



## Área II

# Biotechnología enzimática y biocatálisis



### Contenido

EFFECTO DEL NÚMERO DE MÓDULOS DE UNIÓN A CARBOHIDRATO EN LA ACTIVIDAD DE LA $\alpha$ -AMILASA DE <i>Lactobacillus amylovorus</i> Carlos Herrera Jiménez, Daniel Guillén, Romina Rodríguez Sanoja	38
CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA $\alpha$ -AMILASA PRODUCIDA POR <i>Bacillus licheniformis</i> LB 05 LIBRE E INMOVILIZADA EN AGAR-AGAROSA Leonel I. Blanco-de la Cruz, Anaid M. Silva-Salinas, Ulrico J. López-Chuken, Jesús A. Gómez-Treviño, Edgar A. Blanco-Gámez	39
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES MEDIANTE MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA A BAJO COSTO. Lucelly Montserrat Medina Pino, José Luis Martínez Vaquero, María del Rayo Santellán Olea, Daniel Tapia García,	40
PRODUCCIÓN, INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINASAS DE <i>Penicillium sp.</i> Arelly Núñez-Serrano, Bernardo García-Reyes, Sara Elena Solís Pereira, Alcione García-González	41
DEGRADACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR CUTINASAS RECOMBINANTES DE <i>Aspergillus nidulans</i> Alvarado Martínez Eric y Farrés Amelia	42
USO DE DISOLVENTES EUTECTICOS Y CUTINASAS EN LA REACCIÓN DE DEGRADACIÓN DE PET Jiménez Segura Valeria, Arturo Navarro y Farrés Amelia.	43
IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS ACTIVOS DE LA MURAMIDASA TRANSMEMBRANAL DE <i>Pediococcus acidilactici</i> ATCC 8042 Vianey Anahí Salas-Villagrán y Amelia Farrés	44
IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA MÍNIMA FUNCIONAL DE LA REGIÓN DE TRANSICIÓN RESPONSABLE EN LA ACTIVIDAD TRANSFERASA Y PROCESIVIDAD DE LA LEVANSACARASA LEVS DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> Maura Jennifer Martínez Morales, Flor de María García Paz, Clarita Olvera Carranza	45
PRODUCCION DE $\omega$ -AMINOTRANSFERASA A PARTIR DE <i>Fusarium Oxysporum</i> Rita María Campa-Ramos, Abraham Rogelio Martin-García, Patricia Guerrero-German, Juan Antonio Noriega-Rodríguez, Elisa Miriam Valenzuela-Soto	46
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN DE LA CELOBIOHIDROLASA II EN <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Ma. Irene Morelos Martínez, María Guadalupe Zavala Páramo, Karla Morelia Díaz Tapia, Horacio Cano Camacho	47



SECRECIÓN DIFERENCIAL DE HEMICELULASAS EN DOS PATOTIPOS DE <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> Karla Morelia Díaz Tapia, María Guadalupe Zavala Páramo, Ma. Irene Morelos Martínez, Jeni Bolaños Rebolledo, Horacio Cano Camacho	48
DISEÑO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA EL CRIBADO DE ACTIVIDAD $\beta$ -ESTERASA, ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA Itzel C. Romero-Soto, Olga Concha-Guzmán, Raúl B. Martínez-Pérez, Jorge A. Rodríguez, Rosa M. Camacho-Ruiz, Vicente Armenta-Pérez, M. Ángeles Camacho-Ruiz	49
INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATEPSINA L POR QUIMERAS RECOMBINANTES DE LA CHAGASINA DE <i>Trypanosoma cruzi</i> . Rosa E. Cárdenas-Guerra, Yasmin I. Rodríguez-Gavaldón, Octavio Montes Flores, Claudia I. Flores-Pucheta, Gerardo Reséndiz-Cardiel, Jaime Ortega-López	50
SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE NEO-AZÚCARES UTILIZANDO UNA CICLODEXTRINGLUCANOTRANSFERASA DE <i>Thermoanaerobacter sp.</i> Pedro Ángel Cid Jiménez, Agustín López-Munguía, Edmundo Castillo Rosales	51
ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA/FUNCIÓN DE LA REGIÓN N100 TERMINAL DE LA INULOSACARASA (IsIA) DE <i>Leuconostoc citreum</i> CW28. Ingrid Mercado Del Río, Clarita Olvera Carranza	52
DEVELOPMENT OF CHOLESTEROL OXIDASE AND ESTERASE ELECTRODES FOR THEIR APPLICATION ON SELF-POWERED BIOSENSORS Julio César López Rivas, Johannes Pedro Martínez Morales, Luis Alberto Estrada Jiménez, Abraham Ulises Chávez Ramírez, A. Déctor, Alejandra Álvarez, Juan de Dios Galindo de la Rosa, Vanessa Vallejo Becerra	53
ENTENDIENDO EL MECANISMO DE ELONGACIÓN DE LA LEVANA SINTETIZADA POR LA LEVANSACARASA DE <i>Bacillus subtilis</i> 168 Sol Castrejón, Luis Alberto Morales, María Elena Rodríguez y Agustín López Munguía	54
DETERMINACIÓN IN SILICO DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PEPTIDIL-PROLIL ISOMERASAS DE <i>Trypanosoma cruzi</i> : TcCyP19, TcCyP22 Y TcCySEC Daniel Jiménez-Guerra, Gerardo Reséndiz Cardiel, Aurora Antonio-Pérez, Rosa Elena Cárdenas Guerra, Jaime Ortega López	55
EXPRESIÓN DE GLICOSILTRANSFERASAS DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293 EN CONDICIONES DE ANOXIA. Luz Cristina Vallejo-García, María Elena Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía Canales	56
LAS PEPTIDIL-PROLIL-CIS-TRANS ISOMERASAS TVCYP1 Y TVCYP2 DE <i>Trichomonas vaginalis</i> SON POTENCIALES CATALIZADORES PARA REPLEGAMIENTO ASISTIDO DE PROTEÍNAS Verónica Aranda-Chan, Gerardo Reséndiz-Cardiel, Octavio Montes-Flores, Rossana Arroyo, Jaime Ortega-López	57



- EFFECTO DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293.  
Luz Cristina Vallejo-García, María Elena Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía Canales 58
- CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA ESTERASA GDSL CON AUTOTRANSPORTADOR Y TERMOESTABILIDAD DE *Pseudomonas alcaligenes* AISLADA A 1000 METROS DE PROFUNDIDAD DEL GOLFO DE MÉXICO  
Itzel Anahí Hidalgo-Manzano, José Luis Rodríguez-Mejía, Luis Felipe Muriel-Millán, Nancy Rivera-Gómez, Edmundo Castillo-Rosales, Liliana Pardo-López 59
- SÍNTESIS ENZIMÁTICA DEL ÉSTER FENETÍLICO DEL ÁCIDO CAFEICO EN MICROEMULSIONES.  
Fernanda Melissa Solís Villafranco, María Alejandra Pichardo Sánchez, Rodolfo Torres de los Santos, Guadalupe Bustos Vázquez, Luis Víctor Rodríguez Durán 60



## EFFECTO DEL NÚMERO DE MÓDULOS DE UNIÓN A CARBOHIDRATO EN LA ACTIVIDAD DE LA $\alpha$ -AMILASA DE *LACTOBACILLUS AMYLOVORUS*

Carlos Herrera Jiménez, Daniel Guillén, Romina Rodríguez Sanoja, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 70228, Ciudad Universitaria, Coyoacán C.P. 04510, Ciudad de México, México.  
Tel.: 56229191. romina@biomedicas.unam.mx

Palabras clave:  $\alpha$ -amilasa, CBMs, almidón

**Introducción.** La  $\alpha$ -amilasa (*LaAmyA*) de *Lactobacillus amylovorus* es una endoenzima que cataliza la hidrólisis de almidón, y está compuesta por un dominio catalítico (*LaDC*) en su extremo N-terminal, y un dominio de fijación al almidón (DFA) en su extremo C-terminal, el cual contiene 5 módulos de unión a carbohidrato (CBMs) idénticos y en tándem. Previamente, se ha demostrado que el DFA le provee a la *LaAmyA* la habilidad de adsorberse al gránulo de almidón y la capacidad de hidrolizarlo; así, cuando el DFA se deleta de la amilasa, esta pierde sus habilidades sobre el almidón insoluble (1). Así mismo, se ha demostrado que cada módulo del DFA es capaz de adsorberse de manera independiente al almidón y que no todos los CBMs se fijan al almidón simultáneamente, proponiéndose un fenómeno de cooperatividad (2).

Sin embargo, no se conoce cuál es la función específica de cada CBM en la adsorción e hidrólisis del *LaDC* sobre el gránulo de almidón. Debido a esto, se busca determinar el efecto que 0, 1, 3 y 5 CBMs tienen sobre la capacidad hidrolítica y cinética de la enzima.

**Metodología.** Se construyeron y purificaron las proteínas con 1, 3 y 5 CBMs unidos al *LaDC* (*LaDC-CBMx1*, *LaDC-CBMx3*, y *LaAmyA*, respectivamente), y el *LaDC* (Fig. 1). Posteriormente, se realizaron diversos ensayos de hidrólisis de almidón de papa soluble (Panreac) y almidón de maíz insoluble (Sigma) con todas las enzimas previamente descritas, en buffer citrato-fosfato 5 mM, pH 5.0, 63°C; se analizó el almidón residual (método de yodo-yoduro) (3), y los productos generados mediante el método del ácido 3'-5'-dinitrosalicílico (DNS) (4), cromatografía en placa fina (TLC) (5), y HPLC. Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos ( $V_{\max}$ ,  $K_m$ ,  $k_{cat}$ , y  $k_{cat}/K_m$ ).

**Resultados.** Se encontró que las enzimas *LaDC-CBMx3* y *LaAmyA* tienen una actividad específica 3 veces mayor que las enzimas *LaDC* y *LaDC-CBMx1*. Para la hidrólisis de almidón, se obtuvo el doble de producción de azúcares reductores al hidrolizar almidón soluble con *LaDC-CBMx3* (0.9 mg/mL) y *LaAmyA* (1.0 mg/mL), que al usar *LaDC* (0.4 mg/mL) y *LaDC-CBMx1* (0.5 mg/mL), y un aumento de más de 5 veces al hidrolizar almidón insoluble, usando *LaDC-CBMx3* (0.5 mg/mL) y *LaAmyA* (0.6 mg/mL), que al usar *LaDC* (0.05 mg/mL) y *LaDC-CBMx1* (0.2 mg/mL).

La presencia de 1 o más CBMs no modifican el perfil de productos de hidrólisis del almidón, sin embargo, sí aumentan la concentración de estos. Finalmente, los

*LaAmyA* y *LaDC-CBMx3* tienen una eficiencia catalítica significativamente mayor que *LaDC-CBMx1* y *LaDC* (Fig. 2).

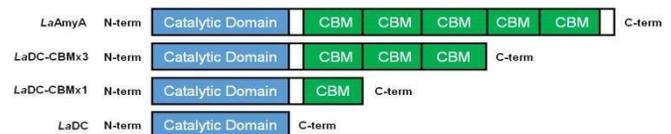


Figura 1. Diagrama de las proteínas *LaAmyA* (105 kDa), *LaDC-CBMx3* (90kDa), *LaDC-CBMx1* (69 kDa) y *LaDC* (53 kDa).

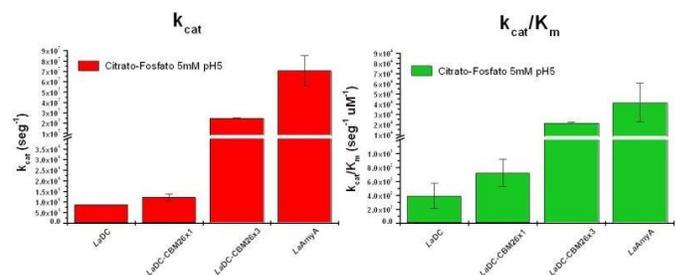


Figura 2. Gráficas de los parámetros cinéticos de las cuatro enzimas: número de recambio ( $k_{cat}$ ) y eficiencia catalítica ( $k_{cat}/K_m$ )

**Conclusiones.** Un solo CBM es capaz de otorgarle al *LaDC* la capacidad de adsorberse sobre el almidón insoluble e hidrolizarlo, sin embargo, este tiene poco efecto sobre su eficiencia catalítica, demostrando que se requieren por lo menos 3 CBMs para hidrolizar eficientemente ambos tipos de almidón, siendo así el número de CBMs el principal factor que afecta las propiedades catalíticas de la enzima.

**Agradecimientos.** Carlos Herrera Jiménez es estudiante del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas (UNAM), contó el apoyo de una beca personal (895190) de Conacyt México. Este proyecto contó con un apoyo parcial de DGAPA-UNAM, IN216419.

### Bibliografía.

- Rodríguez-Sanoja, R., Morlon-Guyot, J., Jore, J., Pintado, J., Juge, N., Guyot, J.P. (2000). *Applied and Environmental Microbiology* **66** (8), 3350-3356.
- Guillén, D., Santiago, M., Linares, L., Pérez, R., Morlon, J., Ruiz, B., Sánchez, S., Rodríguez-Sanoja, R. (2007). *Applied and Environmental Microbiology* **73** (12), 3833-3837.
- Thoma, J. A., French, D. (1960). *Journal of the American Chemistry Society* **82** (16), 4144-4147.
- Miller, G. L. (1959). *Analytical Chemistry*. **31** (3), 426-428
- Anderson, K., Li, S.C., Li, Y.T. (2000). *Anal. Biochem.* **287**, 337-339.



**CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA  $\alpha$ -AMILASA PRODUCIDA POR *Bacillus licheniformis* LB 05 LIBRE E INMOVILIZADA EN AGAR-AGAROSA**

Carlos Leonel I. Blanco-de la Cruz, Anaid M. Silva-Salinas, Ulrico J. López-Chuken, Jesús A. Gómez-Treviño, Edgar A. Blanco-Gámez, Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Químicas. San Nicolas de los Garza, N.L. C.P. 66455.  
edgar.blancogmz@uanl.edu.mx

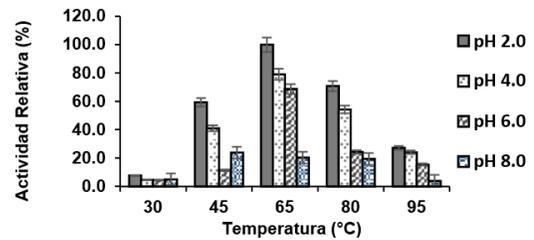
*Palabras clave:*  $\alpha$ -amilasa, inmovilización y *B. licheniformis*

**Introducción.** La  $\alpha$ -amilasa es una enzima extracelular que cataliza las moléculas del almidón hidrolizando los enlaces glucosídicos  $\alpha$ -1,4 obteniendo glucosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas límite; estas enzimas en su mayoría son obtenidas y producidas por bacterias del género *Bacillus*, que comprenden el 60% del mercado destacando las cepas como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*. [1,2]

El objetivo es evaluar el efecto producido por la inmovilización, determinando la actividad enzimática de la  $\alpha$ -amilasa producida por *B. licheniformis* LB05 en su forma libre e inmovilizada.

**Metodología.** La inmovilización de la enzima se realizó mediante la técnica de atrapamiento en agar/agarosa. Las perlas de gel agar/agarosa con la enzima atrapada fueron suspendidas en 0.5 mL del buffer (buffer de acetato de sodio 10 mM, pH 5.5) e incubadas en 0.5 mL, previamente esterilizados, de una solución de almidón soluble al 1.0%, la reacción se detuvo y se analizó mediante el método DNS [3]. La actividad enzimática se determinó a diferentes valores de pH y temperatura, usando buffer Tris-HCl para pH 2 y 3, buffer acetato de sodio a 0.1M para pH 4 y 5 y Glicina-HCl para el pH6; el rango de temperatura que utilizó este proceso fue de los 30°C hasta los 95°C. Se comparó la actividad enzimática en su forma inmovilizada utilizando la misma temperatura en la que se obtuvo una mayor actividad en su forma libre, a 65 °C por 30 min.

**Resultados.** La enzima libre tuvo una mayor actividad de trabajo a pH 2 y a una temperatura de 65°C dando como resultado  $2,340.3 \pm 12.6$  U mg<sup>-1</sup> pero conforme aumenta el pH en este mismo parámetro de temperatura su actividad disminuye como se muestra en la figura 1, por el contrario, al utilizar la técnica de inmovilización, la actividad enzimática fue menor a pH 2 e incrementando su actividad óptima pH más alcalinos como se muestra en la tabla 1.



