellular protease production in microorganisms [3]. Rapidly metabolized nitrogen sources in the medium, such as amino acids, also affect protein synthesis. In addition, several other physical factors affect the amount of protease produced [3].

The present study aimed to increase the production of the alkaline protease PrtA from *A. nidulans*. Thus, we explored two different strategies: expression of recombinant protein in *P. pastoris* and modifications in the culture media components.

Materials and Methods

Microorganisms, Media, Culture Conditions, and Plasmids

Dr. Jesús Aguirre (Institute of Cell Physiology, UNAM) donated the *A. nidulans* PW1 (*biA1*, *argB2*, *methG1*, *veA1*). Conidial suspensions were generated after growth on

minimal nitrate agar containing the appropriate supplements as previously described [12, 13].

Escherichia coli DH5 α (F^- , *lacZM15* (*lacZYA-argF*) *recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi gyrA96 relA1*) was transformed and grown at 37 °C in Luria–Bertani (LB) liquid medium or on LB agar plates [14]. The recombinant clones were selected on low-salt LB plates containing (25 μ g/mL) zeocin.

The wild-type strain *P. pastoris* X-33 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used for enzyme expression. The plasmid pPICZ α A was obtained from Invitrogen, Carlsbad, CA, USA. All media and protocols for *Pichia* were described in the *Pichia* expression manual [15].

Minimal nitrate medium (MM) The basal medium as described by Kafer contained 1.0 % glucose, 0.6 % NaNO₃, 0.052 % KCl, 0.052 % MgSO₄·7H₂O, 0.152 % KH₂PO₄, 0.0025 % biotin, methionine, 0.084 % arginine, and trace elements. The pH was adjusted to 6.5 [12]. All experiments were conducted in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of sterile culture medium. The medium was inoculated with 1×10⁶ spores/mL. The flasks were incubated at 37 °C for 24 h on a rotator shaker (300 rpm).

Construction and Cloning of the Expression Vectors

The *prtA* gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) from an *A. nidulans* cDNA library in λ -ZAPII (constructed by R. Aramayo; available from the Fungal Genetics Stock Center, Kansas City, KS). Specific primers for the mature protein (without signal peptide and pro-peptide) were designed based on published deoxyribonucleic acid (DNA) sequence data [7, 8]. The primer MPF-5'-CCT GAA TTC GCC CTG ACC TCC CAG AG-3' was used to amplify the N-terminus of the protein, and the C-terminus was amplified using one of two primers: PR-5'-TGA TCTAGA TTA TTC GTC GGC ACC GTT GTA G-3', which includes a stop codon after the last amino acid of the protein, or PR-H-5' TGATCTAGA GCT TCG TCG GCA CCG TTG TAG 3' to generate a fusion protein (His)₆-tag. An *Eco*RI site was introduced at the 5' end of the gene, and an *Xba*I site was introduced at the 3' end. The primer pair MPF and PR was used to construct the expression plasmid pPICZ α A-ANMP, and the primer pair MPF and PR-H was used to generate pPICZ α A-ANMPH. A single master mix was prepared containing approximately 100 ng of cDNA, 25 pmol of each primer, 0.25 mM dNTPs, a 1× buffer containing 1.25 mM MgCl₂, and recombinant *Pfu* polymerase (Fermentas, MD, USA). The following amplification reaction conditions were used: an initial cycle at 95 °C for 2 min, followed by 30 cycles at 95 °C for 1 min, 55 °C for 40 s, 72 °C for 1.5 min, and a final cycle at 72 °C for 10 min. The amplified PCR products were resolved using 1 % low-melting agarose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) gel electrophoresis. A gel slice containing the expected band was excised, and the DNA was eluted using a Gen Elute Agarose Spin Column (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Subsequently, the obtained PCR fragments were digested with *Eco*RI and *Xba*I and ligated into pPICZ α A to generate the vectors pPICZ α A-ANMP and pPICZ α A-ANMPH. *E. coli* DH5 α competent cells were freshly transformed with the vectors through electroporation. Zeocin-resistant clones were selected and analyzed using restriction digestion. The correct construction of the vectors was confirmed using PCR with the 5' and 3' *AOXI* primers from Invitrogen directed against the *AOXI* promoter and transcription terminator as previously described [15].

