



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

**RELEVANCIA DE RESIDUOS DE LISINA ÚNICOS EN LA
SUPERFICIE DE LAC3 DISEÑADOS PARA FUTUROS
PROCESOS DE FUNCIONALIZACIÓN Y OXIDATIVOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS NATURALES**

P R E S E N T A:

M. en B. Ariana Adelhy Arteaga Castrejón

D I R E C T O R:

Dr. Fernando Martínez Morales

C O - D I R E C T O R:

Dr. Thierry Tron

Cuernavaca, Morelos

Mayo del 2022

Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2022-05-18 17:42:58 | Firmante

aA6lQWllgFhCjXzxcTMrlyjGmv4eirXSHE94nB95v3Md9LdfTbTVxDDleBPcOsXZXdlpndnCny/0RE6/WQKae+3BjYc9xD+12Y8F5mCXAGyV+OUG9yNel3Ks5YM+MFyLm7063iQGPOxITwHF5LYW/+lGyqiKwel851WJDZ4GzhlBidlmL67qtnCYgWvs4RGfBxS6v3G/K9+HUet+To7qnaZdqFLI8B4mo7tpXwA7XvCOcJtCHDcdszQRhhPNju5s+w+mLxap95kbVfYOyXqMObDRppamwdYOU1gxdmEcOQyv+e7qW2QY5DGCJJKjeUeSvZB2vGlvfRSkGZo2+nUcg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[i0Gmokg73](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/P2b2VrJIEbDStRnL25r5P6YclGMEGXy>



Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. THIERRY TRON



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

THIERRY TRON . | Fecha:2022-05-20 02:27:57 | Firmante

DZIJUzTZJgJNr2gY6c9vMMFJaXIKuC5Qy4NbNulyzIzRj0/RxvurZILGRAq49WEVvkqwWjoAf1WjFhzOGViaY8SI2K0cCQQADDVAKVxNoUY0jIR1KrcG9zTELoGtErpuvY91NEIU
mEGxQRKU0DXNFL5OCcXgV98L0G43LgHqe9POOfMDmUmDNTET2+ bqC2rk6AhYhZ5HDsZJTJkGGk7Hsec5H6r/4etc/lxFXAeHV3NzDFXtoShVmSv/nY/IuDUBODnbLmfWXt
WHy9Sc5tR5seTvITUiXYWwLwV8s4pLoTO5msxLScZ/zLaPKPK+tcTqevcYIOMbtJiJs5B70kbmig==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[uDVz5qmKW](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/haPT3hmTIRIL4gYQCR8vcsX9oXmuyAYy>



Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2022-05-23 12:42:20 | Firmante

eD3ET1ytAqyEiY9Lp0jRn963GaeBRsKZrzh0M4xUpKZueXqRgo+yUqnlyztFtjsssoZYuf1lbrKxhUHN6RodsodURCvm1LoolLKGaEjIzNvUpqPevDIZLJ2IWxT89YdQPycwtKD9pX4v8UulyFjG3kQys/mSE+QM6LnuhuJlLujE7yakq9alrvOIMcM1B86itV9KN1HZpd+whCøZzcK8Ag4qiPKQZnvfFr9sViloRNMVX2951CwMhGBdLizxe2VJVoh0lbSMNhTsOya1MvQIYXUvAWDCSn7aae73XUlxHD/7JPCQkezhBem8LijnLtDe4uDO/BbHBjFO3bU+ZkHHXw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[9pCS4tdLV](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nCmhvyltOH44nuVmhGnMzFdK8iD8IKi7>



Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DR. LUIS CASPETA GUADARRAMA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

LUIS CASPETA GUADARRAMA | Fecha:2022-05-25 14:16:53 | Firmante

pQ/TXWhJ0e1qPdRjxiWKjpiOweFC3a+5EVglzPFRE1EcofFc8MmuvtLYa9lXqbLaYSb8+zSUsuF72DM1/xu7q5CRoYOoFfEvJJ9oA4DOPpeN2Dotln05nkyl/mCZxNYe/yTj4oAjBtgMXF/qZfWmwNqQTV3PqpiYy9J43JvfK2xBQxk2xUgTowNI2pKJfRqiYWkXXsEPrGa4ZtRaaqROG+v7Y5bkjuY3fhazESLN2MKTaEssQBVEgElq3qfmi3h+E8rjR/n+2aOGt9cHyedeE63Vzm7PIrfFEKSe1AGSEJi6r/IU6TV51yYAwJ0mdqetjS104sC6Is8lyiRrko8JA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[OIHu9ge5n](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/mCLYdhNDAANAZG1jftH93vFFZxcFgiC6>





Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE



DRA. VIVECHANA AGARWAL



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

VIVECHANA AGARWAL | Fecha:2022-04-26 15:14:12 | Firmante

UtS7QnfppBy2t8W14Zqh8UHHQxcalFEtdQuGgbjffOOBVGQtYEnWzDM2dLb9ORxyQavY2u/4cbrbOGfbdSxYjnRZ3uJQWkvxrB1lhJnjK0L0Xr0vw2CPmxSKqe08FR+c24OgJJBHz7elx3X0fxKqrlB4upl993UeYp5Y1BhzZuUjyEPifnXk1iast5SYTPUA2Nd5u5jfeJ8yiS/MZTXt0juGQHukZMO7D9T+BPki8ey4WX5EOOKbq2i/Yj03JRE3pVfnjtOBn82tbKyVxw7ZZXjyL1wC7qc9gNHI9PjpBjZL5893MK4yXKNhsf7gHF5k0ogXkHMPwQh4ZIXt/JV2g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



LhVDOQA4B

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NgbW5S680FGrXfblzpt1D1gGeqAvjqQP>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DRA. IRENE DE LA CONCEPCIÓN PEREA ARANGO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IRENE DE LA CONCEPCION PEREA ARANGO | Fecha:2022-05-02 13:07:49 | Firmante

HGylf9x4Tix1vNlql8oQjw9NG+LMaz3pdgaUJ1nTPoJd/mqlq9L1QvIrYVhErRIB6YM/9o8nfYyud4tHMTkF6CyQ279Relsv+JrIAx7cZ28qUZN64sFLR/0/HMHFled/4Myo4oLWs1m/8C0jirslvYlyqQG7wSGQ73RceMDDSDKwfr5c8Oz/Axl9MzUe9qS01/KqLY1de+r6J5Q+k9FrpLNSWriTKJihHBLWm072bieHypXPH/eotKBoCxNt/85DwRvpXTLQIZLq0rFCvji75/LrQ0PFB/ZDpMxKfCNla1dDkBm4g4md2PUiaWZC/j5Kh35+esmNTbs/QE47oQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QIdPGZIJy](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vG4vJjJOVYVx8wyycsZNIuf4DEnvgsn4w>



Cuernavaca, Morelos, a 08 de diciembre del 2021.

COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. Fernando Martínez Morales (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Thierry Tron (codirector de tesis, U AIX Marsella)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández (CEIB UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama (IBT UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal (CIICAp UAEM)

Dra. Irene de la Concepción Perea Arango (CEIB UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (CEIB UAEM)

Tesis: “Relevancia de residuos de lisina únicos en la superficie de lac3 diseñados para futuros procesos de funcionalización y oxidativos”

Alumno que lo presenta a revisión: ARIANA ADELHY ARTEAGA CASTREJÓN

Programa: DOCTORADO EN CIENCIAS NATURALES

VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

APROBADO

ATENTAMENTE

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2022-05-02 13:58:34 | Firmante

QUF0u6tRU9BtFRvnZrHhS6GOA3VUkx7K8CC5UqCbk37cglN2fjNeHSqBXhjfTCJv0/7Afzd4Mz+HwWscubW6s9CDVmac4bBvIMTaxl197FR/Dm3NK7PY+VpWhv4+GJhMIKLGXuCXVxxclCpvV8Cm1wn4/qv0mU0bmZaNwpHon5DkfLeHu7E283X3MCgyRaucQRZ5olAWpXeUb8hxEtTSQJk7tw90Ne1MECVSWiQele9tsnneEwPUgWJfaRfzEzKRVfCeNSC3Xb6NiMoGbdq+FRB7+RNTc1QucEF6EjwPeoVXjqKXcJL4BcjeaF2alZlbV18sx7anEmd2UPmrRWlhQA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Zr0hkf6wl

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/nA872sJafsWLAYRbBQn4yiDh2GLpxtB8>



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología (CEIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), México; y en el Instituto de Ciencias Moleculares de Marsella (ISmM2) de Aix Marseille Université, Francia.

La presente tesis se realizó en el marco del proyecto del “*Catalizadores híbridos obtenidos por trasplante denso y orientado de enzimas en la superficie de materiales*” apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y ANUIES-ECOS NORD México-Francia, Clave del proyecto: 277027 y con la beca de doctorado No. 296808.

COMITÉ TUTORAL

Dr. Fernando Martínez Morales

Director principal (CEIB-UAEM)

Dr. Thierry Tron

Co-director (ISM2, Aix Marseille Université)

Dra. María del Refugio Trejo Hernández

Integrante del comité - (CEIB-UAEM)

Dr. Luis Caspeta Guadarrama

Integrante del comité (IBT-UNAM)

Dra. Vivechana Agarwal

Integrante del comité (CIICAP-UAEM)

Dr. Irene Perea Arango

Integrante del comité revisor de tesis (CEIB- UAEM)

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo

Integrante del comité revisor de tesis (CEIB- UAEM)

Con todo mi amor, a mi hijo Noel,

Eres la razón por la que cada día quiero ser mejor.

A mi esposo Noel, por toda la paciencia, apoyo y confianza.

¡Los amo!

A mis padres, Graciela y Jesús por todo el amor y apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todos estos años muchas personas participaron y formaron parte de este proyecto, cada una de ellas de una forma o de otra colaboraron en el desarrollo de esta tesis y lograron hacer de esta etapa algo maravilloso.

Hoy quiero agradecer a mi director de tesis el Dr. Fernando Martínez, gracias por el apoyo dentro y fuera del laboratorio, por acompañarme en todas las dificultades que se presentaron, por la paciencia, por sacarme de mi zona de confort y sobre todo por confiar en mí para este proyecto del cual me llevó grandes experiencias.

Al Dr. Thierry, quien abrió las puertas de su laboratorio y de su casa para mí, gracias por todo lo que aprendí del otro lado del mundo, por compartir sus conocimientos, por su participación en la discusión de resultados y en la redacción de manuscritos.

A la Dra. Mary que me permitió ser parte de su grupo en el laboratorio de Biotecnología Ambiental, por siempre estar dispuesta a aportar ideas en este proyecto.

También a la Dra. Yasmina quien en todo momento estuvo presente, siempre pendiente de mí y del trabajo, dispuesta a discutir resultados y a encontrar soluciones si había problemas, siempre en las buenas y en las malas, ¡un millón de gracias!

Al M en B. Daniel, por todo el apoyo técnico, por los días en los que me acompañó hasta tarde y por poner ambiente en cada experimento.

También quiero agradecer a la T.L Lucero, por el apoyo técnico y por el café de cada mañana para despertar, porque siempre tenía palabras para alegrar un mal día.

No me quiero olvidar del Dr. Brandt, por el apoyo en la revisión del MS del artículo, a la Biól. Fernanda por todo el apoyo en papeleo y por siempre recordarme las fechas para hacer las cosas a tiempo, al L.I Victor Martínez por todo el soporte técnico cuando no sabía cómo hacer funcionar mi computadora y por esas imágenes que quedaron padrísimas, por sacarme de apuros hasta en vacaciones, gracias!

Tampoco quiero olvidarme de la Dra. Agnes, gracias por toda tu ayuda y paciencia en IsM2, por todas esas horas que pasamos juntas revisando secuencias y haciendo PCR o

geles, a Elise y Yolande de la plataforma AVB, por todo lo que me enseñaron en esos días que parecían eternos en la campana.

Al comité tutorial, gracias a todos por su aporte en este trabajo, por acompañarme en esta etapa y por hacer posible esta tesis.

A mis hermanos Jesús y Jesualdo, quienes hasta estos días me siguieron presionando para finalizar esta etapa, por siempre estar aquí, en las buenas y en las malas.

Oigan y no puedo dejar fuera de estas líneas a mis amigas de always! Karen quien me ha apoyado en muchos aspectos para finalizar este proyecto, ¡amiga, lo logramos! A Delia por esas salidas con los gatos y por los conciertos que me hacían olvidar el estrés.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer cada día menos pesado, por las risas y por las tardes de discusión de artículos (guiño, guiño), por los viajes perdón congresos.

A la Dra. Bárbara por su amistad, eres un gran ser humano, con un corazón de oro, eres mi Alemana favorita. A todas las mexicas que conocí en Marsella que espero ver algún día.

A mis amigos y compañeros de laboratorio en Marsella, por todas las fines de semana de playa, por mostrarme un poquito de su cultura, a mi amikoo Enrique por ser el mejor guía turístico y obvi porque nunca me dejó sin comer!

¡GRACIAS A TODOS!

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	V
ÍNDICE DE TABLAS	VII
LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	VIII
RESUMEN	X
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 ANTECEDENTES GENERALES	3
1.2 LACASAS	3
1.2.1 Generalidades fisicoquímicas	3
1.2.2 Mecanismo catalítico de las lacasas	5
1.2.3 Transferencia Directa de Electrones (TDE)	7
1.2.4 Ingeniería de lacasas	8
1.2.5 Aplicaciones industriales y biotecnológicas	9
1.2.6 Lacasas en biopilas de combustible y biosensores enzimáticos	11
1.2.7 LAC3 de Trametes sp. C30	13
1.3 ANTECEDENTES DIRECTOS	15
1.4 JUSTIFICACIÓN	16
1.5 HIPÓTESIS	17
1.6 OBJETIVO GENERAL	18
1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES	18
2. CAPITULO I	19
DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VARIANTES DE LACASA	19
2.1 Resumen	20
2.2 Introducción	20
2.2.1 Métodos mutágenicos	20
2.2.1.1 Métodos de mutagénesis sitio dirigida (MSD): enfoques racionales	21
2.2.1.2 Métodos de recombinación in vivo en S. cerevisiae	21
2.3 Materiales y métodos	22
2.3.1 Cepas, medios y plásmidos	22
2.3.2 Modelo molecular	23

2.3.3	<i>Método: Recombinación homóloga</i>	23
2.3.4	<i>Análisis de sitios de restricción y diseño de primers</i>	24
2.3.5	<i>Condiciones de PCR</i>	26
2.3.6	<i>Transformación en S. cerevisiae para recombinación de fragmentos homólogos</i>	26
2.3.7	<i>Obtención de las variantes por mutagénesis sitio dirigido</i>	27
2.4	<i>Resultados y discusión</i>	29
2.4.1	<i>Diseño y expresión de las variantes UNIK's (Modelos 3D)</i>	29
2.4.2	<i>Recombinación homologa</i>	32
2.4.3	<i>Obtención de variantes por mutagénesis sitio dirigido</i>	33
3.	CAPITULO II	40
	EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE VARIANTES UNIK's EN	
	Saccharomyces cerevisiae W303-1 A	40
3.1	<i>Resumen</i>	41
3.2	<i>Introducción</i>	41
3.2.1	<i>Expresión de lacasas recombinantes</i>	41
3.3	<i>Materiales y métodos</i>	43
3.3.1	<i>Cepas, medios y plásmidos</i>	43
3.3.2	<i>Purificación de plásmido a partir de Escherichia coli DH5a</i>	43
3.3.3	<i>Purificación de plásmido a partir de S. cerevisiae W303-1A</i>	44
3.3.4	<i>Transformación levadura</i>	44
3.3.5	<i>Producción de las variantes y actividad lacasa</i>	44
3.3.6	<i>Cultivo de las clonas y actividad enzimática en placas de 96 pozos</i>	45
3.3.7	<i>Comparación de la expresión de las variantes UNIK's en SDS-PAGE</i>	45
3.3.8	<i>Caracterización del extracto crudo de las variantes</i>	45
3.3.8.1	<i>Parámetros cinéticos (V_{max}^{app} y K_m^{app})</i>	45
3.3.8.2	<i>Estabilidad de las lacasas a temperatura y pH</i>	46
3.3.8.3	<i>Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad lacasa</i>	46
3.3.8.4	<i>Screening de oxidación de compuestos fenólicos</i>	46
3.3.9	<i>Predicción de parches Hidrofóbicos (HP)</i>	47
3.4	<i>Resultados</i>	47
3.4.1	<i>Screening de actividad sobre placas de 96 pozos</i>	47
3.4.2	<i>Determinación de parámetros cinéticos V_{max} y K_m</i>	50
3.4.3	<i>Estabilidad a temperatura y pH</i>	52

3.4.4	<i>Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad lacasa en las variantes</i>	54
3.4.5	<i>Oxidación de compuestos fenólicos</i>	55
3.4.6	<i>Hidrofobicidad en superficie.</i>	57
3.5	<i>Conclusión.</i>	59
4.	CAPITULO III	60
	VECTORES DE EXPRESION Y TRANSFORMACIÓN EN <i>Aspergillus niger</i>.	60
4.1	<i>Resumen</i>	61
4.2	<i>Introducción</i>	61
4.3	<i>Materiales y métodos</i>	63
4.3.1	<i>Ensamblaje en pAN52.4.1</i>	63
4.3.2	<i>Transformación en <i>A. niger</i></i>	63
4.3.3	<i>Buffers y reactivos</i>	64
4.3.4	<i>Procedimiento</i>	64
4.4	<i>Resultados y discusión</i>	66
4.4.1	<i>Ensamblaje de la secuencia de las variantes de lacasa</i>	66
4.4.2	<i>Expresión en <i>A. niger</i></i>	67
4.5	<i>Conclusión.</i>	68
5.	CAPITULO IV	69
	INMOVILIZACIÓN DE LAC3 Y UNIK₁₆₁ EN PARTÍCULAS DE Ru.	69
5.1	<i>Resumen</i>	70
5.2	<i>Introducción</i>	70
5.2.1	<i>Inmovilización de lacasas</i>	70
5.2.2	<i>Funcionalización de lacasas</i>	72
5.2.3	<i>Funcionalización covalente</i>	74
5.2.4	<i>Activación de los soportes</i>	75
5.2.5	<i>TDE modificada por la inmovilización de lacasas en nanosportes</i>	76
5.3	<i>Objetivo</i>	78
5.4	<i>Resultados y discusión.</i>	78
5.4.1	<i>Producción y purificación de LAC3.</i>	78
5.4.2	<i>Funcionalización de LAC3 en Ru</i>	80
5.4.3	<i>Conclusión.</i>	83
6.	DISCUSION, CONCLUSIONES Y PERPECTIVAS GENERALES.	84
6.1	DISCUSIÓN GENERAL.	85

6.2	CONCLUSIONES GENERALES	88
6.3	PERSPECTIVAS	89
	PUBLICACIÓN	90
	REFERENCIAS	92
	ANEXOS	97
	<i>Anexo 1</i>	98
	<i>Anexo 2</i>	108
	<i>Anexo 3</i>	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general y sitio activo de una lacasa.	5
Figura 2. Mecanismo catalítico de la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> (PDB 1KYA).....	6
Figura 3. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas.	10
Figura 4. Representación esquemática de un EBFC basado en un biocátodo de lacasa.....	13
Figura 5. Plásmido pAK145-LAC3/K0.	23
Figura 6. Metodología para la obtención de mutantes por recombinación homóloga.	24
Figura 7. Mutagénesis sitio-dirigido.....	27
Figura 8. a) Estructura 3D de LAC3-K0 con el programa PyMOL.....	30
Figura 9. Modelos moleculares de las variantes de UNIK´s utilizando la estructura de lacasa 1GYC de <i>Trametes versicolor</i> como plantilla.	31
Figura 10. Análisis de restricción.	32
Figura 11. Gel de agarosa 1% de los fragmentos obtenidos del PCR.....	33
Figura 12. Gel 1% agarosa de los productos de PCR digeridos con <i>DpnI</i>	34
Figura 13. Secuencias confirmadas de las mutantes T270K y D283K.....	35
Figura 14. Secuencias de las mutantes confirmadas por secuenciación.	37
Figura 15. El modelo 3-D de LAC3-K0.	39
Figura 16. Actividad volumétrica de las variantes UNIK´s.	48
Figura 17. Comparación en SDS-PAGE de la expresión de variantes de lacasa UNIK.....	49
Figura 18. Actividad de las variantes UNIK´s en medio sólido con guaiacol.	50
Figura 19. (A) Estabilidad del pH y (B) estabilidad térmica.	53
Figura 20. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad en el extracto crudo de la lacasa concentrada.....	55
Figura 21. Valores de actividad relativa de las variantes de lacasa frente a los diferentes fenoles utilizados como sustrato en este estudio.	57
Figura 22. Parches hidrofóbicos (HP) de superficie.....	58
Figura 23. Residuos que rodean la posición 238 (N211; S236; F240, P300).	59
Figura 24. Producción en masa de esporas en agar medio mínimo con uridina.	64
Figura 25. Placa con medio mínimo selectivo sólido con ABTS como sustrato.....	66
Figura 26. Representación de la inmovilización de la lacasa LAC3 de <i>Trametes versicolor</i> C30 sobre un Nanotúbulo de carbono (NTC).	71
Figura 27. Figura esquemática del procedimiento de funcionalización-activación.....	72
Figura 28. Inmovilización dada por un grupo amino en la superficie de una proteína y el grupo disponible en la superficie de un soporte.	73
Figura 29. A) Unión covalente a través de acoplamiento de amida con los grupos ácido carboxílico de nanotubos de oxidados. B) Enlace peptídico formado por los grupos ácido carboxílico y amino.	74
Figura 30. Los electrones pueden transferirse desde el electrodo al sitio activo de cobre mediante transferencia electrónica directa (DET).	77

Figura 31. Producción de LAC3 en <i>A. niger</i> y purificación.	79
Figura 32. Cinética de actividad enzimática de LAC3 en dos fermentadores (F3 y F1) durante 6 días, con ABT como sustrato.	80
Figura 33. Conjugación de PEG a lisozima usando un procedimiento de dos pasos.	81
Figura 34. Espectros de absorción, en donde se observan los materiales utilizados en la inmovilización (LAC3/UNIK₁₆₁ y Ru).	82

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ingeniería por mutagénesis sitio dirigido de variantes de LAC3.	14
Tabla 2. Oligonucleótidos mutágenicos empleados en el método de recombinación homóloga	25
Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR.	26
Tabla 4. Oligonucleótidos mutágenicos diseñados para la obtención de variantes.	28
Tabla 5. Condiciones de PCR con Phusion polymerase.	29
Tabla 6. Efecto de las diferentes mutaciones sobre la superficie de la lacasa LAC3-K0.	36
Tabla 7. Parámetros cinéticos de variantes UNIK´s en el extracto crudo concentrado.	51
Tabla 8. Velocidad inicial (Vo).	52
Tabla 9. Sustratos utilizados para el cribado de oxidación por las variantes seleccionadas.	56
Tabla 10. Condiciones de PCR para todas las construcciones en pAN52.4.1.	63
Tabla 11. Oligonucleótidos mutágenicos diseñados para la obtención de variantes en pAN52.4.1.	67
Tabla 12. Purificación de LAC33 recombinante de <i>A. niger</i>	79
Tabla 13. LAC3Ru y la UNIK ₁₆₁ Ru inmovilizadas sobre rutenio.	83

LISTADO DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Å	Armstrong
Aa	Aminoácido
Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonato)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
App	Aparente
AE	Actividad específica
BSA	Albúmina de suero bovino
CTN	Closter trinuclear
DO	Densidad óptica
BOD	Bilirrubina oxidasa/ <i>Bilirubin oxidase</i>
Dd	Doble digestión
DET	Transferencia electrónica directa
dNTPs	Desoxirribonucleótidos
E°	Potencial redox
EBFC	Celda de biocombustible enzimático/ <i>Biocathodes for Enzymatic Biofuel Cells</i>
EC	Comisión de Enzimas
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético/ <i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>
EPR	Resonancia paramagnética electrónica/ <i>Electronic Paramagnetic Resonance</i>
GBFC	<i>Glucose biofuel cell</i>
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
HP	Parches Hidrofóbicos/ <i>Hydrophobic Patches</i>
HRPL	Lacasa de alto potencial redox/ <i>High-Redox Potential Laccase</i>
IE	Eficiencia de inmovilización
IY	Rendimiento de inmovilización
K0	Cero lisinas
K _{cat}	Constante catalítica

kDa	Kilodalton
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LB	Luria-Bertani
MCO	Oxidasas azul multicobre/ <i>Blue Multicopper Oxidases</i>
NM	Nanomateriales
MSD	Mutagénesis Sitio Dirigido
NPP	Residuos No Polares a Polares
NTC	Nanotúbulo de carbono
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas/ <i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoelectrico
PM	Peso Molecular
Ru	Rutenio
SAM	Superficies Monocapa Autoensambladas/ <i>self-assembled monolayer surfaces</i>
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico/ <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SN	Sobrenadante
ssDNA	<i>Single-Stranded Carrier DNA</i>
TEI	Transferencia de Electrones Intramolecular
TMC	Complejos Metálicos de Transición / <i>Transition Metal Complexes</i>
UNIK	Variante de LAC con una sola lisina
V_0	Velocidad inicial
V_{max}	Velocidad máxima
YNB	Base Nitrógeno de Levadura / <i>Yeast Nitrogen Base</i>

RESUMEN

Las lacasas fúngicas son oxidorreductasas con baja especificidad de sustrato. La funcionalización de la superficie de lacasa se utiliza para obtener catalizadores híbridos con nuevas propiedades. Los residuos de aminoácidos como la lisina que están expuestos en la superficie, pueden ser fácilmente funcionalizados a través de alquilación reductora. En este trabajo, LAC3-K0, una enzima desprovista de lisina, se utilizó como plataforma para detectar posibles sitios expuestos en la superficie adecuados para ser reemplazados por un residuo de lisina relevante para futuros estudios de funcionalización. Se seleccionaron siete sitios de un modelo 3-D LAC3-K0 a distintas distancias del sitio CuT1 en donde el sustrato interactúa con la enzima y se obtuvieron variantes de lisina únicas (UNIK_n, n = posición del residuo) mediante mutagénesis dirigida al sitio. Las variantes, incluidas aquellas con mutaciones adicionales (que afectan a residuos de superficie) obtenidas al azar, se expresaron en *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A y se detectaron como proteínas secretadas funcionales, por su capacidad para oxidar guaiacol o 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico (ABTS) en placas de agar. Todas las variantes fueron activas a pH ácido y se mantuvieron estables a temperaturas entre 15 y 55 °C. Los ensayos de oxidación revelaron que el reemplazo de uno o dos residuos de superficie afectó en gran medida la actividad enzimática y la selectividad del sustrato independientemente de la distancia al sitio CuT1. Se encontró que los parámetros catalíticos (Km^{app} y $Kcat^{app}$) determinados con ABTS eran diferentes entre las variantes. Se determinó que el papel de los parches hidrofóbicos detectados en la superficie de LAC3-K0 era un factor a considerar en la interacción de los materiales híbridos.

Todas las variantes con lisina de ubicación única en superficie, creadas en este trabajo pueden ser demandadas para obtener lacasas con cierta especificidad de sustrato en el diseño de materiales híbridos.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas (EC 1.10.3.2, *p*-difenol: oxidorreductasas) son enzimas multicobre caracterizadas por la presencia de cuatro iones de cobre organizados en dos centros activos. El sitio de cobre tipo I localizado en la superficie está involucrado en la oxidación de sustratos fenólicos mientras que su centro de cobre trinuclear enterrado está involucrado en la reducción concomitante de O₂ en agua [1, 2]. Su baja especificidad permite que estas enzimas catalicen la oxidación de una amplia variedad de compuestos fenólicos, aminas aromáticas y iones metálicos. Las lacasas se consideran "catalizadores verdes" debido a su capacidad para utilizar O₂ molecular como aceptor de electrones que genera agua como único subproducto [3-5]. Ampliamente distribuidas en la naturaleza, las lacasas realizan una variedad de funciones biológicas que incluyen la morfogénesis, la defensa contra el estrés y la degradación de la lignina [6]. A pesar de que algunas lacasas fúngicas tienen un alto potencial redox (730 -790 mV), ciertos componentes de la lignina y otros sustratos de mayor potencial redox requieren la presencia de mediadores redox [7, 8].

En las últimas décadas, las lacasas han recibido especial atención por sus propiedades redox y su robustez como catalizador, y se utilizan en aplicaciones amigables con el medio ambiente que van desde procesos biotecnológicos para textiles, cosméticos, alimentos, farmacéuticos, polímeros, hasta la producción de biocombustibles y energía. Recientemente, las lacasas han encontrado aplicaciones en nanobiotecnología [6, 9], un campo que emerge como una nueva frontera en biotecnología, en el que se utilizan técnicas de funcionalización e inmovilización para integrar enzimas en el diseño de nanomateriales (NM) con características mejoradas y propiedades aún no descubiertas en la naturaleza.

La inmovilización se conoce desde hace mucho tiempo como una herramienta poderosa para mejorar las propiedades naturales de una enzima [10], cuya implementación a menudo se ve obstaculizada por problemas de posproducción como la estabilidad, almacenamiento a largo plazo, la recuperación y el reciclaje del catalizador. Los procesos de inmovilización aprovechan las propiedades de los aminoácidos disponibles en la superficie de las enzimas, por ejemplo, grupos funcionales reactivos de cisteína o lisina que pueden participar en la formación de enlaces covalentes con el material de soporte [10]. Como observaron recientemente Hoarau *et al.* [11], las superficies monocapa autoensambladas (SAM)

químicamente bien definidas hechas de cadenas cortas de etilenglicol y grupos maleimida reactivos con cisteína los cuales participan en la unión covalentemente en la superficie de la enzima. Los avances en la comprensión a nivel molecular de las interacciones entre proteínas y materiales de soporte que contribuyen a cambios en la estabilidad y actividad permiten avanzar hacia técnicas que controlan la interacción enzima-soporte.

Una contribución a este control de la inmovilización consiste en el diseño de variantes que permitan una orientación de la enzima en relación con la superficie del material de soporte [11-13]. Puede obtenerse una orientación dada mediante la sustitución dirigida de un residuo de aminoácido expuesto en la superficie ubicada apropiadamente por un residuo reactivo que será el objetivo en una reacción de acoplamiento posterior con el material elegido. Como ejemplo, la lacasa se ha orientado en la superficie de nanotubos de carbono modificados para la síntesis de biocátodos eficientes a través de una funcionalización covalente específica de una lisina única [14, 15]. Aumentando el número de enzimas "conectadas", la orientación molecular de las moléculas de enzima en la superficie del electrodo ha permitido observar una transferencia electrónica directa (DET) desde el electrodo a la enzima, un DET se puede modular en función de la orientación de la enzima [14, 15].

La mutagénesis dirigida es un método eficaz para obtener una funcionalización precisa de la superficie de las proteínas a través de una reacción de injerto posterior. Debido a su conocida topografía, algunas lacasas son candidatas perfectas para obtener conocimientos sobre la modulación de la función enzimática desencadenada desde la superficie. La lacasa LAC3 de *Trametes sp.* C30 ha sido estudiado para la oxidación de compuestos no naturales [16, 17] y se han obtenido modulaciones de su actividad a través de diferentes funcionalizaciones de su superficie [14, 15, 18]. A partir de una enzima LAC3 desprovista de grupo lisina, se puede localizar una lisina funcionalizable única en cualquier lugar de su superficie [18]. En el presente trabajo, obtuvimos y caracterizamos un conjunto de variantes originales de lisina única de LAC3 con el objetivo de obtener información sobre la influencia de la localización de la lisina en la superficie de la lacasa en la función general de la enzima antes de su funcionalización covalente, lo que permitirá su uso en procesos oxidativos o en diferentes aplicaciones en la industria.