**Fig. 1.** Efectos producidos por la enzima  $\alpha$ -amilasa a diferentes temperaturas y niveles de pH.

pH	Actividad Específica (U/mg)
2.0	91.3 ± 0.51
3.0	202.4 ± 0.42
4.0	866.2 ± 0.17
5.0	1183.5 ± 0.34
6.0	1481.8 ± 0.23

**Tabla 1.** Actividad específica reportada tras la inmovilización de la enzima  $\alpha$ -amilasa obtenida.

**Conclusiones.** El proceso de inmovilización desplazo la actividad óptima de la enzima a niveles más alcalinos de pH. Este comportamiento puede ser clave para la degradación del almidón en procesos industriales para la hidrólisis de diversos residuos agroindustriales.

**Agradecimiento.** Se agradece el apoyo de la facultad de ciencias Químicas a la UANL y al Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT).

**Bibliografía.**

Dibyngana Raul, Tania Biswas, Suchita Mukhopadhyay, Shrayan Kumar Das, and Suvroma Gupta 2015 Journal of Global Biosciences Volume 4, Special Issue 1, 2015, pp. 1886-1901.  
Dibyngana Raul, Tania Biswas, Suchita Mukhopadhyay, Shrayan Kumar Das, and Suvroma Gupta 2014. Hindawi Publishing Corporation Biochemistry Research International Volume 2014, Article ID 568141, 5 pages.  
O. Prakash and N. Jaiswal, 2011 World Appl. Sci. J., vol. 13, no. 3, pp. 572-577.



**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FLUORESCENTES MEDIANTE MUTAGENESIS SITIO DIRIGIDA BAJO COSTO**

Lucelly Montserrat Medina Pino, José Luis Martínez Vaquero, María del Rayo Santellán Olea, Daniel Tapia García, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Laboratorio de Micoplasmas, CICM-ICUAP, Puebla, 72570. [daniel.tapiag@alumno.buap.mx](mailto:daniel.tapiag@alumno.buap.mx)

*Palabras clave: proteínas fluorescentes, mutagénesis, GFP*

**Introducción.** La proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*, fue reportada por primera vez en 1979(1). Desde entonces, se ha utilizado ampliamente como marcadora de genes (2). Sin embargo, para poder confirmar su presencia es necesario en un tiempo prolongado el uso de un revelador basado en luz ultravioleta. Esto puede provocar daños en el ADN, organelos, células o tejidos (3). Así mismo los procesos de ingeniería genética para expresar una variedad de proteínas fluorescentes son laboriosos y costosos.

**Objetivo:** Expresión de variantes de la GFP mediante mutagénesis sitio dirigida que puedan ser visualizadas con mayor intensidad y menor tiempo de exposición a luz UV.

**Metodología.** Se realizó la transformación de GFPuv en la proteína azul fluorescente (BFP) seguido de la transformación de la BFP en la proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Ambas obtenidas mediante mutagénesis dirigida para sustituir los nucleótidos codificantes (Tabla 1).

**Tabla 1.** Codones de los aminoácidos del cromóforo en las proteínas fluorescentes.

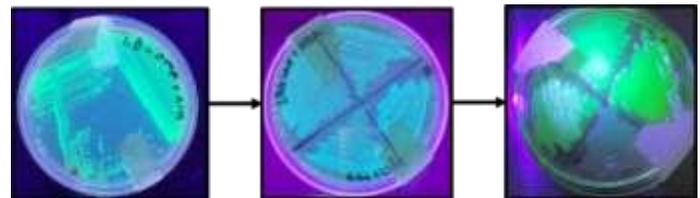
	64			65			66		
	F			S			Y		
<b>GFPuv</b>	t	t	c	T	c	t	t	a	t
	L			S			H		
<b>BFP</b>	t	t	g	T	c	c	c	a	t
	L			T			Y		
<b>EGFP</b>	c	t	g	A	c	c	t	a	t

Los plásmidos pBAD-GFPuv y pBFP fueron publicados mediante el kit ZymoPURE Plasmid Miniprep seguido de una PCR mutagénica utilizando la ADN polimerasa Phusion de alta fidelidad, donde se cambiaron los codones en ambos experimentos y se insertaron extremos y se insertaron externos homólogos de 27pb (4).

La transformación se llevó a cabo en la cepa DH5α de *E. coli*, este proceso se realizó bajo condiciones estandarizadas de transformación por choque térmico con bacterias competentes

generadas en cloruro de calcio, reposadas por dos horas, cultivadas e incubadas 37°C por 24 horas.

**Resultados.** Para la selección de las mutantes que expresan la BFP se utilizó una fuente de luz UV de 390 nm y en el caso de la EGFP se realizó sin ayuda de un revelador debido a que las mutantes tenían una coloración verdosa. En la Figura 1, podemos observar las diferencias en cuanto a la fluorescencia por excitación luz UV de las proteínas.



**Fig. 1.** Visualización de las bacterias fluorescentes en *E. coli* DH5α bajo luz UV. (A) Expresión de la GFPuv, (B) la BFP y (C) la EGFP.

Tanto la GFP como BFP emiten fluorescencia al ser excitada con una luz ultravioleta, no obstante la EGFP tiene la capacidad de ser excitada por dos diferentes longitudes de onda: la luz UV (390 nm) y la luz azul (488 nm).

**Conclusiones.** La PCR mutagénica acoplada a RHIV nos permite expresar proteínas fluorescentes de una variedad de colores a partir del gen de la GFP. Una ventaja al ocupar estas proteínas fluorescentes como marcadores de genes es la versatilidad por la excitación mediante diferentes longitudes de ondas.

**Agradecimiento.** Agradecemos a la Dirección de Bibliotecas Universitarias BUAP por sus servicios para consultar toda la bibliografía utilizada. También queremos agradecer al Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas de la BUAP por prestarnos sus instalaciones para la realización de todos los experimentos.

**Bibliografía.**

Ward W., Cody C., Hart R. & Coemier M. (1980). *Photochem. Photobiol.* 31(1): 611-615.  
 Cormak B., Valdivia R. & Falkow S. (1996): *Gene.* 173 (1): 33-38.  
 Gupta A. Avci P., Dai T., Huang Y. & Hamblin M.(2013) *Adv WoundCare.* 2(8): 422-437.  
 Watson J. & García-Nafría J. (2019). *J Biol Chem.* 294(42): 15271-15281.



## PRODUCCIÓN, INMOVILIZACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PECTINASAS DE *Penicillium sp*

Arely Núñez-Serrano<sup>a</sup>, Bernardo García-Reyes<sup>a</sup>, Sara Elena Solís Pereira<sup>b</sup>, Alcione García-González<sup>a\*</sup> <sup>a</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León, Av. Universidad S/N Ciudad Universitaria, 66455, San Nicolás de los Garza, N.L., México. <sup>b</sup>Instituto Tecnológico de Mérida, Av. Tecnológico km. 4.5 S/N C.P. 9711, Mérida, Yuc., México.  
alcione.garciagn@uanl.edu.mx

*Palabras clave:* pectinasas, *Penicillium sp*, inmovilización

**Introducción.** Las pectinasas son un conjunto de enzimas hidrolíticas altamente demandadas en la industria alimentaria en la extracción y clarificación de jugos. La mayor producción de pectinasas comerciales se lleva a cabo por hongos filamentosos. La inmovilización enzimática en nanopartículas magnéticas (*core-shell*) proporciona mayor estabilidad, fácil recuperación y reusabilidad<sup>1</sup>. El objetivo de este trabajo es producir e inmovilizar pectinasas a partir de *Penicillium sp.* utilizando agro residuos como cosustratos para la industria de alimentos.

**Metodología.** La producción enzimática se realizó a partir de *Penicillium sp.*, por fermentación sumergida utilizando cáscara de limón como cosustrato<sup>2</sup>. El extracto se purificó por ultrafiltración con membrana (<50 kDa). Los parámetros cinéticos se determinaron por modelo de Michaelis-Menten<sup>3</sup>. Se determinó el peso molecular por SDS-PAGE. Las pectinasas se inmovilizaron en nanopartículas Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> aminadas y utilizando glutaraldehído como enlace covalente. Se optimizaron las condiciones de producción y de reacción enzimática libre e inmovilizada por DCC.

**Resultados.** Se observó una diferencia del 45% entre la actividad enzimática con cáscara de limón como cosustrato (350 U/mL) y el medio control (190 U/mL). Posterior a la ultrafiltración del extracto enzimático por membrana se obtuvo un rendimiento del 62.15% y la fracción <50 kDa presentó una actividad total de 43,352.26 U.

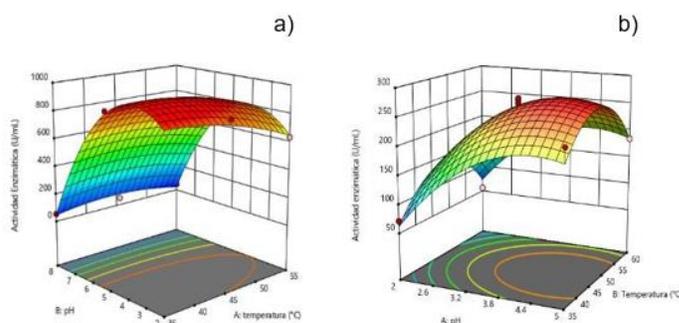
**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de la fracción enzimática <50 kDa mediante modelo Michaelis-Menten, R<sup>2</sup> 0.999.

ENZIMA	V <sub>max</sub>	km	R <sup>2</sup>
Pectinasas*	0.00507 ± 5.15 <sup>-4</sup>	0.627 ± 0.206	0.977
E. enzimático crudo	11.06 ± 1.23	0.777 ± 0.25	0.976
E. ultrafiltrado (<50 kDa)	2.578 ± 0.024	0.115 ± 0.010	0.999

\**A. niger* (Sigma Aldrich)

El extracto pectinolítico ultrafiltrado presentó fracciones proteicas en 20, 30 y 50 kDa de acuerdo con el análisis por SDS-PAGE.

Se observó un incremento en la actividad enzimática (U) con respecto al aumento de la concentración de pectinasa inicial, alcanzando la máxima actividad retenida (183.62 U) a una concentración enzimática de 1.0 % v/v; reteniendo el 80% de la actividad inicial.



**Fig. 1.** Superficie de respuesta de las condiciones de reacción enzimática a) libre e b) inmovilizada.

**Conclusiones.** Se logró producir enzimas pectinasas a partir de *Penicillium sp.*, utilizando cosustratos agroindustriales optimizando las condiciones de producción en fermentación sumergida. La inmovilización en nanopartículas magnéticas (*core-shell*) permitió mayor estabilidad enzimática en condiciones ácidas (pH 4.5) y 10°C que la enzima libre.

**Agradecimiento.** Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante la realización de este proyecto.

### Bibliografía.

- Ahmed, I. et al. Bioprocessing of citrus waste peel for induced pectinase production by *Aspergillus niger*; its purification and characterization. *J. Radiat. Res. Appl. Sci.* 9, 148–154 (2016).
- Miller, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.* 31, 426–428 (1959).
- Mahmoodi, M., Najafpour, G. D. & Mohammadi, M. Production of pectinases for quality apple juice through fermentation of orange pomace. *J. Food Sci. Technol.* 54, 4123–4128 (2017).



### DEGRADACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR CUTINASAS RECOMBINANTES DE *Aspergillus nidulans*

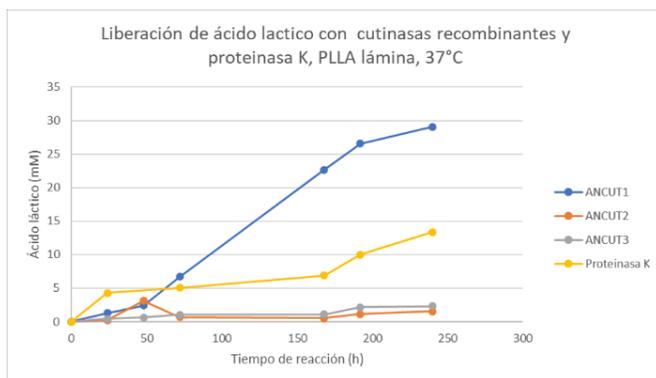
Alvarado Martínez Eric y Farrés Amelia. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Avenida Universidad, 3000, CDMX, 04510. farres@ unam.mx

*Palabras clave:* Cutinasas, Proteinasa K, ácido poliláctico, degradación, ácido láctico

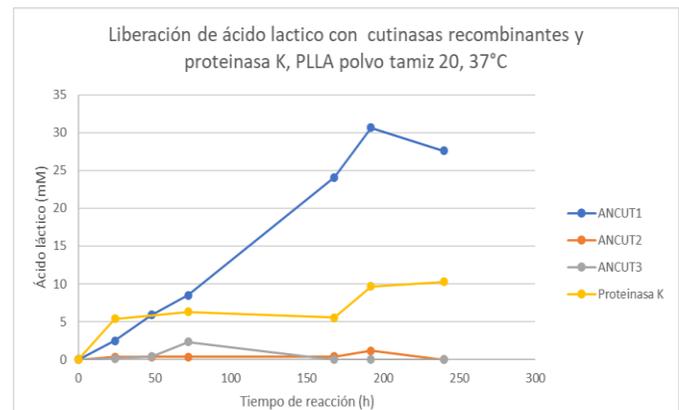
**Introducción.** Los polímeros plásticos sintéticos se han convertido en un problema grave debido a que tardan años en degradarse. Los polímeros biodegradables como el ácido poliláctico (PLA) se han propuesto como una alternativa. El grupo de trabajo demostró la degradación de ácido poliláctico por 3 cutinasas recombinantes de *A. nidulans* (1,2), y en la literatura se reporta proteinasa K de *Engyodontium album* (3). El perfil de degradación de las cutinasas recombinantes frente a su sustrato natural (la cutina) (4) sugiere una posible sinergia entre estas, por lo que se evaluará el uso de una mezcla de cutinasas y la modificación de condiciones de reacción para mejorar la degradación de PLA, buscando una mayor liberación de su monómero, el ácido láctico.

**Metodología.** Se realizó la expresión de cutinasas recombinantes ANCUT1,2,3 de *Aspergillus nidulans* en *Pichia pastoris* (Easysselect, Invitrogen). Se evaluó la actividad esterasa en zimograma utilizando  $\alpha$ -naftilo como sustrato. Se procedió a hacer pruebas de degradación en ácido poliláctico (lámina y molido-tamizado) usando las 3 cutinasas y la proteinasa K. El ácido láctico liberado se cuantificó mediante un kit colorimétrico (Lactate assay kit, Sigma-Aldrich).

#### Resultados.



**Fig. 1.** Concentración de ácido láctico liberado por la degradación de PLA (lámina) por cutinasas y proteinasa K (1%).



**Fig. 2** Concentración de ácido láctico liberado por la degradación de PLA (tamiz 20) por cutinasas y proteinasa K (1%).

Los resultados muestran que la cutinasa recombinante ANCUT1 libera una cantidad mayor de ácido láctico por la degradación de PLA, seguido de la proteinasa K. El uso de PLA molido y tamizado mejora la degradación, y se alcanzó una mayor cantidad en menor tiempo para ANCUT1.

**Agradecimientos.** PAPIIT IT203118, beca CONACYT 1041839.

#### Bibliografía

- Bermúdez-García, E. et al. (2019). Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3863-3874.
- Sánchez-Sánchez M., (2015). Aplicación de las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 recombinantes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres, Tesis de Licenciatura UNAM.
- Kawai, F., Nakadai, K., Nishioka, E., Nakajima, H., Ohara, H., Masaki, K., & Iefuji, H. (2011). Different enantioselectivity of two types of poly (lactic acid) depolymerases toward poly (L-lactic acid) and poly (D-lactic acid). *Polymer degradation and stability*, 96(7), 1342-1348.
- Llanos-Reyes A. C., (2018). Aplicación de las cutinasas recombinantes ANCUT3 y ANCUT4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres, Tesis UNAM.



### USO DE DISOLVENTES EUTECTICOS Y CUTINASAS EN LA REACCIÓN DE DEGRADACIÓN DE PET

Jiménez Segura Valeria, Arturo Navarro y Farrés Amelia. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Avenida Universidad, 300, México, ciudad de México 0510. amelia.farres@gmail.com

*Palabras clave:* Cutinasa, DES, degradación

**Introducción.** La problemática del uso excesivo del PET y el deshecho incorrecto de este ha llevado a contaminación. Se han buscado alternativas para reciclarlo por medio de la biotecnología. La biodegradación de PET con cutinasas es una alternativa para esto, sin embargo, la investigación aún está en desarrollo. Se ha observado que la modificación del medio y de las condiciones de reacción mejora los tiempos de degradación del PET. Se espera que, conjuntando el proceso enzimático y la adición de mezclas eutécticas, habrá biodegradación de PET esperando una reacción eficiente.