Recombinant DNA Techniques

Standard recombinant DNA methods were performed as previously described [16]. For sequence determination, the fluorescence-based dideoxy DNA cycle sequencing method

was used. DNA sequencing was performed using the Taq Dye Deoxy™ Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) on a 373A DNA sequencing system (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing products were separated using capillary electrophoresis and analyzed on an ABI PRISM 310 genetic analyzer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, USA).

Transformation of *P. pastoris* and Protein Expression

The plasmids pPICZ α A-ANMP and pPICZ α A-ANMPH were linearized using *Pme*I and transformed into *P. pastoris* X-33 competent cells through electroporation using a Bio-Rad Gene Pulser instrument and a 0.2-cm cuvette (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The charging voltage, resistance, and capacitance were set at 2,000 V, 200 Ω , and 25 μ F, respectively. The empty vector pPICZ α A was also transformed into *P. pastoris* and used as a control. The recombinant clones were selected on YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Sorbitol Medium) medium. For the analysis of protease expression, the transformants were grown in shaking flasks containing BMGY (Buffered Glycerol Complex Medium) medium until an OD₆₀₀=2–6 was reached. Subsequently, the culture was transferred to BMMY (Buffered Methanol Complex Medium) medium for the induction of protein expression, and methanol was added daily as described in the Pichia expression system manual [15]. The culture was grown at 30 °C with shaking (300 rpm). After induction, the extracts were centrifuged (3,000 \times g), and the supernatant was collected.

Protein Determination

The protein concentration was determined using an enhanced Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and with bovine serum albumin as a standard [17].

Protease Activity

The protease activity was measured using the methods of Rinderknecht et al. with modifications [18]. Briefly, a 0.1-M Tris-HCl buffer (pH 8.0) was used, and the assay volume was reduced to 1 mL with 5 mg/mL Hide Powder Azure (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) per assay. The reaction tubes were incubated at 37 °C and mixed constantly at 300 rpm to keep the solid substrate in suspension. The tubes were transferred to an ice bath to terminate the reaction, followed by centrifugation at 10,000 rpm for 10 min. The samples were measured with a spectrophotometer at 595 nm. One unit (U) of proteolytic activity was defined as the amount of enzyme required to increase the absorbance at 595 nm ($A_{595 \text{ nm}}$) 0.01 units within 1 min. All results are presented as the mean of three assays.

Gel Electrophoresis, In Situ Activity Detection, and Western Blot Analysis

Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 12 % acrylamide gels as previously described [19]. The molecular weight of the proteins was compared with a mixture of seven proteins ranging in size from 14.4 to 116 kDa (Fermentas, MD, USA) or low molecular weight markers (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). The proteins were stained with PageSilver silver staining kit (Fermentas, MD, USA) or Coomassie blue (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

Subsequently, the protease activity was detected using zymography. The acrylamide gel was washed with 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) for 30 min with constant agitation at room

temperature to renature the enzymes. A second wash was performed in the same phosphate buffer containing 5 % Triton X-100 under the similar conditions, and the initial wash step was repeated. To detect the proteolytic activity, the acrylamide gel was copolymerized using 0.1 % (w/v) gelatin as a substrate. After protein renaturation, the gel was incubated at 37 °C for 12 h in developing buffer (50 mM Tris buffer, pH 8.0) with gentle agitation. The gel was stained for 30 min using 0.5 % Coomassie Brilliant Blue R-250 (diluted with 40 % methanol and 10 % acetic acid) and destained in the same solution without the dye until clear proteolytic bands appeared against the contrasting blue background.

For native zymography, the electrophoretic separation of proteins was performed under non-denaturing conditions in the absence of SDS. The protease activity was detected as previously described in this procedure, omitting the protein renaturation process.

For the Western blot analysis, the proteins were transferred to a PVDF transfer membrane (Perkin Elmer, Woodbridge, ON, Canada) using a Mini Trans-Blot system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. To detect the recombinant fusion protein, we used an AP-conjugated anti-His (C-term) antibody according to manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Nutritional Factors Affecting Protease Production in *A. nidulans*

To assess the effects of the addition of organic nitrogen sources on protease production, sodium nitrate was combined with 0.5 % (w/v) beef extract, protease peptone, yeast extract, or skim milk in minimal medium (MM) without the addition of a carbon source. MM without carbon or organic nitrogen sources was used as a control.