1.1 ANTECEDENTES GENERALES

Las enzimas producidas por microorganismos han atraído una atención significativa para aplicaciones industriales debido a la facilidad de producción, estabilidad, ahorro de tiempo, rentabilidad, naturaleza biodegradable y características amigables con el medio ambiente [19]. Por lo que, se utilizan en el desarrollo de suministro de combustible alternativo para superar los problemas asociados con el agotamiento de los recursos naturales y del medio ambiente. Según un análisis de mercado mundial de enzimas industriales, se estimó en 4.200 millones de dólares en 2014 y se prevé que aumente a una tasa de crecimiento anual compuesto del 7% entre 2015 y 2020. Además, las enzimas están también implicadas en la degradación potencial de compuestos químicos tóxicos, tales como compuestos fenólicos, nitrilos, aminas, etc., frecuentes en los desechos industriales y domésticos [19]. De las enzimas estudiadas con este fin, las fenoloxidasas fúngicas extracelulares, como la lignino peroxidasa, la manganeso peroxidasa y las lacasas son las principales enzimas que han sido evaluadas para la eliminación de compuestos fenólicos tóxicos y la degradación de xenobióticos recalcitrantes [20]. Las lacasas han atraído el interés debido a su versatilidad catalítica, a que sólo requiere oxígeno para llevar a cabo su función y son producidas por una diversidad de microorganismos, particularmente los hongos de la pudrición blanca de la madera.

1.2 LACASAS

Las lacasas (*p*-difenol: oxido-reductasa, EC1.10.3.2) son oxidasas azul multicobre (MCO), se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se producen en hongos, plantas, insectos y arqueas, su función se diferencia de un organismo a otro, aumentando su diversidad [2, 21]. Catalizan la oxidación de un amplio rango de sustratos orgánicos e inorgánicos, fenoles, cetonas, fosfatos, ascorbato, aminas y ligninas, con la concomitante reducción de cuatro electrones de oxígeno molecular a agua. [21].

1.2.1 Generalidades fisicoquímicas

Las lacasas son glicoproteínas monoméricas o multiméricas, presentan un peso molecular aproximado 60 -70 kDa, con un punto isoeléctrico ácido (pI) [22], pH óptimo de 4.0 y temperatura óptima en un rango de 20-70 °C. Cuentan con tres dominios, un sitio activo y

cuatro átomos de cobre: T1 (1), T2 (2) y T3(1) (Figura 1); La estructura se estabiliza por uno o dos puentes disulfuro entre los dominios 1 y 2, el cobre tipo 2 y 3 se entrelazan entre los dominios 1 y 3, mientras que el CuT1 se encuentra en el dominio 3, ubicado en la parte inferior del bolsillo de unión del sustrato, este último no está bien definido y se observa como una depresión poco profunda en la parte inferior de la C-terminal. Los tres Cu T2 / T3 están dispuestos en forma triangular o cluster trinuclear (CTN) y coordinados por residuos conservados como el tripéptido His-Cys-His. El dominio 2 no participa directamente en la formación del sitio activo, sino que más probablemente contribuye a la estabilidad del conjunto de proteínas como una unidad funcional [23-27]. El cobre de tipo 1 (CuT1) es responsable de la oxidación del sustrato, imparte el color azul para la enzima [27], y está coordinado por dos histidinas, una cisteína y un ligando axial, es responsable de la transición de la transferencia de carga SCys → Cu (II) próxima a los 610 nm; por lo que está implicado en la transferencia de electrones.

Los potenciales redox de las lacasas van desde +430 mV en lacasas bacterianas y vegetales, y hasta +790 mV en algunas lacasas fúngicas, esto debido a que el ligando axial de CuT1 es un aminoácido hidrófobo (p.e fenilalanina o leucina), que tiene un alto potencial redox. El tipo 2 (T2) coordinado por los dos residuos de histidina restantes y una molécula de agua, con un espectro de resonancia paramagnética electrónica (EPR, por sus siglas en inglés) característico y distinto del CuT1, también está involucrado en la transferencia de electrones y el tipo 3 (T3), llamados Cu T3a y Cu T3b, son iones acoplados anti-ferromagnéticamente y coordinados cada uno por 3 residuos de histidina, responsable de la unión al oxígeno, con una absorbancia de 330 nm [28-30]. Comúnmente se clasifican como lacasas de potencial redox bajo-medio y alto [31].

Desde el punto de vista biotecnológico las lacasas fúngicas son las más importantes, dado su alto potencial redox. Los basidiomicetos ligninolíticos o también llamados hongos de pudrición blanca suelen secretar lacasa con alto potencial redox (HRPL, por sus siglas en inglés) [31].

La mayoría de los basidiomicetos producen tanto lacasas extracelulares e intracelulares, las lacasas son más estables en su papel extracelular, ya que se producen a menudo como proteínas altamente glicosiladas, donde los restos de carbohidratos aumentan su

hidrofilicidad [32]. Su grado de glicosilación oscila entre 10 y 25 % y sólo en algunos casos superior a 30 % [33], típicamente con 3-10 sitios de glicosilación, que han sido determinados a partir de su secuencia de aminoácidos [34]. A pesar de numerosos reportes sobre las lacasas en la literatura, sus propiedades bioquímicas, fisicoquímicas, y sus parámetros catalíticos son a menudo incompletos o difícil de comparar, ya que los investigadores han usado diferentes cepas, sustratos, inductores y condiciones de reacción (mediadores) [27].

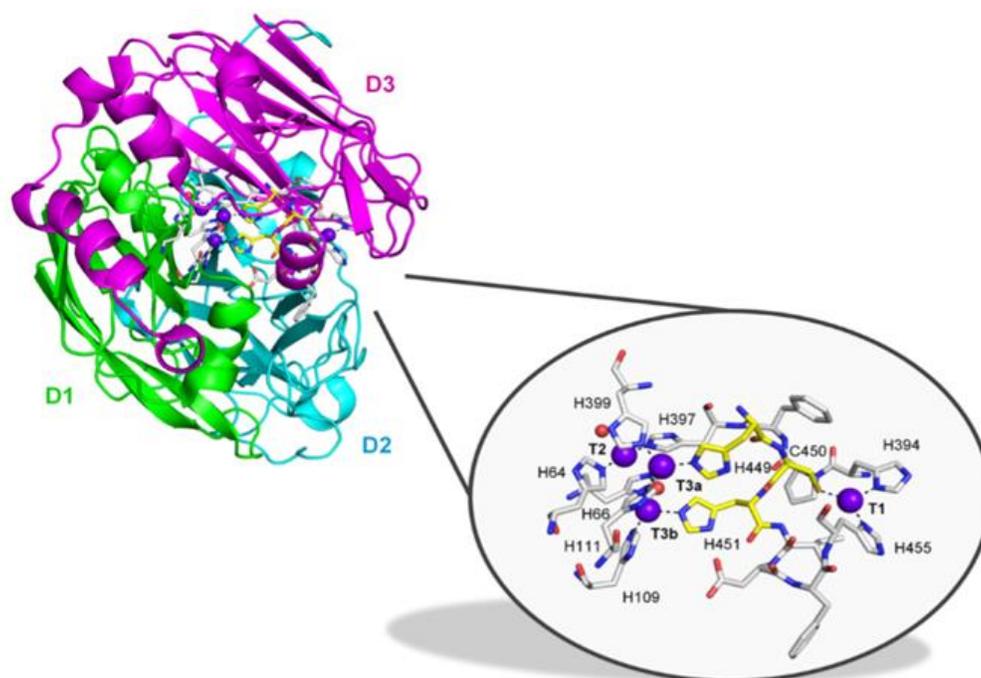


Figura 1. Estructura general y sitio activo de una lacasa (*Trametes trogii*, PDB ID: 2HRG). Los tres dominios (D1, D2 y D3) se muestran en color verde, cian y magenta, respectivamente. Los cuatro átomos de cobre: T1, T2 y T3 se muestran en azul morado. Los aminoácidos de la vía histidina-cisteína están en amarillo, Mate *et al.* [35].

1.2.2 Mecanismo catalítico de las lacasas

La reacción catalítica de lacasa es compleja. En general incluye tres pasos: a) oxidación del sustrato, los electrones del sustrato reductor se extraen del $\text{Cu}_2^+\text{T1}$, el aceptor de electrones del sustrato reductor y determina el potencial de reducción de la lacasa. b) transferencia de electrones dentro de la molécula o transferencia de electrones intramolecular (TEI), se transfieren a través de la proteína al $\text{Cu3}\alpha$ en el sitio CTN a través de un tripéptido His-

Cys-His altamente conservado, y que requiere la acción sincronizada para completar un ciclo catalítico, en este paso las moléculas de oxígeno se difunden en el CTN a través del canal de entrada accesible al disolvente, los primeros dos electrones son donados por iones de cobre T3 de la enzima totalmente reducida al oxígeno, lo que da como resultado la formación del intermedio de peróxido de lacasa, los segundos dos electrones se transfieren luego de los iones de CuT1 y T2 para escindir de forma reductora el enlace O – O. c) y reducción de cuatro electrones de dióxigeno a agua. Este mecanismo de transferencia de electrones / H⁺ evita la generación de radicales reactivos de oxígeno en el sitio CTN, y la primera molécula de H₂O producida se difunde fuera del sitio CTN a través del canal de salida accesible al disolvente (Figura 2). La actividad y todas las características de reacción de la lacasa están estrechamente relacionadas con el nivel de potencial redox (E°) [22, 25, 30, 36].

La reacción enzimática requiere que el potencial de reducción del sustrato sea menor o ligeramente mayor que el del sitio CuT1. El ligando axial del sitio CuT1 está conectado al potencial redox de lacasa. La diferencia en el entorno de coordinación conduce a diferentes potenciales redox, un residuo no coordinando, fenilalanina o leucina, en la posición axial puede ser un determinante importante del alto potencial redox de la lacasa fúngica [30].

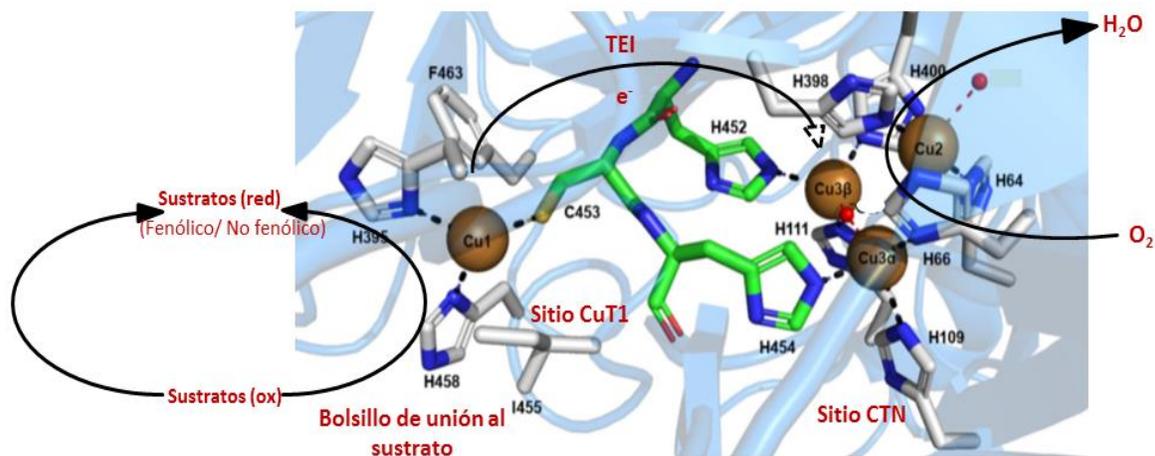


Figura 2. Mecanismo catalítico de la lacasa de *Trametes versicolor* (PDB 1KYA). En gris están representados los aminoácidos que intervienen en la estabilización y orientación del sustrato y en verde los que intervienen en la coordinación de los cobres catalíticos (Vía histidina- cisteína) y la transferencia de electrones. Tomado y editado de Arregui *et al.* [22].

1.2.3 *Transferencia Directa de Electrones (TDE)*

Una utilización eficaz de la energía solar para impulsar la catálisis requiere el desarrollo de sistemas robustos en los que la absorción de la luz provoca eventos de transferencia de electrones (ET) que conducen posteriormente a la activación de un centro catalítico.

Los sistemas que puedan acoplar un catalizador a una fuente renovable de aceptor de electrones (es decir, O₂) son altamente deseables. Se ha descrito el diseño de catalizadores híbridos que asocian a un fotosensibilizador con una unidad capaz de reaccionar eficazmente con el dioxígeno a una velocidad de rotación sustancial. Entre los posibles candidatos para estas "unidades catalíticas de oxígeno" se encuentran varias enzimas. Las lacasas pueden ser reducidas por fotorradicales como CO₂. Las lacasas catalizan la oxidación de complejos metálicos de transición (TMC) que también tienen reportada la habilidad de la enzima para interactuar con estos. Se ha demostrado que en presencia de un donador de electrones de exógeno (EDTA) y fotosensibilizadores tipo-polipiridina de rutenio, la enzima se puede reducir totalmente y es fiable a su vez para reducir el dioxígeno [25].

En años recientes han demostrado que la combinación de una lacasa con: 1) un complejo de paladio resulta en un aumento de 7 veces la eficacia catalítica del complejo sobre la capacidad oxidativa del alcohol veratrílico en agua, a temperatura ambiente y presión atmosférica y; 2) en [Ru (bpy)₃]²⁺ permite la foto-oxidación de alquenos en condiciones donde el dioxígeno es un aceptor de electrones renovable y el donante el átomo de O₂ [17].

Más allá de demostrar la reducción de dioxígeno, la disponibilidad de diversos fotosensibilizadores, así como la plasticidad de las lacasas, se fomenta a nuevos estudios hacia materiales híbridos con aplicaciones potenciales en la fotocatalisis, la fotónica y energía [25]. Es importante destacar la importancia del diseño de tales electrodos enzimáticos, ya que es necesario preservar la estructura 3D de la enzima, por lo que se ha explotado la naturaleza hidrófoba de los aminoácidos cerca del centro de CuT1 de las lacasas de varios hongos para inmovilizar enzimas con técnicas que evitan cualquier desnaturalización enzimática [14]. Además de su uso en la generación de energías renovables cuando estas son acopladas a nanosportes inertes [35, 37].

1.2.4 Ingeniería de lacasas

El crecimiento continuo del mercado industrial de enzimas depende de la innovación tecnológica. Las lacasas pueden y han sido mejoradas por: (1) ingeniería genética, donde por una molécula producida heterológicamente puede modificarse al nivel del ADN, y/o (2) desde un punto de vista químico, modificando químicamente la enzima de tipo salvaje como son la hidrofusión, PEGilación, glicosilación e inmovilización. Los desarrollos en ingeniería genética y de proteínas han llevado a mejoras en la estabilidad, especificidad, economía y el potencial general de aplicación de las enzimas industriales.

La ingeniería de los genes que codifican la lacasa permite niveles de producción más altos y la creación de nuevas lacasas con propiedades modificadas requeridas para la industria, por ejemplo, lacasas con mayor estabilidad, con varios pH óptimos, K_m y K_{cat} , y con afinidades de sustrato mejoradas [7]. La creación de versiones mutadas sirve no sólo para mejorar las aplicaciones industriales, sino que también ayuda a aclarar la relación entre la estructura de la enzima y su función. Recientemente, se han hecho muchos intentos para la ingeniería de lacasa utilizando diversas herramientas bioinformáticas y cálculos computacionales para fortalecer los efectos de la mutagénesis sitio dirigida y la evolución dirigida [38].

Se pueden crear fácilmente nuevas enzimas o nuevas funciones con un amplio conjunto de técnicas de mutagénesis (p. ej. mutagénesis dirigida o aleatoria) entre las cuales las propiedades naturales de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* que se pueden usar apropiadamente para construir híbridos de lacasas. La mutagénesis en lacasas comenzó en los años 90's y se ha utilizado hasta ahora tanto para estudios de relación estructura-función de las enzimas como para afinar sus propiedades en busca de catalizadores mejorados. En algunos casos, estas técnicas también han permitido optimizar directamente parámetros cinéticos o para aumentar la resistencia a los disolventes orgánicos. La plasticidad de la enzima también ha sido modificada por deleciones o adiciones (p. ej. El extremo C-terminal de las lacasas) [39].

De esta manera las modificaciones sobre la superficie de las lacasas permitirá el injerto óptimo, orientado y selectivo de la enzima, la cadena lateral de las lisinas expuestas en la

superficie de la proteína es por lo general fácilmente funcionalizable mediante reacciones químicas simples [14].

1.2.5 Aplicaciones industriales y biotecnológicas

Las lacasas fúngicas son ampliamente estudiadas para su uso en varias aplicaciones industriales debido a su capacidad para oxidar una amplia gama de sustratos relevantes, además, también están implicadas en la degradación potencial de compuestos químicos tóxicos, desechos industriales y domésticos [19, 20]. La oxidación enzimática es un sustituto de un método químico, ya que las enzimas son catalizadores muy específicos, eficientes y son ecológicamente sustentables [20]. Sus principales usos incluyen el blanqueado de la celulosa en la industria papelera (delignificación de materiales lignocelulósicos), decoloración de tintes, la detoxificación de ambientes contaminados y aguas residuales (Figura 3). En la industria alimenticia también se reporta su uso, la modificación ciertos componentes importantes de varios alimentos y bebidas (p.ej. fenoles como sustrato) por lacasas puede dar lugar a una nueva funcionalidad, mejora de la calidad o la reducción de costos [40], así como eliminación de compuestos fenólicos en vino [3]. Más recientemente, también se reporta su uso en preparaciones dermatológicas que contienen proteínas para aclarar la piel, así como en la industria cosmética, por ejemplo, colorantes de cabello a base de lacasas son menos irritantes y más fáciles de manejar que colorantes de cabello que utilizan peróxido.

La aplicación de las lacasas en la eliminación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), junto con otros xenobióticos ha sido también demostrada por diferentes autores [41, 42]. Los HAP son derivados de los depósitos naturales de petróleo y son una fuente importante de contaminación en el suelo, por lo tanto, su degradación es de gran relevancia para el medio ambiente.

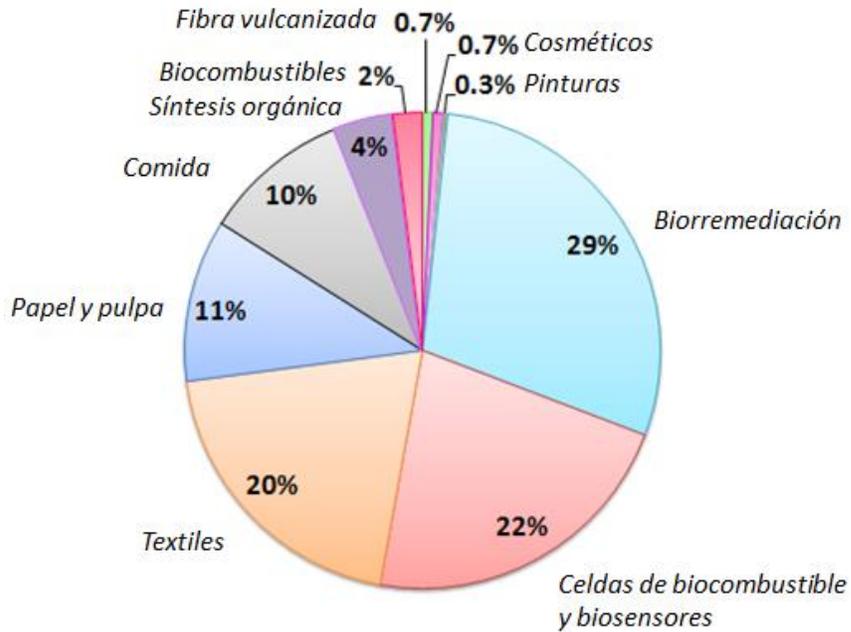


Figura 3. Aplicaciones biotecnológicas de las lacasas. Tomado y modificado de Mate *et al.* [1].

Por otro lado, los materiales lignocelulósicos son prometedores para la producción de bioetanol. Sin embargo, se necesita un pretratamiento rentable de la biomasa para eliminar la lignina y exponer los azúcares a las enzimas hidrolíticas. Las lacasas juegan un papel clave en la biodegradación de la lignina y se está estudiando su uso como agentes en la producción de biocombustibles y como biocatalizadores para eliminar inhibidores fenólicos presentes en los hidrolizados de la biomasa lignocelulósica que favorecen la acción de enzimas para la sacarificación, el crecimiento de levaduras y la producción de bioetanol [1].

Otros autores reportan su uso en el campo de la nanobiotecnología, en los avances del desarrollo de celdas de biocombustible y biosensores basados en lacasas, para la reducción de oxígeno bioelectrocatalítico, donde se destaca su uso de nanomateriales de electrodos avanzados, como nanopartículas y nanocables. Además de numerosos ejemplos de su asociación como complejos metálicos (p. ej. lacasa-paladio), usados con éxito para procesos fotocatalíticos [17, 25, 43].

Sin embargo, los hongos ligninolíticos a menudo producen varias isoformas de lacasa con actividades catalíticas diferentes pero con propiedades químico- físicas similares y por ello, las isoformas son difíciles de purificar, representando uno de los mayores obstáculos para

su aplicación en donde es de suma importancia la producción a gran escala, los rendimientos y la calidad enzimática, como estabilidad y actividad catalítica. Las lacasas producidas por ingeniería genética supera este obstáculo, ya que puede optimizarse mediante el uso de un promotor fuerte adecuado y una secuencia señal dirigiendo la enzima al medio de cultivo, simplificando así su purificación al tiempo que reduce los costos. Encontrar condiciones óptimas para su expresión y actividad, como el pH óptimo y la temperatura, también puede aumentar significativamente los rendimientos [38].

1.2.6 Lacasas en biopilas de combustible y biosensores enzimáticos

Las pilas de biocombustible son una alternativa importante para reemplazar la producción de energía a partir de combustibles fósiles o energía nuclear que han estimulado la generación de gases de efecto invernadero o de nuevas fuentes de contaminación ambiental, incrementando la necesidad de métodos limpios de producción de energía eléctrica. Entre estas fuentes alternativas limpias, la producción de energía eléctrica gracias a las celdas de biocombustible, una subcategoría de las celdas de combustible, es un campo en rápido crecimiento. Las pilas de combustible enzimáticas se basan en la transformación de energía química en electricidad mediante reacciones redox. Por lo que estas células de biocombustible se basa en dos electrodos, utilizando enzimas redox para la oxidación específica de combustibles (alcoholes, hidrógeno, lactato, azúcares como glucosa, fructosa, lactosa o celobiosa) en el ánodo y la reducción de oxidantes (O_2 , H_2O_2) en el cátodo para generar energía eléctrica [43].

Las pilas de combustible enzimáticas o celda de biocombustible enzimático (EBFC por sus siglas en inglés) es una subclase de celdas de combustible que se basa en enzimas redox purificadas para lograr reacciones electrocatalíticas (Figura 1). En comparación con las pilas de combustible de hidrógeno o metanol, los azúcares como la glucosa presentan la ventaja única de ser un compuesto de almacenamiento de energía perfecto en muchos organismos vivos y no tienen absolutamente ningún riesgo toxicológico, explosivo o inflamable. Teniendo en cuenta que los catalizadores, combustibles y productos son biodegradables, el aspecto ecológico de las celdas de biocombustible en comparación con las celdas de combustible es relevante. En las EBFC, el interés de las enzimas radica en la alta especificidad de las enzimas hacia sus respectivos sustratos y su capacidad para lograr

una alta rotación catalítica en condiciones suaves (20-40 C dentro de un rango de pH razonable de 5-8 o incluso a pH neutro). Por lo tanto, se prevé que tales generadores electroquímicos funcionen en medios complejos como fluidos fisiológicos o vegetales. Por lo que las enzimas representan una alternativa renovable para reemplazar los catalizadores de metales preciosos o metales de transición como níquel, oro, plata, rodio, rutenio, paladio o cromo, o aleaciones [43, 44].

Desde el inicio de la década de los 2000, se han logrado enormes avances en el campo de las celdas de biocombustible, lo cual se demuestra en el aumento exponencial de publicaciones científicas y patentes dedicadas a este tema. Esto es resultado de los grandes avances logrados en el campo de los biosensores electroquímicos como el diseño de nuevos nanomateriales, inmovilización y conexión eléctrica de enzimas. Un ejemplo de células de biocombustible enzimático, en el que las enzimas aún no han encontrado competidores, son los EBFC de glucosa implantados (GBFC por sus siglas en inglés). Dado que tanto la glucosa como el O₂ están presentes en los organismos vivos, en la sangre o en los fluidos extracelulares, los GBFC pueden generar energía eléctrica a partir de la oxidación de la glucosa biodisponible y la reducción del oxígeno de un dispositivo implantado biocompatible y sin membrana [43]. Teniendo en cuenta que la actividad del bioelectrodo está relacionada con la actividad de las enzimas, se han diseñado estructuras tridimensionales para mejorar la superficie específica del sustrato conductor y la cantidad inmovilizada de enzimas y mediadores redox que sirven como lanzadera de electrones entre las enzimas y la superficie del electrodo. [44]. La gran mayoría de estos dispositivos se basaban en lacasas y bilirrubina oxidasas (BOD) que representaban el proceso enzimático más eficiente para lograr una reducción de alto potencial de oxígeno a pH medio (Figura 4) [43].

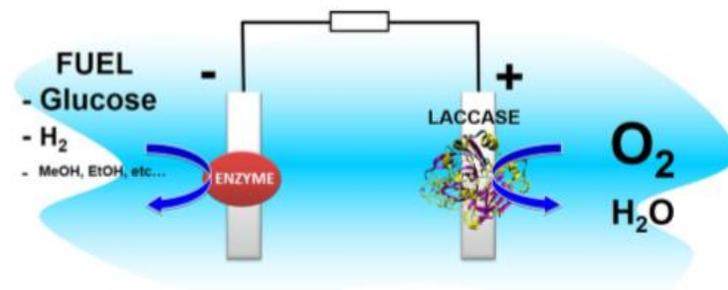


Figura 4. Representación esquemática de un EBFC basado en un biocátodo de lacasa. Tomado de Le Goff *et al.* [43].

1.2.7 LAC3 de *Trametes sp. C30*

La enzima de referencia es LAC3, una lacasa de *Trametes sp. C30*, con alta capacidad oxidativa. En el 2005, Klonowska *et al.* [16] aisló y expresó con éxito a LAC3 (número de acceso de GenBank AY397783) en la levadura *S. cerevisiae*, más adelante Belland *et al.* [45] inmovilizó a esta lacasa sobre electrodos, posteriormente Liu *et al.* [13] hizo modificaciones en C- y N- terminal y expresó de manera funcional. En el 2016, Lalaoui *et al.* [14] logró su inmovilización orientada sobre electrodos para maximizar la TDE, sin embargo fue hasta el 2017 que Robert *et al.* [18] utilizando técnicas de ingeniería obtuvo variantes de lacasa con residuos de lisina accesibles a la superficie únicos como un injerto covalente orientado de un fotosensibilizador para promover la fotocatalisis, demostrando la capacidad oxidativa de esta y sus variantes UNIK's, ver Tabla 1.

Tabla 1. Ingeniería por mutagénesis sitio dirigido de variantes de LAC3. Modificado de Zhou *et al.* [46].

Estudio	Caracterización	Resultados	Referencias
Expresión funcional en levadura.	E° T1; EPR espectroscopia; actividad.	Caracterización de enzimas recombinantes y comparación con homologas LAC1 y LAC2 de <i>Trametes sp.</i> C 30.	[16].
Inmovilización de lacasa sobre electrodos.	Electrocatalisis; actividad; espectroscopia.	Caracterización de una lacasa inmovilizada. Electrocatalisis mediada por redox	[45].
Expresión funcional de la modificación de lacasas en C- y N- terminal.	Actividad.	Caracterización y comparación de lacasas modificadas C-terminal: marcadas con His. Efecto del patrón de glicosilación sobre la actividad	[13].
Inmovilización orientada de LAC sobre electrodos para maximizar la TDE.	Biología molecular; espectroscopia; actividad; electrocatalisis.	Transferencia directa de electrones eficiente para la reducción de dióxígeno utilizando electrodos nanoestructurados modificados con una lacasa modificada en superficie específica (grupo pireno único unido covalentemente cerca del centro CuT1)	[14].
Orientación controlada de nanomateriales sobre la superficie de una lacasa fúngica	Espectroscopia; actividad; biología molecular; covalente docking; dinámica molecular simulación.	Ingeniería de variantes de lacasa con residuos de lisina accesibles a la superficie únicos e injerto covalente orientado de un fotosensibilizador para promover la fotocatalisis. Los estudios de simulación encajan con la reactividad observada	[18].
Variantes de lacasa con una Lys única en superficie, para futuros procesos de funcionalización.	Biología molecular, simulación molecular, actividad.	Ingeniería de variantes de lacasa con residuos de lisina accesibles a las superficies únicas, con actividad en diferentes compuestos fenólicos.	Este trabajo, [47].

1.3 ANTECEDENTES DIRECTOS

En nuestro grupo de trabajo nos dedicamos al estudio de las lacasas y su uso en la biorremediación de suelos y agua contaminados con colorantes, hidrocarburos y otros compuestos aromáticos. Recientemente se aisló el gen (*lac6C*) de una lacasa de *Trametes versicolor* HEMIM-9, este gen fue posteriormente clonado y expresado funcionalmente sobre la superficie de *Saccharomyces cerevisiae* empleando la técnica de despliegue en superficie, esta lacasa de superficie no pierde sus propiedades y su producción fue incrementada de forma sustancial, Bertrand *et al.* [48]. Como parte de una colaboración con el grupo del Dr. Thierry Tron se ha trabajado con la lacasa LAC3 y su variante K0 o UNIK (cero lisina) las cuales han sido expresadas funcionalmente en *S. cerevisiae* y sobreproducidas en *Aspergillus niger* [16, 39, 49], la cualidad de esta lacasa y su variante radica en el número de lisinas que contienen, volviéndose perfectos candidatos para procesos nanobiotecnológicos como funcionalización de proteínas [14, 17, 18, 46].

1.4 JUSTIFICACIÓN

En el laboratorio de biotecnología ambiental del CEIB se estudian alternativas innovadoras y amigables con el ambiente. Por otra parte, en el grupo del Dr. Thierry Tron ha demostrado que LAC3 puede interaccionar con complejos metálicos fotosensibles, oxidando alcoholes e incrementando la transferencia de electrones. No obstante, la orientación del injerto de enzima sobre la superficie del material debería aumentar significativamente la densidad de enzimas conectadas específicamente, permitiendo una transferencia directa de electrones con un electrodo, pero también, potencialmente modular su actividad o su selectividad en función del entorno que ofrece el material alrededor del activo. Sin embargo, la orientación de la enzima sobre un soporte es todavía un tema poco abordado en la inmovilización de biocatalizadores. Hay sólo unos pocos ejemplos de funcionalización controlada de las enzimas. Las estrategias utilizadas como aminas primarias específicas reactivas a otro nucleófilo a menudo resultan en una orientación aleatoria de la enzima en la superficie del material.

La lacasa LAC3 de *Trametes sp. C30* y su variante K0 han sido estudiadas por oxidar compuestos que normalmente no oxidan las lacasas y se ha demostrado que sus reacciones de funcionalización orientada, en donde se implica una única lisina en superficie (UNIK₁₆₁), maximizan la TDE [14]. Por lo que los residuos de lisina expuestos en la superficie pueden ser fácilmente funcionalizados a través de alquilación reductora. En este trabajo, LAC3-K0, una enzima desprovista de lisina, se utilizó como plataforma para detectar posibles sitios expuestos a la superficie adecuados para un reemplazo por un residuo de lisina en superficie, relevante para futuros estudios de funcionalización (el plásmido pAKLAC3-K0, codifica una variante de LAC3 sin lisina (anotado K0 = K40> M, K71> H). De modo que en el presente trabajo nos centramos en obtener variantes con una sola lisina derivadas de LAC3-K0, por mutagénesis sitio dirigida.

El objetivo final de este trabajo es comprender el papel de la lisina en la superficie sin afectar la estructura-función de la enzima y estas variantes puedan ser aplicadas en procesos de funcionalización covalente en trabajos futuros.

1.5 HIPÓTESIS

La superficie de LAC3- K0 posee sitios específicos y únicos que son susceptibles de ser mutados para la obtención de variantes con una única lisina (UNIK's), que conservan la estructura-función de la enzima y estas puedan ser aplicadas en procesos futuros de oxidación y funcionalización covalente.

1.6 OBJETIVO GENERAL

El objetivo de este proyecto es ubicar los sitios en la superficie de LAC3-K0 y a partir de estos obtener variantes UNIK's, las cuales conservarán sus propiedades de estructura-función.