**Metodología.** Se realizó la expresión de las enzimas ANCUT1, ANCUT2 y ANCUT3 de *Aspergillus nidulans* en *Pichia pastoris* (Easysselect manual, Invitrogen) Se evaluó la actividad esterasa en zimograma utilizando  $\alpha$ -naftilo como sustrato, este también para realizar pruebas de estabilidad de las Cutinasas en 3 mezclas eutécticas ChCl:E:H<sub>2</sub>O, ChCl:G:H<sub>2</sub>O y ChCl:EG:H<sub>2</sub>O a

temperaturas de 50 y 55°C. El grado de degradación de PET se determinó por cromatografía en capa fina usando como estándares TPA, BHET y DMT.

#### Resultados.

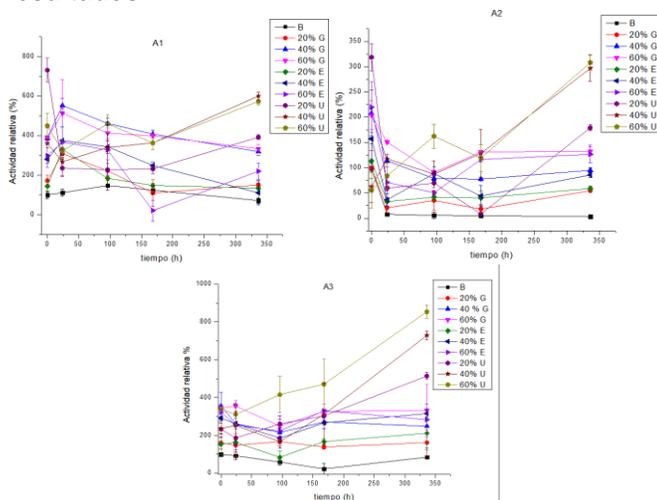


Gráfico 1. Estabilidad térmica relativa de Ancylinas 1, 2 y 3 con diferentes DES empleados en diferentes porcentajes (ChCl:G:H<sub>2</sub>O, ChCl:E:H<sub>2</sub>O, ChCl:U:H<sub>2</sub>O) a 55°C.

**Degradación de PET.** Condiciones 3 semanas, se agregó enzima a los 12 días, 50 °C, agitación 50 rpm, 10 mg de PET.

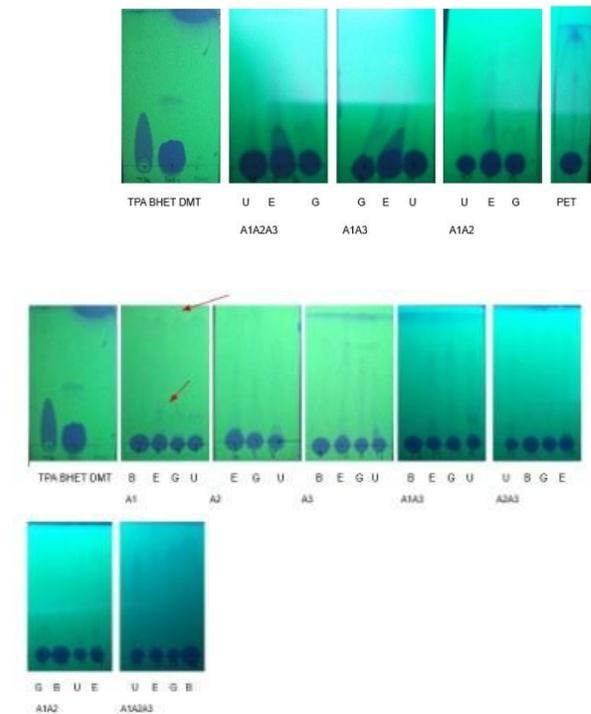


Fig. 1. Productos de degradación obtenidos de la reacción de degradación de PET con mezclas eutécticas **B:** buffer Tris-HCl 50mM pH9, **G:** DES ChCl:G:H<sub>2</sub>O, **E** DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O y **U:** DES ChCl:E:H<sub>2</sub>O.

El uso de mezclas eutécticas con enzimas aumenta la actividad y estabilidad de las cutinasas ANCUT1, ANCUT2 Y ANCUT3, además de verse favorecida la degradación de PET para la obtención de posibles oligómeros, TPA y BHET.

**Agradecimientos.** PAPIIT IT201921. Beca CONACYT 1002934.

#### Bibliografía

Kawai F. *et al.* 2019., Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management another fields, Applied Microbiology and Biotechnology 103:4253-4268. 2) Llanos R.A. (2018), Aplicación de cutinasas recombinantes AnCut 3 y AnCut4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres, Tesis.UNAM 3) Morales S. L., 2018, Degradación de polietileno tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*, Tesis UNAM.



### IDENTIFICACIÓN DE LOS DOMINIOS ACTIVOS DE LA MURAMIDASA TRANSMEMBRANAL DE *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042

Vianey Anahí Salas-Villagrán y Amelia Farrés. Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 312, Facultad de Química, Ciudad de México, C.P. 04510. farres@unam.mx

*Palabras clave:* Peptidoglucano, muramidasa, acoplamiento molecular

**Introducción.** Las peptidoglucano hidrolasas son enzimas responsables de hidrolizar el peptidoglucano de las bacterias. Están organizados en un dominio enzimáticamente activo, responsable de la hidrólisis y en un dominio de unión a carbohidratos. Previamente, el grupo de trabajo identificó una hidrolasa de peptidoglucano de 110 kDa producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 (1). Sin embargo, se identificó solo como un transportador de tipo ABC, además de no tener ningún dominio reportado como antimicrobiano y ninguna secuencia de proteína homóloga a las *N*-acetilmuramidases en las bases de datos. La proteína se clonó y expresó para estudiar su actividad, se observó la degradación de la proteína en fragmentos de bajo peso molecular. No obstante, su actividad lítica no se vio afectada, lo que sugiere que solo un dominio de la proteína fue responsable de la actividad lítica. Por lo tanto, con ayuda de diversos programas computacionales se predijo un modelo de la estructura de la proteína en la membrana (2).

El objetivo de este trabajo es determinar qué dominio de la enzima es el responsable de la actividad antimicrobiana, clonando y expresando cada uno de ellos de forma independiente, así como comprender la relación entre su función y estructura proteica.

**Metodología.** Con base en la predicción estructural de la proteína en la membrana obtenida previamente, se seleccionaron tres regiones y cada una se clonó y expresó de manera independiente. Por otro lado, la predicción de cada una de sus estructuras 3D se realizó mediante modelado *ab initio*, así como la predicción de la unión del sustrato utilizando la herramienta de acoplamiento molecular Autodock Vina.

**Resultados.** Se obtuvo la proteína recombinante de cada una de las regiones y se evaluó su actividad lítica en zimograma frente a células liofilizadas de *M. lysodeikticus*, observando actividad en únicamente una de las regiones (región II) en un peso de aproximadamente 30 kDa, con actividad sustrato-específica de *N*-acetilmuramidasa (Fig. 1). Posteriormente se obtuvieron los modelos 3D de las tres regiones, los cuales fueron utilizados para realizar el acoplamiento molecular usando como sustrato una molécula homóloga del peptidoglucano de las bacterias y

el modelo correspondiente a la región II fue el que mostró tener la menor energía de afinidad en el acoplamiento molecular, lo que indicaría una mayor interacción con el sustrato (Fig. 2).

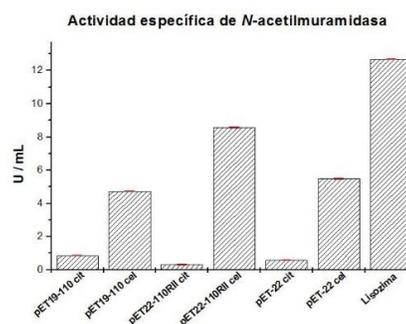


Fig. 1. Evaluación de la actividad sustrato-específica de la proteína de membrana de 110-kDa

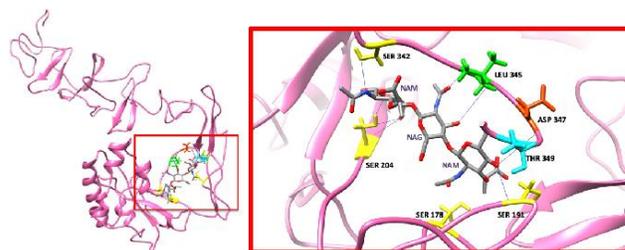


Fig. 2. Acoplamiento molecular con menor energía de afinidad y ligando.

**Conclusiones.** Estos resultados sugieren que el fragmento correspondiente a la región II contiene el sitio catalítico de la proteína de membrana de 110 kDa, con actividad de muramidasa confirmada, siendo el primer transportador de tipo ABC reportado con actividad peptidoglucano hidrolasa, incluso sin tener alguna secuencia consenso correspondiente a las peptidoglucano hidrolasas.

#### Agradecimientos.

CONACYT CVU: 896320

PAIP 5000-9095 UNAM

#### Bibliografía.

- García-Cano I. (2013). Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- Barbosa González P. (2018). Tesis de maestría, Facultad de Química, UNAM.



## IDENTIFICACIÓN DE LA ZONA MÍNIMA FUNCIONAL DE LA REGIÓN DE TRANSICIÓN RESPONSABLE EN LA ACTIVIDAD TRANSFERASA Y PROCESIVIDAD DE LA LEVANSACARASA LEV5 DE *Leuconostoc mesenteroides*

Maura Jennifer Martínez Morales, Flor de María García Paz, Clarita Olvera Carranza, Instituto de Biotecnología, Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, UNAM, Cuernavaca, 62210. maura.martinez@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* Levansacarasa, termoestabilidad, transferencia

**Introducción.** Las levansacarosas son enzimas que utilizan sacarosa como sustrato para llevar a cabo la síntesis de un polímero de fructosas unido mediante un enlace  $\beta$ -2,6, denominado levana. Este polímero tiene amplias aplicaciones en la industria de alimentos y medicina (1). Las levansacarosas pertenecen a la familia GH68 de las glicosilhidrolasas, y pueden presentar arquitecturas unidominio o multidominio. La levansacarasa LevS de *Leuconostoc mesenteroides* es una levansacarasa multidominio que cuenta con tres dominios: dominio N-terminal, dominio catalítico y dominio C-terminal. Resultados obtenidos previamente demuestran que entre el dominio catalítico y el C-terminal de esta enzima existe una zona involucrada en la actividad transferasa y procesividad, la cual fue denominada región de transición (Tn) (2). Sin embargo, hasta el momento se desconoce si se requiere la secuencia total de la Tn para mantener la funcionalidad de la enzima.

Delimitar la región mínima funcional presente en la región de transición en la levansacarasa LevS, que participa en la actividad transferasa y procesividad.

**Metodología.** Se realizó un análisis *in silico* de la región de transición y a partir de él, se llevó a cabo el diseño y construcción de dos versiones truncadas. Las enzimas se purificaron por cromatografía de intercambio iónico y se llevó a cabo su caracterización bioquímica en la cual se determinó pH, temperatura óptima y estabilidad. Además, se analizó su actividad y perfil de productos. Los productos se analizaron y cuantificaron por TLC, HPAE-PAD y HPLC-SEC.

**Resultados.** A partir de los análisis *in silico* se encontró que la Tn presenta un plegamiento tipo solenoide, en el cual se identificaron 4 posibles bolsillos hidrofóbicos (pCBMs). De acuerdo a estos hallazgos se diseñaron y construyeron 2 versiones truncadas a las que se les eliminó gradualmente los pCBMs (Fig.1).

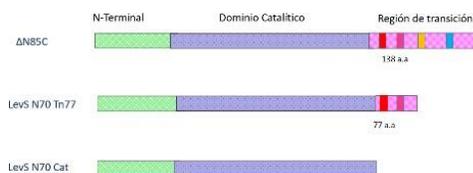


Fig. 1. Arquitectura de las versiones truncadas

La caracterización bioquímica de estas versiones truncadas demostró que los bolsillos III y IV no participan de manera relevante en las propiedades enzimáticas. Mientras que, los bolsillos I y II son importantes para mantener la termoestabilidad. Asimismo, los pCBMs I y II participan en la velocidad de reacción favoreciendo el consumo de sustrato a través del tiempo. En cuanto a la relación hidrólisis-transferencia, se encontró que los pCBMs III y IV no están involucradas en esta especificidad, mientras que, los pCBMs I y II participan fuertemente en la actividad transferasa. Además, se encontró que todas las enzimas fueron capaces de sintetizar fructooligosacáridos y polímero de alto peso molecular (PAPM). Sin embargo, si se observó que los pCBMs I y II están involucrados en la síntesis de PAPM (tabla 1), ya que al eliminarlos se ve afectado en un 50% la producción del polímero.

Tabla 1. Análisis de actividad hidrolítica y polímeros sintetizados por  $\Delta$ N85C y versiones truncadas.

Enzima	% Hidrólisis	% PAPM	% PBPM	T1/2 (horas)
$\Delta$ N85C	16 $\pm$ 0.8	73.12 $\pm$ 0.69	10.87 $\pm$ 0.28	>7 2
LevS N70 Tn77	11 $\pm$ 0.5	72.05 $\pm$ 1.23	16.94 $\pm$ 0.53	>7 2
LevS N70 Cat	41.5 $\pm$ 0.51	36.76 $\pm$ 0.31	21.73 $\pm$ 0.59	4

**Conclusiones.** Se encontró que la región mínima funcional de la región de transición corresponde a los primeros 77 residuos, en los cuales se encuentran ubicados los pCBMs I y II. Se propone que esta zona mínima está involucrada en favorecer interacciones que incrementan la afinidad de la enzima por las moléculas aceptoras (4), lo que se traduce en un aumento en la actividad transferasa y síntesis de PAPM.

**Agradecimiento.** A la Universidad Nacional Autónoma de México por el financiamiento del programa DGAPA- PAPIIT a través del proyecto IN216120.

### Bibliografía.

- Fuchs, A. (1991). Current and potential food and non-food applications of fructans. *Biochemical Society Transactions*, 19(3), 555–560.
- Morales-Arrieta, S., Rodríguez, M., Segovia, L., López-Munguía, A. & Olvera-Carranza, C. (2006). *Gene*. 376(1): 59-67.
- Claverie, M., Cioci, G., Vuillemin, M., Bondy, P., Remaud-Simeon, M., & Moulis, C. (2020). *Journal of Biological Chemistry*, 295(17): 5602–5613.
- Bai, Y., Gangoiti, J., Dijkstra, B. W., Dijkhuizen, L., & Pijning, T. (2017). *Structure*, 25(2): 231–242.

**PRODUCCION DE  $\omega$ -AMINOTRANSFERASA A PARTIR DE *Fusarium Oxysporum***

Rita María Campa-Ramos<sup>a</sup>, Abraham Rogelio Martín-García<sup>a</sup>, Patricia Guerrero German<sup>a</sup>, Juan Antonio Noriega-Rodríguez<sup>a</sup>, Elisa Miriam Valenzuela-Soto<sup>b</sup> <sup>a</sup>Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Sonora, Blvd. Luis Encinas y Rosales s/n, Col. Centro, Hermosillo, Sonora, México. CP 83000. <sup>b</sup>Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo Carretera a la Victoria 71, Col. San Luis, , Hermosillo, Sonora, México. CP 83000. Rinos14@hotmail.com

*Palabras clave:* Aminotransferasa, quiral, *Fusarium Oxysporum*

**Introducción.** Las transferasas son las enzimas que catalizan aquellas reacciones celulares donde un grupo de átomos se transfieren de un sustrato a otro. La importancia de la biosíntesis de aminoácidos y aminas con actividad óptica ha crecido en los últimos veinte años porque aminas quirales se utilizan como productos farmacéuticos intermedios y finales [Martin et al., 2007], y en síntesis asimétrica y la resolución de químicos [Martin et al., 2007]. Las aminotransferasas intervienen en la síntesis de compuestos con actividad óptica. La síntesis asimétrica ha adquirido una gran importancia; esta incluye métodos enzimáticos, estereoquímicos y también catalíticos [Gerlach et al., 2005]. En la preparación de aminas enantioméricamente puras la importancia de las waminotransferasas está aumentando debido a su enantioselectividad [Koszelewski et al., 2010]. Metodología. La producción de *Fusarium oxysporum* fue en 500mL que contenía 0.5 g de urea, 0.5 g de fosfato de potasio, 5.0 g de azúcar. La biomasa fue obtenida por filtración en vacío con filtro Whatman de 150mm, obteniendo un rendimiento de 1.55g/500mL. Dado que la enzima de nuestro interés está en el interior de la célula, se prosiguió a un rompimiento de pared celular del *Fusarium oxysporum*, se utilizó nitrógeno líquido. Se pusieron en contacto 1.2g de células libres en un mortero en la campana de flujo laminar, se cubrieron con nitrógeno líquido utilizando todas las medidas necesarias para su uso, se evaporó el nitrógeno y se cristalizaron las células, después se molieron bien en el mortero para después ponerse en contacto con la reacción de transaminación en las condiciones necesarias, para después ser analizadas por HPLC.