Dry Weight Determination of Fungal Mycelium

The cultured mycelium from 50 mL of medium was separated from the supernatant using suction filtration on a Büchner funnel through pre-dried and pre-weighed filter paper (grade no. 1, Whatman) and subsequently washed twice with 30 mL of distilled water. The mycelium was dried in an oven at 105 °C to a constant weight, cooled in desiccators, and weighed. The weight of the fungus was determined from the difference between the weight of the pre-dried and pre-weighed filter and the combined weight of the filter and mycelium. All measurements were performed in triplicate.

Results and Discussion

Cloning and Expression of the PrtA Alkaline Protease in *P. pastoris*

Plasmid Constructions and Transformations

P. pastoris has great potential for the production of foreign proteins, such as fungal and bacterial enzymes; therefore, the suitability of a *P. pastoris* expression system was explored to achieve a high level production of the *A. nidulans* alkaline protease PrtA. *P. pastoris* strain X-33 and pPICZ α A were selected as the host and expression vector, respectively. Due to the easy detection and purification of tagged recombinant proteins, two expression plasmids containing different C-terminal sequences were constructed in this study. The *prtA* genes, with and without the stop codon, were amplified using PCR and cloned into the EcoRI and XbaI sites of the pPICZ α A vector under the control of the methanol-inducible *AOX1* promoter, which is

downstream of the α -factor secretion signal sequence from *Saccharomyces cerevisiae*. The 283-bp alkaline protease gene was amplified using the primer pair MPF and PR-H and cloned into pPICZ α A in frame with the C-terminal peptide containing additional amino acids for the c-myc epitope and His (pPICZ α A-ANMPH) tags. We also constructed the expression plasmid pPICZ α A-ANMP by introducing a stop codon into the reverse primer PR to express only the mature alkaline protease without any additional amino acids.

The two recombinant expression plasmids were linearized by digestion with *Pme*I and transformed into *P. pastoris*. Transformants for each expression plasmid were obtained.

Expression of the Recombinant Alkaline Protease in *P. pastoris* and Protein Analysis

Recombinant clones were selected on YPDS medium. Colonies from each expression plasmid pPICZ α A-ANMP and pPICZ α A-ANMPH were analyzed for protease expression in a 500-mL shaking flask containing 50 mL of BMMY medium. Samples were obtained every 24 h and assayed for enzyme activity and cell growth at OD_{600 nm}. All transformants showed similar growth patterns (Fig. 1). A small increase in the proteolytic activity was observed in the culture supernatants of three transformants of the systems bearing mature protein compared with *P. pastoris* cells containing only the plasmid vector (Table 1). The maximum activity in the culture supernatant of clones was detected at 48 h after the inducer was added, and the activity remained stable for 120 h of fermentation.

Low levels of native proteins were observed using SDS-PAGE gels in the cell-free media from the *P. pastoris* control containing only the plasmid vector, while in the cell-free culture medium from the BMMY culture of the PrtA clones using both plasmids (pPICZ α A-ANMP and pPICZ α A-ANMPH), the presence of many different intracellular proteins was detected after 48 h, suggesting cell lysis or cellular damage to the host cells (Fig. 2). It has been reported that the expression of some recombinant proteins in methanol-induced *P. pastoris* activates cell stress responses. Toxicity is a relatively common problem with secreted proteins; for example, in the molecular cloning of shrimp trypsinogen, an inhibitory effect on *Pichia* growth was observed [20]. This effect might reflect the complexity of the secretory pathway, which presents a number of possible bottlenecks, or the possibility that foreign secreted proteins might be frequently misfolded and cause a blockage in the pathway [11].