1.6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Diseño y construcción de variantes UNIK's, diseñados como UNIK_n donde *n* se refiere a la posición del residuo de lisina en la secuencia LAC3.
2. Transformación en levadura y producción de variantes UNIK's
3. Caracterización de los sobrenadantes concentrados de cada una de las variantes UNIK's obtenidas
4. Oxidación de diferentes compuestos fenólicos por las variantes UNIK's
5. Clonación y producción en *Aspergillus niger*

CAPITULO I

DISEÑO Y OBTENCIÓN DE VARIANTES DE LACASA

2.1 Resumen

En este trabajo, LAC3-K0, se utilizó como plataforma para detectar posibles sitios expuestos a la superficie adecuados para un reemplazo por un residuo de lisina relevante para futuros estudios de funcionalización. Con el objetivo de mapear estos sitios se utilizaron herramientas computacionales como PyMOL y GetArea para obtener un modelo 3-D LAC3-K0, en donde una vez ubicados estos sitios en la superficie, se midieron las distancias a CuT1 y se seleccionaron siete sitios al azar, algunos se encontraban en la vecindad a CuT1 (como UNIK₂₃₈ A 17 Å), sin embargo no forman parte del sitio activo, por lo que se esperaba que su función lacasa no se viera comprometida. Por otro lado también se seleccionaron sitios alejados de CuT1 (como UNIK₂₉₁ a 48 Å), estos modelos contribuyeron al conocimiento de la proteína 3-D y de las posibles variantes, además nos permiten conocer a los aminoácidos vecinos a estos sitios y de las distancias que existen entre ellas y con otros puntos de interés. Se trató de obtener a estas variantes por métodos de recombinación in vivo en *S. cerevisiae*. Sin embargo, en los resultados de secuenciación no se observó la mutación que se deseaba introducir en la secuencia. Posteriormente se utilizó el plásmido pAKLAC3-K0, se diseñaron primers y por medio de mutagénesis sitio dirigida se obtuvieron las siete variantes diseñadas a partir de sitios seleccionados y dos más obtenidas al azar, también en superficie, finalmente, todas las variantes fueron clonadas en *Escherichia coli* DH5 α , los resultados fueron verificados por secuenciación.

2.2 Introducción

2.2.1 Métodos mutágenicos

El desarrollo en ingeniería genética y de proteínas han llevado a mejoras en la estabilidad, economía, especificidad y el potencial de aplicación general de las enzimas industriales, sin embargo, como se menciona en párrafos anteriores, el uso de tecnologías tradicionales y/o modernas para mejorar las lacasas se enfrenta a varios retos para la aplicación industrial exitosa y atractiva de las lacasas, los altos rendimientos, la alta calidad enzimática y el rendimiento excepcional son de suma importancia. Por lo que, aparte de las estrategias tradicionales, el crecimiento continuo del mercado de enzimas industriales depende de la innovación tecnológica. En este Capítulo nos enfocaremos en la obtención y mejora de

lacasas mediante dos estrategias de ingeniería genética: a) Mutagénesis sitio dirigida (MSD), enfoques racionales y b) Métodos de recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae*.

2.2.1.1 *Métodos de mutagénesis sitio dirigida (MSD): enfoques racionales*

La mutagénesis sitio dirigida (MSD) es una estrategia que se ha utilizado comúnmente para estudiar la relación estructura-función de lacasa [35] dada la sencillez y eficacia para introducir mutaciones en el DNA durante el PCR, haciendo uso de una *Taq* polimerasa con una alta afinidad durante el proceso de amplificación [14, 18].

Varios métodos de MSD se han desarrollado, entre ellos el método “megaprimer”, éste es simple, flexible y utiliza tres oligonucleótidos: dos externos y uno interno mutagénico, en dos rondas de PCR con una plantilla de ADN que contiene la secuencia que se va a mutar. La primera ronda de PCR se lleva a cabo utilizando uno de los oligonucleótidos externos y el oligonucleótido mutagénico que contiene la mutación deseada. Esto amplifica un producto de PCR intermedio que es fragmento mutado de ADN que se purifica y se utiliza como "megaprimer" para la segunda ronda de PCR, junto con el otro oligonucleótido externo, para amplificar una región más larga del ADN molde. Este protocolo se basa en un método que utiliza oligonucleótidos externos directos e inversos con temperaturas de fusión (T_m) significativamente diferentes. El producto de PCR final se clona en vectores o ensamblado por recombinación en la levadura *S. cerevisiae* [50, 51].

2.2.1.2 *Métodos de recombinación in vivo en S. cerevisiae*

La clonación de genes *in vivo* es un método muy eficaz y rápido, mediante el cual se ensambla ADN recombinante dentro de la levadura *S. cerevisiae*. Este método produce, en un solo paso, ADN covalente circular por recombinación homóloga. Éste co-transforma en levadura, un vector lineal más un fragmento de ADN cuyos extremos 5´ y 3´ son homólogos a los extremos 5´ y 3´ del vector, la maquinaria de recombinación homóloga de la levadura hace el trabajo. *S. cerevisiae* presenta una alta frecuencia de recombinación homóloga demostrándose entrecruzamientos de fragmentos que tienen entre 20 y 200 pb de homología. La longitud de los extremos solapantes en la región de entrecruzamiento entre el gen de interés y el plásmido linearizado es un factor clave que determina la eficiencia de

la transformación. Así, regiones de homología con al menos 40 pb dan lugar a eficiencias de recombinación de alrededor del 70 % [73].

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Cepas, medios y plásmidos

Se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5 α ($F^- \phi 80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)$ U169 *recA1 endA1 hsdR17*(r_K^- , m_K^+) *phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1*) para todas las manipulaciones de ADN y *S. cerevisiae* W303-1A (MATa{*leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*}) para la recombinación homóloga. Se utilizó caldo Luria-Bertani (LB) para el cultivo de *E. coli* (10 g L⁻¹ de triptona, 5 g L⁻¹ de extracto de levadura, 10 g L⁻¹ de NaCl), se añadieron 100 μ g/mL de ampicilina (Amp) al medio LB cuando fue necesario. El medio selectivo (MS), (el cual contenía 6.7 g L⁻¹ de base nitrógeno sin aminoácidos (YNB, por sus siglas en inglés), 5 g L⁻¹ de casaminoácidos, 90 mg L⁻¹ adenina; 40 mg L⁻¹ de triptófano, buffer succinato 50 mM, pH 5.3; CuSO₄ 100 μ M, 20 g L⁻¹ de glucosa como fuente de carbono y 0.5 % v/v guaiacol como sustrato), fue utilizado para crecer a las variantes expresadas en *S. cerevisiae*.

Los plásmidos y cebadores utilizados en este trabajo se enumeran más adelante en la Tabla 2. Para la expresión de lacasas recombinantes, se utilizó el plásmido de expresión de levadura pAKLAC3-K0 [16,18] como plásmido original para obtener los derivados (variantes) de lacasa, Figura 5.

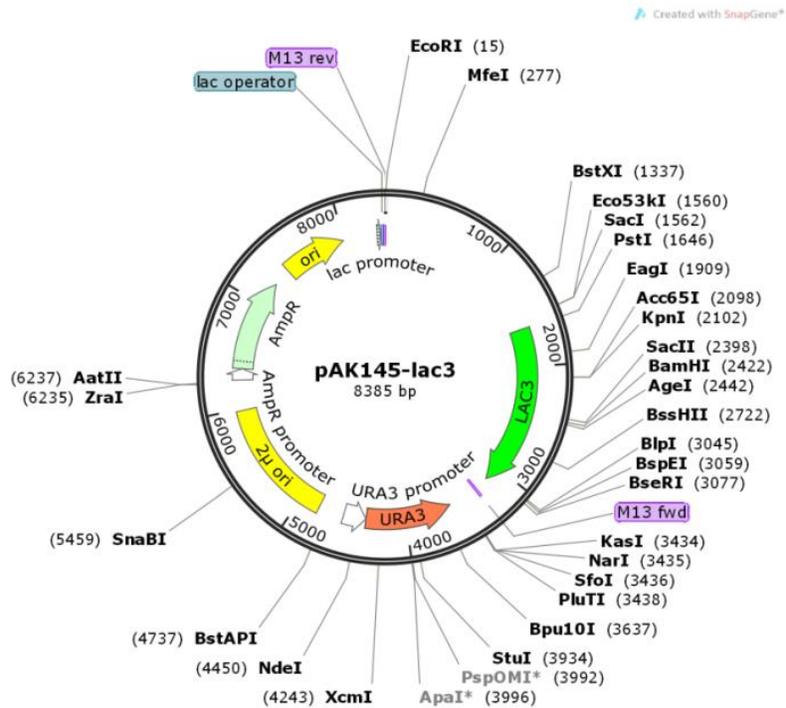


Figura 5. Plásmido pAK145-LAC3/K0. Tomado de Klonowska *et al.* [16]

2.3.2 Modelo molecular

Se generó un modelo 3-D de reemplazo a partir del servidor Swiss Model (swissmodel.expasy.org) utilizando la estructura cristalina lacasa 1GYC de *T. versicolor* como plantilla (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). Este modelo se utilizó para predecir los residuos de aminoácidos expuestos a la superficie en LAC3-K0 (GenBank AAR00925.1) con el software GetArea (www.expasy.org) y PyMOL (pymol.org).

2.3.3 Método: Recombinación homóloga

S. cerevisiae W303-1A que tiene la capacidad de recombinar fragmentos de ADN homólogos, Figura 6, fue usada para la expresión de la lacasa LAC3-K0 y fueron crecidas en medio selectivo (MS).

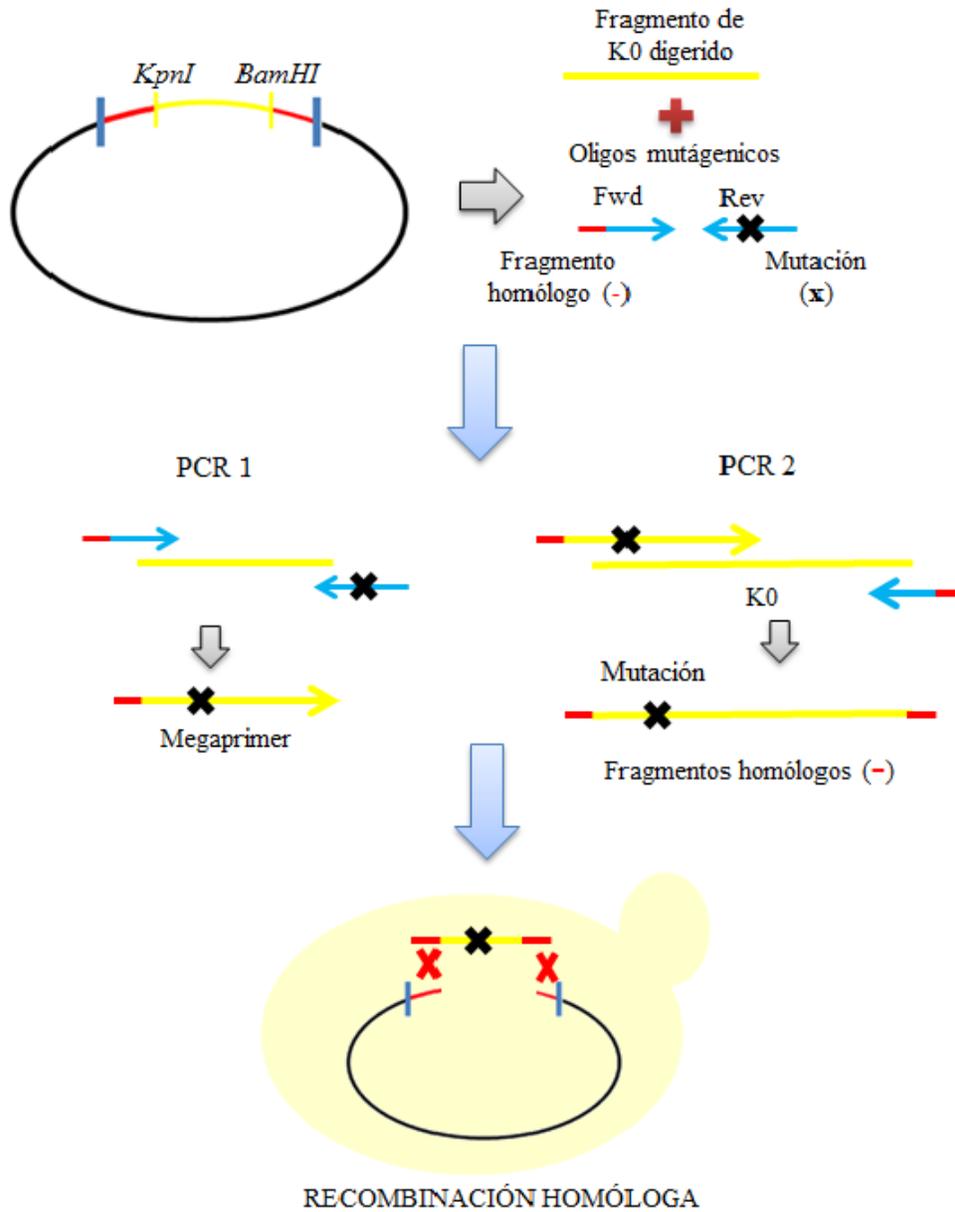


Figura 6. Metodología para la obtención de mutantes por recombinación homóloga.

2.3.4 *Análisis de sitios de restricción y diseño de primers*

De acuerdo al método de recombinación, era necesario obtener un fragmento más corto del gen LAC3-K0 (aproximadamente 300-400 pb), pero en el cual estuviera presente el sitio en el que se deseaba insertar la mutación, por lo que se realizó un análisis de sitios de restricción del plásmido y el gen, utilizando las herramientas de análisis de restricción de la

página oficial de New England, <https://www.neb.com/>, para linearizar las secuencias y obtener dichos sitios, con los cuales obtendríamos el fragmento del gen.

Una vez que se obtuvieron los sitios de restricción se realizó una doble digestión de aproximadamente 150-200 ng de plásmido (que contenía el gen) y 0.5 µL de la enzima *BamHI* HF y 0.5 µL de *KpnI* HF de New England en NEBuffer, durante 30 minutos a 37 °C en un volumen total de 50 µL, al final de la digestión se realizaron geles de agarosa al 1% para confirmar la digestión del plásmido y se observó en Syber green, las bandas (el plásmido cortado y un fragmento de 312 aa perteneciente al gen LAC3-K0) se purificaron con el Zymoclean® Gel DNA Recovery. Los fragmentos obtenidos de la digestión fueron amplificadas por PCR para lo cual se utilizó un par de primers (Forward y Rivers) sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM, para amplificar las secuencias digeridas, llevando uno de ellos el codón de la lisina (AAA/TTT), Tabla 2.

Tabla 2. Oligonucleótidos mutágenicos empleados en el método de recombinación homóloga

Nombre	Secuencia	Longitud	Tm
FwdpAK145	ATGATGCTTTTGCAAGCCTTCCTTTTCCTT	30	61.2 °C
<i>KRevMV269</i>	ATCGGTGGT TTT TGTACCGGTGTT	24	59.2°C
<i>KRevMT270</i>	GCCATCGGT TTT GACTGTACCGGT	24	61.5 °C
<i>KRevMD272</i>	GTAAACGCCGCC TTT GGTGGTGAC	24	62.8 °C
<i>KRevMD283</i>	GTCCGCCGT TTT GTAACGCAG	21	59.4 °C
<i>KRevMT284</i>	GATCGGGTCCGC TTT GTCGTAACG	24	61.8 °C
<i>KRevMD286</i>	TTCGATCGG TTT CGCCGTGTC	21	60.1 °C
<i>KRevMD291</i>	GTCTGCGGC TTT GGGTTCGAT	21	60.4 °C
<i>KRevMA293</i>	GGTGGGGTCT TTT GGCGTCGGG	21	65.4 °C
<i>KRevMS298</i>	GAGCGGGAT TTT GCTGGTGGG	21	61.3 °C

*El FwdpAK145 pertenece a uno de los primers externos y el resto de los primer resaltados en negritas e itálicas son primers internos mutágenicos.

2.3.5 Condiciones de PCR

El PCR se realizó utilizando un termociclador de Thermo Fisher Scientific de acuerdo a siguiente protocolo, Tabla 3:

Tabla 3. Condiciones de la reacción de PCR.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95	4 minutos
35	95	30 segundos
	60	
	72	
1	72	5 minutos
	4	∞

Se realizaron geles de agarosa al 1% para confirmar la amplificación de secuencias de lacasas. Posteriormente, se cortaron las bandas y se purificaron los productos de PCR obtenidos usando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery.

El resultado del PCR (secuencia amplificada que posiblemente contenía la mutación) fue transformado en *S. cerevisiae*, por la recombinación de fragmentos de ADN homólogos, como se describe a continuación.

2.3.6 Transformación en *S. cerevisiae* para recombinación de fragmentos homólogos

Al finalizar la reacción de PCR, se purificaron los productos y fueron utilizados en la transformación en *S. cerevisiae* mediante el método de acetato de litio/ssDNA *carrier*/PEG [52], 240 μ L de PEG 3350(50% w/v), 36 μ L de acetato de litio 1 M, 50 μ L de ssDNA *carrier* (2 mg/ml), plásmido 1 μ g (aproximadamente 1 μ L de producto de PCR purificado y 1 μ L de los fragmentos de plásmido digerido y purificado) en un volumen final de 360 μ L, posteriormente se incubó a 42 °C por 40-60 min, las células transformadas fueron plaqueadas y seleccionadas en medio MS, después de 72 horas de incubación a 28 °C. Las clonas positivas fueron identificadas por la coloración marrón producto de la reacción

enzimática al emplear como sustrato guaiacol. El plásmido fue extraído por lisis utilizando una solución STET pH 8 (Sacarosa al 8%, Triton x-100, 50mM Tris base y 50mM EDTA) y Acetato de amonio 7.5M), al finalizar se corrió un gel de agarosa al 1% para visualizar el plásmido extraído y fue enviado a secuencias a Macrogen. Posteriormente, se tomaron las clonas positivas y fueron sembradas en medio líquido MS sin guaiacol, después de 24 horas se midió actividad con ABTS como sustrato, se determinó la actividad lacasa de 5 μ l de sobrenadante concentrado, a 25 °C por oxidación de ABTS 1 mM en tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,4) en un volumen total de 1ml [46].

2.3.7 Obtención de las variantes por mutagénesis sitio dirigido

Esta técnica utiliza una polimerasa de alta afinidad (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase) que no introduce ningún error en el proceso de PCR y la enzima *DpnI* (escinde solo cuando su sitio de reconocimiento está metilado) que garantiza la eliminación del plásmido parental después de la PCR, de modo que *E. coli* solo incorpora ese plásmido que tiene la mutación deseada, Figura 7.

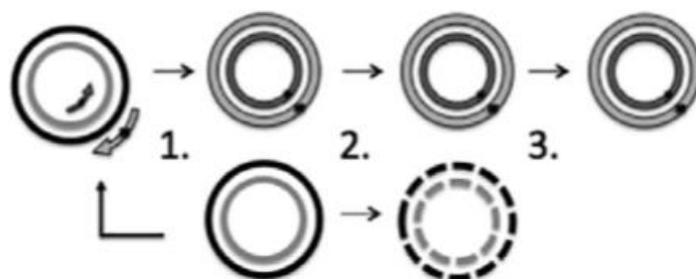


Figura 7. Mutagénesis sitio-dirigido. (1) Síntesis de la cadena mutante que contiene la mutación dirigida. (2) Digestión del templado con *DpnI*. (3) Transformación de la molécula mutada en células competentes. Tomado de Zhou *et al.* [46].

Los oligonucleótidos se diseñaron para amplificar las secuencias del plásmido completo, incluida la lacasa y con ello la incorporación de la mutación deseada, los oligonucleótidos mutágenicos se diseñaron con una longitud de 21-30 bases y sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología, UNAM y, siguiendo las recomendaciones del protocolo de mutagénesis de Quick-change mutagenesis kit® (Thermo Scientific, USA). Adicionalmente, se diseñó un par oligonucleótidos (Tabla 4)

para amplificar la lacasa completa, con la finalidad de utilizarse para confirmar la mutación incorporada.

Tabla 4. Oligonucleótidos mutágenicos diseñados para la obtención de variantes.

Gen Lacasa	Nombre del Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Longitud del oligonucleótido
UNIK ₂₃₈	Q238KFwd	GTCGACTCGATC AAA ATTTTCGCCGGG	27
	Q238KRev	CCCGGCGAAAA TTT TGATCGAGTCGAC	27
UNIK ₂₅₄	D254KFwd	ACCGCGGATCAA AAA ATCGGTA ACTAC	27
	D254KRev	GTAGTTACCGAT TTT TTGATCCGCGGT	27
UNIK ₂₆₉	V269KFwd	CTAACACCGGTACA AAA ACCACCGATGG	28
UNIK _{96/269/479}	V269KRev	CCATCGGTGGT TTT TGTACCGGTGTTAG	28
UNIK ₂₇₀	T270KFwd	GGTACAGTC AAA ACCGATGGCGGC	24
	T270KRev	GCCGCCATCGG TTT TGACTGTACC	24
UNIK ₂₈₃	D283KFwd	CATTCTGCGTTAC AAA ACGGCGGACCC	27
	D283KRev	GGGTCCGCCGT TTT GTAACGCAGAATG	27
UNIK ₂₉₁	D291KFwd	CGATCGAACCC AA AGCCGCAGACC	24
UNIK _{89/291}	D291KRev	GGTCTGCGGC TTT GGGTTTCGATCG	24
UNIK ₂₉₃	A293KFwd	GAACCCGACGCC AAA GACCCACCAG	26
	A293KRev	CTGGTGGGGTCT TTT GGCGTCGGGTTC	26
Oligonucleótidos para secuenciación	FwdpAK145	ATGATGCTTTT G CAAGCCTTCCT	24
	RevAK145	CTAGGAGGAACGAATGGCTCG	21

El PCR se realizó utilizando un termociclador de Thermo Fisher, bajo las condiciones de la Tabla 5. Al finalizar el PCR se obtienen los productos y el templado de ADN parental fue removido utilizando 1 μ L de la enzima *DpnI* a 37 °C durante 2 horas, posteriormente se inactiva la enzima a 80°C por 20 minutos. Los productos de PCR son transformados en *E. coli* DH5 α por medio de un choque térmico (30 min en hielo y 2 min a 42 °C), las células de *E. coli* transformadas son sembradas en medio sólido LB más 100 μ g/mL de Amp,

después de 12 horas a 37 °C se obtuvieron colonias, de las cuales se tomó una de ellas y se sembró en medio líquido adicionado con Amp, se incubó 12 horas a 37 °C. El cultivo es centrifugado por 1 minuto a 12, 000 rpm, para purificar el plásmido utilizando el Kit Zyppy™ Plasmid Miniprep de Zymo Research y al finalizar el protocolo se envió a secuenciar a MacroGen para confirmar la modificación deseada.

Tabla 5. Condiciones de PCR con *Phusion polymerase*. Temperatura, tiempos y ciclos.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	98	30 sec
	98	30 sec
16	55	1 min
	72	5min
1	72	5-10 min
	37	∞

2.4 Resultados y discusión

2.4.1 Diseño y expresión de las variantes UNIK's (Modelos 3D)

Para obtener un único residuo de lisina funcionalizable expuesto ubicado a diferentes distancias de los sitios de CuT1 o T2/3, se examinó primero la superficie de un modelo 3-D de la enzima LAC3-K0. El programa GetArea mostró que 115 residuos están ubicados y expuestos en la superficie de K0, de éstos, los residuos de glicina y prolina no se consideraron aquí, para evitar cambios importantes potenciales en la relación estructura-función de la proteína. Los 85 residuos de aminoácidos restantes fueron visualizados cada uno con el programa PyMOL y fueron considerados para reemplazar por un codón de lisina, Figura 8.

De todas las posibles variantes UNIK's de la enzima LAC3, se seleccionaron siete, se midieron las distancias desde el sitio de la posible mutación hasta la CuT1, Figura 9. Por lo tanto, tendríamos variantes en donde el residuo de lisina estaría ubicado a una distancia de CuT1, que varía entre 17.5 a 42 Å a CuT1.

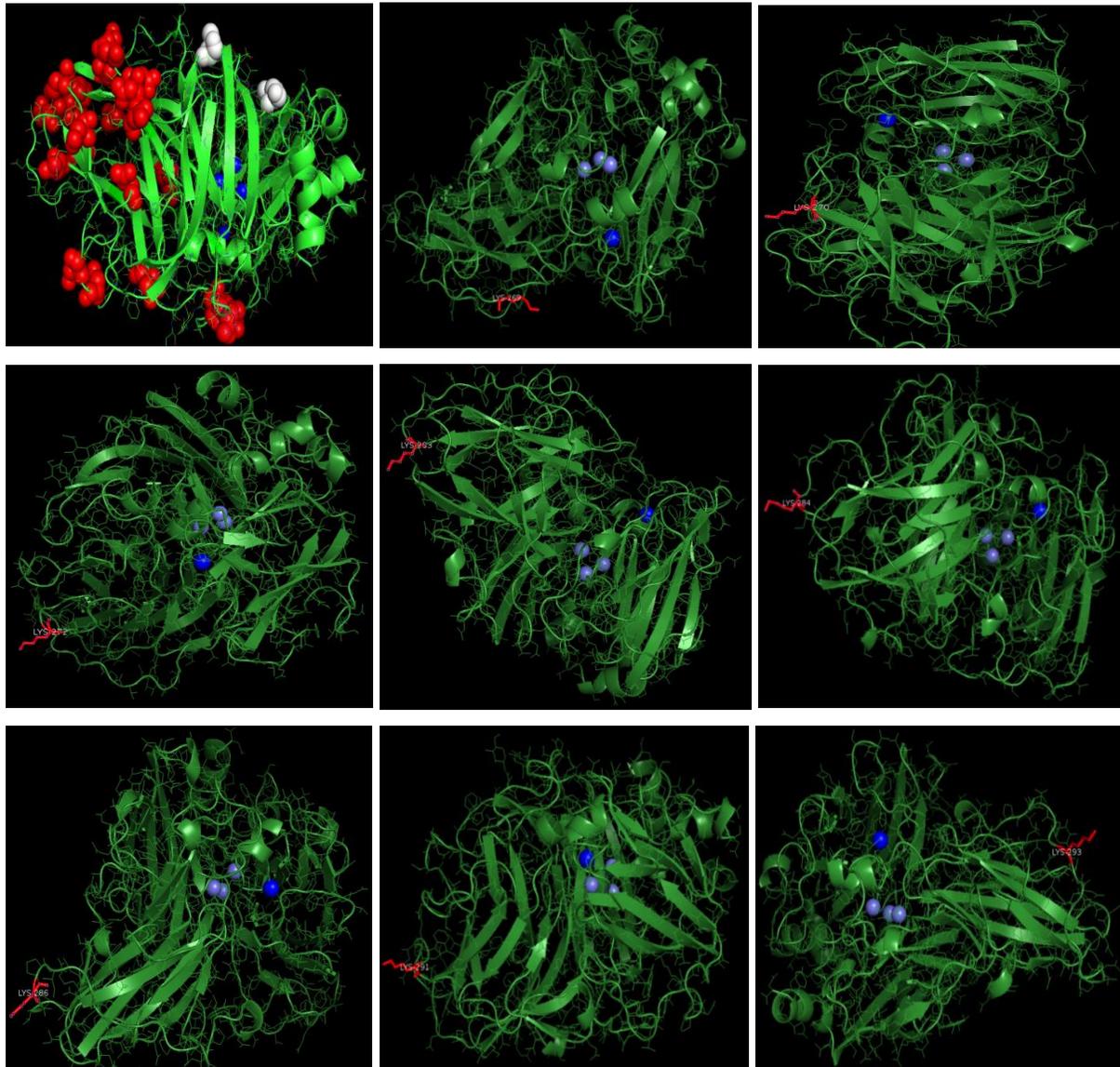


Figura 8. a) Estructura 3D de LAC3-K0 con el programa PyMOL Las esferas en color blanco pertenecen al sitio de las lisinas K₄₀ y K₇₁. Aminoácidos en superficie susceptibles a ser remplazados por la lisina. En azul los cuatro átomos de cobre y en rojo algunos aminoácidos en la superficie. Estructura en color rojo corresponde a la lisina que sustituye a otro aminoácido en superficie.

Por otro lado, los modelos también nos permitieron visualizar la orientación de la cadena lateral de la lisina y con ello una posible interacción con los residuos vecinos a éstas.

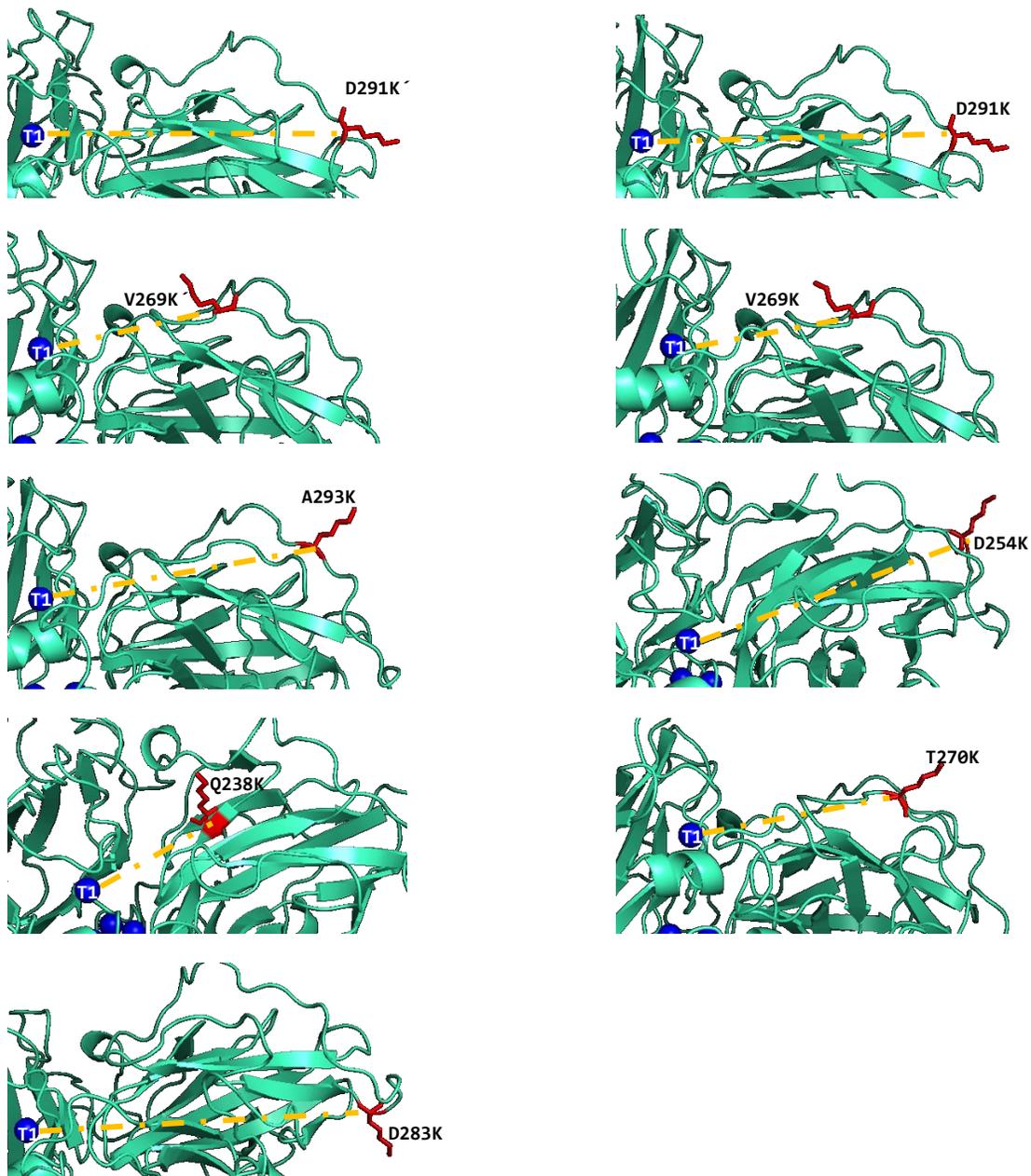


Figura 9. Modelos moleculares de las variantes de UNIK's utilizando la estructura de lacasa 1GYC de *Trametes versicolor* como plantilla. La superficie de UNIK's es de verde cian; la Lys (K) está coloreada en rojo y el Cu (I, II y III) está coloreado en azul. La distancia se indica con la línea naranja. (')= Aquellas lacasas que tienen más de una mutación.