**Resultados.** En la Figura 1 se muestra el gel de agarosa al 1.0% mostrando los resultados de la prueba de PCR para la detección de hongos, dando positivo para el hongo tipo *Fusarium oxysporum*.

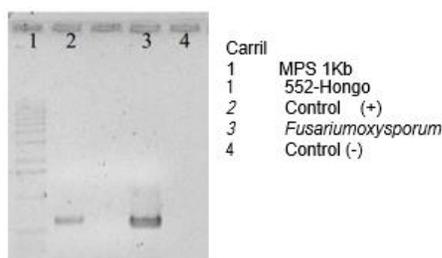


Fig. 1. Prueba de PCR para la detección de hongos.

La actividad de R-AT se midió directamente con la velocidad inicial de la generación de la acetofenona (Figura 2), la cual se obtuvo a los 19.8 minutos por HPLC, dando una velocidad de producción de 0.301 $\mu$ M/min, en sus condiciones óptimas de 32.5°C y pH de 6.28.

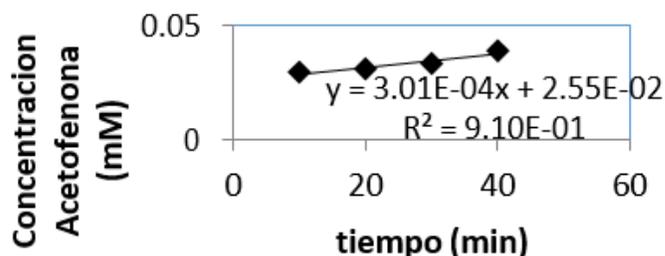


Fig. 2. Velocidad de producción de Acetofenona a 32.5°C y pH de 6.28.

**Conclusiones.** Se purificó una enzima aminotransferasa con actividad estereoselectiva; con la cual fue posible convertir RMBA a acetofenona. La estereoselectividad de  $\omega$ -AT fue con R-AT ya que fue donde se mostró actividad. La R-AT detectada presentó la mayor actividad a 32.5°C y pH de 6.28; esas condiciones se obtuvieron una velocidad de reacción de 0.301 $\mu$ M/min.

**Bibliografía.**

Gerlach, Matthias; Pütz, Claudia; Enders, D. and Gaube, Gero. "Procedimiento de síntesis de compuestos quirales". Patente Europea. Numero: 2234908. (2005.07.01). Koszelewski, Clay, Dorina; Grischek, Dominik; Gross, Barbara; Lavandera, Ivan; Wolfgang, Kroutil. "Testing of microorganisms for  $\omega$ -transaminase activity". Tetrahedron: Asymmetry (2010), 21(16), 2005-2009. 3.Martin, Abraham R.; DiSanto, Rocco; Plotnikov, Irina; Kamat, Sanjay; Shonnard, David; Pannuri, Sachin. "Improved activity and thermostability of (S)- aminotransferase by error-prone polymerase chain reaction for the production of a chiral amine". Biochemical Engineering Journal (2007), 37(3), 246-255.

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DEL GEN DE LA CELOBIOHIDROLASA II  
EN *Colletotrichum lindemuthianum***

Ma. Irene Morelos Martínez, María Guadalupe Zavala Páramo, Karla Morelia Díaz Tapia, Horacio Cano Camacho. Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología (CMEB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, C.P. 58100.  
irene.morelos@umich.mx, gzavpar@hotmail.com, more.fergie93@gmail.com, hcano1gz1@mac.com

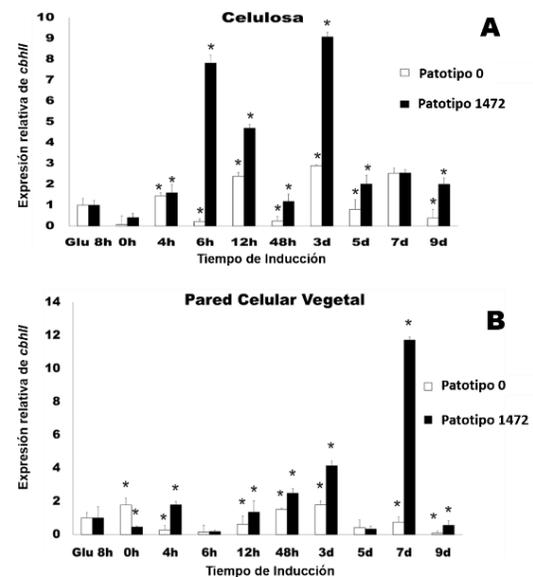
*Palabras clave:* Expresión, celulosa, *cbhII*

**Introducción.** *Colletotrichum lindemuthianum* es hongo patógeno de *Phaseolus vulgaris* que presenta una gran diversidad de patotipos con diferente grado de virulencia (1). Los hongos fitopatógenos al enfrentarse con la pared celular vegetal, para despolimerizarla, secretan un arsenal de enzimas hidrolíticas (2), entre las que se encuentran la Celobiohidrolasa II (CBHII) (EC 3.2.1.91), que participa en la degradación de la celulosa actuando sobre los extremos no reductores (3).

El objetivo de este trabajo fue analizar los perfiles de transcripción del gen *cbhII* en un patotipo patógeno (1472) y uno no patógeno (0) de *C. lindemuthianum*.

**Metodología.** Se realizó extracción de ARN total por el método de TRIzol (Invitrogen) de micelio de ambos patotipos previamente inducido en medio Mathur modificado suplementado con 2.5% de pared celular de *P. vulgaris* (cv. Flor de Mayo), celulosa o glucosa como única fuente de carbono y con diferentes tiempos de incubación (0, 4, 6, 12 y 48 horas y 3, 5, 7 y 9 días) (4). Se realizó síntesis de ANDc siguiendo las instrucciones del kit SuperScrip III RT (Invitrogen). Se realizaron ensayos de qPCR, usando el kit de RadiantTMGreen (2X) qPCR Mix Hi-Rox (1X) (Alkali Scientific) y el sistema de PCR StepOne Real-Time (Applied Biosystems). La cuantificación relativa de la expresión génica se realizó mediante el método de CT comparativo ( $\Delta\Delta CT$ ) (5) y los datos se obtuvieron por triplicado en dos eventos independientes. Se realizó análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se reportaron como las medias con errores estándar (SE). Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron significativos.

**Resultados.** El patotipo 1472 presentó mayores niveles de transcrito de *cbhII* que el patotipo 0. El patotipo 1472 presentó dos picos de expresión relativa (6 h y 3 días) en cultivo con celulosa. En contraste, el patotipo 0 mostró incremento de expresión hasta los 3 días. Cuando se utilizó pared celular de frijol como fuente de carbono, el patotipo 1472 mostró un incremento máximo de expresión a los 7 días, que fue el mayor nivel de transcrito detectado en el análisis, mientras que para el patotipo 0, los niveles de expresión apenas sobrepasaron a los basales



detectados con glucosa (fig. 1).

**Fig. 1.** Expresión relativa del gen *cbhII* en la raza 1472 y raza 0 de *C. lindemuthianum*. **A** celulosa y **B** pared celular vegetal. Las barras muestran la media de los valores por triplicado

**Conclusiones.** El patotipo patógeno presentó mayor nivel de expresión de *cbhII* en casi todos los tiempos en ambas fuentes de carbono, comparado con el patotipo no patógeno. El mayor nivel de expresión del patógeno se obtuvo en la fuente de carbono más compleja que es la pared celular vegetal.

**Agradecimiento.** A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (Proyecto 2020-2021 a HCC) y a CONACYT (Proyecto 2019-2022 a MGZP y becas a KMDT y MIMM).

**Bibliografía.**

- Pastor-Corrales M. (199). *Phytopathology* 81(6): 694.  
King, B. C., Waxman, K. D., Nenni, N. V., Walker, L. P., Bergstrom, G. C., & Gibson, D. M. (2011). *Biotechnol Biofuels*, 4(1), 1-14.  
Horn, S. J., G. Vaaje-Kolstad, B. Westereng y V. G.Eijsink. (2012). *Biotechnol Biofuels* 5(1): 45.  
Acosta-Rodríguez, I., Piñón-Escobedo, C., Zavala-Páramo, M. G., López-Romero, E., & Cano-Camacho, H. (2005). *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87(4), 301-310.  
Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). *methods*, 25(4), 402-408.



## SECRECIÓN DIFERENCIAL DE HEMICELULASAS EN DOS PATOTIPOS DE *Colletotrichum Lindemuthianum*

Karla Morelia Díaz Tapia, María Guadalupe Zavala Páramo, Ma. Irene Morelos Martínez, Jeni Bolaños Rebolledo, Horacio Cano Camacho, Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, FMVZ, Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo, CP 58194, Morelia, Michoacán, México.  
morelia.diaz@umich.mx

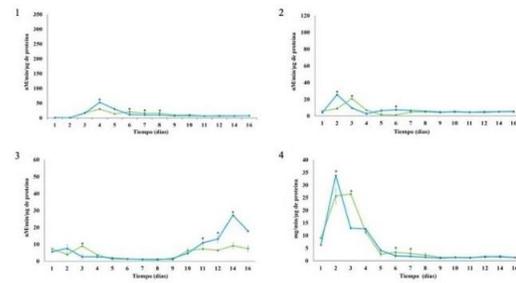
*Palabras clave: Hemicelulasas, hemibiotrófico, fitopatógeno*

**Introducción.** *Colletotrichum lindemuthianum* es el agente causal de la antracnosis en la planta del frijol común (*Phaseolus vulgaris*)<sup>1</sup>. Presenta una gran variedad de patotipos entre los cuales se encuentran el patotipo patógeno 1472 y el patotipo no patógeno 0<sup>2</sup>. *C. lindemuthianum* es un hongo hemibiotrófico que secreta un complejo de enzimas hidrolíticas para degradar la pared celular vegetal (PCV)<sup>3</sup>. La degradación de la hemicelulosa de la PCV requiere de la acción coordinada de enzimas hidrolíticas entre las que se encuentran endoxilanasas,  $\beta$ -xilosidasas y  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasas<sup>4</sup>. Por otro lado, la degradación de celulosa implica una acción secuencial de un grupo de enzimas, llamadas celulasas (endoglucanasas, exoglucanasas, celobiohidrolasas y  $\beta$ -glucosidasas)<sup>5</sup>.

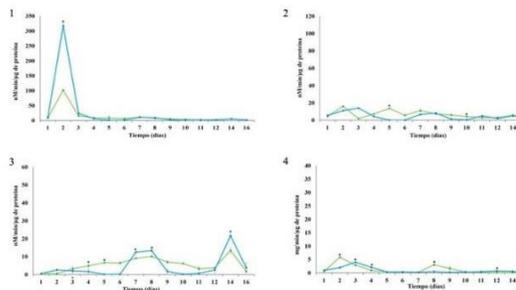
**Objetivo:** Medir la actividad extracelular de hemicelulasas y celulasas de dos patotipos de *C. lindemuthianum* en cultivo con hipocotilos de frijol y ejote.

**Metodología.** Se utilizaron los patotipos 1472 y 0 de *C. lindemuthianum*. Se analizó la actividad enzimática en cultivos con medio mínimo Mathur modificado suplementado con hipocotilos de frijol (molido) y ejote (molido) en cinéticas de incubación de 1 a 12 días, 14 y 16 días; para medir la actividad enzimática se utilizó el medio extracelular, buffer de acetato de sodio 50mM pH 5.0 y los sustratos 4MU-arabinofuranósido, 4MU-xilopiranosido, 4MU-celobiosido para determinación de fluorescencia y azul brillante de Remazol con xilanapara determinación colorimétrica.

**Resultados.** El análisis de la actividad enzimática en cultivos suplementados con hipocotilos de frijol (**Fig.1**) mostró mayor actividad de arabinofuranosidasas y xilanasas en los primeros días de inducción en ambos patotipos de *C. lindemuthianum*. Sin embargo, el patotipo no patógeno (0) mostró mayor actividad arabinofuranosidasa que el patotipo patógeno (1472) en cultivos suplementados con ejote (**Fig.2**). En contraste, ambos hongos mostraron baja actividad de celobiohidrolasas con cualquiera de los sustratos empleados en el análisis.



**Fig. 1.** Actividad enzimática de patotipo 1472 (●) y el patotipo 0 (●) de *C. lindemuthianum* en cultivo con hipocotilos de frijol. 1)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, 2) celobiohidrolasa, 3)  $\beta$ -xilosidasa y 4) endoxilanasas. El símbolo (\*) indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre patotipos.



**Fig. 2.** Actividad enzimática del patotipo 1472 (●) y el patotipo 0 (●) de *C. lindemuthianum* en cultivo con ejote. 1)  $\alpha$ -L-arabinofuranosidasa, 2) celobiohidrolasa, 3)  $\beta$ -xilosidasa y 4) endoxilanasas. El símbolo (\*) indica la diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ) entre patotipos.

**Conclusiones.** *C. lindemuthianum* presenta una secreción diferencial de hemicelulasas que depende del estilo de vida del hongo y del tipo de tejido del huésped. Destaca la alta actividad de arabinofuranosidasa secretada por el patotipo 0 en cultivo con ejote, en contraste con el patotipo 1472.

**Agradecimiento.** A la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH (Proyecto 2020, 2021 a HCC) y a CONACYT (Proyecto 2019-2022 a MGZP y becas a KMDT y MIMM).

### Bibliografía.

- O'connell et al. (1985). *Physiol Plant Pathol.* 27(1):75-98.
- Rodríguez-Guerra et al. (2006). *Rev. Mex. De Cienc. Agric.* 32 (1):101-114.
- Münch, Steffen (2008). *J Plant Physiol.* 165 (1):41-51.
- Conejo-Saucedo et al. (2011). *Curr Trends Microbiol.* 7(1):113.
- Acosta-Rodríguez et al. (2005). *Antonie van Leeuwenhoek.* 87 (1):301-310.



## DISEÑO DE UN MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA EL CRIBADO DE ACTIVIDAD B-ETERASA, ENZIMAS DEGRADADORAS DE LIGNINA

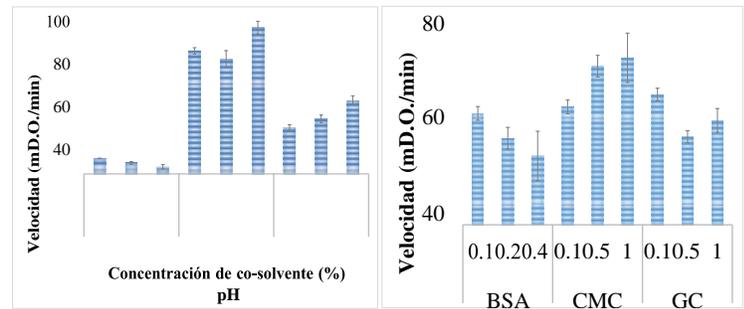
Itzel C. Romero-Soto<sup>a</sup>, Olga Concha-Guzmán<sup>a</sup>, Raúl B. Martínez-Pérez<sup>b</sup>, Jorge A. Rodríguez<sup>b</sup>, Rosa M. Camacho-Ruiz<sup>b</sup>, Vicente Armenta-Pérez<sup>b</sup>, M. Ángeles Camacho-Ruiz<sup>a\*</sup> <sup>a</sup>Laboratorio de Investigación en Biotecnología, Centro Universitario del Norte, Universidad de Guadalajara, Colotlán, 46200, Jalisco, México. <sup>b</sup>Biotecnología Industrial, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Zapopan, 45019, Jalisco, México.

