



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## IDENTIFICACIÓN DE UNA NUEVA CUTINASA (ANID5309.1) DE *Aspergillus nidulans* Y FACTORES QUE AFECTAN SU PRODUCCIÓN

Katía L. Esqueda Domínguez, Laura M. Segoviano Reyes, L. Denise Castro Ochoa, Carolina Peña Montes, Arturo Navarro Ocaña y Amelia Farrés.

Universidad Nacional Autónoma de México, Fac. Química. Depto. Alimentos y Biotecnología, Ciudad Universitaria, 04510, D.F. México. [farrés@unam.mx](mailto:farrés@unam.mx), Tel. y fax (55) 5622-5305

*Palabras clave:* Cutinasa, *Aspergillus nidulans*, SDS-PAGE

**Introducción.** Las cutinasas degradan cutina, biopolímero vegetal insoluble compuesto por hidroxí- y epoxi ácidos grasos de 16 y 18 carbonos unidos por enlaces éster, presente en cutícula de frutos. Presentan propiedades de lipasas y esterases, ya que hidrolizan tanto ésteres solubles como insolubles y triglicéridos; también realizan síntesis en medios con bajo  $a_w$ , lo que las hace enzimas potenciales para aplicación industrial (alimentos, detergentes, biodiesel). Se han aislado principalmente de hongos, como *F. solani*; la producción en *A. nidulans* ha sido reportada, sin embargo, no se muestran aspectos sobre regulación, purificación, caracterización ó identificación. Trabajos previos en el grupo han identificado una cutinasa de 28 kDa producida con aceite de olivo como inductor (Castro-Ochoa, comunicación personal).

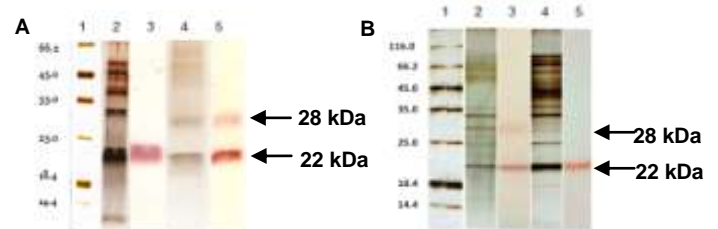
El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto de condiciones de cultivo y nutrientes sobre la producción de cutinasas en *Aspergillus nidulans* utilizando cutina ó cutícula como inductor y fuente de carbono (FC).

**Metodología.** Se obtuvieron cutícula y cutina a partir de manzana Golden (1). El efecto del inductor se evaluó empleando medio mínimo (MM) (2) y sustituyendo FC por cutina (0.1%-0.5%) ó cutícula (0.2% y 0.5%). Se probaron diferentes condiciones de temperatura (25°C, 30°C y 37°C) y velocidad de agitación (200, 250 y 300rpm). Se analizó el efecto de FC adicionales al inductor (sacarosa, glucosa, almidón y glicerol) en diferentes concentraciones; así como distintas fuentes de nitrógeno (FN), ( $KNO_3$ , urea,  $NH_4NO_3$ ,  $(NH_4)_2SO_4$ , extracto de levadura y bactopectona). La concentración de proteína se determinó con el método Bradford (3) y la actividad se midió con *p*-nitrofenil laurato (4). Geles SDS-PAGE se tiñeron con plata (Ag) para determinar peso molecular (PM) y zimogramas para demostrar la actividad enzimática con  $\alpha$ -naftil acetato ( $\alpha$ -NA) (5). Para la identificación, se cortó del gel SDS-PAGE la banda que mostró actividad en zimogramas, se digirió con tripsina y se secuenciaron péptidos por espectrometría de masas.

**Resultados.** La tabla 1 muestra las condiciones de cultivo y nutrientes óptimos encontrados para la producción de cutinasas y en la figura 1 se muestran los perfiles de proteínas, así como carboxilesterasas producidas en estas condiciones.

**Tabla 1.** Condiciones de cultivo y nutrientes óptimos

|                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| Temperatura                         | 37°C                          |
| Velocidad de agitación              | 300rpm                        |
| Concentración de cutina / cutícula  | 0.20%                         |
| Fuente de carbono cutina / cutícula | Glicerol 0.1% / Glicerol 0.5% |
| Fuente de nitrógeno                 | $KNO_3$                       |



**Figura 1.** Perfil de proteínas y carboxilesterasas en extractos crudos de medios óptimos para producción de cutinasas. **(A)**, Medios con cutina al 0.2% como inductor y FC: Carriles: 1, marcador de PM; 2, MM con glicerol 0.1% como FC adicional, tinción con Ag; 3, zimograma de medio en carril 2; 4, MM con  $KNO_3$  al 0.06% como FN y 5, zimograma de medio en carril 4. **(B)**, Medios con cutícula al 0.2% como inductor y FC: Carriles: 1, marcador PM; 2, MM sin FC adicional tinción con Ag; 3, zimograma de medio en carril 2; 4, MM con glicerol 0.5% como FC adicional y 5, zimograma de medio en carril 4.

La proteína de 22 kDa corresponde a la cutinasa ANID5309.1 reportada en el genoma de *A. nidulans*.

**Conclusiones.** Se identificó una nueva cutinasa de 22 kDa, en medio y condiciones diseñadas para la producción de cutinasas. La adición de  $KNO_3$  permite la producción de 2 enzimas (22 y 28 kDa), al igual que el uso de cutícula como única FC. La proteína de 28 kDa probablemente corresponde a la cutinasa previamente identificada en condiciones de producción de lipasas. Al adicionar glicerol se observó el mismo efecto para medio con cutícula ó cutina: la represión de la enzima de 28 kDa. Se determinó que la glucosa actúa también como represor para la producción de cutinasas.

**Agradecimientos.** K.E.D. agradece a CONACYT por beca #311607, PAPIIT IN2148092.

### Bibliografía.

- (1) Walton T., Kolattukudy P. (1972) *Biochemistry*, vol.(11):1885-1897
- (2) Käfer E. (2001). *Fungal Genetics Newsletter*, vol.(48): 20-21.
- (3) Bradford M. M. (1976). *Analytical Biochemistry*, vol.(72):248-254.
- (4) Nawani N., Singh R., Kaur J. (2006). *Electronic Journal of Biotechnology*, vol.(9):559-565
- (5) Kakariari, E. et al. (2000). *Le Lait*, vol. (80): 491-501.