2.4.2 Recombinación homóloga

Una vez analizados los posibles sitios a mutar y como se observa en la Figura 10A, en el análisis de restricción de LAC3-K0 se detectaron 40 sitios de cortes con diferentes enzimas de restricción, de los cuales se seleccionaron los sitios en donde cortan las enzimas *KpnI* y *BamHI* (Figura 10B) y se realizó la doble digestión tanto para plásmido que contenía la secuencia del gen de la lacasa silvestre (LAC3) como el que contenía a la variante sin lisinas (K0).

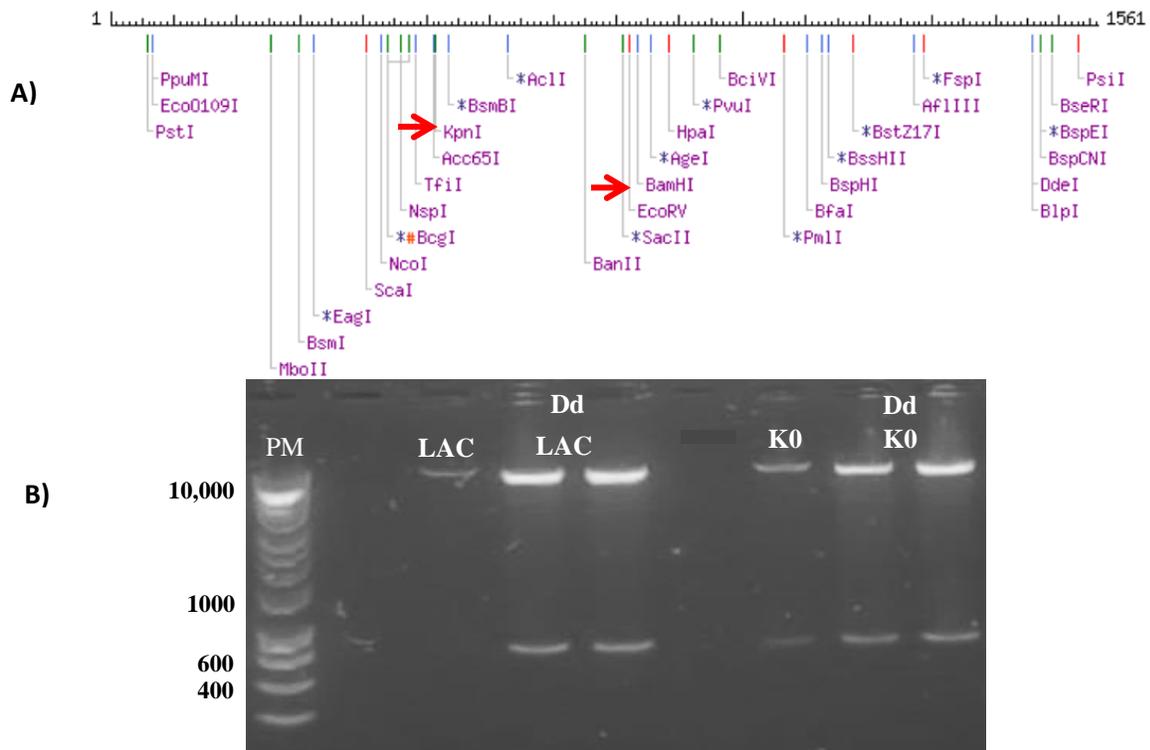


Figura 10. Análisis de restricción. A) Sitios de restricción *KpnI* y *BamHI*. B) Doble digestión de K0 y LAC3, en donde se obtuvo el plásmido cortado y el fragmento de 312 aa. *Dd: Doble digestión.

Posteriormente se inició la construcción de las variantes, seleccionando los sitios susceptibles a ser mutados encontrados en el fragmento digerido, por recombinación de fragmentos homólogos, se diseñaron los oligonucleótidos (ver Tabla 2) y mediante una reacción de PCR bajo las condiciones descritas anteriormente, se amplificaron fragmentos de 800 a 900 pb utilizando los oligonucleótidos mutágenicos para cada secuencia mutante

UNIK en donde uno de los oligonucleótidos no tenía mutación, una vez amplificados fueron purificados (Figura 11A), el resultado fue transformado en *S. cerevisiae* por la recombinación de fragmentos homólogos de ADN, Figura 11B.

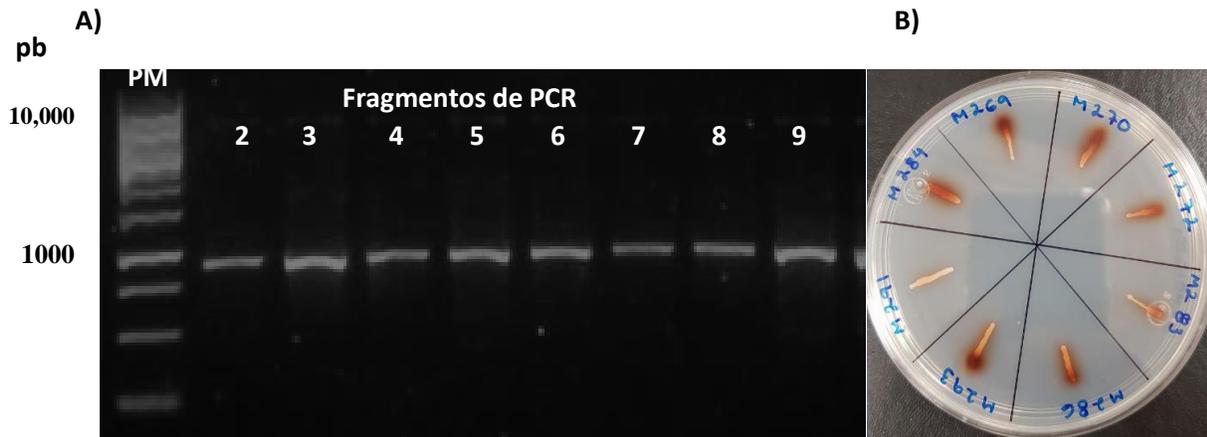


Figura 11. Gel de agarosa 1% de los fragmentos obtenidos del PCR. A) Carril 1, marcador peso molecular. Carriles 2-9. Fragmentos de PCR obtenidos con los primers que llevan la mutación, cada uno de ellos lleva una mutación diferente. B) “Transformantes” obtenidas en *S. cerevisiae*.

Para verificar que la mutación estaba presente se envió a secuenciar el plásmido, los resultados de la secuenciación demostraron que la mutación esperada no estaba presente en el plásmido. Diferentes trabajos han reportado que la frecuencia de recombinación depende de la homología de las secuencias que se recombinan, por lo que al estar presente la mutación dentro de los fragmentos homólogos a recombinar y el tamaño de estos fragmentos no fue posible que la mutación quedara dentro del plásmido a replicar; según los resultados de la secuenciación, la secuencia obtenida correspondía a K0, por lo que las colonias obtenidas tenían actividad en guaiacol y ABTS debido a la presencia de esta variante.

2.4.3 Obtención de variantes por Mutagénesis sitio dirigido

Con la finalidad de cumplir con el objetivo de generar las variantes de LAC3-K0, se analizaron otras estrategias y se eligió el método de *Phusion polymerase*, esta técnica utiliza una polimerasa de alta afinidad en el proceso de PCR y la enzima *DpnI* garantiza la eliminación del plásmido parental por lo que *E. coli* únicamente incorporará aquel plásmido

que tenga la mutación deseada por lo que tiene la ventaja de ser una técnica muy específica, en contraste con la técnica de recombinación homóloga, donde la levadura puede incorporar plásmidos parentales no degradados por *BamHI* y *KpnI*. El plásmido pAKLAC3-K0, se usó como plantilla de ADN para obtener mutantes de lisina simples, denominadas UNIK₂₃₈ (Q238K); UNIK₂₅₄ (D254K); UNIK₂₆₉ (V269K); UNIK₂₇₀ (T270K); UNIK₂₈₃ (D283K); UNIK₂₉₁ (D291K) y UNIK₂₉₃ (A293K), como se describe más adelante. Se corrió el PCR y se obtuvieron los productos, la reacción total se sometió a una degradación con *DpnI*, Figura 12, enseguida se transformó en *E. coli* obteniendo colonias con el plásmido que contenía la mutación deseada.

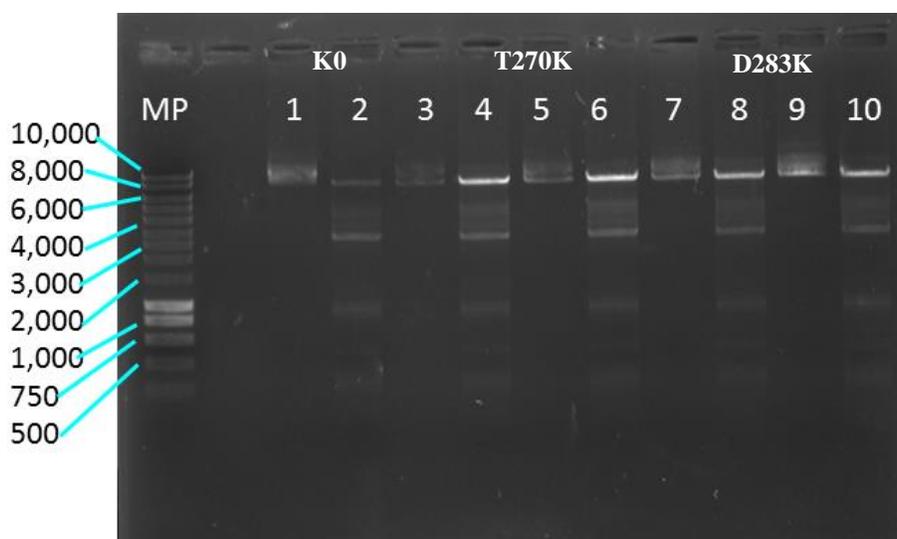


Figura 12. Gel 1% agarosa de los productos de PCR digeridos con *DpnI*. MP: Marcador de peso molecular. Carriles 1, 3, 5, 7 y 9: Productos de PCR. Carriles 2, 4, 6, 8 y 10: Productos de PCR digeridos con *DpnI*. Carriles 1 y 2 pertenecen a pAK145K0. Carriles 3, 4, 5 y 6 a pAK145T270K. Carriles 7, 8, 9 y 10 a pAK145D283K.

Los resultados de la secuenciación mostraron que la mutación correspondía a las mutantes T270K y D283K respectivamente, Figura 13. En el primer caso el codón correspondiente al ácido aspártico (GAC) un residuo de aminoácido con carga negativa que fue cambiada por una lisina (AAA) con carga positiva para el segundo caso una Treonina (ACC) sin carga, por lo que la carga ni la distancia entre el Cu TI y el aminoácido cambiado afectó la función de la enzima, al mantener la capacidad de oxidar el guaiacol en medio sólido, Tabla 6.

T270K	Query	827	CAGGCCGTTCCCTAACACCGGTACAGTC AAA ACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	886
K0	Sbjct	921	CAGGCCGTTCCCTAACACCGGTACAGTC ACC ACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980
D283K	Query	918	CGTTAC AAA ACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGCAGACCCCACCAGCAGTATCCCG	977
K0	Sbjct	981	CGTTAC GAC ACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGCAGACCCCACCAGCAGTATCCCG	1040

Figura 13. Secuencias confirmadas de las mutantes T270K y D283K. A) Secuencia de la mutante T270K y B) Secuencia de la mutante D283K, se puede observar en ambas secuencias que la mutación fue incorporada ya que el codón de lisina reemplazó al codón de la treonina y el ácido aspártico respectivamente.

Una vez que se obviaron las primeras variantes con esta técnica, se mandaron a sintetizar oligonucleótidos para el resto de las variantes, con las mismas características de los oligonucleótidos sintetizados anteriormente, Tabla 4. Siguiendo en protocolo nuevamente se corrieron los PCR's y se transformó en *E. coli DH5 α* , estas variantes también fueron elegidas de acuerdo a su posición en la superficie de la proteína y van de los más alejados al CuTI como los residuos D291K (46 Å) y D254K (44 Å) a los más cercanos como los residuos V269L (20 Å) y Q238 (17 Å), Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de las diferentes mutaciones sobre la superficie de la lacasa LAC3-K0.

<i>Plásmido</i>	<i>No. codón</i>	<i>Codón</i>	<i>Aminoácido</i>	<i>Características</i>	<i>pI Teórico</i>	<i>Fenotipo</i>	<i>d (Å) a CuTI</i>	<i>Referencia</i>
pAK145-LAC3	---	---		Con dos lisinas, carga positiva, residuos básicos.	4.13	Tipo silvestre	---	[16]
pAK145-K0	40/71	ATG/CAC	Met/ His	Sin lisinas, Hidrofóbico/carga positiva.	4.1	Mutante	---	[14]
pAK145-Q238K	238	CAG	Gln	Sin carga.	4.13	Mutante	17	Este trabajo
pAK145-D254K	254	GAT	Asp	Residuo ácido, carga negativa.	4.15	Mutante	44	Este trabajo
pAK145-V269K	269	GTC	Val	Alifático, hidrofóbico.	4.13	Mutante	20	Este trabajo
pAK145-T270K	270	ACC	Thr	Sin carga	4.13	Mutante	27	Este trabajo
pAK145-D283K	283	GAC	Asp	Residuo ácido, carga negativa.	4.15	Mutante	43	Este trabajo
pAK145-D291K	291	GAC	Asp	Residuo ácido, carga negativa.	4.15	Mutante	46	Este trabajo
pAK145-A293K	293	GCA	Ala	Pequeño, hidrofóbico.	4.13	Mutante	34	Este trabajo
pAK145-D96N/V269K/T479A	96/269/479	GAC/GTC/ACG	Asp/Val/ Thr	Residuo ácido, carga negativa/ Alifático, hidrofóbico/ Sin carga.	4.15	Mutante	30.6/20/33	Este trabajo
pAK145-A89S/D291K	89/291	GCC/GAC	Ala/ Asp	Pequeño, hidrofóbico/ ácido, carga negativa.	4.15	Mutante	30/46	Este trabajo

d: Distancia

Å: Armstrong

Después de la extracción de plásmidos de *E. coli* DH5 α , se enviaron a secuenciar, en los resultados se obtuvieron 5 nuevas secuencias, pertenecientes a las variantes UNIK₂₃₈, UNIK₂₅₄, UNIK₂₆₉, UNIK₂₉₁ y UNIK₂₉₃, Figura 14A. Todas fueron expresadas en *S. cerevisiae* por separado, obteniendo variantes con actividad guaiacol en medio sólido, Figura 14B.

A)

Q238K	Query	808	AICAAAATTTTCGCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGT	867
K0	Sbjct	849	AICCAGATTTTCGCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGT	908
D254K	Query	821	GCOGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAAAAATCGGTA ACTACTGGATC	880
K0	Sbjct	861	GCOGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAGATATCGGTA ACTACTGGATC	920
V269K	Query	885	CAGGCGTTCTTAACACCGGTACAAAACCCACOGATGGCGCGTTAACTCTGCCAITCTG	944
K0	Sbjct	921	CAGGCGTTCTTAACACCGGTACGTCACCCACOGATGGCGCGTTAACTCTGCCAITCTG	980
D291K	Query	910	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCAAAGCCGCAGACCCACCAGCAGTATCCCG	969
K0	Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGACCCACCAGCAGTATCCCG	1040
D293K	Query	911	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCAAA GACCCACCAGCAGTATCCCG	970
K0	Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGCA GACCCACCAGCAGTATCCCG	1040

B)

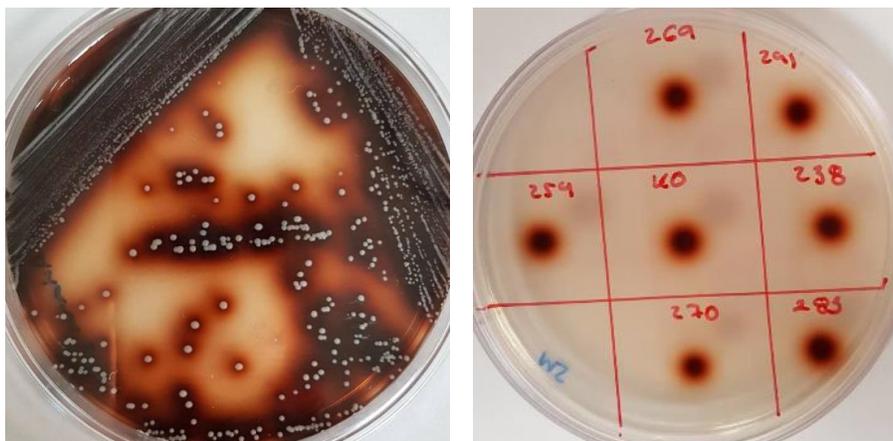


Figura 14. Secuencias de las mutantes confirmadas por secuenciación. A) Secuencias de la mutantes Q238K, D254K, V269K, D291K y D293K, se puede observar en todas las secuencias que la mutación fue incorporada, ya que el codón de lisina reemplazó al codón del que se deseaba reemplazar, respectivamente. B) Placas con medio MS y guaiacol como sustrato. El color marrón indica la oxidación del sustrato por las diferentes variantes UNIK's.

En dos casos, probablemente debido a errores de la ADN polimerasa, se detectaron mutaciones al azar (resaltadas en negrita) en las variantes UNIK₂₆₉ (**D96N/V269K/T479A**) y UNIK₂₉₁ (**A89S/D291K**), Anexo 1. Estas mutaciones se mapearon en la superficie del modelo 3-D LAC3-K0 y además se encontraron como enzimas activas en placas de agar (como se discutirá más adelante) por lo que decidimos incluirlas en este estudio, en la Figura 15 se puede observar a todos los sitios mutados sobre la superficie de LAC3-K0, lo cual es posible visualizar gracias a un giro de 180° del modelo 3-D.

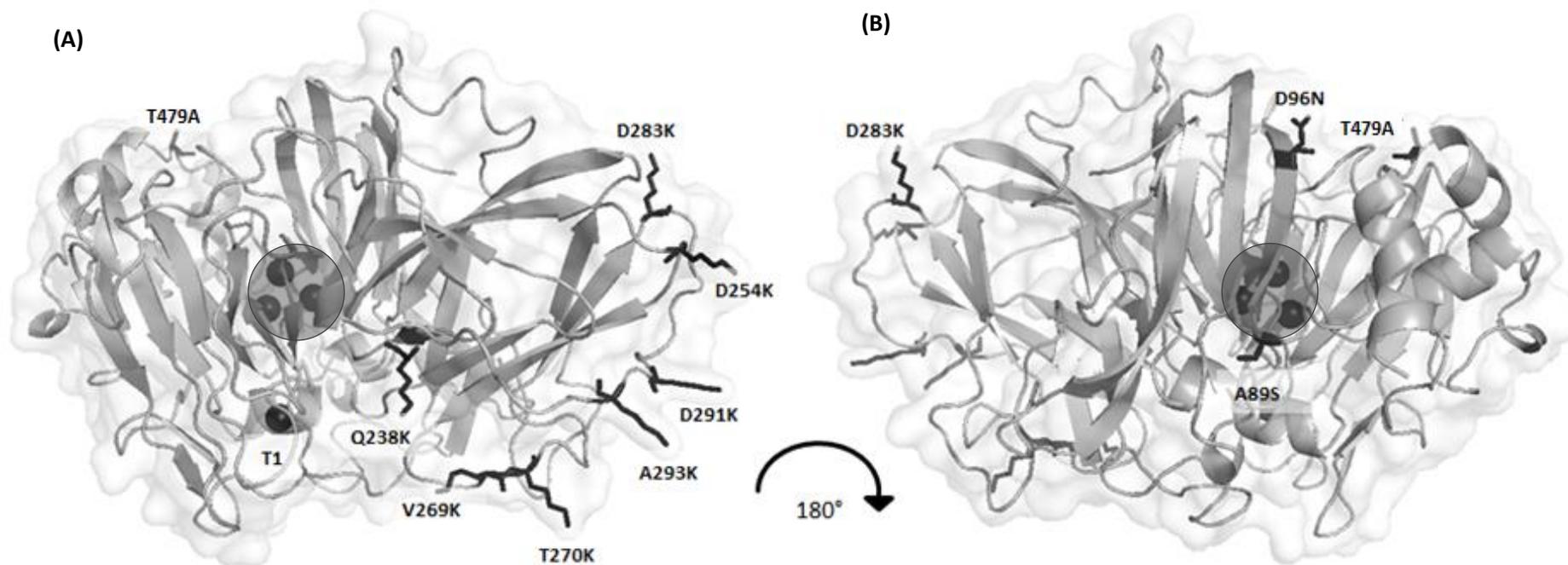


Figura 15. El modelo 3-D de LAC3-K0. (A) y (B), La lacasa LAC3-K0 se muestra en gris y los residuos de aminoácidos de la superficie seleccionados para la mutagénesis se muestran como barras negras, el CuT1 se muestra como una esfera negra; el CTN está encerrado en un círculo; Se utilizó como plantilla la estructura cristalizada de la lacasa 1GYC de *Trametes versicolor*. Tomada de Arteaga - Castrejón *et al.* [47].

CAPITULO II

EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN

BIOQUÍMICA DE VARIANTES

UNIK 's EN Saccharomyces

cerevisiae W303-1 A

3.1 Resumen

Las variantes obtenidas, incluidas aquellas con mutaciones adicionales (que afectan a residuos de superficie) obtenidas al azar, en el capítulo 1, fueron clonadas y expresadas en *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A, por medio de la técnica de acetato de litio/ssDNA carrier/PEG. Todas las variantes obtenidas conservaron la función lacasa en medio selectivo por su capacidad para oxidar guaiacol y ABTS. Posteriormente fueron producidas en medio selectivo (MS) líquido, se midió actividad lacasa, proteína y actividad específica, además se corrió un gel SDS-PAGE para comparar la expresión de las variantes, finalmente los sobrenadantes de cada una de las variantes fueron concentrados y caracterizados, se midió actividad lacasa a diferentes pH y temperaturas, con la finalidad de conocer la estabilidad. Todas las variantes fueron activas a pH ácido pero no presentaron actividad a pH neutro, como se esperaba. Por otro lado, todas las variantes fueron estables a temperaturas entre 15 y 55 °C, pero en general fueron completamente inactivas a 70 °C. Los ensayos de oxidación revelaron que el reemplazo de uno o dos residuos de superficie afectó en gran medida la actividad enzimática y la selectividad del sustrato independientemente de la distancia al sitio CuT1. Se encontró que los parámetros catalíticos (K_m^{app} y K_{cat}^{app}) determinados con ABTS eran diferentes entre las variantes. Se determinó que el papel de los parches hidrofóbicos detectados en la superficie de LAC3-K0 es un factor favorable para el diseño de materiales híbridos. La lisina en superficie creada en este trabajo podría ofrecer sitios apropiados para la funcionalización de la lacasa.

3.2 Introducción

Algunas cepas y especies de levaduras producen sus propias lacasas, sin embargo muchas especies de levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia methalonica* y *Cryptococcus sp.* se han utilizado con éxito para la producción a gran escala de estas enzimas [7, 39].

3.2.1 Expresión de lacasas recombinantes

Las levaduras permiten la producción de nuevas proteínas con las propiedades deseadas debido a sus habilidades de recombinación natural y manipulaciones genéticas bien establecidas. Otras ventajas incluyen principalmente el manejo fácil de las células,

manipulación genética rápida y fácil, medios de cultivo económicos y velocidad de crecimiento rápida [38]. Las levaduras más comúnmente usadas para la producción heteróloga de proteínas son *P. pastoris* y *S. cerevisiae*, en donde es interesante observar que los rendimientos de actividad de lacasa varían significativamente. Debido principalmente a la disponibilidad de un gran conjunto de herramientas moleculares como plásmido replicativo, promotor inducible o constitutivo y procedimientos de transformación sencillos) *S. cerevisiae* es el hospedero más sencillo utilizado con éxito para producir lacasas recombinantes a partir de eucariotas [31, 39]. Sin embargo, con frecuencia, la expresión se ve obstaculizada por las diferencias entre el organismo de origen y el huésped heterólogo, tales como el uso de codones, las chaperonas para ayudar al plegamiento de proteínas y las modificaciones postraduccionales (glicosilación, enlaces disulfúricos, señales de secreción, etc.) [7].

El uso de lacasas para el tratamiento o la eliminación de contaminantes ambientales e industriales ha atraído una atención creciente debido a su alta eficiencia y alta selectividad, no obstante su producción a gran escala y las principales dificultades en el uso de estas enzimas a escala industrial resulta en altos costos de producción [31, 53].

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, durante la última década se han realizado esfuerzos extraordinarios para modificar genéticamente las lacasas fúngicas. La mayoría de los experimentos de ingeniería genética tienen la intención de obtener HRPL, que además junto con el uso de *Saccharomyces cerevisiae* como huésped modelo, se ha logrado mejorar la expresión funcional y/o estabilidad de las lacasas. Los avances en el conocimiento de las relaciones estructura-función de lacasa y la disponibilidad de un buen número de estructuras cristalinas de lacasa, aunado a las metodologías de ingeniería de proteínas bien establecidas para modular las propiedades de las enzimas, han facilitado el diseño racional de lacasas para objetivos específicos, p. ej. residuos de aminoácidos se han sometido a mutagénesis dirigida al sitio después de su simulación computacional para determinar y definen los parámetros que afectan directamente los parámetros bioquímicos (pH óptimo, estabilidad térmica y especificidad hacia el sustrato) y las actividades catalíticas de estas enzimas [3, 46, 54]. Estas modificaciones incluyen perturbaciones estructurales y en la vecindad del sitio de CuT1 ubicados en el bolsillo de unión al sustrato

para determinar la relación entre estructura-función, afectando su actividad. Sin embargo, también se ha descubierto que las mutaciones beneficiosas ubicadas lejos de estos sitios afectan la actividad enzimática general en estudios de evolución dirigida, mutagénesis dirigida al sitio y aleatoria. Además de la actividad las lacasas también se han modificado para aumentar la especificidad de la enzima hacia diferentes sustratos, como ABTS sobre SGZ. La C-terminal también juega un papel crítico en la actividad de lacasa, por lo que también se han realizado estudios sobre los extremos C y N de las lacasas para determinar su papel en la actividad específica, estabilidad, oxidación de diferentes sustratos e incluso expresar y secretar lacasas activas o inactivas, esto último probablemente debido a un procesamiento C-terminal incorrecto [3, 54].

Está ampliamente aceptado que existe un equilibrio entre la actividad enzimática y la estabilidad, y con mucha frecuencia en los estudios de evolución dirigida, las mutaciones que mejoran la catálisis son desestabilizadoras para la proteína [54]. Por todo ello, es importante introducir ensayos de estabilidad junto con los ensayos de actividad y otros parámetros cinéticos, entre estos K_m y V_{max} para la selección de mutantes, para mejorar la estabilidad o detectar mutaciones desestabilizadoras.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Cepas, medios y plásmidos

Se utilizó la cepa *E. coli* DH5 α para todas las manipulaciones de ADN en medio LB y *S. cerevisiae* W303-1A se utilizó para la expresión de lacasa, las transformantes se cultivaron de forma rutinaria en medio selectivo (MS), medios descritos previamente. Para la expresión de recombinantes de lacasa se utilizó el plásmido pAKLAC3-K0.

3.3.2 Purificación de plásmido a partir de Escherichia coli DH5 α

Se tomó una colonia positiva resultante de la transformación en *E. coli* DH5 α , se creció en 10 mL de medio LB con ampicilina, después de 12 h se centrifugó y se extrajo el ADN plásmidico utilizando el kit ZyppyTM Plasmid Miniprep. Se realizó un gel de agarosa al 1% con 1 μ L de la extracción y se midió la concentración del plásmido extraído en un NanoDrop de Thermo Fisher Scientific.

3.3.3 Purificación de plásmido a partir de *S. cerevisiae* W303-1A

Una colonia positiva resultante de la transformación en *S. cerevisiae* W303-1A se creció en 10 mL de medio MS con CuSO₄ 100 µM, después de 12 h se centrifugo y se extrajo el ADN plásmidico utilizando el kit Thermo Scientific™ Yeast DNA Extraction. Se realizó un gel de agarosa al 1% con 1µL de la extracción y se midió la concentración del plásmido extraído en un NanoDrop de Thermo Fisher Scientific.

3.3.4 Transformación levadura

Después de conocer los resultados de la secuenciación, se realizó en *S. cerevisiae*, la transformación del plásmido en *S. cerevisiae* W303-1A se realizó con el protocolo de acetato de litio/ssDNA carrier/PEG [52], con cambios menores. Después de la transformación, las células se esparcieron en placas de medio selectivo MS y se incubaron a 28 °C, donde, después de 72 horas se observaron las clonas positivas, la actividad lacasa en las transformantes se detectó primero cualitativamente en placas MS que contenían CuSO₄ 100 µM y guaiacol al 0,5% v/v. La producción de las enzimas LAC3 y LAC3-K0, utilizadas como controles en este estudio, se llevó a cabo como describieron anteriormente [46].

3.3.5 Producción de las variantes y actividad lacasa

Los cultivos de levadura transformados con variantes de lacasa se cultivaron durante 60 h con una DO₆₀₀ inicial de 0,1 en 50 ml de medio MS en matraces de 250 ml a 28 °C con agitación a 160 rpm. Después de la centrifugación (4.200 rpm, 10 min), los sobrenadantes del cultivo se filtraron a través de papel de filtro (Whatman No. 1), posteriormente se pasaron a través de filtros de fibra de vidrio (porosidad 1,6 µM) y luego se concentraron en una celda de ultrafiltración (Amicon) equipada con una membrana de 10 kD (Millipore). El concentrado de enzima se almacenó a -80 °C en glicerol al 30% (p/v). Se determinó la actividad lacasa (de 5 µl de sobrenadante concentrado) a 25 °C por oxidación de ácido 2, 2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6 sulfónico) (ABTS) 1 mM en tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,4) en un volumen total de 1ml. Se siguió la oxidación de ABTS a 436 nm ($\epsilon = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (DU 640 Beckman).

Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

3.3.6 *Cultivo de las clonas y actividad enzimática en placas de 96 pozos*

Una placa para cultivo de 96 pozos se llenó con 300 μl de medio MS y se inoculó una colonia de levadura, las células se cultivaron durante 3 días a 28 °C; después se toman 10 μl de esta suspensión celular y se inocularon en 300 μl de medio MS nuevo, los cuales se cultivaron durante 24 horas a 28 °C a 160 rpm [46]. Las células se centrifugaron a 13 000 rpm durante 2 minutos y 10 μL de sobrenadante se pasaron a una microplaca para medir la actividad y la concentración de proteínas. En este trabajo, las condiciones estándar para la actividad lacasa se determinaron a 25 °C por oxidación de 1 mM ABTS), en condiciones previamente descritas. La concentración de la enzima (concentración de proteína) se determina mediante el método del ensayo colorimétrico de Bradford en micro placa y en celda, con albúmina de suero bovino o ASB (más conocida por sus siglas en inglés, BSA) como estándar y se midió en espectrofotómetro UV/Vis a 595 nm, después de incubar a temperatura de 5 a 10 minutos, cada muestra se hizo por triplicado [55].

3.3.7 *Comparación de la expresión de las variantes UNIK's en SDS-PAGE.*

Se comparó la expresión de las diferentes variantes obtenidas en SDS-PAGE de poliacrilamida de 7.5 a 12%, se utilizaron los sobrenadantes como muestras y las proteínas se tiñeron con azul brillante Coomassie G250 (Sigma, St. Louis, Mo.).

3.3.8 *Caracterización del extracto crudo de las variantes*

3.3.8.1 *Parámetros cinéticos (V_{max}^{app} y K_m^{app})*

Los valores aparentes de los parámetros V_{max} y K_m se obtuvieron de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten, luego se calculó K_{cat} . La concentración usada para ABTS fue 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2,5 mM, 3 mM y 5 mM en tampón de acetato de sodio 100 mM (pH 4,4) con 5 μl de concentrado de enzima en un volumen total de 1 ml. Todos los ensayos se realizaron por triplicado en las condiciones descritas anteriormente. Debido a que la catálisis de lacasa involucra dos sustratos y $[\text{O}_2]$ era invariante y se suponía que

saturaba en este estudio, la K_m medida, se consideró aparente (K_m^{app}). Debido a la suposición de que el 100% de la lacasa participó en la catálisis como enzima activa, la K_{cat} y V_{max} medidos también se consideraron aparentes (K_{cat}^{app} y V_{max}^{app}).