*Palabras clave: Lignina, B-eterasa, cribado*

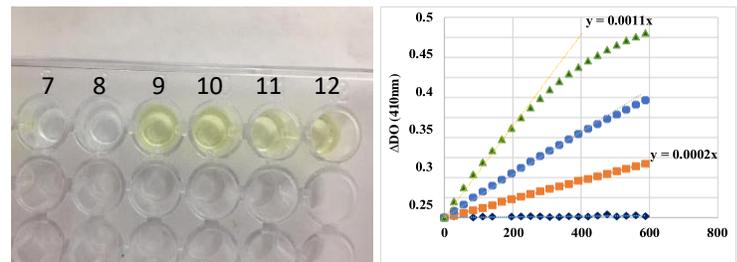
**Introducción.** En los últimos años, la demanda en la industria tequilera y azucarera se han incrementado y con ello la generación de residuos lignocelulósicos. Los cuales son difícil de tratar debido a la presencia de lignina (parte no polisacárida). Las b-eterasas son enzimas que tienen la capacidad de romper el enlace B-O-4 aril - eter que representa aproximadamente del 45-60% de los enlaces presentes en la lignina. La aplicación de biocatálisis para la despolimerización de lignina no genera radicales libres inestables durante la reacción (como los procesos químicos convencionales), lo cual facilita su hidrólisis para su posterior aprovechamiento en la obtención de monoligninas (vainillina, guayacol, catecol, etc.) de alto valor agregado [1-3]. El estudio de estas enzimas es casi nulo, por lo que el objetivo de esta investigación fue diseñar un método espectrofotométrico para el cribado de microorganismos con actividad B-eterasa.

**Metodología.** Se sintetizó el sustrato 1-(4-hidroxi-3metoxifenil)-2-(4-nitrofenoxi)-etan-1-ona (PNP-GE) por reacción de sustitución nucleofílica. se clonó el gen LigF de la cepa *Sphingobium* sp. SYK-6 en *E.coli* BL21 utilizando el vector de expresión pET28a en los sitios de restricción *NdeI* y *BamHI*. Para el desarrollo del método se probaron los solventes dimetilsulfóxido y acetonitrilo en proporciones de 3.3%, 5% y 10% y detergentes (CTAB, Tritonx100, NaTDC) a concentraciones <CMC, CMC y >CMC. Así mismo se evaluaron diferentes gomas (Albúmina BSA, goma arábiga CA y carboximetilcelulosa CMC) al 0.5%, 1% y 2% de concentración. Se determinó la linealidad y repetibilidad del método en las mejores condiciones.

**Resultados.** Para la validación del método se eligieron las condiciones con mayor actividad: pH de 8 con 3.3% de acetonitrilo como co-solvente y CMC a 0.5 % de concentración, esta última se seleccionó de 0.5% y 1% y la solución presenta mayor viscosidad a mayor concentración de emulsificante (Figura 1). Por otro lado, los detergentes evaluados no favorecieron la actividad enzimática, por lo que se descarta su uso en la validación del método. La figura 2 (a la izquierda) muestra una fotografía de la reacción enzimática de la clona LigF en presencia del sustrato cromogénico PNP-GE (pozo 7 y 8, blancos y del 9-12, reacción enzimática) y las cinéticas típicas de concentración de enzima sobre el sustrato (derecha) a concentraciones de 0.69 mg/mL, 0.138 mg/mL, 0.27 mg/mL y 0.552 mg/mL de enzima pura.



**Fig. 1.** Velocidad enzimática a diferentes pH y concentraciones de co-solvente (izquierda) y velocidad enzimática de enzima purificada (clona de la cepa *Sphingobium* sp. SYK-6) en diferentes concentraciones y emulsificantes.



**Fig. 2.** Fotografía de la reacción catalizada por LigF en el sustrato cromogénico PNP-GE. Los pocillos 7 y 8 corresponden a los blancos de la reacción; los pocillos 9-12 corresponden a la reacción enzimática (izquierda) y cinéticas típicas a diferentes concentraciones de enzima sobre el sustrato (derecha).

**Conclusiones.** Las mejores condiciones del método para el cribado de microorganismo fueron pH de 8, co-solvente al 3.3%, 0.5% de CMC, a una concentración de sustrato cromogénico de PNP-GE 15 mM, así mismo, este método permitirá identificar microorganismos con actividad b-eterasa para aplicación en la biorrefinería de lignina.

**Agradecimiento.** Fondo Sectorial de Investigación y Educación SEP / CONACyT, México (CB-2016/283183).

### Bibliografía.

- Wang, C., Ouyang, X., Su S., Liang, X., Zhang, C., Wang, W., Yuan, Q., Li, Q. (2016) Effect of sulfonated lignin on enzymatic activity of the ligninolytic enzymes Calpha-dehydrogenase LigD and beta-etherase LigF". *Enzyme MicrobTechnol* 93-94, 59-69.
- Yoo, C. G., Meng, X., Pu, Y., Ragauskas, A. J. (2020) The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. *Bioresour Technol* 301, 122784.
- Picart, P., Domínguez, P., Schallmey, A. (2014) From gene to biorefinery: microbial B-etherases as promising biocatalysts for lignin valorization. *Frontiers in Microbiology* 6, 916.



## INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA CATEPSINA L POR QUIMERAS RECOMBINANTES DE LA CHAGASINA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Rosa E. Cárdenas-Guerra, Yasmin I. Rodríguez-Gavaldón, Octavio Montes Flores, Claudia I. Flores-Pucheta, Gerardo Reséndiz-Cardiel, Jaime Ortega-López. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, CINVESTAV-IPN. Av. IPN No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco. Ciudad de México, C.P. 07360. rcardenas@cinvestav.mx

*Palabras clave:* proteína quimérica, chagasina, inhibición

**Introducción.** *Trypanosoma cruzi* quien causa la enfermedad de Chagas, es uno de los parásitos más lacerantes en términos de salud e impactos sociales, por lo que es necesario buscar fármacos más eficaces y seguros, explorando nuevas moléculas y tratamientos alternativos como vacunas terapéuticas.

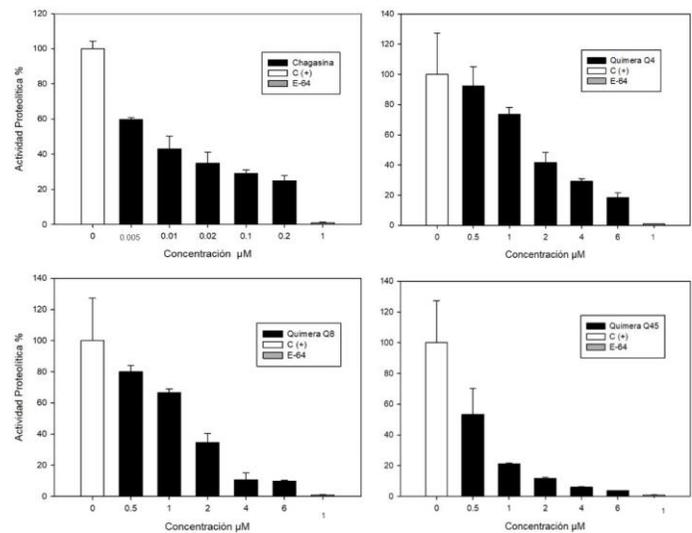
La proteína de superficie TSA-1 es viable para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra la enfermedad de Chagas (1), pero se produce recombinantemente en agregados insolubles. Una alternativa es la generación de proteínas quiméricas multi-epítipo de TSA-1 que se expresen en forma soluble. La chagasina es una proteína de *T. cruzi* que inhibe a la catepsina L de humano (h-Cat L) y se expresa de forma soluble en *E. coli*. Su estructura 3D permite el anclaje de secuencias exógenas en los lazos L4 y L6. Después de un análisis *in silico* de Quimeras (Q) de la chagasina donde se insertaron secuencias de los epítopos de TSA-1 (E1, E2, E3, E4 y E5) en los lazos L4 y L6, se expresaron en *E. coli* en forma soluble de las proteínas quiméricas Q4 (E5-E1), Q8 (E5-E2) y Q45 (E1/E2 -E5), esta última con dos epítopos en el lazo L4 y solo 50% soluble (2, 3).

El objetivo del trabajo fue analizar la inhibición de la actividad enzimática de la catepsina L por las quimeras recombinantes Q4, Q8 y Q45.

**Metodología.** Se realizó la expresión de las proteínas recombinantes (chagasina, Q4, Q8 y Q45) en células de *E. coli* SoluBL21 y la purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. La actividad inhibitoria de cada proteína purificada fue analizada usando la enzima h-Cat L, y el sustrato específico para catepsina L, Z-Phe-Arg-MCA (Z-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin). La chagasina se utilizó en concentraciones crecientes (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.1 y 0.2  $\mu$ M), así como para las quimeras Q4, Q8 y Q45 (0, 0.5, 1, 2, 4 y 6  $\mu$ M). Como control positivo se utilizó al inhibidor E-64 a una concentración 1  $\mu$ M.

**Resultados.** Todas las proteínas quiméricas mostraron un cambio importante en la  $K_i$  (0.05, 0.09, 0.29  $\mu$ M) con respecto a la chagasina (0.0024  $\mu$ M), lo que sugiere que sería más conveniente la producción de una proteína recombinante que no inhiba o inhiba menos a la h-Cat L. La Q4 sería la más indicada como antígeno y fue la más soluble. Desde el punto de vista del número de epítopos de TSA-1, Q45 sería la más indicada, pero fue la que más inhibió a la catepsina L (Figura 1). Es posible que todas pudieran ser aptas para su uso como

antígenos, lo cual se tendría que descartar en ensayos en animales de laboratorio o diseñar una quimera que no inhiba la catepsina L.



**Fig. 1.** Inhibición de la actividad proteolítica de h-Cat L por las proteínas recombinantes chagasina, Q4, Q8 y Q45 a diferentes concentraciones en presencia del sustrato fluorogénico Z-Phe-Arg-MCA.

**Conclusiones.** La modificación de los giros L4 y L6 de la chagasina por epítopos de TSA-1, afectó negativamente la actividad inhibitoria de las quimeras recombinantes (chagasina>Q45>Q8>Q4).

**Agradecimiento.** Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Cinvestav-IPN (FIDSC2018/268), CONACYT (269657, A1-S34224,) y de la Fundación Carlos Slim (SLIM-W04.PO5600999400), y becas CONACYT para estudios maestría YIRG (No. 721653).

### Bibliografía.

- Wrightsmann RA, *et al.* (1994). *J Immunol.* 153:3148–3154.
- Nava Pintor EE. (2018). *Tesis de Maestría.* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México.
- Rodríguez Gavaldón YI. (2021). *Tesis de Maestría.* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México.

**SÍNTESIS QUIMIOENZIMÁTICA DE NEO-AZÚCARES UTILIZANDO UNA CICLODEXTRINGLUCANOTRANSFERASA DE *Thermoanaerobacter* sp**

Pedro Ángel Cid Jiménez<sup>a</sup>, Agustín López-Munguía<sup>b</sup>, Edmundo Castillo Rosales<sup>b</sup>. <sup>a</sup>Centro de Investigaciones Químicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca 62209, Morelos, pedro.cid@uaem.edu.mx. <sup>b</sup>Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca 62210, Morelos.

*Palabras clave:* ciclodextringlucanotransferasa, glicosidación, neo-azúcares

**Introducción.** Los carbohidratos son la principal fuente de energía en los seres vivos e intervienen en diversos eventos de reconocimiento celular. En la naturaleza existen azúcares que poseen en su estructura enlaces glicosídicos poco frecuentes, lo que les confiere propiedades que los hacen atractivos sustitutos de los carbohidratos tradicionalmente conocidos (1). Actualmente, existe un interés particular en el desarrollo de estrategias para la obtención de carbohidratos funcionales o de nuevos azúcares (neo-azúcares) que presenten actividad biológica. Si bien, la formación de enlaces glicosídicos es uno de los mayores retos para la síntesis orgánica, en la naturaleza existe un grupo de enzimas que son capaces de formar enlaces glicosídicos de manera eficiente, con una alta selectividad y, prácticamente, sin la formación de subproductos o residuos tóxicos.

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar un proceso quimio-enzimático de tres etapas, para la síntesis regio- y estereoselectiva de nuevos di- y oligosacáridos que poseen enlaces glicosídicos raros o inexistentes en la naturaleza, empleando una ciclodextringlucanotransferasa de *Thermoanaerobacter* sp. (CGTasa).

**Metodología.** Los azúcares protegidos **2a** y **2b** (Fig. 1) se obtuvieron a partir de sus correspondientes azúcares libres (**1a** y **1b**) en condiciones suaves de catálisis ácida. La glicosidación enzimática de **2a** y **2b** se realizó empleando CGTasa de *Thermoanaerobacter* sp. (10 U/mL) como biocatalizador y  $\beta$ -ciclodextrina como sustrato donador de grupos  $\alpha$ -glucopiranosilo. La reacción se realizó en un medio de buffer de fosfatos 50 mM pH 6.0 por 48 h a 50°C y 850 rpm. La digestión enzimática de los productos poliglucosilados se realizó con una  $\alpha$ -glucosidasa de *Aspergillus niger* (258 U/mL, 50°C por 24 h). Los productos puros **4a** y **4b** se recuperaron por cromatografía flash y se caracterizaron por espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.

**Resultados.** Para limitar la promiscuidad regioquímica que presenta la CGTasa, al transferir grupos  $\alpha$ -glucopiranosilo sobre su sustrato aceptor (2), se recurrió a la ingeniería de sustrato. Así, en una primera etapa se incorporan grupos protectores sobre posiciones

específicas de los sustratos aceptores (**2a** y **2b**). A partir de estos compuestos se realizó la glicosidación con CGTasa, lo que permitió obtener una serie de maltooligoglicósidos (**3a** y **3b**), hasta con 4 unidades de  $\alpha$ -glucosa incorporadas (Fig. 1). Los maltooligoglicósidos obtenidos se sometieron a una digestión enzimática *in situ* con  $\alpha$ -glucosidasa de *A. niger*, para obtener productos con un solo residuo  $\alpha$ -glucopiranosilo (**4a** y **4b**). Es importante mencionar que, al final del proceso, la diferencia de hidrofobicidad entre los sustratos residuales **2a** y **2b** y los productos finales **4a** y **4b**, facilita su separación.

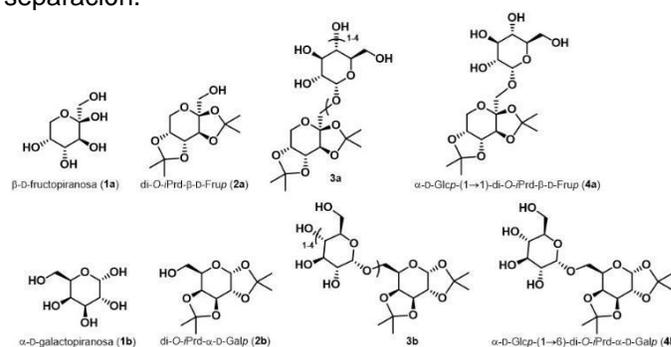


Fig. 1 Materia prima, sustratos aceptores y productos de glicosidación.

**Conclusiones.** Se obtuvieron dos nuevos azúcares (**4a** y **4b**) reportados como potentes antioxidantes y suplementos alimenticios (3, 4). Uno de ellos posee un enlace glicosídico raro ( $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 1)- $\beta$ -Frup, **4a**) y el otro es un azúcar nuevo ( $\alpha$ -D-Glcp-(1 $\rightarrow$ 6)- $\alpha$ -Galp, **4b**). Esta estrategia describe una ruta de síntesis en tres etapas para la obtención de glicoconjugados: a) protección simple, b, c) glicosidación y digestión enzimática. Esta metodología sintética podría ser aplicada a diferentes azúcares para generar nuevas bibliotecas de neo-azúcares con potencial de aplicación en diferentes sectores.

**Bibliografía.**

- Van Laar A *et al.* (2021). *Crit Rev Food Sci Nutr.* 61 (5): 713-741.  
Strompen S *et al.* (2015). *Carbohydr Res.* 404: 46-54.  
Fletcher M *et al.* (2020). *Sci Rep*, 10(1): 1-8.  
Meloncelli P *et al.* (2007). *Carbohydr Res*, 342(12-13): 1793-1804.



**ESTUDIO DE LA RELACIÓN ESTRUCTURA/FUNCIÓN DE LA REGIÓN N<sub>100</sub> TERMINAL DE LAINULOSACARASA (IsIA) DE *LEUCONOSTOC CITREUM* CW28**

Ingrid Mercado Del Río, Clarita Olvera Carranza. Instituto de Biotecnología (Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis), Cuernavaca, Mor., CP 62210.

ingrid.mercado@ibt.unam.mx.