Two proteolytic bands with no corresponding signals were detected in the Western blot analysis. These proteases might be intracellular *Pichia* proteases released as a result of the lytic process and might be responsible for the small increase in proteolytic activity observed

Fig. 1 Time course of growth by *P. pastoris* transformants in induction medium containing methanol (BMMY)

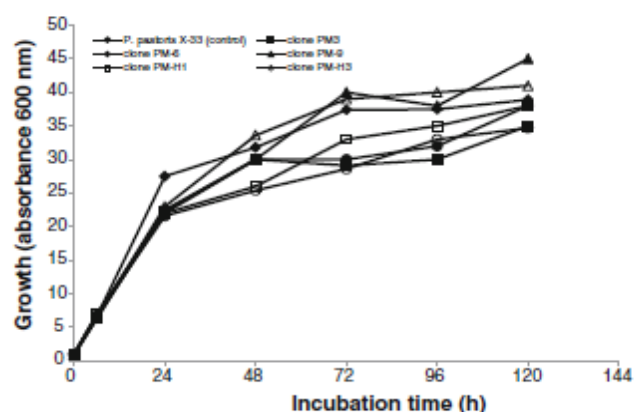


Table 1 Protease activity in the culture supernatant of *P. pastoris* transformant cells after growth for 48 h in buffered minimal medium containing methanol

Transformant	Protease activity (U/mL±SD)
<i>P. pastoris</i> X-33 (control)	0.51±0.06
PM-3	0.83±0.09
PM-6	0.09±0.09
PM-9	0.75±0.04
PM-H1	0.83±0.02
PM-H3	0.94±0.06
PM-H4	0.72±0.05

The protease activity was determined as described in “Materials and methods” section. All results were represented as the mean±SD of three separate determinations

in the spectrophotometric assays [21]. PrtA activity was not detected in the zymograms, but a single 37-kDa band was observed using Western blot analysis of clones containing the C-terminal His tag (Fig. 3). Therefore, we concluded that the expression product was a recombinant inactive mature alkaline protease that might result from incorrect folding of the protein, as the pro-peptide region of the alkaline protease is necessary for the secretion of active enzymes. This result is consistent with reports that indicate that most proteases require the pro-peptide sequence for proper protein folding [10, 22]. Unfortunately, the success in secreting foreign proteins using the pre-type signal sequence has been variable; thus, this signal might be necessary to empirically test several signal sequences or different host strains for the efficient secretion and processing of the alkaline protease PrtA from *A. nidulans* in *P. pastoris*. Therefore, a new strategy to increase protease production in the *A. nidulans* strain and the modification of medium constituents that might exert a regulatory effect was explored.

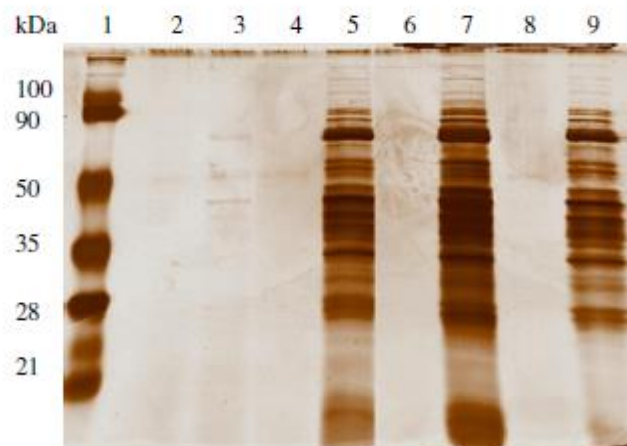


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the proteins in the culture supernatants of *P. pastoris* transformants. Samples were collected from 24 and 48 h after growth in induction medium BMMY. Each lane was loaded with 24 μ L of supernatants to SDS-PAGE analysis. Lane 1, standard protein molecular weight marker; lanes 2–3, supernatants from *P. pastoris* X-33 (clone that is transformed with empty vector alone) at 24 and 48 h, respectively; lanes 4–5, clone PM-H1 at 24 and 48 h, respectively; lanes 6–7, supernatants from clone PM-H3 at 24 and 48 h, respectively; lanes 8–9, supernatants from clone PM-H4 at 24 and 48 h, respectively