3.3.8.2 *Estabilidad de las lacasas a temperatura y pH*

La termoestabilidad de las variantes seleccionadas se investigó incubando el sobrenadante concentrado de las variantes a varias temperaturas (15, 25, 37, 55 y 70 °C) durante 120 min y se dejó reposar a 4 °C antes del ensayo. A continuación, se ensayó la actividad lacasa a 25 °C en las condiciones descritas previamente, con ABTS 1 mM como sustrato, tampón acetato de sodio 100 mM (pH 4,4). El efecto del pH sobre la estabilidad de la lacasa se estudió incubando los sobrenadantes a distintos valores de pH en tampón acetato 100 mM (pH 3.5 – 4.5) o tampón fosfato 100 mM (pH 5 – 7.5) durante 180 min a 25 °C; luego, los sobrenadantes concentrados se transfirieron a condiciones de reacción estándar para la actividad lacasa con 1 mM de ABTS como sustrato (pH 4.4), luego se calculó la actividad específica (AS) para cada variante.

3.3.8.3 *Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad lacasa*

Para estudiar el efecto de la temperatura, los sobrenadantes concentrados se incubaron a 15, 25, 37, 55 y 70 °C durante 30 min, y luego se analizó la actividad lacasa a la temperatura correspondiente en condiciones estándar [46]. Para estudiar la influencia del pH, se analizó la actividad lacasa en el sobrenadante concentrado en tampón acetato 100 mM/tampón fosfato 100 mM (pH 3,5 - 7,5) a 25 °C con 1 mM de ABTS como sustrato, luego se calculó AS para cada variante.

3.3.8.4 *Screening de oxidación de compuestos fenólicos.*

Los ensayos de oxidación se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Pardo *et al.* [7], con cambios menores. Se adquirieron sustratos de catecol, ácido vanílico, ácido gálico, ácido ferúlico y vainillina de Sigma-Aldrich (Alemania). Se prepararon soluciones stock 10 mM en etanol al 20% excepto catecol que se disolvió en agua. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pozos añadiendo 10 µl de extracto concentrado de lacasa, 180 µl de tampón acetato 100 mM, pH 5,0 y 20 µl de solución madre por pozo; se incluyó una reacción de

control sin enzima. Las reacciones se realizaron por duplicado para cada variante en un lector de placas Bio-Rad (lector de microplacas modelo 680) para cada sustrato a la longitud de onda apropiada (400-450 nm), y las lecturas se tomaron respectivamente en tiempos de incubación 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h y 24 h. Se calculó el Δ Abs promedio por μ g de proteína para cada variante y se normalizó frente al tipo parental (LAC3). La actividad relativa para cada variante con respecto al control LAC3 se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula [7]:

$$\frac{((\Delta \text{AbsX} - \Delta \text{Absblanco}) / [\text{proteína}]\text{X})}{((\Delta \text{Abscontrol} - \Delta \text{Absblanco}) / [\text{proteína}]\text{control})}$$

Dónde: AbsX: Absorbancia de la muestra.

Absblanco: Absorbancia de la solución.

Abscontrol: Absorbancia del control LAC3.

3.3.9 Predicción de parches Hidrofóbicos (HP).

El servidor web protein-sol (<http://protein-sol.manchester.ac.uk/>) se utilizó para predecir parches hidrofóbicos en la superficie de las proteínas [56]. Se usó el modelo PDB de LAC3 (GenBank AAR00925.1) para obtener un modelo de reemplazo de LAC3-K0.

3.4 Resultados

3.4.1 Screening de actividad sobre placas de 96 pozos.

La actividad de lacasa se analizó a las 24 horas de cultivo de las transformantes de levadura, se midió la actividad enzimática con ABTS. La Figura 16A muestra la actividad volumétrica de cada variante y dos controles (LAC3 y K0), las actividades fueron 1,98 U/ml para UNIK₂₇₀ y UNIK₂₈₃; para LAC3 la actividad fue 2.6 ± 0.124 U/mL, no hubo diferencias significativas entre las variantes y los controles, una observación importante fue que en el caso de la actividad específica, las variantes UNIK_{96/269/479}, UNIK₂₆₉ y UNIK_{89/291} no mostraron diferencias significativas con el control LAC3, con 18.58 ± 0.27 U / mg, 4.44 ± 0.21 y 21.02 ± 0.24 U/mg y 2.80 ± 0.134 /mg, respectivamente, Figura 16B.

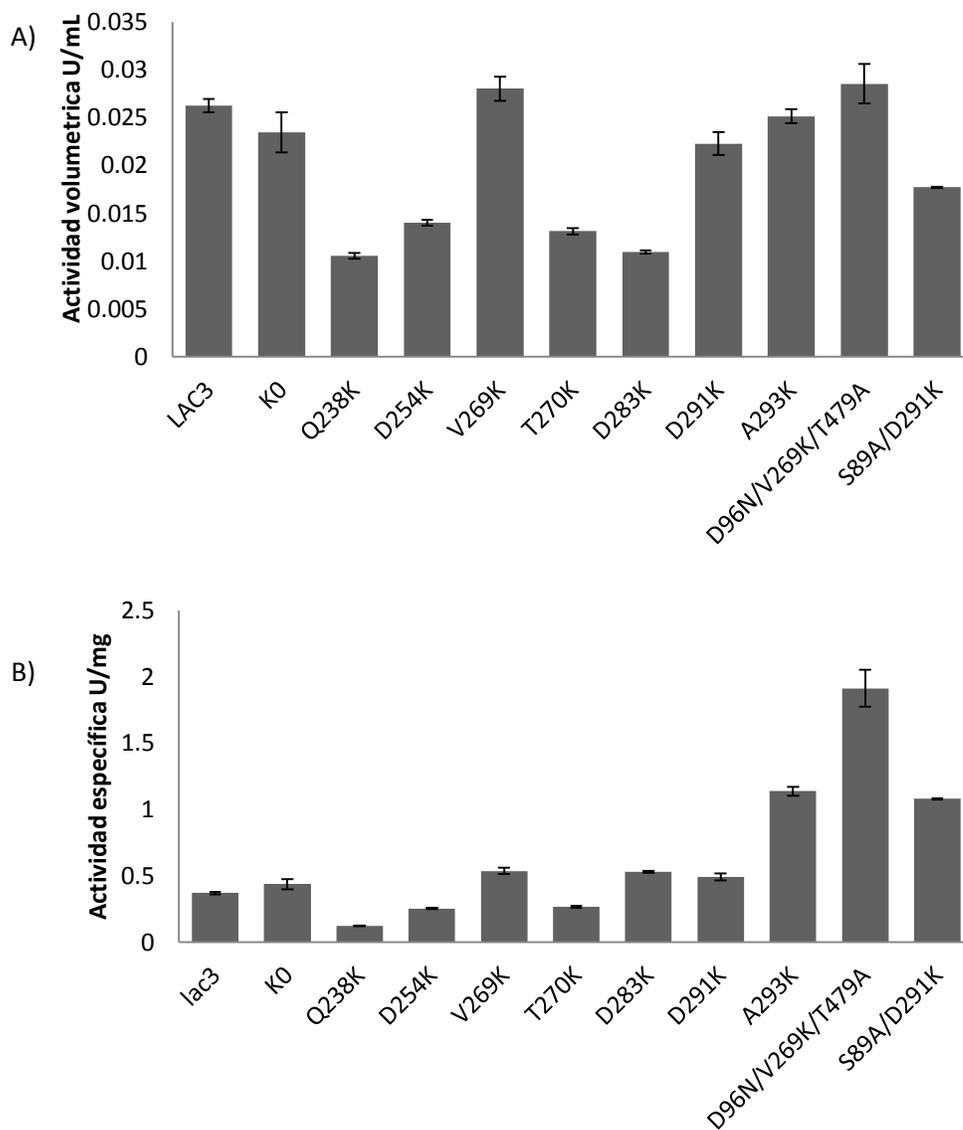


Figura 16. Actividad volumétrica de las variantes UNIK's (A), y actividad específica (B) en sobrenadante de cultivo líquido de *S. cerevisiae*, crecido 24 horas a 30°C. ABTS 1 mM en acetatos tampón pH 4.4.

Todas las variantes de lacasa UNIK's expresadas en *S. cerevisiae* como enzimas secretadas fueron capaces de oxidar guaiacol, ABTS y sustratos seleccionados, Figura 17. En el Anexo 2 se pueden observar los resultados de actividad volumétrica y actividad específica de los sobrenadantes (SN) de las variantes UNIK's.

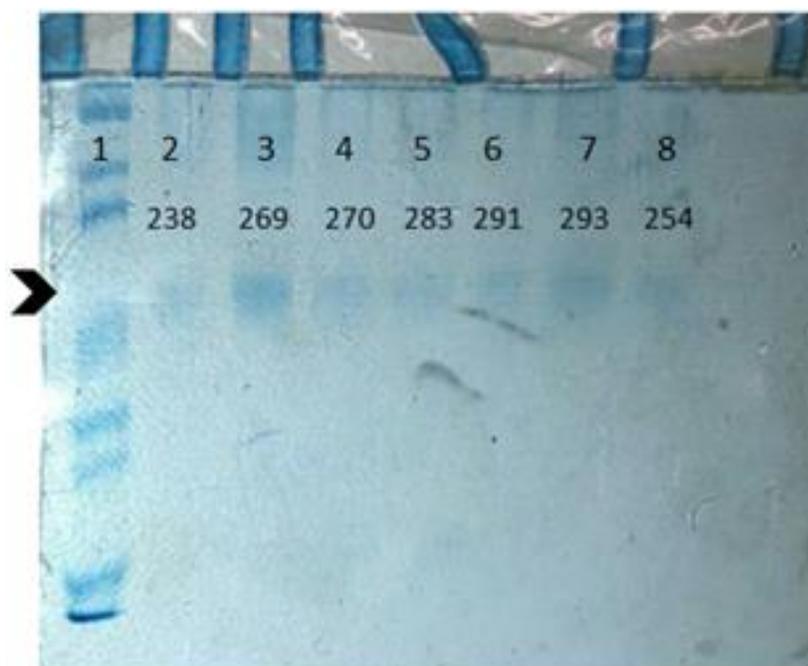


Figura 17. Comparación en SDS-PAGE de la expresión de variantes de lacasa UNIK. Carril M: estándares de peso molecular; Carril 1: Marcador de peso; Variantes del carril 2-8 UNIK.

Durante la mutagénesis se produjeron mutaciones al azar (espontáneas) dignas de mención que llevaron a un reemplazo adicional en la superficie de dos derivados de UNIK's (es decir, UNIK₂₆₉; UNIK_{96/269/479} y UNIK₂₉₁; UNIK_{89/291} sin poner en peligro su actividad enzimática. Por lo tanto, se exploraron las propiedades bioquímicas utilizando los sobrenadantes crudos sin purificación adicional. En la Figura 18 se puede observar que las nueve mutantes muestran diferencias en sus niveles de expresión tanto en reacción en placa de 96 pozos con ABTS (coloración azul indica oxidación), como en placas de agar con guaiacol como sustratos (coloración marrón indica oxidación), respectivamente. Las actividades se normalizaron al contenido de proteína (es decir, actividad relativa específica).

La detección de placas de actividad se basa en la oxidación del sustrato cromogénico fenólico o no fenólico de lacasa. Un halo de color (marrón para la oxidación de guaiacol) alrededor de la colonia aislada atestigua la secreción de lacasas activas. Este procedimiento es un cribado primario aplicable a un gran número de clones al mismo tiempo directamente sobre placas de transformación, ya que el sustrato incluido en los medios selectivos

(guaiacol) no es tóxico para las transformantes. Además, para colonias de tamaño similar, tanto la extensión del halo como la profundidad del color son indicativas de diferencias en los niveles de secreción y/o en actividades específicas.

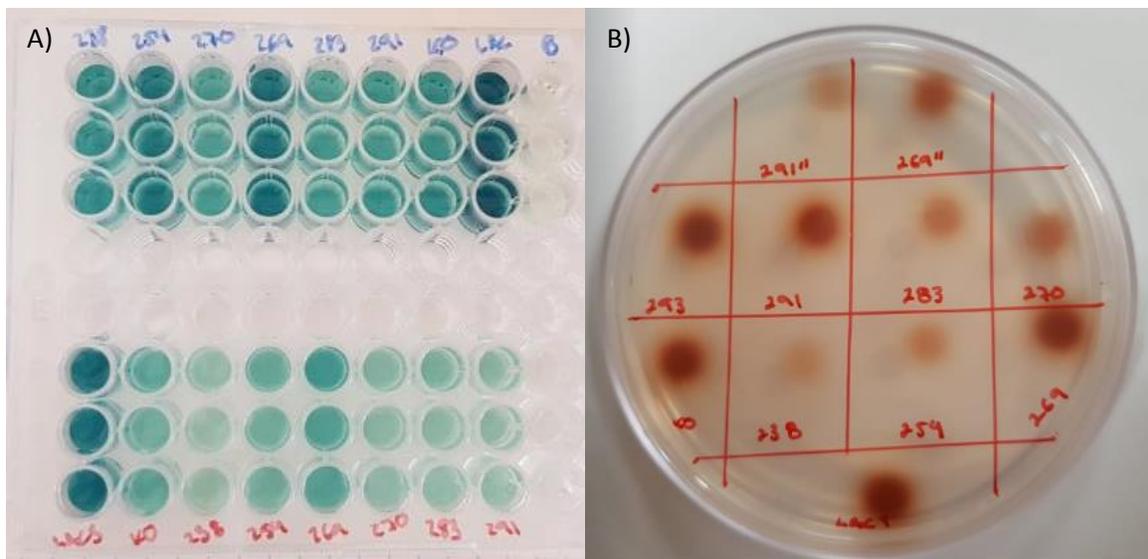


Figura 18. Actividad de las variantes UNIK's en medio sólido con guaiacol. A) Actividad de las variantes en medio líquido, con ABTS como sustrato. B) Actividad de las variantes en medio sólido, con guaiacol como sustrato.

3.4.2 Determinación de parámetros cinéticos V_{max} y K_m

Los parámetros cinéticos aparentes V_{max}^{app} , K_{cat}^{app} y K_m^{app} se obtuvieron ajustando la curva $v_i = f([ABTS])$ con la ecuación de Michaelis-Menten. Los valores de K_m^{app} fueron milimolares ($\approx 0,3$ a $0,9$ mM) y el rango de los de la enzima control. Los valores de V_{max}^{app} también fueron relativamente homogéneos entre las variantes, excepto las que portaban la mutación V269K, que fueron ligeramente superiores (1,5 a 2 veces) (Tabla 7). Por otro lado, las variantes UNIK₂₃₈ y UNIK_{D96N/V269/T479A} tienen una K_{cat} similar entre ellos, y superior al resto de las variantes.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de variantes UNIK's en el extracto crudo concentrado.

	K0	Q238K	D254K	V269K	T270K	D283K	D291K	A293K	D96N/V269K/ T479A	A89S/D291
AE* (U/mg)	2.52 ± 0.20	3.92 ± 0.27	3.58 ± 0.15	4.44 ± 0.21	2.80 ± 0.08	2.90 ± 0.11	2.42 ± 0.06	6.07 ± 0.36	18.58 ± 0.27	21.02 ± 0.24
V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$)	5.54 ± 0.27	4.55 ± 0.18	5.24 ± 0.10	8.22 ± 0.29	2.85 ±0.075	2.96 ± 0.10	2.98 ± 0.09	3.94 ± 0.06	11.98 ± 0.21	6.00 ± 0.07
<i>Km</i> (mM)	0.64 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.27 ± 0.001	0.40 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.30 ± 0.004	0.81 ± 0.00
k_{cat} (s^{-1})	16.7376	30.2539	11.8157	18.0768	3.7858	4.8349	5.5861	10.1747	32.3469	10.0784

* Se utilizó ABTS a diferentes concentraciones como sustrato.

AE*: Actividad específica

Se calculó K_{cat} (usando la concentración de proteína) y luego se calculó la velocidad inicial (V_o) para cada concentración de sustrato ensayado (Tabla 8), esta fue cercana a V_{max} en la mayoría de los cálculos, especialmente cuando se usó 5 mM de sustrato, en la mayoría de las variantes 90 -El 95% de la enzima participa en la catálisis, como enzima activa (a excepción de S89A / D291), por lo que K_{cat} debe considerarse aparente.

Tabla 8. Velocidad inicial (V_o). Calculadas para las diferentes concentraciones utilizadas de sustrato (0.25-5 mM).

	V_o ($\mu M/min$)					
	0.25	0.5	1	2.5	3	5
LAC3	1.333	2.179	3.190	4.424	4.622	5.078
K0	1.559	2.433	3.381	4.414	4.57	4.915
Q238K	2.156	2.925	3.561	4.095	4.164	4.31
D254K	1.796	2.675	3.542	4.397	4.519	4.782
V269K	3.948	5.333	6.468	7.415	7.538	7.795
T270K	1.102	1.59	2.041	2.460	2.518	2.644
D283K	1.085	1.589	2.067	2.523	2.586	2.723
D291K	2.221	1.561	2.048	2.52	2.586	2.73
A293K	1.382	2.047	2.694	3.326	3.415	3.6
D96N/V269K/A479T	5.368	7.412	9.157	10.663	10.861	11.281
S89A/D291K	1.416	2.291	3.316	4.534	4.727	5.165

3.4.3 Estabilidad a temperatura y pH

La estabilidad de las variantes de lacasa se evaluó pre incubando enzimas a diferentes pH o temperaturas antes de probar su actividad de oxidación ABTS. La estabilidad de las variantes se mantuvo estable de pH 5.5 a pH 7.5 con ABTS como sustrato con un ligero aumento a pH 5.5 para la mayoría de las variantes, en contraste con la estabilidad de UNIK₂₉₁ que presentó alrededor de un 20% de disminución a pH 5.5 y 6.5. Se encontró que LAC3-K0 era más estable que las variantes, mostrando un aumento del 53% a pH 6.5,

Figura 19A. Todas las variantes eran estables entre 15 y 37 °C; mientras que las variantes mantuvieron del 63 al 75% de su actividad inicial después de 120 min de incubación a 55 °C. Todas las variantes se inactivaron por completo después de una incubación prolongada a 70 °C, Figura 19B.

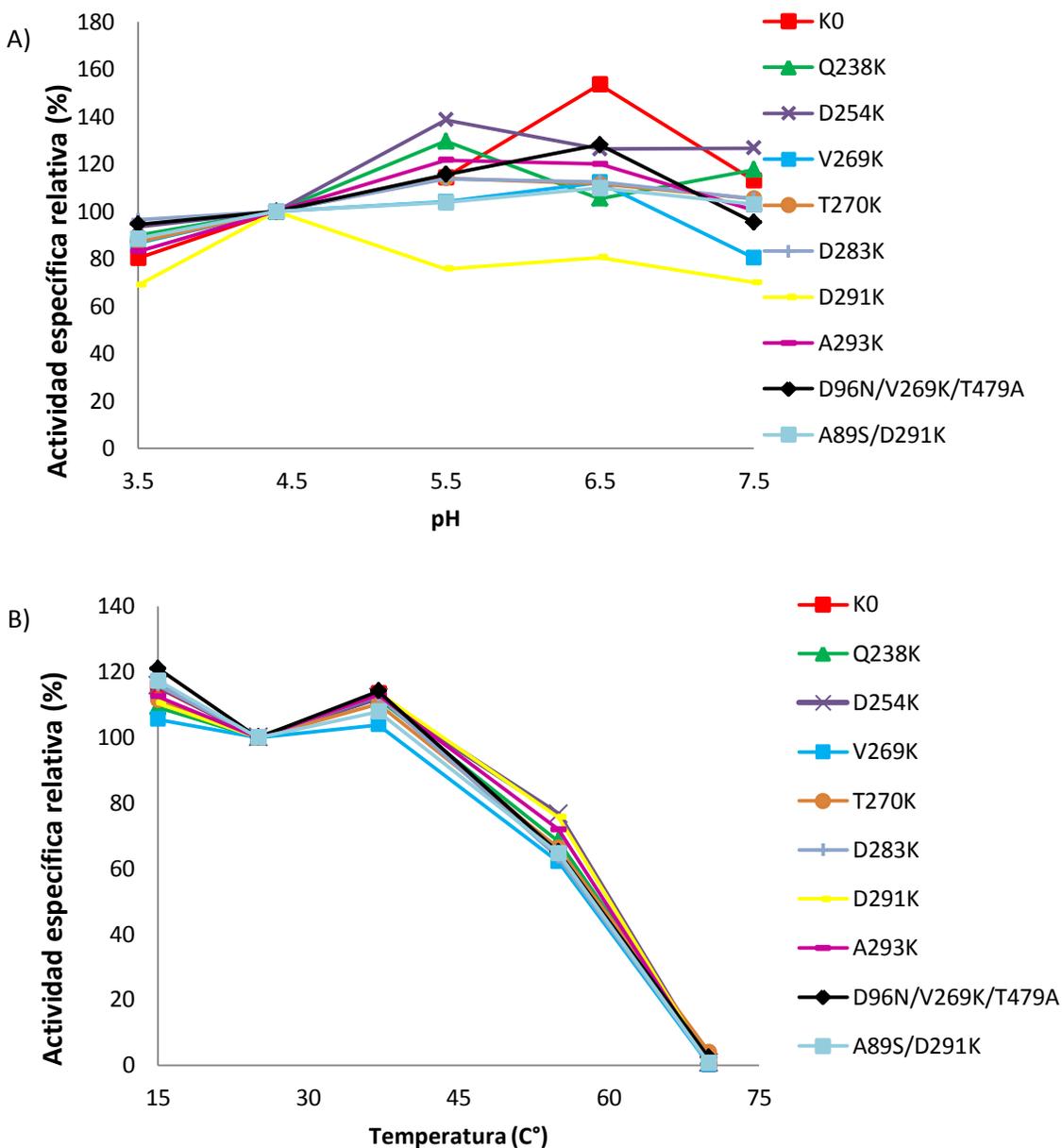


Figura 19. (A) Estabilidad del pH y (B) estabilidad térmica. Todas las pruebas se realizaron con ABTS 1 mM como sustrato. La actividad específica (AS) se calculó para cada variante y se normalizó a LAC3.

3.4.4 Efecto de la temperatura y pH sobre la actividad lacasa en las variantes

Para todas las variantes, se encontró que la actividad de lacasa era más alta a un pH ácido de 4,5, Figura 20A. En todos los casos, a valores de pH más altos, la actividad disminuyó constantemente casi a cero a pH 7,5 (98% de pérdida de actividad). La actividad de las variantes fue bastante estable entre 15 y 55 °C, con una fuerte disminución por encima de los 55 °C para la mayoría de las variantes. Por el contrario, la actividad relativa del control K0 y la de la variante UNIK_{A89S/D291K} se mantuvo estable hasta 70 °C, Figura 20B.

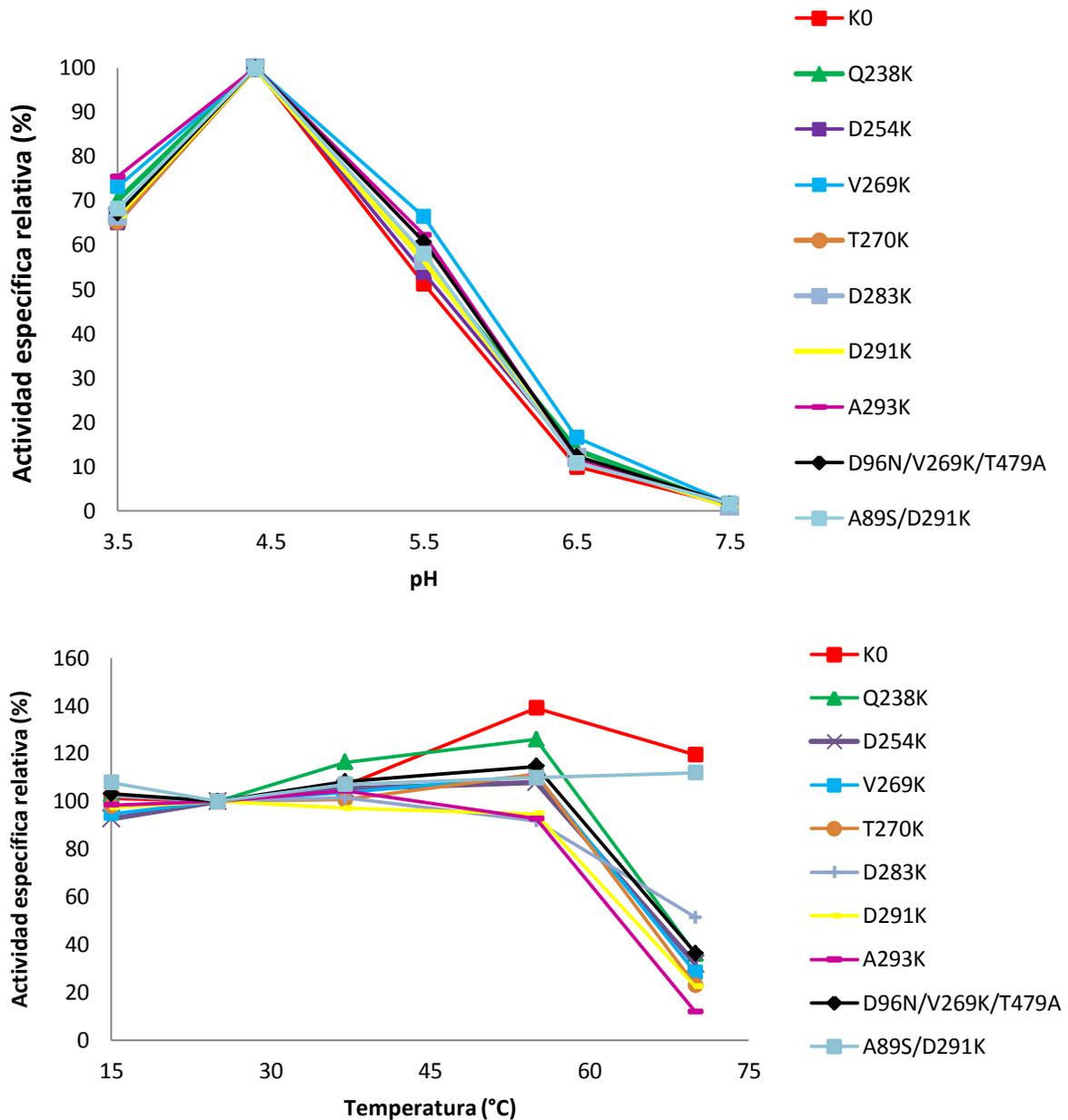
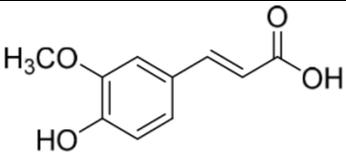
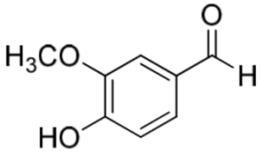
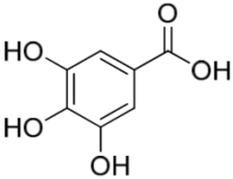
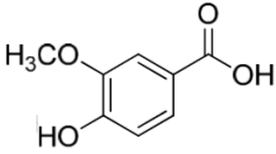
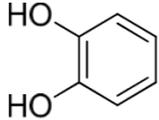


Figura 20. Efecto del pH y la temperatura sobre la actividad en el extracto crudo de la lacasa concentrada. (A) pH en un rango de 3.5 - 7.5 y (B) Varias temperaturas en un rango de 25 a 70 ° C. Todas las pruebas fueron realizadas con ABTS 1 mM como sustrato.

3.4.5 Oxidación de compuestos fenólicos

Las lacasas fúngicas son conocidas por su capacidad para oxidar compuestos derivados de la lignina [57]. Se seleccionaron como sustratos cinco compuestos fenólicos con diferentes estructuras químicas, Tabla 9.

Tabla 9. Sustratos utilizados para el cribado de oxidación por las variantes seleccionadas.

Compuesto Fenólico	Estructura	Espectro UV (nm)
Ácido Ferúlico		430
Vainilina		410
Ácido Galico		415
Ácido Vanílico		405
Catecol		400

Para estudiar la oxidación de compuestos fenólicos se utilizó el extracto concentrado de lacasa de cada variante. Todas las variantes y el control K0 tienen la capacidad de oxidar los cinco compuestos, Figura 21. La actividad relativa se normaliza a la de LAC3 para cada sustrato.

Se encontró que las variantes UNIK₂₉₃ y UNIK_{D96/V269K/T479A} tenían la mejor actividad oxidante para la vainillina, mientras que UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ y UNIK₂₇₀ se desempeñaron mejor que el resto para el ácido ferúlico. UNIK₂₃₈ oxidó ácido gálico hasta 1,4 veces más en comparación con K0. La oxidación de catecol aumentó en todas las variantes, particularmente en UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ y UNIK_{D96N/V269K/T479A}. Finalmente, UNIK₂₃₈ oxidó

el ácido vanílico hasta 10 veces más que el LAC3, haciendo de esta variante la mejor para la oxidación de los compuestos probados.

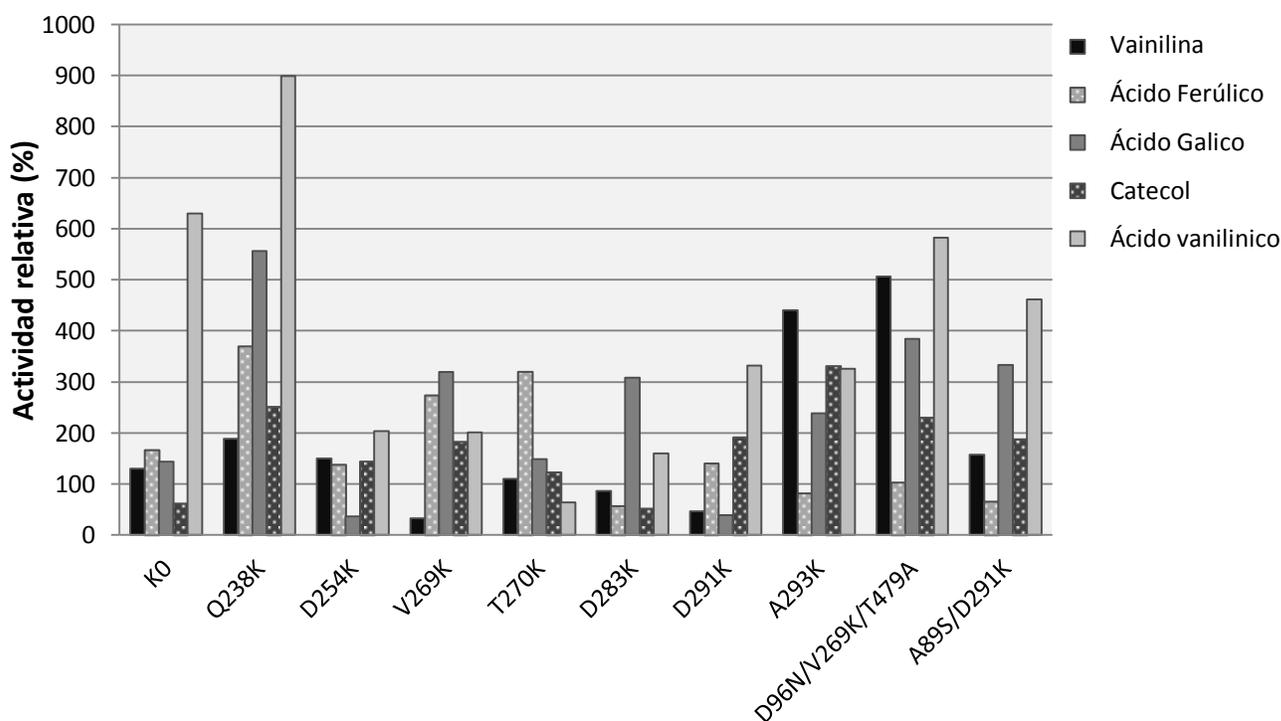


Figura 21. Valores de actividad relativa de las variantes de lacasa frente a los diferentes fenoles utilizados como sustrato en este estudio. La actividad se normaliza a la de LAC3 para cada sustrato. Los colores de las barras indican diferentes compuestos.