*Palabras clave: fructansacarasa, procesividad, estructura*

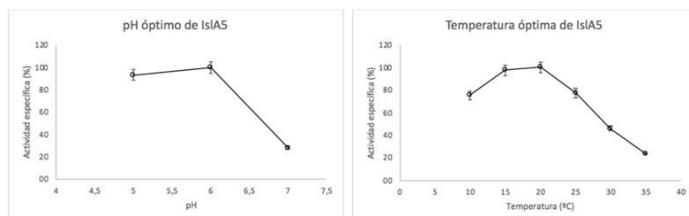
**Introducción.** Las fructansacarasa (FNSs) son enzimas capaces de sintetizar polímero de fructosa a partir de sacarosa (1). La FNS de *L. citreum* CW28, IsIA, es una enzima multidominio que sintetiza polímero a través de un mecanismo procesivo (2). De acuerdo con reportes en otras FNS (3), se ha sugerido que la procesividad de IsIA podría estar dada por los dominios adicionales, y específicamente, por la región N<sub>100</sub> terminal, contigua al dominio catalítico (4).

**Objetivo.** Determinar la influencia de la región N<sub>100</sub> terminal en la procesividad de IsIA.

**Metodología.** Para abordar el objetivo del trabajo se utilizaron las versiones truncadas IsIA4 e IsIA5. La primera consta del dominio catalítico y la región N<sub>100</sub> terminal, mientras que IsIA5 carece de la región N<sub>100</sub> terminal. Se realizaron las siguientes actividades:

1. Caracterización bioquímica de las versiones truncadas seleccionadas.
2. Estudio de la influencia de la región N<sub>100</sub>-terminal en el perfil de productos y mecanismo de elongación.
3. Análisis del efecto del aumento en la concentración de sustrato en el perfil de productos de ambas versiones truncadas.

**Resultados.** La delección de la región N<sub>100</sub> terminal (IsIA5) no afecta el pH óptimo de la enzima, ni la estabilidad enzimática, sin embargo, propicia la disminución de la temperatura óptima comparada con IsIA4 (4) (fig1). Asimismo, esta delección merma la actividad enzimática en más de un 99%, demostrando que esta región es muy importante para la catálisis enzimática.



**Fig. 1.** Determinación de pH y temperatura óptima de IsIA5. Los ensayos se llevaron a cabo con 1170 mM de sustrato.

En cuanto a la procesividad de la enzima, la eliminación de la región N<sub>100</sub> terminal causó una disminución del 39%

en la producción de productos de alto peso molecular cambiando la relación entre productos de alto y bajo peso molecular, de una relación 2:1 a una relación 1:1 (Tabla 1).

Por otro lado, observamos que al aumentar la concentración de sustrato en la reacción con IsIA5, hay un aumento en la velocidad de reacción y una preferencia hacia la transferencia en la síntesis de productos de bajo peso molecular.

Condición de reacción	Conversión de sacarosa (%)	Hidrólisis (%)	Porcentaje de pAPM (%)	Porcentaje de pBPM (%)
<b>IsIA4</b>				
30°C, 292 mM	89 ± 0.23	61 ± 0.58	25.6 ± 1.47	13.4 ± 0.06
20°C, 292 mM	91 ± 0.04	47 ± 0.05	18.9 ± 1.56	34.1 ± 1.98
20°C, 1170 mM	63 ± 0.31	45 ± 0.26	31.1 ± 2.02	23.9 ± 0.03
<b>IsIA5</b>				
20°C, 292 mM	65 ± 0.27	62 ± 0.18	18.5 ± 2.02	19.2 ± 2.00
20°C, 1170 mM	82 ± 0.63	31 ± 0.11	18.1 ± 2.31	50.9 ± 0.19

**Tabla 1.** Porcentaje de hidrólisis y de productos de alto (pAPM) y bajo (pBPM) peso molecular.

Finalmente, el análisis de los productos sintetizados sugiere que la región N<sub>100</sub>-terminal otorga mayor flexibilidad a la regioselectividad de los subsitios de unión a aceptores, lo que se traduce en una mayor cantidad de intermediarios sintetizados.

**Conclusiones.** La región N<sub>100</sub>-terminal no es indispensable para desarrollar el mecanismo procesivo, pero su delección modula la relación polímero/productos de bajo peso molecular y la actividad enzimática.

**Agradecimiento.** El proyecto fue financiado por la UNAM por el programa DGAPA-PAPIIT a través del proyecto IN216120, además del apoyo económico otorgado por el CONACYT a través de la beca no. 855138.

**Bibliografía.**

Ni D., Zhu Y., Xu W., Zhang T., Mu W. (2018). *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 109: pág 1209-1218

Olivares-Illana V., López-Munguía A., Olvera-Carranza. C. (2003). *J. Bacteriol.*, vol. 185: pág 3606-3612

Morales-Arrieta S., Rodríguez M. E., Segovia L., López-Munguía Olvera-Carranza C. (2006). *Gene*, vol. 376: pág 59-67

Del Moral S., Olvera C., Rodríguez M. E., Munguía L. (2008). *BMC Biochem.*, vol. 9: pág 1-10.



## DEVELOPMENT OF CHOLESTEROL OXIDASE AND ESTERASE ELECTRODES FOR THEIR APPLICATION ON SELF-POWERED BIOSENSORS

Julio César López Rivas,<sup>1</sup> Johannes Pedro Martínez Morales,<sup>1</sup> Luis Alberto Estrada Jiménez,<sup>1</sup> Abraham Ulises Chávez Ramírez,<sup>2</sup> A. Déctor,<sup>3</sup> Alejandra Álvarez,<sup>1</sup> Juan de Dios Galindo de la Rosa<sup>1</sup> y Vanessa Vallejo Becerra<sup>1\*</sup> <sup>1</sup> Facultad de Ingeniería, División de Investigación y Posgrado, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Qro., C.P. 76010, México. <sup>2</sup> Centro de Investigación y Desarrollo Tecnológico en Electroquímica, Pedro Escobedo, Qro., C.P. 76703, México. <sup>3</sup> CONACYT and Universidad Tecnológica de San Juan del Río, 76800, San Juan del Río, Querétaro, México. jlopez162@alumnos.uaq.mx

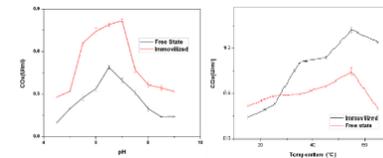
*Palabras clave:* Colesterol oxidasa, biosensor, biocelda de combustible

**Introducción.** Hoy en día el área de biosensores está en constante evolución, donde se busca fabricar electrodos auto-alimentables que puedan generar energía eléctrica a partir de la misma muestra a detectar. Uno de los principales analitos es el colesterol debido a que es un biomarcador de diferentes enfermedades cardiovasculares. En este trabajo se realizó el desarrollo de electrodos basados en la inmovilización de la enzima colesterol oxidasa (ChOx), para aplicación en detección de colesterol y para celda de combustible microfluídica. La enzima fue inmovilizada usando enlaces covalentes con nanotubos de carbón multi-pared. Así, el pH óptimo y la temperatura para la actividad enzimática óptima de la enzima inmovilizada fueron determinadas por métodos colorimétricos. Los electrodos fueron evaluados por pruebas electroquímicas, tales como la voltametría y el voltaje de circuito abierto (OCV). Estos electrodos fueron aplicados en la fabricación de una biocelda de combustible enzimática, basada en celdas de papel miniaturizadas de flujo lateral.

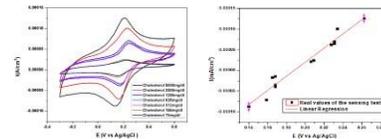
El objetivo general es desarrollar un electrodo de colesterol oxidasa para su aplicación en biosensores auto-alimentables para la cuantificación del colesterol.

**Metodología.** Se funcionalizó nanotubos de carbono multi-pared y se inmovilizó la enzima colesterol oxidasa. Evaluaron el efecto del pH y la temperatura en la actividad enzimática del ChOx, así como la termo estabilidad. Se llevó a cabo la fabricación de electrodos de ChOx (como ánodo) y Pt-C (como cátodo).

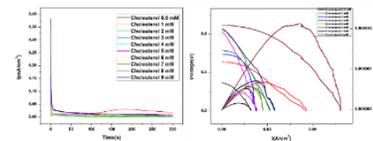
**Resultados.** El colesterol oxidasa es dependiente del pH con una actividad máxima en un pH cercano a 7.0. La actividad enzimática del ChOx se ha reportado que incrementa en un 62% una vez inmovilizada, en un rango de pH de 5 a 6 (1,2). Se ha reportado en la literatura que el efecto de la temperatura en la estabilidad de la ChOx muestra una actividad enzimática máxima a 50°C (1). En nuestras evaluaciones se obtuvieron los siguientes datos:



**Fig. 1.** Actividad enzimática obtenida a diferentes condiciones de pH y a diferentes temperaturas. Se muestra el comportamiento de la enzima en sus dos estados, inmovilizada y libre.



**Fig. 2.** Voltametría cíclica del electrodo ChOx sumergido en diferentes concentraciones de colesterol, en presencia de buffer fosfato (pH 7.0, 0.5 mM) y su curva de calibración de las pruebas de detección.



**Fig. 3.** Evaluación de la estabilidad de la celda de biocombustible microfluídica de papel mediante pruebas de cronoamperometría de colesterol a diferentes concentraciones, y pruebas OCP para diferentes concentraciones de colesterol, de 0.5 mM a 8mM, solución buffer.

**Conclusiones.** La inmovilización de la ChOx sobre NTCPM incrementa la actividad enzimática, permitiendo su uso a altas temperaturas. Se obtuvieron buenas lecturas de corriente eléctrica obtenidas de la oxidación del colesterol en comparación con las ya reportadas con una diferencia aproximada de  $40 \mu W/cm^2$  en un intervalo similar de voltajes. La celda mostró estabilidad y un comportamiento de reacción continuo de casi 180 segundos. Este trabajo presenta una buena plataforma para la detección electroquímica de colesterol y una buena alternativa para la producción de energía a partir de reacciones de oxidación y reducción.

**Agradecimiento.** Al programa de fondos para el fomento de la cultura emprendedora.

### Bibliografía.

- Li B, Wang W, Wang FQ, Wei DZ. (2009). *Appl MicrobiolBiotechnol* 85, 1831–1838.
- Lashkarian H, Raheb J, Shahzamani K, Hossein S, ShamsaraM. (2010). *Iran Biomed J.* 2. 49–57.



### ENTENDIENDO EL MECANISMO DE ELONGACIÓN DE LA LEVANA SINTETIZADA POR LA LEVANSACARASA DE *Bacillus subtilis* 168

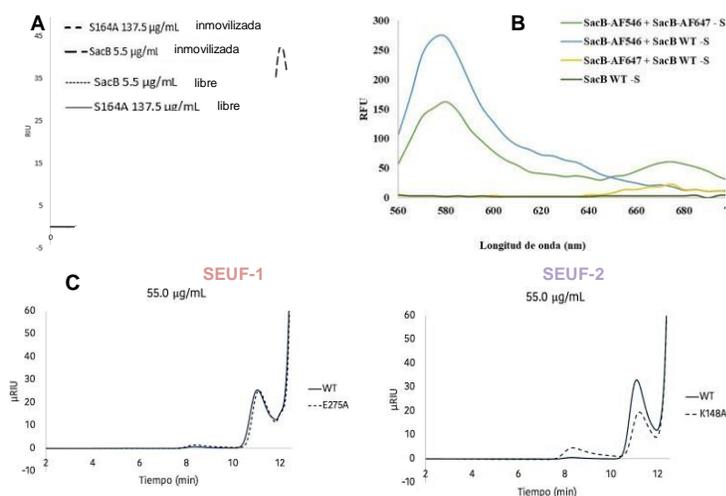
Sol Castrejón, Luis Alberto Morales, María Elena Rodríguez y Agustín López Munguía. Instituto de Biotecnología, UNAM. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis. Cuernavaca, Morelos. CP 62210. sol.castrejon@ibt.unam.mx

**Palabras clave:** Levansacarasa, polisacárido, ingeniería de proteínas

**Introducción.** La levansacarasa (EC2.4.1.10) codificada en *Bacillus subtilis* por el gen *sacB* (*Bs-SacB*), es una enzima que pertenece a la familia 68 de las Glicosil Hidrolasas (GH68). En presencia de sacarosa sintetiza levana, un polímero de fructosas unidas mediante enlaces  $\beta$  2–6. Se ha demostrado que el peso molecular que alcanzan las levanas sintetizadas por *Bs-SacB* depende, entre otros factores, de la concentración de enzima, alcanzando pesos moleculares de varios millones de Daltons a concentraciones equivalentes a 0.1 U/mL mientras que por arriba de 10.0 U/mL la enzima sintetiza levana de bajo peso molecular<sup>1</sup>. De un estudio de acoplamiento molecular entre *Bs-SacB* y fructosa, encontramos dos distintas áreas de interacción en la superficie de la enzima, que denominamos: SEUF-1 y SEUF-2<sup>2</sup>. Suponemos que el efecto de la concentración de enzima en la distribución de pesos moleculares de la levana, es consecuencia de interacciones proteína proteína (IPP). El objetivo de este trabajo es demostrar que existen IPP en la reacción de *Bs-SacB* con sacarosa y analizar la participación de los SEUF en la distribución de peso molecular de la levana obtenida en la reacción, afectando dichas interacciones.

**Metodología.** Se sintetizó la levana empleando la enzima inmovilizada, para observar el producto en ausencia de IPP. Para estudiar la IPP se realizó el ensayo de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). Por otro lado, para demostrar la participación de los SEUF en dichas interacciones se seleccionó un aminoácido participante en la interacción con fructosa de cada uno de los dos SEUF identificados. Se aplicó el método de mutagénesis dirigida QuikChange para obtener las variantes. El análisis de la distribución del peso molecular de la levana se llevó a cabo en un sistema de permeación en gel (GPC) por medio de cromatografía de exclusión de tamaño con índice de refracción (SEC-RI).

**Resultados.** La figura 1.A corresponde al efecto de la inmovilización de *Bs-SacB*, que resulta en la producción de levana de alto peso molecular. En la figura 1.B se presentan los resultados de FRET, donde se muestra una posible IPP determinada por la disminución de la fluorescencia del donador y un incremento en la fluorescencia del aceptor. Por último, en la figura 1.C se incluye la distribución del peso molecular de la levana producida por las variantes obtenidas. Se puede observar que las variantes producen levana de alto peso molecular a altas concentraciones de enzima equivalentes a 10 U/mL.



**Fig. 1.** A) Cromatograma de permeación en gel que muestra el efecto de la concentración de proteínas y la inmovilización sobre el tamaño de la levana. B) Espectros de emisión de fluorescencia de AF546-SacB (donador), AF647-SacB (aceptor) y mezcla. C) Distribución del peso molecular de la levana producida por *Bs-SacB* (líneas continuas) y mutantes (líneas punteadas), empleando una concentración de 100 g/L de sacarosa, a 37°C y pH 6. Reacción con 55.0 µg/mL de enzima equivalente a 10 U/mL.

**Conclusiones.** Mediante el ensayo de FRET se obtuvieron posibles evidencias de una interacción proteína-proteína. Este resultado puede explicar la influencia de la concentración de enzima y de otros parámetros en la especificidad de reacción, ya que cualquier condición que las impide, da lugar a la síntesis de levana de alto peso molecular. Las variantes obtenidas de la levansacarasa *Bs-SacB*: E275A (SEUF-1) y K148A (SEUF-2), diseñadas a partir de estudios de acoplamiento molecular, contribuyen a la producción preferente de levana de alto peso molecular. SEUF-1 y SEUF-2 podrían ser entonces sitios en los que ocurra la posible IPP que conlleva a una probable competencia por las cadenas de fructosa en crecimiento durante la polimerización, dando lugar a levana de bajo peso molecular.

**Agradecimiento.** Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología mediante la beca de maestría con número 958042 y se desarrolló en el marco del proyecto de Ciencia Básica CONACYT AS-S-21209, sobre funcionalidad de glicosiltransferasas.

#### Bibliografía

- Raga-Carbajal, E. et al. (2016). *Glycobiology*. 26, 377–385.  
Ortiz-Soto, M. E. et al. (2020). *Int. J. Biol. Macromol.* 161, 898–908.