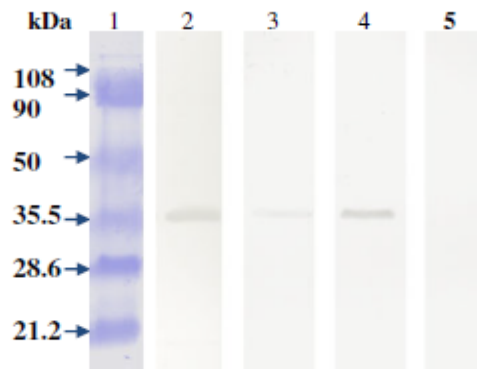


Fig. 3 Immunoblot of *P. pastoris* transformant culture supernatants. *Lane 1*, standard protein molecular weight markers; *lane 2*, supernatants from clone PM-H1; *lane 3*, supernatants from clone PM-H3; *lane 4*, supernatants from clone PM-H4; *lane 5*, supernatants from a negative control *P. pastoris* X-33 clone that is transformed with empty vector alone

Production of Protease Activity in *A. nidulans*

Effect of Carbon and Organic Nitrogen Sources on Protease Activity in A. nidulans

The mechanisms that regulate the production of extracellular proteases vary among filamentous fungi. The effect of carbon sources on extracellular protease production by *A. nidulans* has been extensively studied; extracellular proteases are regulated by carbon catabolite repression and induced by starvation [23]. Our results are consistent with these findings, as no proteolytic activity was detected when *A. nidulans* was grown in minimal medium (1 % glucose); however, low levels of proteolytic activity were detected in the absence of glucose (Table 2).

Higher levels of extracellular protease activity were detected in minimal nitrate medium (lacking glucose) containing 0.5 % proteose peptone, beef extract, or yeast extract as an organic nitrogen source (Table 2). If these nitrogen sources were used at concentrations higher than 0.5 %, an inhibitory effect was observed (data not shown). The best specific activity was obtained after the addition of 0.5 % beef extract. Surprisingly, the addition of skim milk to the liquid medium (Table 2) repressed protease production; however, agar plates supplemented with skim milk revealed the presence of hydrolysis halos, similar to the findings of previous studies [23]. This difference might be because enzymes can be produced in larger amounts on solid media as a result of diffusion, morphological differences in mycelia, and proteolysis [24]. Fukushima demonstrated that many proteases and peptidases produced by *A. oryzae* on solid media were not present in liquid culture [25]. Organic nitrogen sources are more effective at inducing growth and protease production in some organisms, while the use of inorganic nitrogen sources, such as ammonium sulfate and potassium nitrate, can enhance enzyme yields in other organisms [26]. In *A. nidulans*, extracellular protease production is a function of carbon, nitrogen, or sulfur limitation, and proteins might not play a major role as protease inducers [23]. Nitrate has even been reported to be a repressor of extracellular protease production [27]. The results presented in this study indicate that extracellular protease production is derepressed in minimal nitrate medium (lacking glucose); however, protease production was increased after the addition of 0.5 % organic nitrogen sources (Table 2). When beef extract was used, the specific protease activity increased 6.4-fold compared with the values obtained with the minimal control medium, and the biomass

Table 2 Effect of glucose and organic nitrogen sources on the protease production by *A. nidulans*

Analyzed sources		Proteolytic activity (U/mL)	Protein ($\mu\text{g/mL}$)	Dry weight (mg/mL)	Specific proteolytic activity (U/mg mycelium)
Carbon	Organic nitrogen				
Glucose ^a 1 %	None	nd	1.3 \pm 0.1	3.838	nd
None ^b	None	0.16 \pm 0.03	13.3 \pm 1.8	0.834	0.19
None	Proteose peptone 0.5 %	2.19 \pm 0.34	27.0 \pm 1.5	2.79	0.78
None	Beef extract 0.5 %	2.37 \pm 0.64	20.3 \pm 0.5	2.102	1.13
None	Yeast extract 0.5 %	1.87 \pm 0.44	32.6 \pm 2.4	3.37	0.55
None	Skim milk 0.5 %	nd	748 \pm 127	–	nd

^a Minimal nitrate medium^b Control medium

nd not detectable under assay conditions

The protease activity was determined as described in “Materials and methods”.

All results were represented as the mean \pm SD of three separate determinations

increased 2.5-fold (Table 2). This result may reflect the fact that organic nitrogen sources contain a high proportion of low molecular weight peptides and free amino acids that may exert a regulatory effect on the expression of genes involved in protease synthesis.