3.4.6 Hidrofobicidad en superficie.

Los modelos obtenidos en el servidor web Protein-sol, mostraron la hidrofobicidad en la superficie de las lacasas, la proporción de residuos no polares a polares (NPP) se representa en la escala de colores a continuación. Una relación NPP baja se indica en violeta y en verde a la inversa. Los parches de superficie se indican mediante el visor NGL integrado en la aplicación web Protein-sol después del cálculo. Como se muestra en la figura 22, dispersos sobre la superficie de K0.

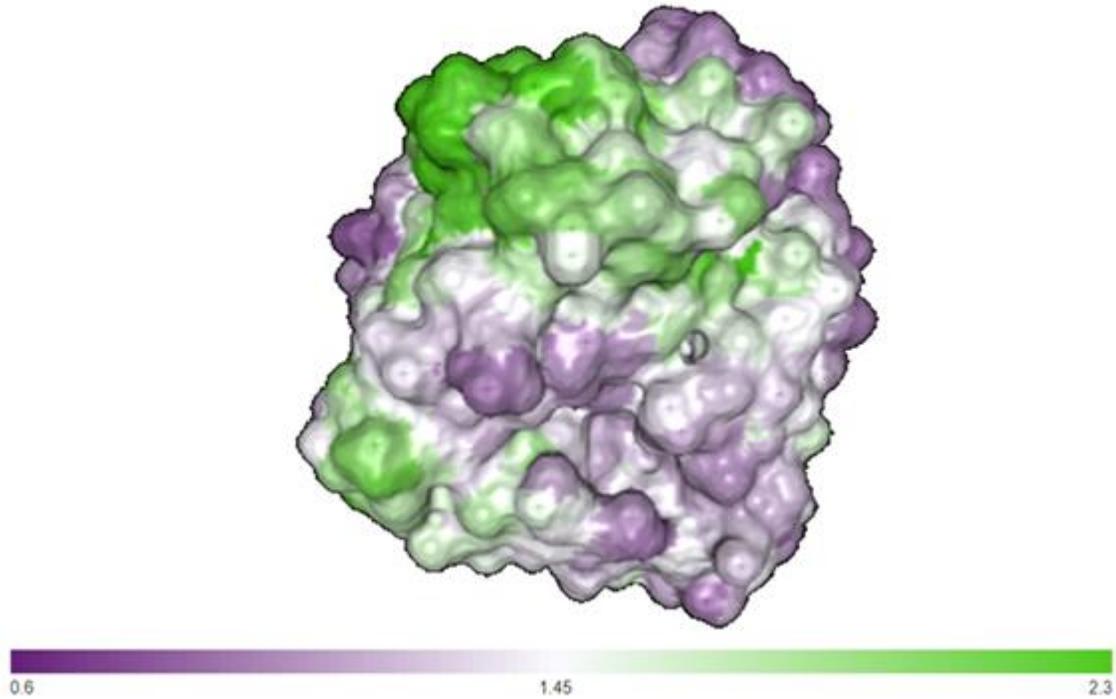


Figura 22. Parches hidrofóbicos (HP) de superficie. Se usó el modelo PDB de LAC3 (GenBank AAR00925.1) para obtener un modelo de reemplazo de LAC3-K0 para ser analizado con el servidor de proteína-sol para visualizar parches en la superficie de esta proteína.

Una vez mapeados los HP, fue indispensable conocer la relación de estos con los sitios mutados en nuestras variantes, para la variante Q238K, los residuos que rodean la posición 238 (N211; S236; F240, P300, Figura 23) y las distancias que existen entre estos y la lisina, así como la lisina con el CuT1 (que en conjunto se encuentran cercanas al sitio de unión al sustrato) y que están formando un HP, que podría en un futuro beneficiar las reacciones de funcionalización.

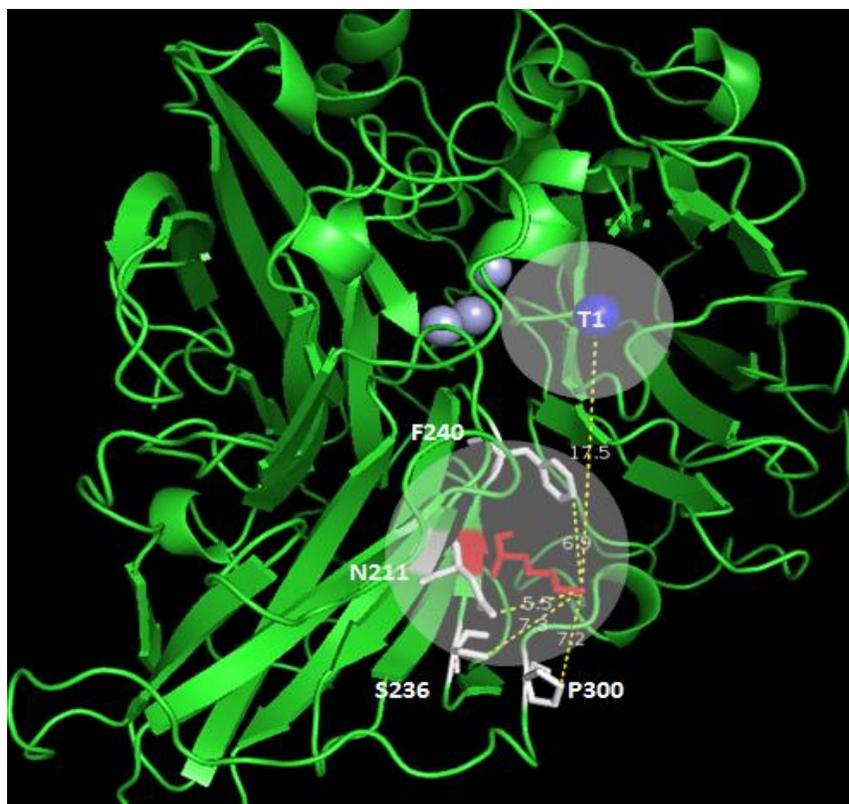


Figura 23. Residuos que rodean la posición 238 (N211; S236; F240, P300).

3.5 Conclusión

La superficie expuesta de LAC3 permitió la inserción de mutaciones en diferentes sitios, sin afectar la relación estructura función, y conservando sus propiedades enzimáticas como capacidad oxidativa y estabilidad operativa. La triple mutante fue favorecida por el fenómeno de aditividad, por lo que nuevos estudios de mutagénesis sobre las variantes UNIK's podrían ser implementados en la búsqueda de nuevas variantes de LAC3; En donde la función de estas podría ser beneficiada por el fenómeno de aditividad. Además, gracias a la presencia de los HP, la cercanía de la Lys a CuT1 y su mejoramiento en sus propiedades de enzimáticas en las variantes, las hace perfectas candidatas para procesos de funcionalización orienta, dando lugar a futuros híbridos cada uno con una orientación y propiedades diferentes.

CAPITULO III

VECTORES DE EXPRESION Y TRANSFORMACIÓN EN *Aspergillus niger.*

4.1 Resumen

Se ha reportado previamente en otros trabajos que LAC3-K0 y sus variantes UNIK₁₆₁ y UNIK₁₅₇ han sido sobre expresadas en *Aspergillus niger* [18, 46], un huésped fúngico bien conocido que produce una gran cantidad de enzimas homólogas o heterólogas para su aplicación. Otros autores han reportado que *A. niger* permitió un aumento de hasta 80 veces en la producción de lacasas [58], por lo que como resultado de una estancia en el ISM2 en mayo del 2019, las variantes fueron transformadas en el plásmido pAN52, para posteriormente ser expresadas en *A. niger* y así aumentar su producción.

4.2 Introducción

Tradicionalmente los productos enzimáticos como las lacasas se producían a partir de cultivos de organismos nativos o silvestres, los productos estaban generalmente acompañados de muchos otros contaminantes y los rendimientos eran relativamente bajos para su aplicación a gran escala [3]. En la actualidad, más del 90% de las enzimas producidas industrialmente son recombinantes, lo que da como resultado una pureza relativamente alta y costos bajos. La expresión heteróloga de secuencias codificantes de lacasa en huéspedes adecuados se realiza en organismos procariontes o eucariotes, entre estos últimos sobresalen los ascomycetos filamentosos y basidiomicetos, que se modifican genéticamente, la variación de las condiciones de cultivo y la mutagénesis en un huésped determinado pueden utilizarse para ajustar la producción, además se pueden eliminar productos no deseados como las proteasas y se ha informado que producen rendimientos enzimáticos más altos que las cepas nativas, alcanzando niveles de expresión de hasta un gramo por litro [3, 46]. Sin embargo, cabe señalar que una maduración postraduccional compleja de la enzima está influyendo en la expresión de los genes de las lacasas, así como en la diversidad que se puede obtener entre las variantes sintéticas, además, la secreción de lacasas fúngicas es un proceso que involucra decoraciones enzimáticas de la superficie de la enzima con restos de azúcar (glicosilación) y de la secuencia señal por peptidasa (s) específica(s) durante la secreción. Por lo tanto, para maximizar la producción de variantes de lacasa fúngica requiere una selección cuidadosa de las secuencias iniciales, huéspedes altamente secretores y un procedimiento de selección simple y directa, Zhou *et al.* [46] describe este proceso en dos pasos:

1) Selección de variantes (a partir de secuencias propagadas inicialmente en *Escherichia coli*).

2) Producción de variantes seleccionadas, involucrando cada una de ellas un huésped de expresión heterólogo especializado (p. ej., levaduras para el paso 1 y hongos filamentosos para el paso 2).

Además, la producción de lacasa recombinante se ha incrementado recientemente a niveles de casi 1 gL^{-1} , a través de la transformación y posterior optimización de las condiciones de fermentación en el ascomiceto GRAS *Aspergillus niger*. En conjunto, estos trabajos destacan el potencial de combinar una secuencia genérica de lacasa con sistemas de expresión de levaduras y hongos para la generación y producción a gran escala de variantes.

El gen de la lacasa *lac1* de *Pycnoporus cinnabarinus* se sobreexpresó en *A. niger*, el ADNc correspondiente se colocó bajo el control del promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como un promotor fuerte y constitutivo. Se usó el péptido señal de lacasa o la preprosecuencia de glucoamilasa de *A. niger* para dirigir la secreción. Ambos péptidos señal dirigieron la secreción de lacasa al medio de cultivo como una proteína activa, pero la preprosecuencia de *A. niger* permitió un aumento de 80 veces en la producción de lacasa. La masa molecular de la lacasa madura sugiere que no hay hiperglicosilación. Todas las características de la lacasa recombinante concuerdan con las de la lacasa nativa. Este es el primer informe de la producción de una lacasa de pudrición blanca en *A. niger* [58].

En este capítulo, se proporciona una descripción general de la producción a gran escala de LAC3 y el uso los plásmidos pAN52-4 (Número de acceso de EMBL Z32750) para la subclonación de la secuencia de las variantes de lacasa y pAB4-1 que alberga *pyrG* como marcador de selección. Como lo señala Zhou *et al.* [46], al explorar la plasticidad de la lacasa a través de la mutagénesis y la expresión en la levadura *S. cerevisiae*, es eficiente usar el organismo GRAS *A. niger* para la producción en masa de las variantes elegidas. Las pos funcionalizaciones químicas controladas con precisión de la superficie de la enzima están dando lugar a nuevos catalizadores biohíbridos o materiales con rendimientos sin precedentes en relación con la función lacasa [46].

4.3 Materiales y métodos

4.3.1 Ensamblaje en pAN52.4.1

El siguiente paso fue preparar plásmidos en el laboratorio de Dr. Tron, como parte de una estancia académica en ISmM2 (ver Tabla 11). Para la transformación en *Aspergillus niger*, el plásmido pAN52.4.1 es el requerido para realizar la integración cromosómica. Los primers fueron diseñados y ordenados de acuerdo al protocolo de ensamblaje.

Se corrió el PCR con el kit de ensamblaje *NEB build*. El producto de la PCR fue observado en gel, Tabla 10. La digestión con *DpnI* fue para deshacerse del plásmido original

*Digestión PCR con 1 μ L *DpnI*, 10X buffer a 37° C por 2 h.

Tabla 10. Condiciones de PCR para todas las construcciones en pAN52.4.1.

ADN [10 ng/ μ l]	0.5	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Buffer	10	1	98	2 min
dNTPs	0.5		98	20 sec
A ₁ [20 μ M]	1.25	30	72	1 min
A ₂ [20 μ M]	1.25			
Q5	0.5	1	72	5min
H ₂ O	36			
Total volume	50	-	37	∞

4.3.2 Transformación en *A. niger*

A. niger D15 # 26 [cepa D15#26 (*pyrG*⁻) (*prfT*) (*phmA*)] se transformó con el plásmido pAN52-Q238K junto con el plásmido pAB4-1 que alberga el marcador de selección auxotrófico *pyrG* como marcador de selección y el plásmido pAN52-4 (EMBL número de accesoión Z32750) (cotransformación) [46, 58]. Los transformantes *pyrG* + estables resultantes de la recombinación en el locus *pyrG* se seleccionan para la prototrofia de uridina, la parte experimental de este capítulo se llevó a cabo en ISm2 UMR 7313 en Marsella, Francia.

4.3.3 Buffers y reactivos

Enzimas de lisis de *Trichoderma harzianum* de Sigma (L1412-5G). ATA (Ácido aurintricarboxílico, sal amónica, 10–20mM, MERCK). Solución stock Trace elementos: 76mM ZnSO₄, 178mM H₃BO₃, 25mM MnCl₂, 18m M FeSO₄, 7.1mM CoCl₂, 6.4mM CuSO₄, 6.2mM Na₂MoO₄, 174mM EDTA. Medio Mínimo: 70mM NaNO₃, 7mM KCl, 200mM Na₂HPO₄, 2mM MgSO₄, 50gL⁻¹ glucosa, 50mgL⁻¹ CuSO₄, 5H₂O. Añadir 1% del stock de trece elementos y ajustar a pH5 con 1M solución ácido cítrico.

4.3.4 Procedimiento

1. Producción de esporas: Se prepararon diez placas grandes con medio completo sólido con uridina, para sembrar se utilizó 50 µl de solución madre de esporas por placa y se incubaron durante 10 días a 30 ° C, es necesario obtener esporas de la cepa parental, Figura 24.

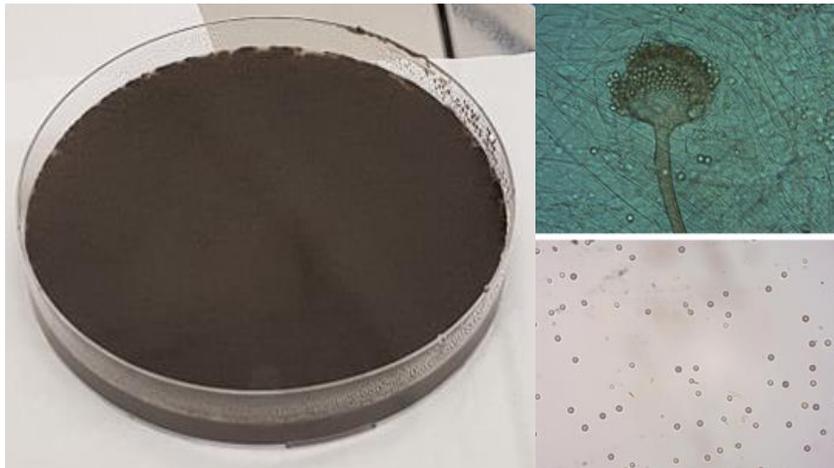


Figura 24. Producción en masa de esporas en agar medio mínimo con uridina.

2. Generación de protoplastos (por tratamiento químico y enzimático). 2. 10⁶ ml de esporas y se incubaron con agitación a 150 rpm (24 h) a 30 ° C.

Nota. En este primer paso, cuando se inspeccionó el cultivo en el microscopio, se observó contaminación con bacterias. Un segundo cultivo se puso en crecimiento a 30 ° C durante 24 h, utilizamos esporas de un nuevo glicerol (no esporas frescas) y luego continuamos con el paso 2.

El medio se filtró a través de Miracloth estéril, delicadamente. El micelio recogido se lavó con tampón CaCl_2 , se re suspendió en tampón CaCl_2 que contenía Glucanex y se incubó a $30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h en un agitador orbital (80 rpm), para obtener protoplastos. La suspensión de protoplastos se filtró luego a través de Miracloth estéril, se re suspendió suavemente en el mismo volumen de tampón STC frío y se centrifugó a $1026 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min. El sobrenadante se decantó cuidadosamente y los protoplastos se resuspendieron en 25 ml de tampón STC frío. La suspensión se centrifugó a $1478 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 min. Después de la remoción del sobrenadante, los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de tampón STC frío. En esta etapa, el número de protoplastos se estima contándolos con una cámara de conteo de células de Malassez bajo un microscopio

3. Transformación de protoplastos.

En un tubo de cultivo celular, 1 μl de ATA, 10 μg de pAN-52-Q238K, 2 μg de pAB4-1 y 150 μl de protoplastos se mezclaron bien y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Se añadió tampón PEG, se mezcló bien y la suspensión se incubó a temperatura ambiente durante 20 min. Después de agregar 10 ml de tampón STC, la suspensión se centrifugó a $1864 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante. Los protoplastos se resuspendieron en 1 ml de tampón STC.

4. Selección.

Aproximadamente 25 μl y 50 μL de la solución del paso anterior se colocaron en placa en medio mínimo selectivo sólido que contenían ABTS y se incubaron durante 4 días a $30\text{ }^\circ\text{C}$, Figura 25. Después de 4 días de incubación no se observaron transformantes en las placas.

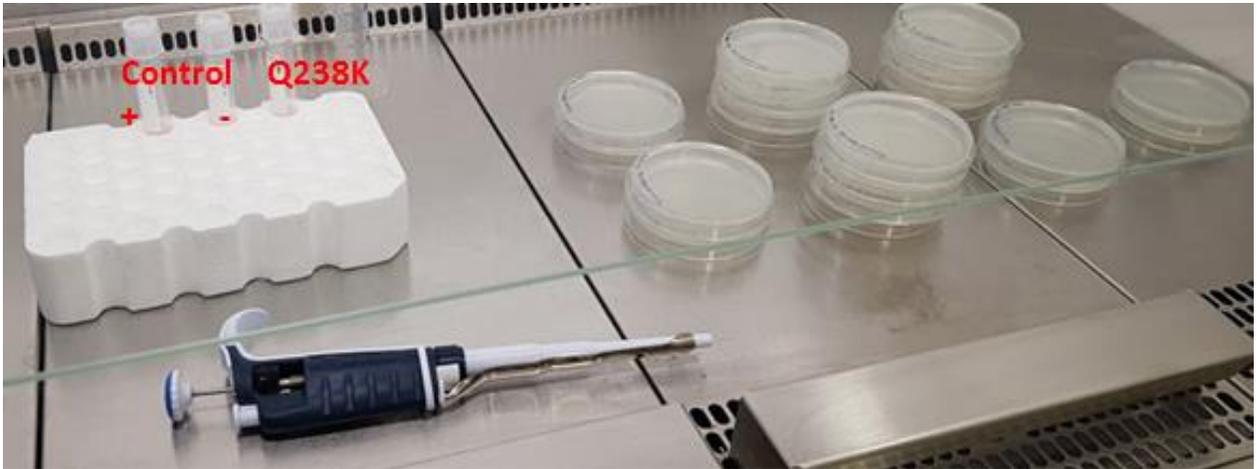


Figura 25. Placa con medio mínimo selectivo sólido con ABTS como sustrato.

Para medir la actividad de las variantes expresadas se utiliza una solución de ABTS recién preparada en buffer de acetato 100 mM a pH 5,7. La concentración de la enzima se determina mediante el método del ensayo colorimétrico de Bradford en microplacas (el ensayo de Bradford se realiza en 150 μ L de SN no diluido, la concentración de proteína de lacasa se estima a partir de una curva estándar obtenida de la solución de BSA).

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Ensamblaje de la secuencia de las variantes de lacasa

Después de correr los PCR's se corrieron los geles de agarosa y aquellas muestras que presentaron bandas, indicando la presencia del plásmido y el posible gen de la variante ensamblado, se prepararon las muestras para la secuenciación. Los resultados de secuenciación se presentan en la Tabla 11, donde se indica que seis de las variantes obtenidas se encuentran ensambladas en el plásmido pAN52-4^b, cabe señalar que el material se encuentra listo para iniciar la integración cromosómica en *A. niger*.

Tabla 11. Oligonucleótidos mutágenicos diseñados para la obtención de variantes en pAN52.4.1.

Lacasa	Nombre	Secuencia (5'-3')	Longitud	pAK145	pAN52-4 ^b
UNIK ₂₃₈	Q238KFwd	GTCGACTCGATCAAAAATTTTCGCCGGG	27	✓	✓
	Q238KRev	CCCGGCGAAAATTTTGATCGAGTCGAC			
UNIK ₂₅₄	D254KFwd	ACCGCGGATCAAAAAATCGGTA ACTAC	27	✓	✓
	D254KRev	GTAGTTACCGATTTTTTGATCCGCGGT			
UNIK ₂₆₉	V269KFwd	CTAACACCGGTACAAAAACCACCGATGG	28	✓	---
	V269KRev	CCATCGGTGGTTTTTTGTACCGGTGTTAG			
UNIK _{96/2} 69/479	V269KFwd	CTAACACCGGTACAAAAACCACCGATGG	28	✓	✓
	V269KRev	CCATCGGTGGTTTTTTGTACCGGTGTTAG			
UNIK ₂₇₀	T270KFwd	GGTACAGTCAAAACCGATGGCGGC	24	✓	✓
	T270KRev	GCCGCCATCGGTTTTGACTGTACC			
UNIK ₂₈₃	D283KFwd	CATTCTGCGTTACAAAACGGCGGACCC	27	✓	✓
	D283KRev	GGGTCCGCCGTTTTGTAAACGAGAATG			
UNIK ₂₉₁	D291KFwd	CGATCGAACCCTAAAGCCGCAGACC	24	✓	---
	D291KRev	GGTCTGCGGCTTTGGGTTCGATCG			
UNIK _{89/2} 91	D291KFwd	CGATCGAACCCTAAAGCCGCAGACC	24	✓	✓
	D291KRev	GGTCTGCGGCTTTGGGTTCGATCG			
UNIK ₂₉₃	A293KFwd	GAACCCGACGCCAAAGACCCACCAG	26	✓	---
	A293KRev	CTGGTGGGGTCTTTGGCGTCGGGTTC			

4.4.2 Expresión en *A. niger*

Al cabo de 10 días se revisaron las cajas para ver si se obtuvieron colonias positivas, sin embargo, no se obtuvieron clonas, existe la posibilidad de que el material utilizado no estaba correctamente esterilizado, por lo que queda en perspectiva repetir la expresión en hongo.

4.5 Conclusión

Las variantes obtenidas se encuentra expresadas en *S. cerevisiae*, sin embargo, la integración cromosómica en *A. niger* es un proceso sumamente complejo, por lo que solo se podrá sobre expresar al menos un par de variantes en este hospedero, ya que existe el riesgo no solo de fracasar en el proceso, como lo fue este primer intento, también está el riesgo de una contaminación cruzada en el momento de intentar clonar dos variantes juntas.

CAPITULO IV

INMOVILIZACIÓN DE LAC₃ Y UNIK₁₆₁ EN PARTÍCULAS DE Ru

5.1 Resumen

Finalmente, con el objetivo de aprender técnicas de clonación, expresión, purificación e inmovilización de lacasas, se realizó una estancia en ISm2 en Marsella, Francia, donde se logró clonar, expresar y producir a la LAC3 en *Aspergillus niger*. Posteriormente, fue purificada por cromatografía y se realizó la funcionalización de la UNIK₁₆₁ sobre partículas de rutenio, Ru.

5.2 Introducción

5.2.1 Inmovilización de lacasas

El término "inmovilización enzimática" abarca una amplia gama de procesos industriales destinados a retener una enzima completamente activa sobre un soporte sólido insoluble (Figura 26). Para la inmovilización enzimática se han propuesto varios métodos, entre estos el atrapamiento de enzima, cross-linking y la unión al soporte. Estos últimos pueden incluir enlaces físicos a través de interacciones débiles (enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals), intercambio iónico, interacciones de afinidad y enlaces covalentes. Entre todos estos, los enlaces covalentes constituyen el más interesante método de inmovilización de lacasas para aplicaciones industriales [59, 60].

El desarrollo eficiente de un sistema enzimático inmovilizado [rendimiento de inmovilización (IY) y la eficiencia de inmovilización (IE)] están significativamente influenciados por el material de soporte, las propiedades de la enzima y la optimización de las condiciones de inmovilización lo que es crítico para su éxito [61]. El material de soporte elegido, este debe cumplir algunos requisitos como ser apto para la inmovilización covalente, tales como morfología, composición, hidrofobicidad, tamaño de partícula, superficie específica, grupo de superficie funcional y rigidez. Por lo anterior cabe mencionar que se pueden insertar varias funciones químicas en la superficie del material de soporte (es decir, -NH₂, -OH, -COOH, -SH) capaz de reaccionar covalentemente con enzimas en condiciones apropiadas [60].

Por otra parte, el uso de nanopartículas como soportes para la inmovilización enzimática ha recibido atención creciente en los últimos años debido a sus características. En primer lugar, proporcionan un área superficial específica elevada para el acoplamiento de la

enzima, lo que permite una alta capacidad de carga enzimática [59]. Típicamente, un soporte genérico para la inmovilización de proteínas debe ser químicamente inerte, de lo contrario, podría reaccionar con agua (o buffers y/o con sustratos/ productos derivados de las reacciones catalizadas por enzimas). Sin embargo, un soporte ideal debe ser reactivo lo suficiente como para ser modificado químicamente con vistas a lograr la inmovilización enzimática, mostrando generalmente una superficie más o menos hidratada, que consiste en grupos -OH unidos covalentemente a los átomos [60].

La inmovilización covalente requiere usualmente tanto la funcionalización como la activación del soporte, todos estos pasos deben diseñarse adecuadamente proporcionar el mayor incremento en la estabilidad y actividad de la proteína. De hecho, un proceso de inmovilización mal diseñado puede dar lugar al efecto opuesto, es decir, disminución de la estabilidad. La fijación covalente de enzimas suele ser irreversible, evitando así la reutilización del soporte cuando la enzima inmovilizada ha perdido su actividad. Sin embargo, en ciertos casos la liberación de proteínas en condiciones suaves es posible, logrando así la recuperación del soporte [60].

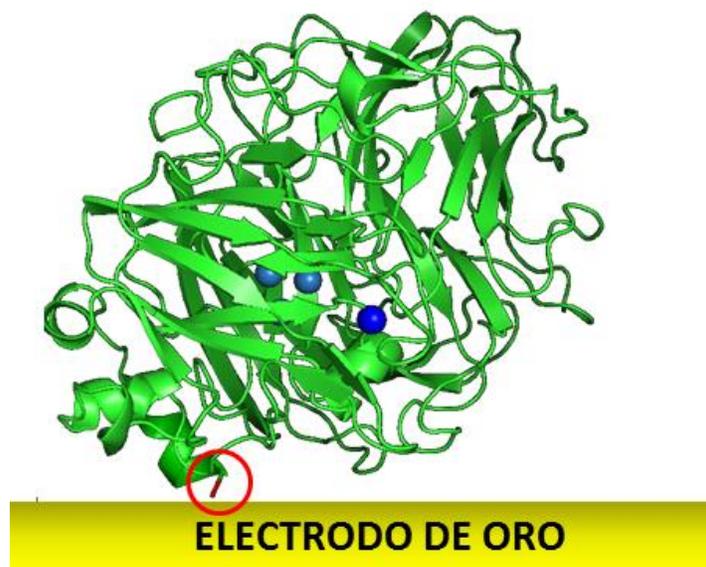


Figura 26. Representación de la inmovilización de la lacasa LAC3 de *Trametes versicolor* C30 sobre un Nanotúbulo de carbono (NTC).

La inmovilización de enzimas también proporciona ventajas claras comparadas a los procesos industriales convencionales, donde, por ejemplo, los reactores de flujo continuos hacen el uso de la lacasa más rentable. Aparte del hecho de que las enzimas inmovilizadas se utilizan en las mismas aplicaciones que las enzimas libres, y con resultados aún mejores [3].

5.2.2 Funcionalización de lacasas

Conceptualmente, la funcionalización es el procedimiento mediante el cual se introduce una nueva función química sobre un soporte (portador de enzima), la activación significa que la función química recién introducida se hace reactiva hacia la enzima (Figura 27). También se han descrito muchos métodos de activación que ayudan a minimizar los inconvenientes típicos de la inmovilización covalente (pérdida de actividad y modificación de la estructura de la proteína 3-D) [60].

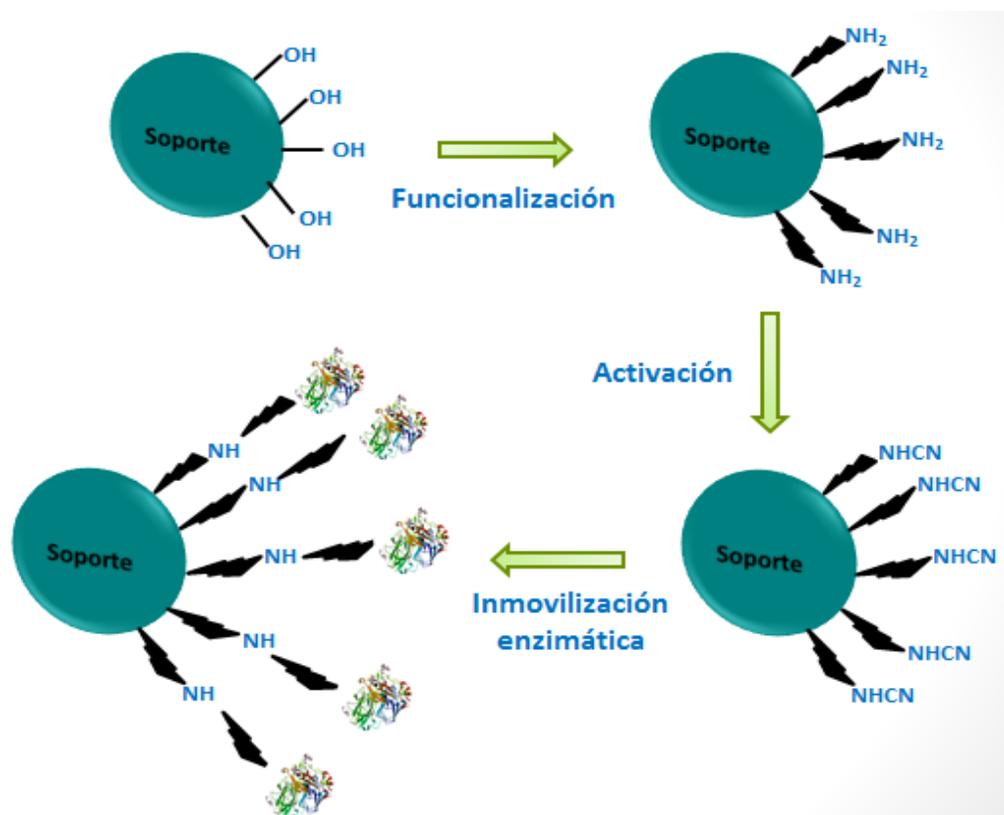


Figura 27. Figura esquemática del procedimiento de funcionalización-activación. Tomada de Zucca y Sanjust [60].

Además, se tiene que preservar la estructura proteica por lo que requiere técnicas de inmovilización suave para evitar cualquier desnaturalización enzimática o despliegue. Por ejemplo, algunas de las enzimas utilizadas en estos procesos son las lacasas, de estas enzimas se ha explotado la naturaleza hidrófoba de los aminoácidos próximos al centro de CuT1 de lacasas de varios hongos basidiomicetes para inmovilizar enzimas con orientación favorecida. Los electrodos, funcionalizados con moléculas hidrófobas han mostrado interactuar fuertemente con estos aminoácidos [14].

El proceso de funcionalización con los diversos compuestos inorgánicos (metales, óxidos metálicos, polímeros, semiconductores o fluoróforos) se da principalmente a través de la activación con los residuos de grupos aminas (His, Lys, Arg, Asn y Gln), sulfhidrilo (Cys) y carboxilos (Glu y Asp), que están correctamente localizados y expuestos al medio de reacción (Figura 28), se puede lograr por uniones covalentes, la cual se basa en reacciones químicas entre el grupo lateral de residuos de aminoácidos localizados en la superficie de la proteína y el grupo funcionalizado disponible en la superficie de la partícula [62].