**DETERMINACIÓN *IN SILICO* DE LA SOLUBILIDAD DE LAS PEPTIDIL-PROLIL ISOMERASAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*: TcCyP19, TcCyP22 Y TcCySEC**

C Daniel Jiménez-Guerra, Gerardo Reséndiz Cardiel, Aurora Antonio-Pérez, Rosa Elena Cárdenas Guerra, Jaime Ortega López, Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Ciudad de México CP 07360.  
daniel.jimenezguerra@cinvestav.mx

*Palabras clave:* PPlasa, Ciclofilinas, *Trypanosoma cruzi*, cis/trans isomerización

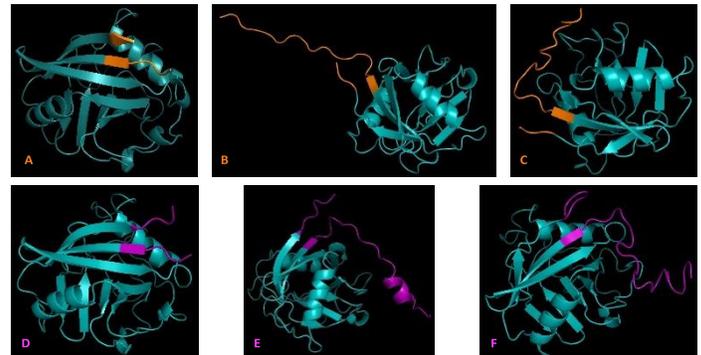
**Introducción.** La mayor limitante de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli* es la agregación de proteína mal plegada en cuerpos de inclusión<sup>1</sup>. Estudios previos sugieren que en proteínas con gran número de prolina, la cis/trans isomerización de los enlaces que preceden a la prolina es un paso limitante para su correcto plegamiento. *In vivo* esta isomerización es catalizada por las Peptidil-Prolil cis- trans Isomerasas (PPlasa) o ciclofilinas<sup>2-4</sup>. El antígeno vacunal TSA-1 de *Trypanosoma cruzi* contiene un gran número de prolina y solo se expresa de manera eficiente en *E. coli* en cuerpos de inclusión. Se ha propuesto que PPlasas del propio parásito asisten su replegamiento eficientemente.

**Objetivo:** determinar *in silico* la solubilidad de tres PPlasas de *T. cruzi* para su posterior expresión y caracterización enzimática.

**Metodología.** Se seleccionaron las PPlasas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC de *T. cruzi*. A partir de su secuencia de aminoácidos se realizó un análisis *insilico* de estas ciclofilinas que incluyó: BLAST, Alineamiento de Secuencias Múltiple (MSA) entre las PPlasas objetivo y PPlasas ya cristalizadas de otros organismos, determinación de parámetros fisicoquímicos, modelado por homología en tres servidores, refinamiento y validación de cada modelo, y finalmente la determinación de la solubilidad y agregación de cada secuencia y de su dominio PPlasa. La TcCySEC, conocida también como TcMIP, ya ha sido cristalizada (PDB ID 1JVV), por lo que el modelo 3D reportado en el PDB se usó como referencia para la predicción de solubilidad y agregación.

**Resultados.** Los modelos 3D de TcCyP19 y TcCyP22 obtenidos, se optimizaron y validaron usando diferentes servidores disponibles. En la Figura 1 se muestran los modelos 3D de TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC con su dominio PPlasa en color cian. Los modelos 3D de las tres ciclofilinas se usaron para la predicción de solubilidad y agregación. Los valores obtenidos (Tabla 1) sugieren que las tres proteínas se expresan en forma soluble en

*E. coli*. La expresión de TcCyP19 y TcCyP22 permitirá validar esta predicción, se conoce que TcCySEC se expresa en forma soluble. Se cuenta con genes sintéticos para demostrar la expresión de las ciclofilinas.



**Fig. 1.** Modelo 3D de TcCyP19 y TcCyP22 obtenidos en los servidores SwissModel (A, D), trRosetta (B, E) e I-TASSER (C, F). El dominio de PPlasa se indica en color cian.

**Tabla 1.** Solubilidad y Agregación de tres Ciclofilinas de *T. cruzi*.

Modelo 3D <sup>a</sup>	Solubilidad <sup>b</sup>			Agregación <sup>c</sup>		
	TcCyP 19	TcCyP 22	TcCyS EC	TcCyP 19	TcCyP 22	TcCyS EC
1	0.547	0.846		-0.841	-0.865	
2	0.563	0.677	2.363	-0.831	-0.777	<b>-1.270</b>
3	<b>0.563</b>	<b>0.677</b>		<b>-0.789</b>	<b>-0.719</b>	

**a** Los modelos 3D se generaron en 1) Swiss-Model, 2) trRosetta, 3) I-TASSER. **b** Solubilidad estimada con CamSol (Soluble > 0.0). **c** Agregación estimada con Aggrescan3D (Agregación > 0). En la TcCySEC se utilizó el modelo cristalizado PDB ID 1JVV.

**Conclusiones.** El análisis *in silico* de las proteínas TcCyP19, TcCyP22 y TcCySEC sugiere que son PPlasas que pueden expresarse en forma soluble en *E. coli*.

**Agradecimiento.** Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Cinvestav (FIDSC2018/268), CONACYT (269657, A1-S34224,) y CONACyT para estudios de maestría DJG (Nº CVU 289362).

#### Bibliografía.

- Antonio-Pérez A, Rivera-Hernández T, Aldaz-Martínez LM, Ortega-López J. (2012). *Biotech and Biopr Eng.* vol(17):703-710.  
Resendiz-Cardiel G, Arroyo R, Ortega-Lopez J. (2017). *Prot Expr Purif.* vol (134):104-13.  
Rego JV, Duarte AP, Liarte DB, de Carvalho Sousa F, Barreto HM, Bua J, et al.(2015). *Exp Paras.* vol (148):73-80.  
<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>; [www.rcsb.org](http://www.rcsb.org); [www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk);  
<https://web.expasy.org/protparam/>  
<https://www.cohsoftware.ch.cam.ac.uk/index.php>;  
<http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2/>

**EXPRESIÓN DE GLICOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 EN CONDICIONES DE ANOXIA**

Luz Cristina Vallejo-García, María Elena Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía Canales.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM.

Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62210.

cristina.vallejo@ibt.unam.mx

*Palabras clave: glicosiltransferasas, exopolisacáridos, cultivo aerobio*

**Introducción.** Las cepas del género *Leuconostoc* producen una o más Glicosiltransferasas (GTFs), enzimas que, en presencia de sacarosa como sustrato producen Exopolisacáridos (EPS). Aunque no está plenamente demostrado, existe la hipótesis de que éstos polímeros se producen como respuesta a condiciones ambientales hostiles, para proteger a las bacterias<sup>1</sup>. En algunas cepas del género, se ha determinado que los EPS absorben a las especies reactivas de oxígeno (ERO), conteniendo con la oxidación y mejorando la viabilidad de la bacteria<sup>2</sup>, mientras que en otras cepas, se ha reportado que un ambiente de CO<sub>2</sub> incrementa la producción de EPS<sup>3</sup> por lo que el efecto parece específico para cada cepa. El genoma de la cepa *Ln. mesenteroides* ATCC 8293 contiene 6 secuencias correspondientes a GTFs<sup>4</sup> sin que hasta la fecha se haya reportado el mecanismo de regulación de las mismas.

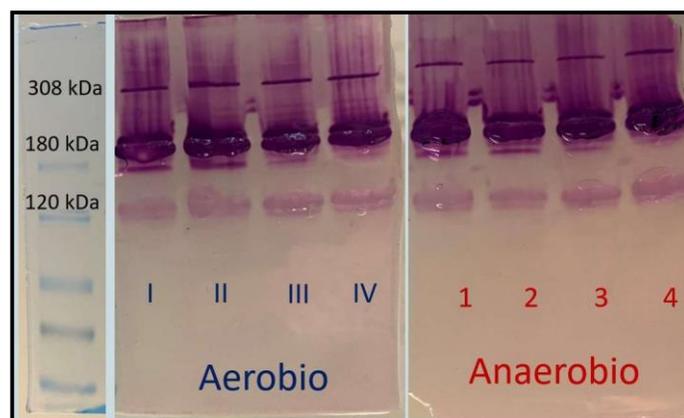
En este trabajo exploramos la producción de las GTFs de la cepa mencionada, en cultivos aerobios y anaerobios.

**Metodología.** Se usaron botellas de vidrio de 150 mL con 50 mL de medio Lm y 20 g/L de sacarosa, para todos los cultivos. En los cultivos aerobios se usaron tapones de gasa y algodón que permiten el intercambio de oxígeno con la atmósfera; mientras que en los cultivos anaerobios el oxígeno se desplazó con una mezcla 80:20 de N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> y se emplearon tapones de silicón con sello de aluminio para evitar la entrada de oxígeno. Se realizaron 4 cultivos secuenciales en condiciones anaerobias para asegurar la ausencia total de oxígeno en el último cultivo. Al final de la fase exponencial, se centrifugó el cultivo y se recuperaron las células. Se determinó actividad enzimática por el método de DNS y proteína por el método de Lowry. Se cargaron 200 µg de proteína en un gel SDS-PAGE 10% que fue tratado con Tween 80 al 1% al final de la corrida. El gel se incubó a 28°C con una solución de sacarosa 50 g/L por 24h. Al final, se tiñó con reactivo de Schiff para detectar el polímero asociado con la actividad GTF.

**Resultados.** Los zimogramas correspondientes a los cultivos aerobios y anaerobios se muestran en la Fig. 1 donde es obvia la presencia de las GTFs independientemente de las condiciones de cultivo empleadas o del número secuencial del cultivo.

Dado que no se observó diferencia en los zimogramas, solo se determinó la actividad global de las bacterias del

último cultivo secuencial ("IV" en aerobio y "4" en anaerobio). Tampoco en este caso se encontró diferencia significativa en la actividad enzimática inducida ni en la proteína total en ambos experimentos (Tabla 1).



**Fig. 1.** Zimogramas de los cultivos secuenciales en diferentes condiciones. La numeración representa la secuencia de los cultivos.

**Tabla 1.** Actividad global de las células del cultivo final de ambas condiciones.

Condición del Cultivo	Actividad (U/mL)	Proteína (µg/mL)	U/µg proteína
<b>Aerobio (IV)</b>	1.85 ± 0.1	193.1 ± 9.2	<b>0.096 ± 0.001</b>
<b>Anaerobio (4)</b>	1.92 ± 0.3	195.8 ± 2.2	<b>0.098 ± 0.001</b>

**Conclusiones.** En el caso de la cepa *Ln. mesenteroides* ATCC 8293, la presencia o ausencia de oxígeno durante el cultivo no tiene efecto sobre la actividad y la producción de las enzimas. La síntesis de GTFs como respuesta a la presencia o ausencia de oxígeno podría ser particular a cada cepa.

**Agradecimientos.** Beca CONACyT No. 477574, Proyecto CONACyT: A1-S-21209.

**Bibliografía.**

- Versluys, M., Kirtel, O., Toksoy-Öner, E. & Van den Ende, W (2018). *Plant Cell Environ.* **41**, 16–38.
- Yan, M. et al. (2018). *Front. Microbiol.* **9**, 1–10.
- Dror, B. et al. (2019). *Appl. Environ. Microbiol.* **85**, 1–13.
- Olvera, C., Centeno-Leija, S. & López-Munguía, A. (2006). *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* **92**, 11–20.



## LAS PEPTIDIL-PROLIL-CIS-TRANS ISOMERASAS TvCyP1 y TvCyP2 DE *Trichomonas vaginalis* SON POTENCIALES CATALIZADORES PARA REPLEGAMIENTO ASISTIDO DE PROTEÍNAS

Verónica Aranda-Chan<sup>1</sup>, Gerardo Reséndiz-Cardiel<sup>1</sup>, Octavio Montes-Flores<sup>1</sup>, Rossana Arroyo<sup>2</sup>, Jaime Ortega-López<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, <sup>2</sup>Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV-IPN. Zacatenco, Ciudad de México, C.P. 07360.  
veronica.aranda@cinvestav.mx

*Palabras clave:* PPLasas, *Trichomonas vaginalis*, replegamiento asistido

**Introducción.** Las peptidil-prolil cis-trans isomerasas (PPLasas) o cilofilinas son enzimas ubicuas responsables de la isomerización cis-trans de los enlaces amido propil en el plegamiento de las proteínas. En el parásito protozoario *Trichomonas vaginalis*, se ha demostrado in vivo que los ortólogos de la PPLasa humana (hPPLasa) TvCyP1 y TvCyP2 catalizan la isomerización de enlaces -gly-pro- (1). Lo anterior sugiere que in vitro podrían asistir el replegamiento de proteínas recombinantes de parásitos que en su secuencia contiene un gran número de prolinas y se expresan en *E. coli* solo como cuerpos de inclusión. Para determinar su potencial uso como catalizadores en el replegamiento de proteínas, es necesario expresarlas de manera recombinante y caracterizar su actividad enzimática de PPLasas. El objetivo de este trabajo es analizar in silico las propiedades de las proteínas TvCyP1 y TvCyP2 de *T. vaginales*, expresarlas en *E. coli* para posteriormente evaluar su uso en el replegamiento de proteínas de parásito de difícil expresión. **Metodología.** La secuencia de aminoácidos y estructura 3D reportadas de la TvCyP1 y TVCyP2 se usaron para predecir las propiedades físico-químicas, identificar las regiones propensas a la agregación y estimar su solubilidad en la plataforma de expresión de *E. coli* usando softwares disponibles en la red (AggreScan, ProteinSol, CamSol, Solart, SoDoPe) (2). Para la expresión de la TvCyP1, *E. coli* BL21 (DE3) transformada con el plásmido pET28aTvCyP1 se creció a 37 C en medio LB y se indujo con 0.5 mM de IPTG a 0.6-0.7 de OD600nm y la expresión de la TvCyP1 se analizó mediante SDS-PAGE.

**Resultados.** Los parámetros Físico-químicos muestran proteínas pequeñas, estables, de carácter ligeramente básico y potencialmente hidrofílicos. El alineamiento de secuencias entre ambas ciclofilinas (muestra un porcentaje de Identidad del 67.43%). Las estructuras 3D de la TvCyP1 y TvCyP2 (figuras 1A y 1B) muestran zonas más propensas de agregación en ambas proteínas en el extremo N-t. La superposición de su estructura secundaria (figura 1C) y el análisis de secuencias en 3-D resalta grandes similitudes y algunas diferencias en el sitio activo. La comparación de los valores de solubilidad obtenidos para TvCyP1 y TvCyP2 se ubicaron en una escala intermedia al compararlos con los valores estimados para dos proteína de parásitos protozoarios expresadas en *E. coli*, una en forma soluble

(Tc24) y otra en cuerpos de inclusión (TvLegu-1) (3,4). Lo anterior sugiere que al menos una fracción de ambas proteínas se expresará en forma soluble en *E. coli*. En la figura 1D se muestra el perfil electroforético de la expresión de TvCyP1, donde se puede observar que aproximadamente 50 % de la proteína recombinante se expresa en forma soluble.

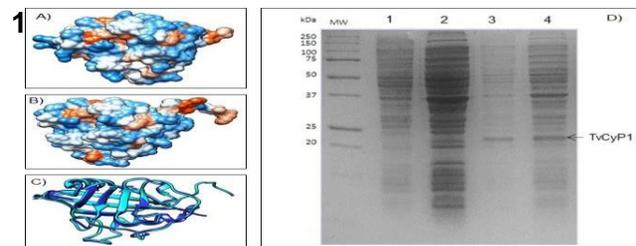


Fig. 1. Expresión en *E. coli* de la TvCyP1 de *T. vaginalis*. Estructura 3D de la TvCyP1 (A) y TvCyP2 (B) y comparación estructural por superposición de TvCyP1 (azul oscuro) y TvCyP2 (azul claro) (C). D) Perfil electroforético de la expresión de TvCyP1 en *E. coli* BL21 (DE3). Antes (carril 1) y después de la 16h (carril 2) de inducción con 0.4 mM de IPTG.: Fracciones soluble (carril 3) insoluble (carril 4), MW marcadores de peso molecular.

**Conclusiones.** La expresión de TvCyP1 de aproximadamente 50% en la fracción soluble es consistente con las estimaciones de solubilidad in silico y podría ser factible de mejorar modificando condiciones de inducción o los potenciales sitios de agregación en el extremo N-t. Las diferencias en secuencia y estructura en el sitio activo entre ambas enzimas sugieren diferencias en la actividad de PPLasas.

**Agradecimiento.** Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Cinvestav-IPN (FIDSC2018/268), CONACYT (269657, A1-S34224,) y de la Fundación Carlos Slim (SLIM-W04.PO5600999400), y becas CONACYT para estudios de doctorado VSAC (Beca No. 762544). Al Dr. J. Tai por la donación de plásmidos para la expresión de TvCyP1 y TVCyP2.

### Bibliografía.

- Hsu, H., et al., (2014). *J. Biol. Chem.*, 289(27), 19120–19136. 2. [biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2](http://biocomp.chem.uw.edu.pl/A3D2); [protein-sol.manchester.ac.uk](http://protein-sol.manchester.ac.uk); [vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod](http://vendruscolo.ch.cam.ac.uk/camsolmethod); [babylone.ulb.ac.be/SOLART](http://babylone.ulb.ac.be/SOLART); [tisigner.com/sodope/faq](http://tisigner.com/sodope/faq)
- Martínez-Campos, V., et al., (2015). *Vaccine*. 33(36), 4505–4512.
- Reséndiz-Cardiel, G., Arroyo, R., & Ortega-López, J. (2017). *Protein Expr. Purif.* 134, 104–113.