SDS-PAGE and zymography were used to identify the proteases produced in this study. The gels showed that the same pattern of proteins was present in the crude extracts from media containing yeast extract, proteose peptone, and beef extract, with two major bands corresponding to 37 and 70 kDa proteins. When skim milk was used as a nitrogen source, a highly variable gel pattern was observed. Few bands were detected in the extracts obtained from *A. nidulans* grown in minimal nitrate medium (with and without glucose) (Fig. 4a). The pattern of in situ protease activity in the extracts revealed that only the 37-kDa band, corresponding to

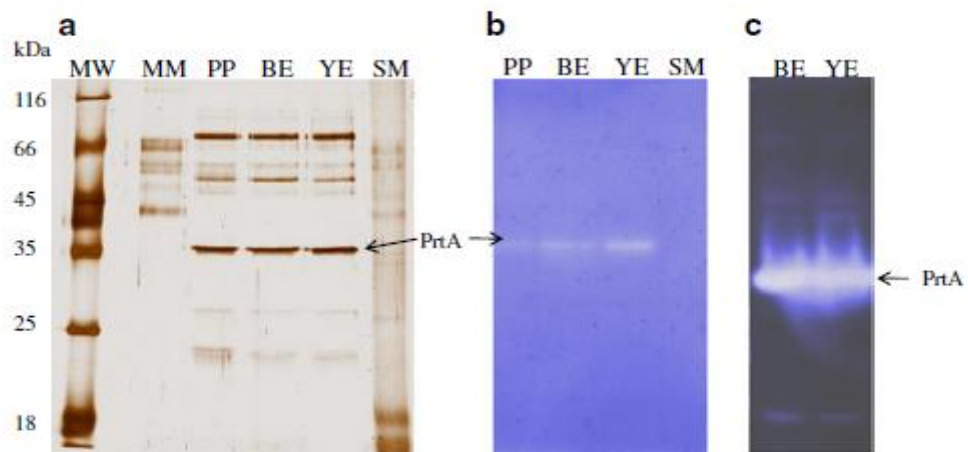


Fig. 4 **a** SDS-PAGE analysis of secreted protein by *A. nidulans* cultivated in minimal nitrate medium with different organic nitrogen sources. Lane MW, standard protein molecular weight markers; lane MM, minimal nitrate medium (control); lane PP, proteose peptone; lane BE, beef extract; lane YE, yeast extract; lane SM, skim milk. **b** Zymogram analysis demonstrates protease activity. **c** Native zymogram analysis demonstrates protease activity under non-denaturalizing conditions

PrtA, had proteolytic activity (Fig. 4b). However, six bands with proteolytic activity were identified in the native zymograms (Fig. 4c), which is consistent with the results of Cohen and Katz, who used different media and culture conditions [23, 27]. The 37-kDa band from the protease medium (supplemented with 0.5 % beef extract) was identified as protease PrtA using internal peptide sequencing (data shown below). This enzyme has been previously purified and characterized as having carboxylesterase activity in CEHM medium [7]; however, we did not report the proteolytic activity or protein expression in a medium designed for protease production. Interestingly, when proteolytic activity was assayed in media containing olive oil, there was no significant difference compared with media that did not contain lipidic sources (data not shown). Thus, even if the protein expressed by the *prtA* gene shows promiscuous esterase activity, its physiological role is related to the presence of organic nitrogen sources, as the PrtA protein was expressed at different levels in all of the tested conditions.

Identification of the 37-kDa Protein by Internal Amino Acid Sequencing

The 37-kDa protein identified in the SDS-PAGE gels was excised and identified using LC/MS/MS. The analysis revealed the presence of three peptide sequences: ALTSQS-GAPWGLGAISHK, ANLLSVK, and IKELATQGVLSNVQGSPNLLAYNGADE, which corresponded to protease PrtA sequences.