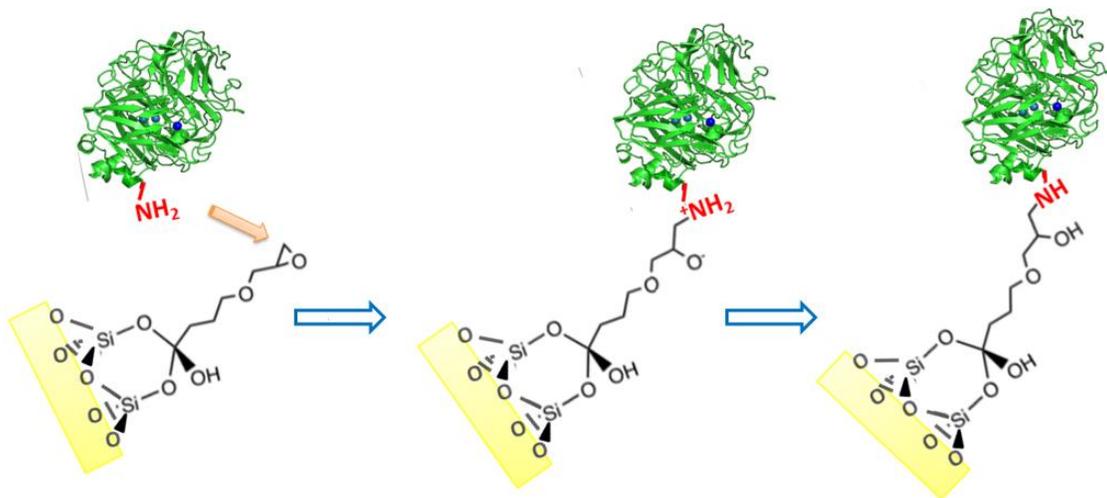


Figura 28. Inmovilización dada por un grupo amino en la superficie de una proteína y el grupo disponible en la superficie de un soporte. Estrategia de aminación reductora para el injerto covalente.

5.2.3 Funcionalización covalente

Entre las diferentes técnicas para inmovilizar lacasas en electrodos, la unión no covalente a través de interacciones supramoleculares con el cavidad hidrofóbica situada cerca del centro multicobre CuT1 de lacasa fue descrita inicialmente por F. Armstrong *et al.* [63]. Esta técnica se basa en la funcionalización del electrodo utilizando compuestos aromáticos policíclicos tales como antraquinona, antraceno, naftaleno o criseno que pueden interactuar con el lado hidrófobo de la lacasa, logrando así la inmovilización y orientación de la enzima sobre los electrodos. La transferencia de esta técnica a nanotubos de carbono (CNTs) funcionalizados covalentemente condujo al logro de una reducción efectiva del oxígeno bioelectrocatalítico [25].

Se pueden incorporar fácilmente diversos grupos funcionales en la superficie de los nanotubos de carbono mediante modificación química, tales como carboxilación, acilación, amidación o esterificación, algunos de los cuales son no covalentes mientras que el resto son funcionalizaciones covalentes (Figura 29A). En general, la inmovilización de proteínas covalentes en los nanotubos de carbono se ha demostrado mediante la inducción de una reacción entre los grupos de aminoácidos en la superficie de la proteína y los grupos de ácidos carboxílicos en la pared lateral de los CNTs oxidados (Figura 29B) [62].

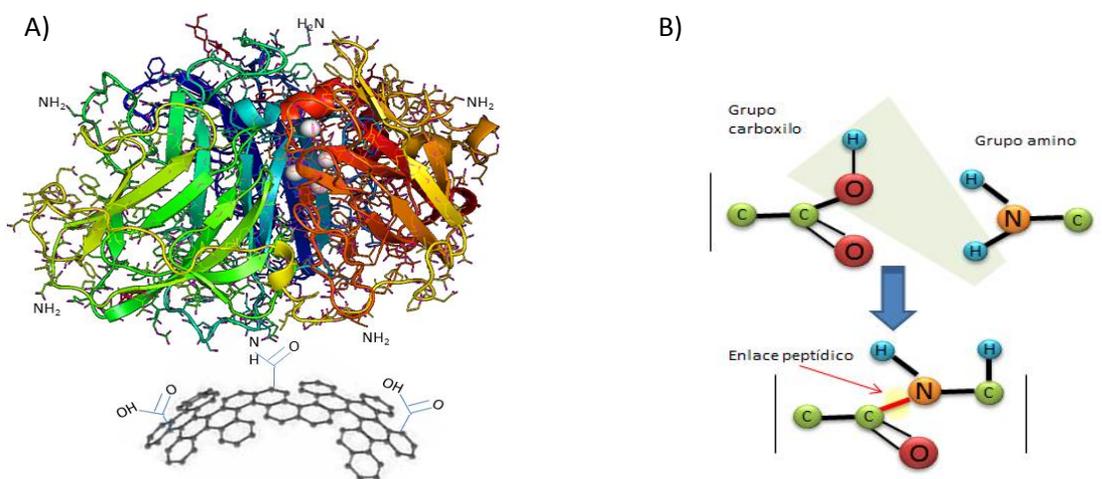


Figura 29. A) Unión covalente a través de acoplamiento de amida con los grupos ácido carboxílico de nanotubos de oxidados. B) Enlace peptídico formado por los grupos ácido carboxílico y amino. Tomado de Oliveira *et al.* [62].

La inmovilización covalente garantiza generalmente, la mayor fuerza de unión entre la nanopartícula de soporte y la proteína, minimizando al mismo tiempo las cuestiones de fugas y aumentando la estabilidad operativa hacia el calor, el pH, los disolventes orgánicos y el almacenamiento. Sin embargo, si una enzima se desactiva irreversiblemente por unión covalente a una nanopartícula, tanto la enzima como el soporte se vuelven inutilizables [62].

5.2.4 *Activación de los soportes*

Los soportes funcionalizados no suelen ser capaces de reaccionar directamente con las proteínas. Sólo los soportes funcionalizados con epoxi o aldehído, por ejemplo, pueden acoplarse directamente con enzimas. En todos los demás casos, el soporte debe activarse con reactivos específicos que aseguren la reactividad hacia los grupos funcionales de la proteína. En general, la activación de un soporte implica la inserción de funciones electrofílicas directamente sobre la superficie de soporte. Alternativamente, cuando el soporte está funcionalizado, las funciones recién introducidas se modifican químicamente para transformarlas en los restos electrofílicos deseados [60]. En general, los valores de pH entre 6 y 9 son los más adecuados para la inmovilización rápida con altos rendimientos, también en términos de retención de la actividad enzimática. Aunque, en principio, cuanto más alto es el pH, más rápida y más alta es la reacción de unión (inmovilización), se debe tener en cuenta que los iones hidróxido son también nucleófilos; Por lo que los valores de pH excesivamente altos en general, tienden a desperdiciar una fracción notable de los restos electrofílicos sobre el soporte en lugar de favorecer la inmovilización. Cuando se trabaja en portadores electrofílicos comparativamente no reactivos, también las disoluciones diluidas de NaHCO_3 (pH 8,3) podría ser el disolvente de elección para obtener excelentes resultados [60].

El objetivo de las funciones químicas genéricas sobre la superficie de la lacasa (hidroxilos de azúcares, grupos carboxílicos, grupos amino o cualquier otro nucleófilo) es obtener un anclaje covalente de la enzima, aunque a través de una localización aleatoria en la cubierta de la proteína. Esto no puede resultar en una orientación totalmente controlada y homogénea de las moléculas de enzima sobre los materiales del electrodo [14]. Es probable que se produzcan modificaciones estructurales masivas de las proteínas inmovilizadas.

Incluso cuando esto se excluye, la mala orientación simple del sitio activo podría afectar la correcta interacción entre las enzimas y sustratos. Todos estos fenómenos podrían afectar así la actividad catalítica [60].

Varias cadenas laterales de aminoácidos presentes en la superficie de la enzima pueden formar enlaces covalentes con soportes inorgánicos activados, particularmente, la lisina ϵ -NH₂. Estas últimas están extendidas en casi todas las proteínas; la reactividad es óptima; la lisina tiene usualmente una relevancia mecánica menor (por lo que no es fundamental para la retención de la actividad catalítica). Sin embargo, en algunos casos el $-\text{NH}_3^+$ protonado puede estar implicado en interacciones iónicas cruciales para la estabilidad de proteínas: en estos casos, su compromiso en enlaces con el soporte podría conducir a la desnaturalización. Finalmente, las lisinas suelen estar presentes en la superficie de la proteína, por lo que son fácilmente accesibles durante las reacciones de acoplamiento [60].

De las enzimas estudiadas con este fin, las lacasas fúngicas son las principales enzimas que han sido evaluadas para su funcionalización con nanomateriales, que aunado a los requisitos simples de la catálisis, hace que estas enzimas sean tanto adecuadas como atractivas para la obtención de nuevos materiales híbridos.

5.2.5 *TDE modificada por la inmovilización de lacasas en nanosportes*

La generación de electricidad de fuentes renovables y técnicas amigables con el ambiente que aunado a las estrategias de inmovilización (funcionalización) y a las propiedades oxidativas únicas (reducción de oxígeno en agua) de las lacasas, han contribuido en la construcción de células de biocombustible enzimáticas. En las últimas décadas se ha manifestado un creciente interés hacia estos dispositivos debido a sus aplicaciones potenciales en diferentes aspectos como la bioelectrónica y propósitos médicos [64]. Sin embargo, la transferencia directa de electrones (TDE) de la lacasa en electrodos convencionales depende de los materiales del electrodo y las estrategias de inmovilización de la lacasa, los cuales juegan un papel esencial en la TDE [37].

Se ha encontrado que la reducción electrocatalítica del oxígeno en el electrodo de lacasa no orientada se acompaña de la producción del intermedio H₂O₂, lo que disminuye la eficiencia de la reducción de O₂. Algunos estudios muestran la influencia de la orientación

enzimática sobre superficies funcionalizadas y la eficiencia catalítica [49], por lo tanto se deduce que la inmovilización orientada de la lacasa es un requisito previo para la comprensión de los fenómenos anteriores y también es el punto difícil para estudiar la TDE de la lacasa [37].

En pocos años, CNT se han convertido en un material de elección para la construcción de electrodos. Los CNTs representan una clase de nanomateriales con una combinación ideal de alta especificidad de superficie, alta conductividad y propiedades TDE efectivas para el cableado enzimático. Las inmovilizaciones covalentes de lacasas sobre nano-objetos también han demostrado favorecer la TDE al centro de CuT1 (Figura 30). De estos sistemas estables sin diferencias condujo al desarrollo de inmovilizaciones de lacasa mediante acoplamiento de amidas a través de eslabones activados con NHS o enlaces imino a través de nanopartículas de oro modificadas con amina [14].

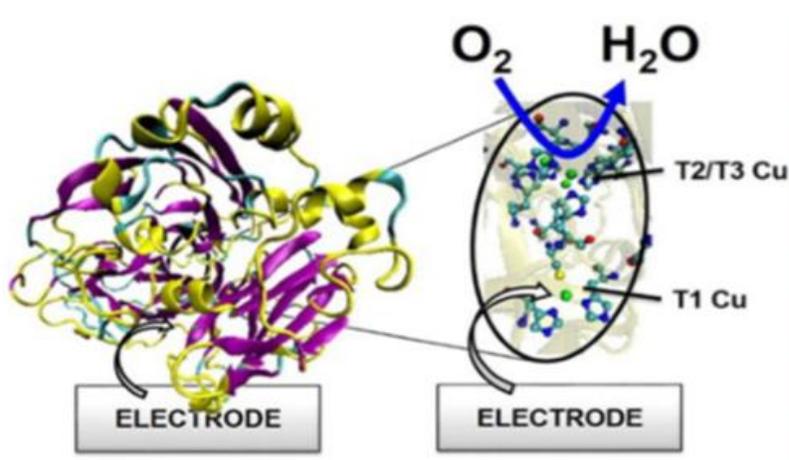


Figura 30. Los electrones pueden transferirse desde el electrodo al sitio activo de cobre mediante transferencia electrónica directa (DET). Tomada de Le Goff *et al.* [43].

En la actualidad la ciencia en conjunto con la industria, buscan mejorar las propiedades fisicoquímicas de las lacasas, para ampliar a nuevos campos su aplicabilidad, por lo que existen numerosos estudios de estas enzimas a nivel molecular, comprendiendo el papel que tienen los genes para su producción, purificación y mejoramiento de las lacasas.

5.3 Objetivo

Como se ha mencionado a lo largo de este trabajo, se realizaron estancias de investigación al CNRS, Aix Marseille Université, iSm2 UMR, con el objetivo de implementar técnicas de producción, purificación y funcionalización de LAC3.

5.4 Resultados y discusión.

5.4.1 Producción y purificación de LAC3

LAC3 fue clonado en el genoma de *Aspergillus niger* por el método descrito por Record *et al.* [58] y como se describe en el capítulo anterior, donde después de 5 días en caja 2×10^6 esporas fueron inoculadas en un fermentador de 5L conteniendo 4L de medio, con la finalidad de producir a LAC3.

En el 6to día inicio la purificación, el primer paso fue por ultrafiltración, para separar en moléculas pequeñas y grandes, de un volumen inicial de 8 L se llegó a un volumen final de 200 mL, este volumen fue purificado en una columna DEAE- sepharosa, tampón Na 20mM pH6, 300 mM NaCl, para obtener 175 mL de enzima purificada y finalmente se concentró y se pasó por una columna Saphacryl S-100, usando un tampón 0.3M NaCl en Tp 20mM, se obtuvo un volumen final de 50 mL, Figura 31. Se midió actividad lacasa bajo las condiciones previamente descritas, ver apartado 1.1.5. Se siguió la oxidación de ABTS a 436 nm ($\epsilon = 29.300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) utilizando un espectrofotómetro UV/Vis. Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (U). Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para oxidar 1 μmol de ABTS por minuto.

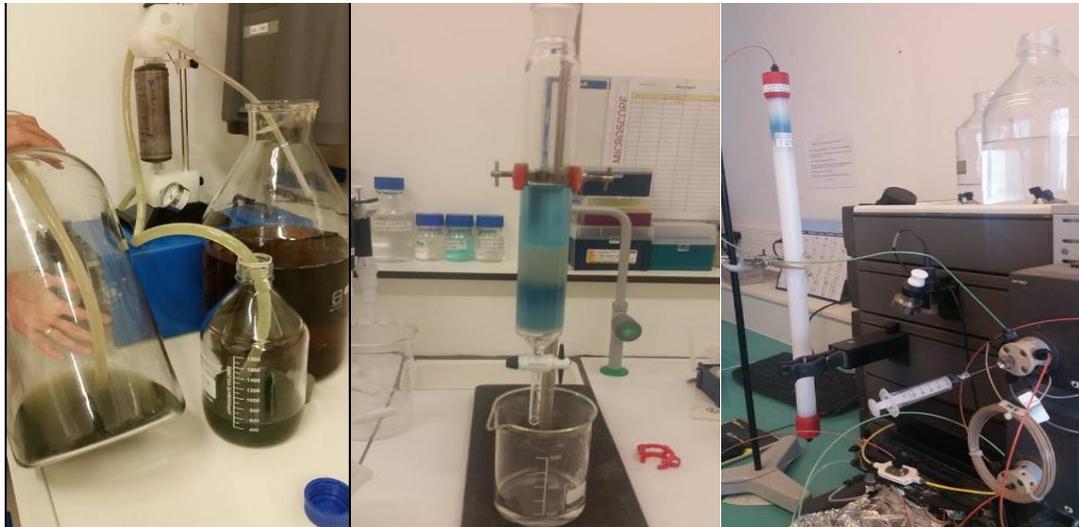


Figura 31. Producción de LAC3 en *A. niger* y purificación. A) Sobrenadante, B) DEAE-Sepharose, C) Saphacryl S-100.

En la Tabla 12, se presentan las etapas de la purificación. Se determinaron en la muestra obtenida la actividad volumétrica, la actividad total en cada paso de purificación y para el último paso (Saphacryl- S-100) se determinó la actividad específica. Se obtuvo un máximo de 5000 U/mL y una actividad total de 250,000 U, esta producción es comparable con la reportada por Mekmouche *et al.* [17] que han reportado un aumento hasta de 200 veces más que en *S. cerevisiae*, cuando se purifica de *A. niger*.

Tabla 12. Purificación de LAC33 recombinante de *A. niger*. Las actividades fueron medidas con ABTS como sustrato.

Paso	[Proteína]	Vol Total	U/mL	Actividad Total (U)	AE (U/mg)
SN*		8L	78.495	627960	
DEAE-Sepharose		175mL	2355.7	412247	
Saphacryl S-100	30	50mL	5000	250000	166.7

AE: Actividad Específica

SN: Sobrenadante

Se tomaron muestras del fermentador cada 24 horas durante los 5 días de producción, en donde se puede observar que la producción enzimática inicia en el día 3 y tiene como máximo el día 6, Figura 32. Al finalizar la etapa de producción en fermentador se midió la

oxidación siringaldazina a 525nm ($\epsilon = 65,000 \text{ Lmol}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$), utilizando un espectrofotómetro UV/Vis. Las actividades enzimáticas se expresaron en unidades internacionales (U), en donde se obtuvo una actividad volumétrica de 1800 U/ml y una actividad específica de 60U/mg.

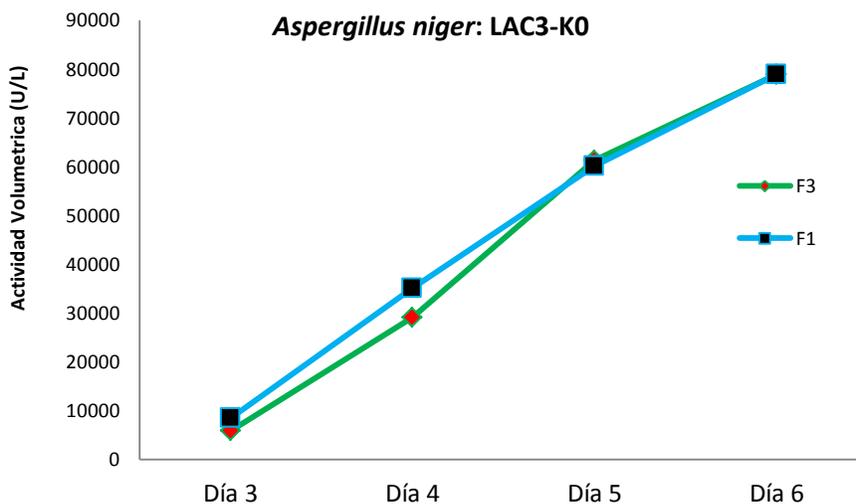


Figura 32. Cinética de actividad enzimática de LAC3 en dos fermentadores (F3 y F1) durante 6 días, con ABT como sustrato.

5.4.2 Funcionalización de LAC3 en Ru

Una vez purificada LAC3, se inmovilizó en partículas de rutenio (Ru) por el método ya descrito anteriormente por Mc Farland *et al.* [65], usando 50 μM de enzima, 10 eq. de aldehído y 500 μM de Ru en un volumen de reacción de 2.5 μL , dicha reacción se llevó a cabo en agitación “over night” a temperatura ambiente y posteriormente se purificó en una columna Sephadex™ G-25, tampón 20 mM acetato más 100mM NaCl pH 5.6.

Los grupos amino de las lisinas poseen propiedades de reacción que no tienen otros residuos de aminoácidos y que son aprovechados en la funcionalización con otras moléculas. El grupo del Dr. Tron tiene experiencia en la funcionalización de lisinas, Figura 33. Esta funcionalización une covalentemente una molécula que servirá como ancla reactiva para posteriormente ser acoplada mediante una reacción con los complejos de

interés, con la meta de establecer los mejores sitios de anclaje para transplantar complejos con funciones catalíticas de las variantes sencillas de lisina.

La reacción de conjugación es la siguiente: 50 mM Enzima + 10 eq Aldehído + Iridium 500 μ M, en un volumen total de la reacción de 2.5 mL durante 72 h en agitación a temperatura ambiente.

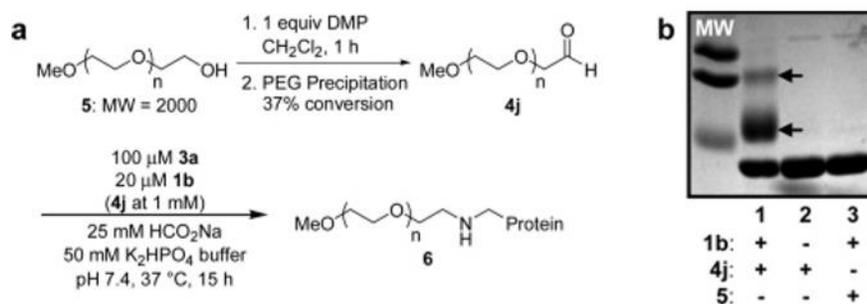


Figura 33. Conjugación de PEG a lisozima usando un procedimiento de dos pasos. (a) Los alcoholes PEG disponibles comercialmente se pueden oxidar para producir aldehídos antes de la conjugación con proteínas mediante alquilación reductora. (b) El análisis SDS-PAGE de 6 muestra la formación de conjugados alquilados simple y doblemente. Tomado de McFarland y Francis, [65].

Después de 24 h de agitación, la mezcla de reacción se pasó por cromatografía de exclusión de tamaño (Sephadex G25) equilibrada con tampón de acetato (50 mM, pH 5,5) que contenía NaCl 100 mM para eliminar el exceso de reactivo, Figura 34.

Para verificar la funcionalización y su eficiencia se observaron los espectros UV/Vis a 450/601 nm, Figura 34B. Además se midió actividad enzimática y la concentración de proteína, Robert *et al.* [18] sondea los residuos de lisina accesibles a la superficie de las enzimas UNIK's y LAC3, seleccionando cromóforos de rutenio (II) – tipo polipiridina por las siguientes razones: 1) su banda de absorción intensa en el espectro visible a λ_{max} 450 nm. Esta banda no solapa las características de la banda λ_{max} 605 nm del sitio CuT1 CuII de lacasas y, por lo tanto, la relación 450/605 se puede utilizar para evaluar el injerto eficiencia, Figura 34A.

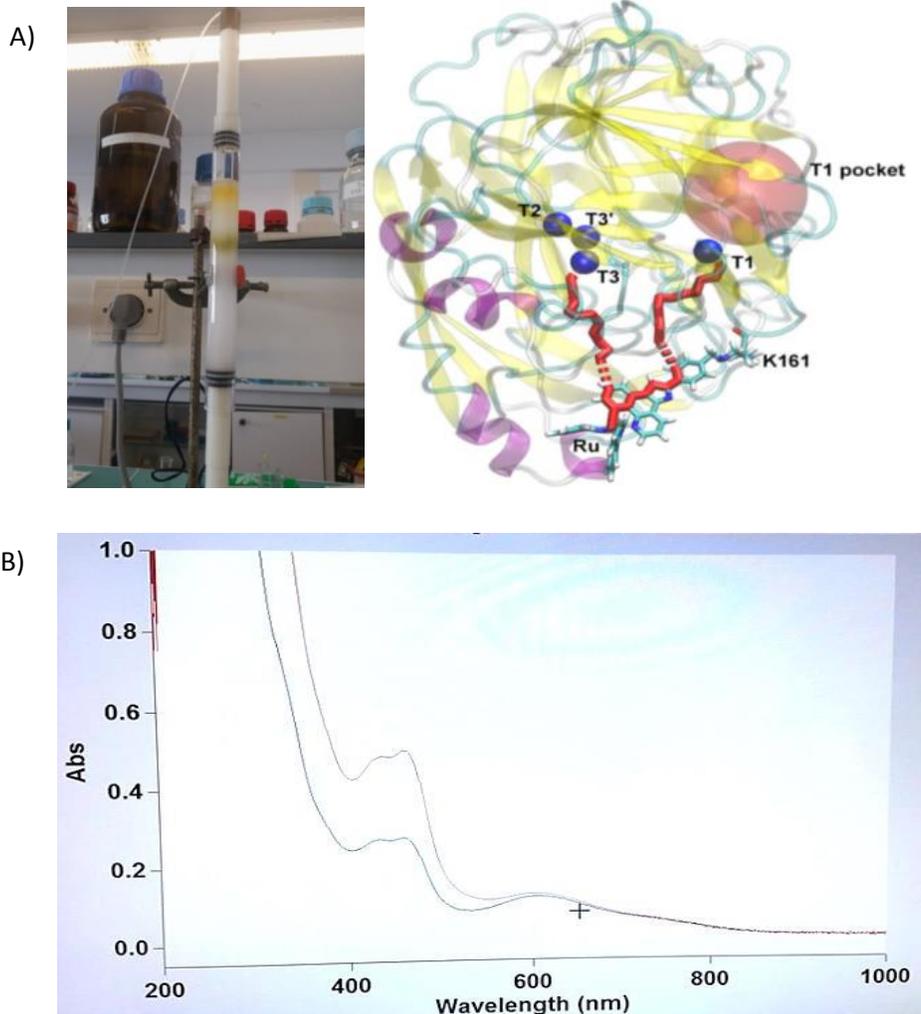


Figura 34. Espectros de absorción, en donde se observan los materiales utilizados en la inmovilización (LAC3/UNIK₁₆₁ y Ru). A) LAC3 inmovilizada sobre partículas de rutenio (Ru) [18]. El color azul es característico del CuT1 y el color amarillo del Ru. B) La enzima y el rutenio se evaluaron luego por espectroscopia UV / Vis a 606 nm y 450 nm.

Se obtuvo una actividad de 3090 U/mL con el híbrido LAC3Ru y 2859 U/mL con el híbrido UNIK₁₆₁Ru, la concentración de proteína fue de 16.4 y 18 mg/mL respectivamente y una actividad específica mayor en el híbrido LAC3Ru con 188.1 U/mg, Tabla 13.

No se encontró diferencia en la actividad específica de la LAC3Ru/UNIK₁₆₁ y la LAC3 purificada, una de las ventajas de la inmovilización covalente es que garantiza generalmente la mayor fuerza de unión entre la nanopartícula de soporte y la proteína, minimizando al mismo tiempo las cuestiones de fugas y aumentando la estabilidad

operativa hacia el calor, el pH, los disolventes orgánicos y el almacenamiento [62], por lo que sería interesante medir las nuevas variantes, esperando a que las enzimas funcionalizadas presenten una mayor estabilidad.

Tabla 13. LAC3Ru y la UNIK₁₆₁Ru inmovilizadas sobre rutenio. Se observa la actividad volumétrica, proteína y actividad específica con cada uno de los híbridos.

	AV* (U/mL)	Proteína [mg/mL]	AE* (U/mg)
LAC3Ru	3295	16.43	188.11
	2886		
UNIK ₁₆₁ Ru	2778	18	158.833333
	2940		

AE*: Actividad Específica

AV*: Actividad Volumétrica

5.4.3 Conclusión

UNIK₁₆₁ ha sido inmovilizada con partículas de rutenio anteriormente por el grupo del Dr. Thierry Tron, sin embargo se espera en un futuro, que al menos una de las variantes sea producida en *A. niger* e inmovilizada sobre nanopartículas como el rutenio, por lo que conocer y entender los protocolos fue parte de este trabajo.

***DISCUSION,
CONCLUSIONES Y
PERPECTIVAS
GENERALES***

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Las lacasas fúngicas son biocatalizadores con un gran potencial biotecnológico en muchas aplicaciones [9]. En los últimos tiempos, estas enzimas se han utilizado para desarrollar nanomateriales híbridos (NM). La unión covalente de las lacasas a la superficie de los nanomateriales puede producir propiedades novedosas que aún no se encuentran en la naturaleza; una unión controlada de la enzima en la superficie de un NM es un requisito previo para ajustar el rendimiento de un material híbrido. Por lo tanto, la superficie expuesta al solvente de cada enzima es interesante para ser estudiada con el fin de definir los puntos clave para una funcionalización de los residuos de K involucrados en más reacciones de acoplamiento. En este estudio utilizamos a una enzima desprovista de residuo de lisina (K0) derivada de la lacasa LAC3 de *Trametes versicolor* C30 como plataforma para introducir nuevos residuos de lisina en sitios seleccionados en la superficie de la enzima (Figura 15). Siete de los 85 residuos expuestos a la superficie fueron reemplazados por un residuo de K; todos los derivados de UNIK, incluidas las variantes con sustituciones superficiales espontáneas adicionales a la de lisina, permanecieron activos para la gama de sustratos probados, lo que indica la conservación de una propiedad muy característica de las lacasas y deseada para realizar manipulaciones posteriores. Se ha informado que la proximidad con el CuT1 de un sitio de funcionalización podría ser favorable y amplificar los efectos positivos en la inmovilización covalente de lacasas, por ejemplo, se detectó un aumento de la eficiencia de transferencia directa de electrones en relación con la orientación relativa de la enzima al material del electrodo [18, 37]. La unión covalente a la superficie del NM obtenida mediante la alquilación de un residuo de K genera una interfaz biomolecular definida por la naturaleza química del material y el microambiente de los residuos expuestos en la superficie alrededor del punto de funcionalización.

Todas las variantes de lacasa UNIK's preparadas en este estudio, así como las creadas previamente por Robert *et al.* [18] presentan una actividad, pH y estabilidad térmica comparables o incluso ligeramente mejorados similares a los controles LAC3 y K0 (Figura 19 y Tabla 7). Esto es digno de mención, ya que se sabe que muy pocas posiciones pueden mutar sin perder la actividad enzimática debido a la alta conservación de las regiones peptídicas en las lacasas [66].

Todas las variantes conservaron la capacidad de oxidar los cinco compuestos fenólicos seleccionados en diferentes grados. Se observó una disminución en K_m para Q238K (68%), V269K (69%), D96N/V269K/T479A (66%) en comparación con LAC3. Además, la K_{cat} aumentó de 2,2 a 7 veces en la mayoría de las variantes, el incremento más alto fue en UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ y UNIK_{D96N/V269K/T479A}, ver tabla 7. El efecto sobre K_m y K_{cat} de estas mutaciones fue similar al informado por Mollania *et al.* [67]. Entre las variantes individuales, el UNIK₂₃₈ ubicado a 17.5 Å de CuT1 presenta el rendimiento catalítico más alto hacia todos los sustratos analizados, esto revela que Q238 (un residuo conservado en lacasas de basidiomicetos) puede tener una influencia crucial en la afinidad del sustrato debido a la flexibilidad de la cadena lateral de la lisina y al aumento de una red hidrofóbica local como se explica a continuación. Además, la mayoría de las variantes mantuvieron la capacidad de oxidar los derivados del ácido *p*-hidroxibenzoico (ácido gálico y ácido vanílico) en contraste, la vainillina, un derivado *p*-hidroxibenzaldehído, fue oxidada eficientemente por las variantes UNIK₂₉₃ y UNIK_{D96N/V269K/T479A}; mientras tanto, se detectaron bajos porcentajes de oxidación en las otras variantes. Por otro lado, UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ y UNIK_{D96N/V269K /T479A}, mostraron un mejor desempeño en la oxidación de catecol. El ácido ferúlico, un derivado del ácido *p*-hidroxicinámico, presentó buenos porcentajes de oxidación con las variantes UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ y UNIK₂₇₀. Estos resultados confirman la afirmación de Festa *et al.* [68], de que las mutaciones en las lacasas, aunque no están directamente involucradas con el bolsillo de unión a sustrato, pueden influir en la eficiencia y estabilidad de la enzima, aunque en la presencia de amplias regiones altamente conservadas y funcionalmente esenciales en estas proteínas. Entre las variantes obtenidas al azar, la actividad específica relativa de UNIK_{D96N/V269K /T479A} es notablemente más alta que la de su contraparte UNIK₂₆₉. Las variaciones de superficie adicionales, D96N y T479A, que se encuentran en esta variante no se agrupan espacialmente en V269K. Sin embargo, a partir de un examen de nuestro modelo, parece que las posiciones 96 y 479 se enfrentan entre sí en la interfaz entre el dominio 1 similar a la cupredoxina y el dominio 3. Por lo tanto, es plausible que esta nueva combinación de aminoácidos (es decir, N96, A479) esté afectando localmente la estructura terciaria de la lacasa en los límites D1/D3 con una influencia de larga distancia sobre la oxidación del sustrato. En general, se piensa que, si los sitios mutados no están en estrecho contacto, las posibilidades de efecto mutacional

aditivo son altas, por el contrario, si tales mutaciones están en contacto, su contribución es baja [69, 70]. El fenómeno de la aditividad podría explicar el efecto positivo observado en UNIK_{D96N/V269K/T479A}, aunque este efecto no es claro en la variante UNIK_{A89S/D291K}.