### EFFECTO DE DIVERSAS FUENTES DE CARBONO SOBRE LA EXPRESIÓN DE LAS GLICOSILTRANSFERASAS DE *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293

Luz Cristina Vallejo-García, María Elena Rodríguez-Alegría, Agustín López-Munguía Canales. Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, CP 62210. cristina.vallejo@ibt.unam.mx

*Palabras clave:* PPlasas, glicosiltransferasas, fuentes de carbono

**Introducción.** Las cepas del género *Leuconostoc* producen una o más Glicosiltransferasas (GTFs) y tienen hábitats muy diversos, donde se encuentra una diversidad de azúcares y otros compuestos, que pueden usarse como fuentes de carbono. Tal es el caso de la cepa *Ln. mesenteroides* ATCC 8293 cuyo genoma contiene 6 secuencias de GTFs<sup>1</sup>. Con anterioridad se estableció que la sacarosa induce su expresión cuando está presente como fuente de carbono (FC) en el medio de cultivo<sup>2</sup>. En este trabajo se explora el efecto del uso de diversos azúcares sobre la expresión de estas las GTFs analizadas mediante zimogramas.

**Metodología.** Se analizó el efecto de las siguientes FC: sacarosa (Sac), fructosa (Fru), glucosa (Glu), xilosa (Xil), galactosa (Gal), manosa (Man), celobiosina (Cel) y ácido Ascórbico (Asc), en concentración 59 mM en el medio de cultivo, incluyendo un control con únicamente extracto de levadura (s/c). Se realizaron tres ciclos de cultivo en placa Petri y dos ciclos en matraz con cada FC para asegurar la ausencia de FC de cultivos previos. La cepa se cultivó a 28°C, con una agitación de 200 rpm en caso de los matraces. El cultivo se centrifugó al final de la fase exponencial y se recuperaron las células. Se determinó actividad enzimática por el método de DNS y proteína por el método de Lowry. Se cargaron 200 µg de proteína en un gel SDS-PAGE 10% que fue tratado con Tween 80 al 1% al final de la corrida. El gel se incubó a 28°C con una solución de sacarosa 50 g/L por 24h. Al final, el gel se tiñó con reactivo de Schiff para detectar polímero resultado de la actividad GTF.

**Resultados.** En la Fig.1 se muestran los zimogramas obtenidos en cultivos con las diversas FC. Se observan al menos 5 bandas correspondientes a la actividad GTF. En los cultivos con Xil y Asc no se observa la banda correspondiente a una GTF de 308 kDa presente en todas las demás. A diferencia del resto de las FC, Xil y Asc comparten parte de la vía de la interconversión pentosa-glucoronato, antes de integrarse a la vía de la glicólisis. Es probable entonces que en esta parte de la vía se ubique el mecanismo de regulación de la GTF. Al analizar la actividad global de las GTFs (Fig. 2), está claro que indistintamente de la FC utilizada, se detectó actividad, lo que lleva a una nueva discusión sobre el papel de la sacarosa como inductor para todas las GTFs de esta cepa y el rol de la Xil.

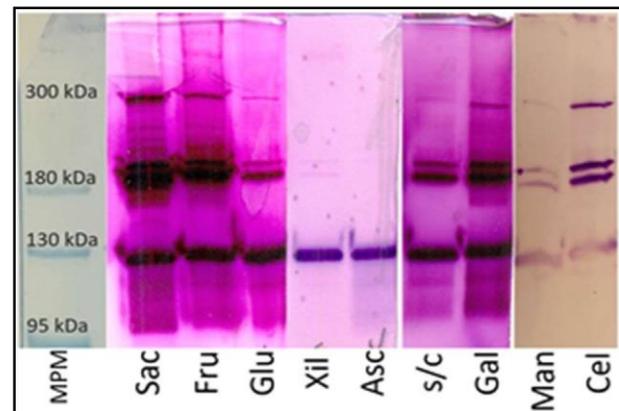


Fig. 1. Zimogramas de las células crecidas en diferentes FC.

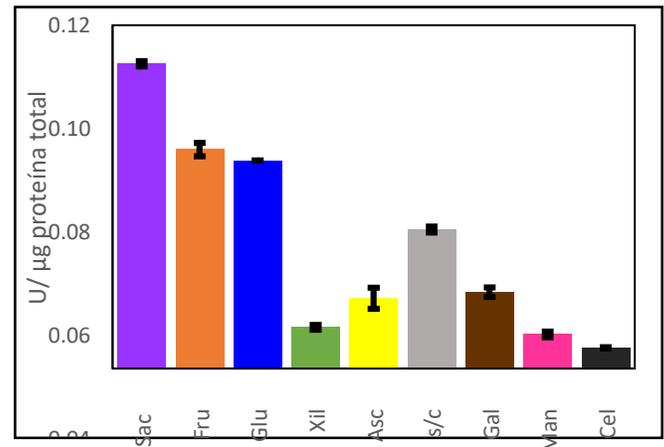


Fig. 2. Actividad global de las GTFs en las células de la cepa en diferentes FC.

**Conclusiones.** En Xil y Asc no se observó una de las GTFs. Creemos que el mecanismo de regulación de la enzima, está relacionado con la vía de interc. pentosa- glucoronato. Hay que replantear el papel de la sacarosa como inductor de las GTFs, al menos en esta cepa.

**Agradecimiento.** Beca CONACyT No. 477574, Proyecto CONACyT: A1-S-21209

#### Bibliografía.

- Olvera, C., Centeno-Leija, S. & López-Munguía, A. (2006) Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol. **92**, 11-20.
- Monsan, P. et al. (2001). Int. Dairy J. **11**, 675-685.



### CARACTERIZACIÓN DE UNA NUEVA ESTERASA GDSL CON AUTOTRANSPORTADOR Y TERMOESTABILIDAD DE *Pseudomonas alcaligenes* AISLADA A 1000 METROS DE PROFUNDIDAD DEL GOLFO DE MÉXICO

Itzel Anahí Hidalgo-Manzano<sup>1,2</sup>, José Luis Rodríguez-Mejía, Luis Felipe Muriel-Millán, Nancy Rivera-Gómez, Edmundo Castillo-Rosales, Liliana Pardo-López<sup>1</sup>, <sup>1</sup>Instituto de Biotecnología UNAM, <sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca Morelos C.P 62210. itzel.hidalgo@ibt.unam.mx

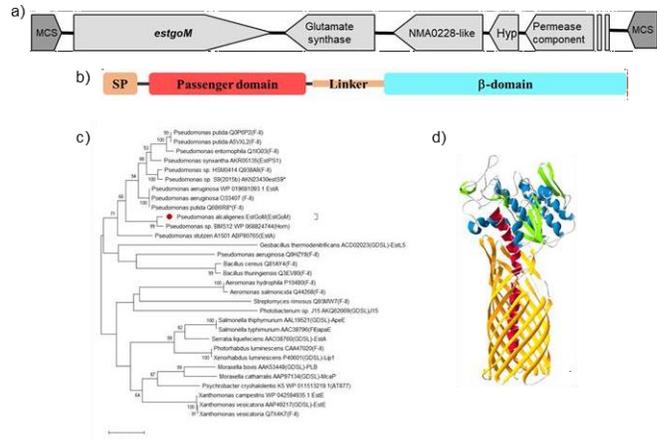
**Palabras clave:** Ambiente marino, enzima, esterasa-GDSL

**Introducción.** El ambiente marino cubre más del 70% de la superficie del planeta albergando diversas formas de vida, particularmente, una gran diversidad de microorganismos que son un reservorio de enzimas con potenciales aplicaciones biotecnológicas. La búsqueda de enzimas estables y activas en condiciones extremas de reacción ha llevado a la exploración de hábitats propiamente extremos como el marino, cuyas condiciones fisicoquímicas han permitido el aislamiento de enzimas con propiedades catalíticas novedosas. Las esterases (EC 3.1.1.1), que son enzimas que catalizan la ruptura y formación de enlaces éster, presentan amplia especificidad de sustrato, estabilidad en disolventes orgánicos y no requieren cofactores (1). Son consideradas catalizadores atractivos con aplicaciones en la elaboración de alimentos, fármacos, detergentes y biorremediación (2). En el presente trabajo se aisló una bacteria de 1000 m del fondo marino y a través de una librería genómica se encontró una nueva esterasa con características biotecnológicas relevantes.

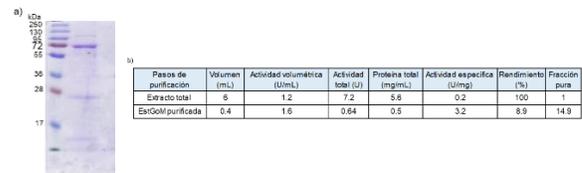
#### Metodología.



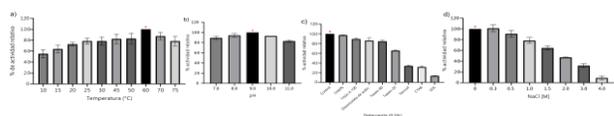
**Resultados.** Con una librería genómica se identificó una esterasa denominada EstGoM (Fig.1a). Se trata de una proteína de 633 aa (67 kDa) con dos dominios: hidrolasa y autotransportador (Fig.1b). Ha sido clasificada como un nuevo miembro de la familia GDSL/SGNH de enzimas lipolíticas (Fig.1c) (4). El modelamiento de su estructura tridimensional se muestra en la Fig.1d. La enzima se expresó exitosamente en *E. coli* y se purificó parcialmente (Fig.2a). La purificación fue de 14.9 veces con un rendimiento del 8.9% (Fig.2b). Presentó actividad en un amplio rango de temperaturas (10-75°C) siendo la óptima de 60°C, pH óptimo de 9.0 (Fig.3b) y actividad en presencia de detergentes (Fig.3c) y NaCl (Fig.3d).



**Fig. 1.** a) contexto genómico de EstGoM, b) representación esquemática de los dominios proteicos, c) árbol filogenético de clasificación, d) modelamiento de estructura tridimensional.



**Fig. 2.** a) SDS-PAGE de EstGoM, b) tabla de purificación.



**Fig.3.** Resultados de caracterización bioquímica.

**Conclusiones.** Se caracterizó una nueva esterasa GDSL/SGNH marina con potencial aplicación en un amplio rango de temperaturas, pH alcalino y en presencia de detergentes.

**Agradecimiento.** Fondo sectorial CONACYT-SENER-Hidrocarburos proyecto 201441. Programa UNAM- PAPIIT IN207019. Programa PAPIIT-UNAM IT200220.

#### Bibliografía.

Bazkar, N., Sohail, M., Tamadoni-Jahromi, S., et al. (2021). *Appl Biochem Biotechnol.* 193: 1187–1214.  
Huo, Y.Y., Rong, Z., Jian S., et al. (2017). *Front. Microbiol.* 8: 2315.  
Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J; Farr, A.L., Randall, L.J. (1951). *JBiol Chem.* 193: 265-275.  
Kovacic, F. (2019). En: *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils, and Lipids.* Rojo, F. Springer Nature. 255-289.

**SÍNTESIS ENZIMÁTICA DEL ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO EN MICROEMULSIONES**

Fernanda Melissa Solís Villafranco<sup>1</sup>, María Alejandra Pichardo Sánchez<sup>2</sup>, Rodolfo Torres de los Santos<sup>1</sup>, Guadalupe Bustos Vázquez<sup>1</sup>, Luis Víctor Rodríguez Durán<sup>1</sup>.  
<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Mante, Cd. Mante, Tamaulipas, C.P. 89840. <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Biotecnología, Cd. de México, C.P. 09340.  
luis.duran@docentes.uat.edu.mx

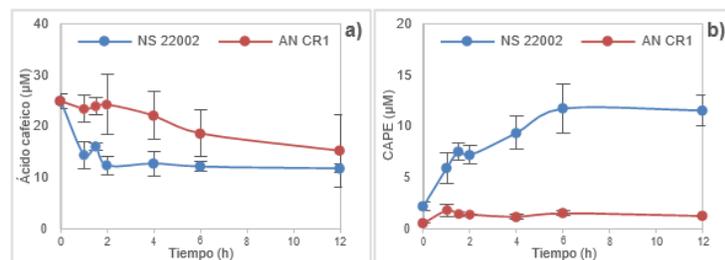
*Palabras clave:* CAPE, Clorogenato hidrolasas, Transesterificación

**Introducción.** El éster fenético del ácido cafeico (CAPE, por su nombre en inglés) tiene importantes actividades biológicas que benefician a la salud humana, tales como: actividad antioxidante, antiinflamatoria, antiviral, inmunomoduladora, anti-angiogénica, antiinvasiva, anti-metastásica, carcinostática, neuroprotectora, hepatoprotectora y cardioprotectora (1). Actualmente, el CAPE se extrae de fuentes naturales, como el propóleo. El proceso es sencillo, pero lento y costoso. La síntesis química mediante la esterificación entre el ácido cafeico (AC) y el alcohol fenético (AF) es lenta (hasta 4 días) y con bajos rendimientos (38-40%). La síntesis enzimática tiene altos rendimientos (90-100%). Sin embargo, la reacción es lenta (48-60 h) y requiere de grandes cantidades de biocatalizador (15-18 mg /mg de AC) (2).

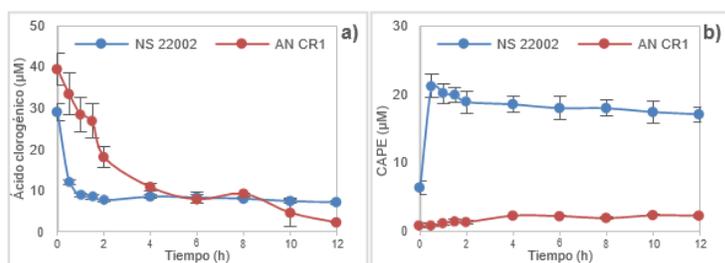
El objetivo de este trabajo fue evaluar la síntesis enzimática de CAPE por reacciones de esterificación y transesterificación en un sistema de microemulsiones.

**Metodología.** Se estudiaron las reacciones de esterificación entre AC y AF y de transesterificación entre ácido clorogénico (ACL) y AF. Se utilizó una hemicelulasa comercial de *Humicola insolens* (Novozymes NS22002), la cual tiene actividad clorogenato hidrolasa de 17.7 U/mL. Así como un extracto enzimático crudo producido por *Aspergillus niger* CR1 (ANCR1). La enzima se produjo en fermentación en estado sólido usando un medio de cultivo con ácido clorogénico como única fuente de carbono y agrolita como soporte inerte. La enzima se extrajo con agua destilada, se filtró a través de membranas de nylon de 0.2 µm y se concentró por ultrafiltración. Las reacciones se en una microemulsión agua-AOT-isooctano con una relación molar agua/AOT de 10. Las mezclas de reacción (4 mL) se colocaron en viales ámbar de 8 mL con tapa de rosca. Los viales se incubaron a 50 °C durante 12 h con agitación magnética. Se tomaron muestras periódicamente las cuales se analizaron por HPLC.

**Resultados.** Ambas enzimas (NS22002 y ANCR1) catalizaron la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación (Fig 1 y 2).



**Fig. 1.** Consumo de sustrato (a) y formación de producto (b) durante las reacciones de esterificación.



**Fig. 2.** Consumo de sustrato (a) y formación de producto (b) durante las reacciones de transesterificación.

La mayor conversión ( $0.94 \pm 0.01$ ) se obtuvo en la reacción de transesterificación catalizada por el extracto enzimático crudo. El mayor rendimiento ( $0.71 \pm 0.13$ ) se alcanzó en la reacción de esterificación catalizada por la enzima comercial.

**Conclusiones.** Las enzimas con actividad clorogenato hidrolasa (NS22002 y ANCR1) catalizan la síntesis de CAPE mediante reacciones de esterificación y transesterificación en un sistema de microemulsión agua-AOT-isooctano.

**Agradecimiento.** Al proyecto SEP-CONACYT Ciencia Básica A1-S-29456.

**Bibliografía.**

1. Tolba, M.F., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Rahman, S.Z. & Abdel-Naim, A.B. (2013). IUBMB Life 65(8): 699-709.
2. Widjaja, A., Yeh, T.-H. & Ju, Y.-H. (2008). J. Chin. Inst. Chem. Eng. 39(5): 413-418