Conclusions

Two strategies to increase the production of alkaline protease PrtA from filamentous fungus *A. nidulans* were analyzed. In the first strategy, heterologous expression of the PrtA protein in *P. pastoris* was not successful. Although enzyme expression was observed, the protein was produced in an inactive form and exerted a lytic effect in the host cells. Therefore, enzyme overproduction in *A. nidulans* using culture-based strategies was explored, and the addition of organic sources (proteose peptone, beef extract, and yeast extract) to minimal nitrate medium (without additional carbon source) resulted in a 6.4-fold increase in the proteolytic activity in microorganisms. We also confirmed alkaline protease PrtA as the main proteolytic activity produced under these conditions, and the esterase activity of this protease did not appear to have physiological significance.

Acknowledgments The authors would like to thank Bsc. Norma Ballesteros and Ana Alva for technical assistance. Financial support for this project was obtained from PAPIIT-DGAPA-UNAM IN2148092. Denise Castro received a scholarship from CONACyT. The authors would also like to thank the Proteomic Unit of the Institute of Biotechnology, UNAM, for the LC/MS/MS analysis.

References

1. Rao, M. B., Tanksale, A. M., Ghatge, M. S., & Deshpande, V. V. (1998). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(3), 597–635.
2. Kumar, C. G., & Takagi, H. (1999). *Biotechnology Advances*, 17, 561–594.
3. Gupta, R., Beg, Q. K., & Lorenz, P. (2002). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 15–32.
4. Anwar, A., & Saleemuddin, M. (1998). *Bioresource Technology*, 64, 175–183.
5. Berka R.M., Dunn-Coleman N., Ward M. (1992) *Aspergillus* biology and industrial applications. In: Bennet, J.W., Klich, M.A. (eds) Boston: Butterworth-Heinemann, pp. 155–202.
6. Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L. J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., et al. (2005). *Nature*, 438(7071), 1092–1093.

7. Peña-Montes, C., González, A., Castro-Ochoa, D., & Farrés, A. (2008). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78(4), 603–12.
8. Katz, M. E., Rice, R. N., & Cheetham, B. F. (1994). *Gene*, 150, 287–292.
9. Sienze, R. J., & Leunissen, J. A. M. (1997). *Protein Science*, 6, 501–523.
10. Guo, J. P., & Ma, Y. (2007). *Protein Expression and Purification*, 58(2), 301–308.
11. Cereghino, J. L., & Cregg, J. M. (2000). *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 45–66.
12. Kafer, E. (1977). *Advances in Genetics*, 19, 33–131.
13. Kawasaki, L., Farres, A., & Aguirre, J. (1995). *Experimental Mycology*, 19(1), 81–85.
14. Luria, S. E., Adams, J. N., & Ting, R. C. (1960). *Virology*, 12, 348–390.
15. Invitrogen, Easy Select™ *Pichia* expression kit. A manual of methods for expression of recombinant proteins using pPICZ and PICZα in *Pichia pastoris*. Catalog no. K1740-01.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual* (2nd ed.). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
17. Bradford, M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
18. Rinderknecht, H., Geokas, M. C., Silverman, P., & Haverback, B. J. (1968). *Clinica Chimica Acta*, 21, 197–203.
19. Laemmli, U. K. (1970). *Nature*, 227, 680–685.
20. Guerrero-Olazarán, M., Escamilla-Treviño, L. L., Castillo-Galván, M., Gallegos-López, J. A., & Viader-Salvado, J. M. (2009). *Biotechnology Progress*, 25(5), 1310–1316.
21. Huang, C. J., Damasceno, L. M., Anderson, K. A., Zhang, S., Old, L. J., & Batt, C. A. (2011). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(1), 235–247.
22. Kim, T., & Lei, X. G. (2005). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 355–359.
23. Katz, M. E., Bernardo, S. M., & Cheetham, B. F. (2008). *Current Genetics*, 54, 47–55.
24. Viniegra-González, G., Favela, T., Aguilar, C., Romero, S., Díaz, G., & Augur, C. (2003). *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167.
25. Fukushima, D. (1982). Use of enzymes in food technology. In: Dupuy P. (ed). Paris: Lavoisier, pp. 381–388.
26. Singh, A., Ghosh, V. K., & Ghosh, P. (1994). *Letters in Applied Microbiology*, 18, 177–180.
27. Cohen, B. L. (1972). *Journal of General Microbiology*, 71, 293–299.