Aunque no existe una tendencia común entre la estructura del sustrato y la actividad de las diferentes variantes, el alto potencial redox de la lacasa no siempre garantiza una oxidación del sustrato más eficiente [71]. El entorno hidrofóbico que rodea a CuT1 es uno de los principales determinantes bioquímicos en la modulación del potencial redox en lacasas fúngicas y la introducción de una red hidrofóbica aún más extensa cerca del sitio CuT1 podría tener un efecto positivo. El potencial redox podría aumentarse sin modificar completamente la bolsa catalítica, ya que de otro modo se podría impedir la interacción del sustrato [23]. Los elementos proteicos tales como cargas locales, parches hidrofóbicos (HP) y restos de glicosilación podrían contribuir de manera importante en la nueva interfaz intermolecular formada después de la unión covalente del NM y la lacasa. Está bien documentado que los HP son uno de los principales elementos que modulan las interacciones ligando-receptor [72]. La distribución de HP es probablemente un factor principal que afecta a la interfase NM de lacasa o la interfase formada con moléculas LAC3 vecinas en la superficie NM. Los diferentes HP dispersos sobre la superficie de K0 (Figura 22) pueden ser importantes para diseñar áreas de interacción dependiendo de la naturaleza del NM utilizado. En particular, la distribución de residuos de K parece ser un contribuyente principal al límite de la superficie polar/apolar en diferentes HP [72, 73] y parece influir positivamente en la relación estructura-función de lacasa.

Por lo tanto, más allá de la justificación de seleccionar un residuo de lisina para la funcionalización (selectividad de la reacción, distribución en la enzima natural), el uso de este aminoácido específico es particularmente apropiado ya que puede desempeñar un papel importante en el diseño de interfaces heterogéneas. Por ejemplo, para la variante Q238K, los residuos que rodean la posición 238 (N211; S236; F240, P300), Figura 23, están formando un HP genuino que podría beneficiarse de la contribución hidrofóbica de lisina que puede tener un efecto positivo en el bolsillo hidrofóbico cerca de CuT1. Sin embargo, el comportamiento de cada variante es único y requiere un examen detenido para comprender el papel que desempeña HP en los procesos de funcionalización futuros.

6.2 CONCLUSIONES GENERALES

Todas las variantes de UNIK conservaron propiedades enzimáticas como la capacidad oxidativa y la estabilidad operativa. Por lo tanto, un área relativamente grande de la superficie de LAC3 expuesta al solvente parece que puede tolerar mutaciones en diferentes sitios sin una alteración dramática de las relaciones estructura-función. Esto refuerza la idea de que la funcionalización de lacasa se puede abordar de manera pertinente desde cualquier ubicación de la superficie injertada en una entidad redox (es decir, material de electrodo o complejo de metal de transición). Siguiendo este razonamiento, se pueden proponer UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ y UNIK₂₇₀ para futuros injertos de electrodos a partir de los cuales la orientación debería favorecer la transferencia directa de electrones al CuT1. Por otro lado, UNIK₂₅₄, UNIK₂₈₃, UNIK₂₉₁ o UNIK₂₉₃ proporciona un punto de anclaje en la punta del dominio 2 y, por lo tanto, ofrecer la oportunidad de probar una orientación sin DET. Es necesario evaluar varios sitios para ajustar la interacción entre el LAC3 inmovilizado y el material injertado.

6.3 PERSPECTIVAS

- 1) Concluir la cuarta y última etapa de este trabajo para lo cual se espera hacer la producción a gran escala en *A. niger* y la posterior purificación de al menos una de las variantes, así se podrá hacer la caracterización bioquímica de la enzima purificada.
- 2) Al final de la última etapa y con el material caracterizado se pretende utilizarlo en al menos una reacción de funcionalización covalente con un nanomaterial seleccionado de acuerdo a las características bioquímicas de la enzima purificada y se espera obtener la caracterización bioelectrocatalítica de un híbrido lacasa-nanosoporte y/o electrodo de lacasa con una orientación única.

PUBLICACIÓN

=====STRUCTURAL-FUNCTIONAL ANALYSIS OF BIOPOLYMERS AND THEIR
COMPLEXES=====

UDC 577.151:577.033

RELEVANCE OF SURFACE-EXPOSED LYSINE RESIDUES DESIGNED FOR FUNCTIONALIZATION OF
LACCASE[#]

A. A. Arteaga-Castrejón¹, M. R. Trejo-Hernández¹, Y. Mekmouche², A. Amouric²,
P. Rousselot-Pailley², V. Robert², T. Tron^{2, **}, F. Martínez-Morales^{1, *}

¹Centro de Investigación en Biotecnología, Morelos, 62209 México

²Aix Marseille Université, Centrale Marseille, CNRS, , Marseille, 13397 France

*E-mail: fernandomm@uaem.mx

**E-mail: thierry.tron@univ-amu.fr

Received September 05, 2021

Revised December 02, 2021

Accepted for publication December 10, 2021

Fungal laccases are oxidoreductases with low-specificity for substrates. The characterization of laccase's surface is a prerequisite used to obtain hybrid catalysts with new properties. Surface-exposed lysine residues are targets in immobilization reactions. In this work, LAC3-K0, an enzyme devoid of lysine, was used as a platform to detect potential surface-exposed sites suitable for replacement with a lysine residue. Seven sites were selected from a LAC3-K0 3-D model, and single lysine mutants (UNIK_n, n = residue number) were obtained by site-directed mutagenesis. All mutants were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A and detected as functional secreted proteins by their ability to oxidize guaiacol or 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) on agar plates. All variants were active at acidic pH but presented no activity at neutral pH, as expected. Likewise, variants were stable a temperature between 15–55°C, and were completely inactivated at 70°C. Oxidation assays revealed that the replacement of one or two surface residues with lysine greatly affected enzyme activity and substrate specificity. The catalytic parameters (K_M^{app} and k_{cat}^{app}) determined with ABTS were found to be different among the variants; the V_{max}^{app} was 1.5–2 fold higher in UNIK₂₆₉ and triple mutant, with a K_M^{app} of 0.27 and 0.30, respectively; k_{cat}^{app} was 30.25 in UNIK₂₃₈ and 32.34 in the triple mutant. The role of hydrophobic patches detected on the surface of LAC3-K0 was determined to be a favorable factor to be considered in the interaction of hybrid materials. All variants with uniquely surface located lysine created in this work can be in demand for obtaining laccases with a certain substrate specificity in the design of hybrid materials.

Keywords: laccase, oriented functionalization, site-directed mutagenesis, UNIK

REFERENCIAS

1. Mate, D.M. and M. Alcalde, *Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology*. Microbial Biotechnology, 2017. **10**(6): p. 1457-1467.
2. Stanzione, I., et al., *Beyond natural laccases: extension of their potential applications by protein engineering*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020. **104**(3): p. 915-924.
3. Bertrand, B., F. Martinez-Morales, and M.R. Trejo-Hernandez, *Upgrading Laccase Production and Biochemical Properties: Strategies and Challenges*. Biotechnol Prog, 2017. **33**(4): p. 1015-1034.
4. Martínez, A.T., et al., *Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations*. Biotechnology Advances, 2017. **35**(6): p. 815-831.
5. Pardo, I., et al., *A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 15669.
6. Su, J., et al., *Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols*. Crit Rev Biotechnol, 2018. **38**(2): p. 294-307.
7. Pardo, I. and S. Camarero, *Exploring the Oxidation of Lignin-Derived Phenols by a Library of Laccase Mutants*. Molecules, 2015. **20**(9): p. 15929-43.
8. Yin, Q., et al., *The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization*. AMB Express, 2019. **9**(1): p. 151-151.
9. Pezzella, C., L. Guarino, and A. Piscitelli, *How to enjoy laccases*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015. **72**(5): p. 923-940.
10. Mateo, C., et al., *Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques*. Enzyme and Microbial Technology, 2007. **40**(6): p. 1451-1463.
11. Hoarau, M., S. Badieyan, and E.N.G. Marsh, *Immobilized enzymes: understanding enzyme – surface interactions at the molecular level*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2017. **15**(45): p. 9539-9551.
12. Shen, L. and J. Zhu, *Oriented Protein Nanoarrays on Block Copolymer Template*. Macromolecular Rapid Communications, 2016. **37**(6): p. 494-499.
13. Liu, Y., et al., *Molecular Orientation of Enzymes Attached to Surfaces through Defined Chemical Linkages at the Solid–Liquid Interface*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(34): p. 12660-12669.
14. Lalaoui, N., et al., *Direct Electron Transfer between a Site-Specific Pyrene-Modified Laccase and Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Supramolecular Assemblies for Bioelectrocatalytic Dioxygen Reduction*. ACS Catalysis, 2016. **6**(3): p. 1894-1900.
15. Gentil, S., et al., *Efficiency of Site-Specific Clicked Laccase–Carbon Nanotubes Biocathodes towards O₂ Reduction*. Chemistry – A European Journal, 2020. **26**(21): p. 4798-4804.
16. Klonowska, A., et al., *LAC3, a new low redox potential laccase from Trametes sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast*. Enzyme and Microbial Technology, 2005. **36**(1): p. 34-41.
17. Mekmouche, Y., et al., *Laccases as palladium oxidases*. Chemical Science, 2015. **6**(2): p. 1247-1251.
18. Robert, V., et al., *Probing the Surface of a Laccase for Clues towards the Design of Chemo-Enzymatic Catalysts*. ChemPlusChem, 2017. **82**(4): p. 607-614.
19. Singh, R., et al., *Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture*. 2017. **7**(1): p. 016-0586.
20. Viswanath, B., et al., *Fungal laccases and their applications in bioremediation*. Enzyme Res, 2014. **163242**(10): p. 15.
21. Mehra, R., et al., *A structural-chemical explanation of fungal laccase activity*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 17285.

22. Arregui, L., et al., *Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation*. Microbial Cell Factories, 2019. **18**(1): p. 200.
23. Mateljak, I., et al., *Increasing Redox Potential, Redox Mediator Activity, and Stability in a Fungal Laccase by Computer-Guided Mutagenesis and Directed Evolution*. ACS Catalysis, 2019. **9**(5): p. 4561-4572.
24. Mot, A.C. and R. Silaghi-Dumitrescu, *Laccases: complex architectures for one-electron oxidations*. Biochemistry, 2012. **77**(12): p. 1395-407.
25. Lazarides, T., et al., *Visible Light-Driven O₂ Reduction by a Porphyrin–Laccase System*. Journal of the American Chemical Society, 2013. **135**(8): p. 3095-3103.
26. Zhukova, Y., et al., *Atomic structure of unligated laccase from *Cerrena maxima* at 1.76 Å with molecular oxygen and hydrogen peroxide*. Crystallography Reports, 2010. **55**: p. 436-447.
27. Majeau, J.A., S.K. Brar, and R.D. Tyagi, *Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants*. Bioresour Technol, 2010. **101**(7): p. 2331-50.
28. Piscitelli, A., et al., *Heterologous laccase production and its role in industrial applications*. Bioengineered bugs, 2010. **1**(4): p. 252-262.
29. Schückel, J., A. Matura, and K.-H. van Pée, *One-copper laccase-related enzyme from *Marasmius sp.*: Purification, characterization and bleaching of textile dyes*. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **48**: p. 278-84.
30. Zhu, Y., et al., *Axial bonds at the T1 Cu site of *Thermus thermophilus* SG0.5JP17-16 laccase influence enzymatic properties*. FEBS Open Bio, 2019. **9**(5): p. 986-995.
31. Piscitelli, A., et al., *Fungal laccases: versatile tools for lignocellulose transformation*. C R Biol, 2011. **334**(11): p. 789-94.
32. Singh Arora, D. and R. Kumar Sharma, *Ligninolytic fungal laccases and their biotechnological applications*. Appl Biochem Biotechnol, 2010. **160**(6): p. 1760-88.
33. Giardina, P., et al., *Laccases: a never-ending story*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(3): p. 369-85.
34. Rodgers, C.J., et al., *Designer laccases: a vogue for high-potential fungal enzymes?* Trends Biotechnol, 2010. **28**(2): p. 63-72.
35. Mate, D.M. and M. Alcalde, *Laccase engineering: from rational design to directed evolution*. Biotechnol Adv, 2015. **33**(1): p. 25-40.
36. Hitaishi, V.P., et al., *Interplay between Orientation at Electrodes and Copper Activation of *Thermus thermophilus* Laccase for O₂ Reduction*. Journal of the American Chemical Society, 2020. **142**(3): p. 1394-1405.
37. Li, Y., et al., *Construction and direct electrochemistry of orientation controlled laccase electrode*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **446**(1): p. 201-5.
38. Antošová, Z. and H. Sychrová, *Yeast Hosts for the Production of Recombinant Laccases: A Review*. Mol Biotechnol, 2016. **58**(2): p. 93-116.
39. Robert, V., et al., *Engineering laccases: in search for novel catalysts*. Curr Genomics, 2011. **12**(2): p. 123-9.
40. Osma, J.F., J.L. Toca-Herrera, and S. Rodríguez-Couto, *Uses of laccases in the food industry*. Enzyme Res, 2010. **30**(918761): p. 918761.
41. Rivera-Hoyos, C.M., et al., *Fungal laccases*. Fungal Biology Reviews, 2013. **27**(3): p. 67-82.
42. Mayolo-Deloya, K., et al., *Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Partially Purified Laccase from Residual Compost of *Agaricus bisporus**. Chemical Engineering & Technology, 2011. **34**(8): p. 1368-1372.
43. Le Goff, A., M. Holzinger, and S. Cosnier, *Recent progress in oxygen-reducing laccase biocathodes for enzymatic biofuel cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2015. **72**(5): p. 941-952.

44. Cosnier, S., M. Holzinger, and A. Le Goff, *Recent Advances in Carbon Nanotube-Based Enzymatic Fuel Cells*. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2014. **2**(45).
45. Balland, V., et al., *Oriented immobilization of a fully active monolayer of histidine-tagged recombinant laccase on modified gold electrodes*. Chemistry, 2008. **14**(24): p. 7186-92.
46. Zhou, S., et al., *Production and manipulation of blue copper oxidases for technological applications*. Methods Enzymol, 2018. **613**: p. 17-61.
47. Arteaga-Castrejón, A., et al., *Relevance of Surface-Exposed Lysine Residues Designed for Functionalization of Laccase*. Molecular Biology, 2022.
48. Bertrand, B., et al., *Functional expression, production, and biochemical characterization of a laccase using yeast surface display technology*. Fungal Biol, 2016. **120**(12): p. 1609-1622.
49. Lalaoui, N., et al., *Efficient direct oxygen reduction by laccases attached and oriented on pyrene-functionalized polypyrrole/carbon nanotube electrodes*. Chemical Communications, 2013. **49**(81): p. 9281-9283.
50. Xu, Z., A. Colosimo, and D.C. Gruenert, *Site-directed mutagenesis using the megaprimer method*. Methods Mol Biol, 2003. **235**: p. 203-7.
51. *Rapid and efficient site-directed mutagenesis by the single-tube megaprimer PCR method*. Nature Methods, 2004. **1**(2): p. 181-182.
52. Gietz, R.D. and R.A. Woods, *Yeast Transformation by the LiAc/SS Carrier DNA/PEG Method*, in *Yeast Protocol*, W. Xiao, Editor. 2006, Humana Press: Totowa, NJ. p. 107-120.
53. Wong, K.-S., et al., *A Novel Lentinula edodes Laccase and Its Comparative Enzymology Suggest Guaiacol-Based Laccase Engineering for Bioremediation*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66426.
54. Pardo, I. and S. Camarero, *Laccase engineering by rational and evolutionary design*. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2015. **72**(5): p. 897-910.
55. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1): p. 248-254.
56. Hebditch, M. and J. Warwicker, *Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics*. Scientific Reports, 2019. **9**(1): p. 1969.
57. Wang, X., B. Yao, and X. Su, *Linking Enzymatic Oxidative Degradation of Lignin to Organics Detoxification*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(11): p. 3373.
58. Record, E., et al., *Expression of the Pycnoporus cinnabarinus laccase gene in Aspergillus niger and characterization of the recombinant enzyme*. Eur J Biochem, 2002. **269**(2): p. 602-9.
59. Arca-Ramos, A., et al., *Assessing the use of nanoimmobilized laccases to remove micropollutants from wastewater*. Environ Sci Pollut Res Int, 2016. **23**(4): p. 3217-28.
60. Zucca, P. and E. Sanjust, *Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms*. Molecules, 2014. **19**(9): p. 14139-94.
61. Patel, S.K., et al., *Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability*. J Microbiol Biotechnol, 2014. **24**(5): p. 639-47.
62. Oliveira, S.F., et al., *Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications*. Carbon, 2015. **95**: p. 767-779.
63. Blanford, C.F., R.S. Heath, and F.A. Armstrong, *A stable electrode for high-potential, electrocatalytic O(2) reduction based on rational attachment of a blue copper oxidase to a graphite surface*. Chem Commun, 2007. **7**(17): p. 1710-2.
64. Arrocha, A.A., et al., *Enzyme orientation for direct electron transfer in an enzymatic fuel cell with alcohol oxidase and laccase electrodes*. Biosens Bioelectron, 2014. **61**: p. 569-74.

65. McFarland, J.M. and M.B. Francis, *Reductive alkylation of proteins using iridium catalyzed transfer hydrogenation*. J Am Chem Soc, 2005. **127**(39): p. 13490-1.
66. Koschorreck, K., R.D. Schmid, and V.B. Urlacher, *Improving the functional expression of a Bacillus licheniformis laccase by random and site-directed mutagenesis*. BMC Biotechnol, 2009. **9**: p. 12.
67. Mollania, N., et al., *Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop*. Enzyme and Microbial Technology, 2011. **49**(5): p. 446-452.
68. Festa, G., et al., *Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2008. **72**(1): p. 25-34.
69. Ming, D., R. Chen, and H. Huang, *Amino-Acid Network Clique Analysis of Protein Mutation Non-Additive Effects: A Case Study of Lysozyme*. International Journal of Molecular Sciences, 2018. **19**(5): p. 1427.
70. Konishi, A., X. Ma, and K. Yasukawa, *Stabilization of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis of surface residue Val433*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 2014. **78**: p. 75-8.
71. Glazunova, O.A., et al., *Catalytic Efficiency of Basidiomycete Laccases: Redox Potential versus Substrate-Binding Pocket Structure*. Catalysts, 2018. **8**(4): p. 152.
72. Lijnzaad, P., H.J.C. Berendsen, and P. Argos, *Hydrophobic patches on the surfaces of protein structures*. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 1996. **25**(3): p. 389-397.
73. Ernst, H.A., et al., *A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases*. PLoS One, 2018. **13**(11): p. e0206589-e0206589.

ANEXOS

Anexo 1

>pAN52-Q238K (CAG/AAA).

Query	328	GACGGTGCGGCATTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGAC	387
Sbjct	369	GACGGTGCGGCATTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGAC	428
Query	388	TTCACGGCGACGGACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTCGACGCAGTAC	447
Sbjct	429	TTCACGGCGACGGACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTCGACGCAGTAC	488
Query	448	TGTGATGGCCTGCGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTG	507
Sbjct	489	TGTGATGGCCTGCGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTG	548
Query	508	TACGATGTGGACGACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCG	567
Sbjct	549	TACGATGTGGACGACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCG	608
Query	568	CGTCTCGGCGCTCGTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGT	627
Sbjct	609	CGTCTCGGCGCTCGTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGT	668
Query	628	GCGGCAGGCGCGATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGT	687
Sbjct	669	GCGGCAGGCGCGATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGT	728
Query	688	TACCGCTTCCGCCTGGTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTCAACTTCACCATCCAAGAT	747
Sbjct	729	TACCGCTTCCGCCTGGTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTCAACTTCACCATCCAAGAT	788
Query	748	CACAACATGACGATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCG	807
Sbjct	789	CACAACATGACGATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCG	848
Query	808	ATC AAA ATTTTCGCCGGGAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGT	867
Sbjct	849	ATC CAG ATTTTCGCCGGGAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGT	908
Query	868	AACTACTGGATCCAGGCCGTTCC T AACACCGGTACAGTACCACCGATGGCGGC G TAAAC	927
Sbjct	909	AACTACTGGATCCAGGCCGTTCC T AACACCGGTACAGTACCACCGATGGCGGC G TAAAC	968
Query	928	TCTGCCATTCTGCGTTACGACACGGCGGACCCGATCGA A CCCGACGCCGAGACCC C ACC	987
Sbjct	969	TCTGCCATTCTGCGTTACGACACGGCGGACCCGATCGA A CCCGACGCCGAGACCC C ACC	1028
Query	988	AGCAGTATCCCGCTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCGCTGGAGAACCTCGCAGCGCC G GA	1047
Sbjct	1029	AGCAGTATCCCGCTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCGCTGGAGAACCTCGCAGCGCC G GA	1088
Query	1048	GATCCACCGTCGGTGGTGT T GACCTGGCGATGAACCTGGAGTTCGACTTTAATGGC A CG	1107
Sbjct	1089	GATCCACCGTCGGTGGTGT T GACCTGGCGATGAACCTGGAGTTCGACTTTAATGGC A CG	1148

>pAN52-D254K (GAT/AAA).

Query	281	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	340
Sbjct	321	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	380
Query	341	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	400
Sbjct	381	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	440
Query	401	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	460
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	500
Query	461	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	520
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	521	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	580
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	620
Query	581	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	640
Sbjct	621	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	680
Query	641	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTAACGTTACCAAGGCTCGCGTTACCGTTCCGC	700
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTAACGTTACCAAGGCTCGCGTTACCGTTCCGC	740
Query	701	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTTCAACTTACCATCCAAGATCACAACATGACG	760
Sbjct	741	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTTCAACTTACCATCCAAGATCACAACATGACG	800
Query	761	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	820
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	821	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAA AAA ATCGGTA A ACTACTGGATC	880
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAA GAT ATCGGTA A ACTACTGGATC	920
Query	881	CAGGCCGTTCCCTAACACCCGGTACAGTACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	940
Sbjct	921	CAGGCCGTTCCCTAACACCCGGTACAGTACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980
Query	941	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGAGACCCACCAGCAGTATCCCG	1000
Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGAGACCCACCAGCAGTATCCCG	1040
Query	1001	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCACCGTC	1060
Sbjct	1041	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCACCGTC	1100

>pAN52-/D96N/V269K/T479A (GAC/AAC).

Query	225	GGAGACAACCTCCAAATCAATGTCATCGACAATCTCTCCAATAGTACAATGCTCACTTCC	284
Sbjct	261	GGAGACAACCTCCAAATCAATGTCATCGACAATCTCTCCAATAGTACAATGCTCACTTCC	320
Query	285	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	344
Sbjct	321	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	380
Query	345	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACAACTTCACGGCGACG	404
Sbjct	381	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	440
Query	405	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	464
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	500
Query	465	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	524
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	525	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGGTCTCGGCGT	584
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGGTCTCGGCGT	620
Query	585	CGTTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCGGTGCGGCAGGCGGC	644
Sbjct	621	CGTTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCGGTGCGGCAGGCGGC	680
Query	645	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTCCGC	704
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTCCGC	740
Query	705	CTGGTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	764
Sbjct	741	CTGGTTCCCTGTCATGCGACCCGAACCTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	800
Query	765	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	824
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	825	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGATCAAGATATCGGTAACACTGGATC	884
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGATCAAGATATCGGTAACACTGGATC	920
Query	885	CAGGCCGTTCCCTAACACCGGTACAAAACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	944
Sbjct	921	CAGGCCGTTCCCTAACACCGGTACAGTACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980

>pAN52-/D96N/V269K/T479A (ACG/GCC).

Query	361	CTCTGCCATTCTGCGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGAGACCCCAC	420
Sbjct	968	CTCTGCCATTCTGCGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGAGACCCCAC	1027
Query	421	CAGCAGTATCCCGCTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGG	480
Sbjct	1028	CAGCAGTATCCCGCTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGG	1087
Query	481	AGATCCCACCGTCGGTGGTGTGACCTGGCGATGAACCTGGAGTTCGACTTTAATGGCAC	540
Sbjct	1088	AGATCCCACCGTCGGTGGTGTGACCTGGCGATGAACCTGGAGTTCGACTTTAATGGCAC	1147
Query	541	GTGGTTCTTTATCAACGGCGAGCCATTGTTCCCTCCTAGTGTCCCTGTTTTGCTGCAAAT	600
Sbjct	1148	GTGGTTCTTTATCAACGGCGAGCCATTGTTCCCTCCTAGTGTCCCTGTTTTGCTGCAAAT	1207
Query	601	CATGAGTGGCGCGCAGTCTGCTGCGGACCTTCTCCCGAGCGGAAGCGTATACACGCTCCC	660
Sbjct	1208	CATGAGTGGCGCGCAGTCTGCTGCGGACCTTCTCCCGAGCGGAAGCGTATACACGCTCCC	1267
Query	661	CGCCAACTCTACCATCGAGATTTCCCTCCCTATGAACACTACAGCAGCGCCCGGTGCGCC	720
Sbjct	1268	CGCCAACTCTACCATCGAGATTTCCCTCCCTATGAACACTACAGCAGCGCCCGGTGCGCC	1327
Query	721	GCATCCGTTCCACCTTACGGGCACACGTTCTACGTGCGCAGCGCGGCAGCACCGA	780
Sbjct	1328	GCATCCGTTCCACCTTACGGGCACACGTTCTACGTGCGCAGCGCGGCAGCACCGA	1387
Query	781	ATACAACTACGTGAACCCACCCAGCGGACACCGTCAGCACGGGCACCGAGAGACAA	840
Sbjct	1388	ATACAACTACGTGAACCCACCCAGCGGACACCGTCAGCACGGGCACCGAGAGACAA	1447
Query	841	TGTCACCATCCGGTTCACGACGAACAACCCGCCCCGTGGTTCCTCCACTGCCACATCGA	900
Sbjct	1448	TGTCACCATCCGGTTCACGACGAACAACCCGCCCCGTGGTTCCTCCACTGCCACATCGA	1507
Query	901	CTTTCACCTCGACGCCGGCTTCGCCATCGTGCTCAGCGAGGACACTCCGGACGCTGCTTC	960
Sbjct	1508	CTTTCACCTCGACGCCGGCTTCGCCATCGTGCTCAGCGAGGACACTCCGGACGCTGCTTC	1567
Query	961	GGCCAACGCGCCCTCCTCTGCGTGGGATGATCTTTGCCCCACTTATAACACCGACTATCC	1020
Sbjct	1568	GGCCAACACGCGCCCTCCTCTGCGTGGGATGATCTTTGCCCCACTTATAACACCGACTATCC	1627
Query	1021	CGACGGTCTCGGGCGCTGAGAGGCGAAGC	1049
Sbjct	1628	CGACGGTCTCGGGCGCTGAGAGGCGAAGC	1656

>pAN52-T270K (ACC/AAA).

Query	347	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	406
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	500
Query	407	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	466
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	467	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	526
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	620
Query	527	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAACGGTTTGGGCCGTGCCGAGGCGGC	586
Sbjct	621	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAACGGTTTGGGCCGTGCCGAGGCGGC	680
Query	587	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	646
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	740
Query	647	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	706
Sbjct	741	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	800
Query	707	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	766
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	767	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGTAACACTGGATC	826
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGTAACACTGGATC	920
Query	827	CAGGCCGTTCTTAACACCGGTACAGTCAAAACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	886
Sbjct	921	CAGGCCGTTCTTAACACCGGTACAGTCAACACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980
Query	887	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCG	924
Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCG	

>pAN52-D291K (GAC/AAA).

Query	370	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	429
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	500
Query	430	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	489
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	490	GACGATTCAACTGTTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCGTCTCGGCGCT	549
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCGTCTCGGCGCT	620
Query	550	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	609
Sbjct	621	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	680
Query	610	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	669
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	740
Query	670	CTGGTTTCCCTGTTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAAACATGACG	729
Sbjct	741	CTGGTTTCCCTGTTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAAACATGACG	800
Query	730	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGCGACTCGATCCAGATTTTC	789
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTGCGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	790	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGTAACACTGAGATC	849
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGTAACACTGAGATC	920
Query	850	CAGGCCGTTCCCTAACACTGGTACAGTACCACCGATGGCGGCGTAACTCTGCCATTCTG	909
Sbjct	921	CAGGCCGTTCCCTAACACCGGTACAGTACCACCGATGGCGGCGTAACTCTGCCATTCTG	980
Query	910	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACC AAA GCCGCAGACCCACCAGCAGTATCCCG	969
Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACC GAC GCCGCAGACCCACCAGCAGTATCCCG	1040
Query	970	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCGCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCCACCGTC	1029
Sbjct	1041	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCGCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCCACCGTC	1100
Query	1030	GGTGGTGTGACCTGGCGATGAACC	1054
Sbjct	1101	GGTGGTGTGACCTGGCGATGAACC	1125

>pAN52-A89S/D291K (GCC/TCC).

Query	215	GGAGACAACCTCCAAATCAATGTCATCGACAATCTCTCCAATAGTACAATGCTCACTTCC	274
Sbjct	261	GGAGACAACCTCCAAATCAATGTCATCGACAATCTCTCCAATAGTACAATGCTCACTTCC	320
Query	275	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	334
Sbjct	321	ACCACTATCCACTGGCACGGCTTCTTCCAGCACGGCACTAATTGGGCGGACGGTGCGGCA	380
Query	335	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGTCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	394
Sbjct	381	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	440
Query	395	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACCTGTCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	454
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACCTGTCGACGCAGTACTGTGATGGCCTG	500
Query	455	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	514
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	515	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	574
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	620
Query	575	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	634
Sbjct	621	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	680
Query	635	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	694
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	740
Query	695	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	754
Sbjct	741	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAACATGACG	800
Query	755	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCGATCCAGATTTTC	814
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	815	GCCGGGCAGAGATACTCCTTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGTAACACTACTGGATC	874
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTTCGTGCTCACCGCGGATCAAGATATCGGTAACACTACTGGATC	920
Query	875	CAGGCCGTTCCCTAACACTGGTACAGTCACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	934
Sbjct	921	CAGGCCGTTCCCTAACACTGGTACAGTCACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980
Query	935	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCTAAAGCCGACACCCACCAGCAGTATCCCG	994
Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCTAAAGCCGACACCCACCAGCAGTATCCCG	1040

>pAN52-D293K (GCA/AAA).

Query	311	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	370
Sbjct	381	TTCGTCAATCAATGTCCGATCTCGGCCGGCAATTCGTTCTTGTACGACTTCACGGCGACG	440
Query	371	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGACGACTGTGATGGCCTG	430
Sbjct	441	GACCAAGCCGGCACATTCTGGTATCACAGTCACTTGTGACGACGACTGTGATGGCCTG	500
Query	431	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	490
Sbjct	501	CGTGGTCCCATGGTTGTCTATGATCCCGACGATCCACATGCCTCCCTGTACGATGTGGAC	560
Query	491	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	550
Sbjct	561	GACGATTCAACTGTCATTACGCTCTCGGACTGGTACCACACTGCCGCGCTCTCGGCGCT	620
Query	551	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	610
Sbjct	621	CGTTTCCCTGCTGGGGCCGACTCAACTCTCATTAAACGGTTTGGGCCGTGCGGCAGGCGGC	680
Query	611	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	670
Sbjct	681	GATGCGGACGCCGCTCTCGCAGTATTCAACGTTACCCAAGGCTCGCGTTACCGCTTCCGC	740
Query	671	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAAACATGACG	730
Sbjct	741	CTGGTTTCCCTGTCATGCGACCCGAACTTCAACTTCACCATCCAAGATCACAAACATGACG	800
Query	731	ATCATCGAGGTTGATGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCGATCCAGATTTTC	790
Sbjct	801	ATCATCGAGGTTGATGGGTCAACGTCGAGCCCGTCACTGTCGACTCGATCCAGATTTTC	860
Query	791	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGTAACACTACTGGATC	850
Sbjct	861	GCCGGGCAGAGATACTCCTTCGTGCTCACCGGGATCAAGATATCGGTAACACTACTGGATC	920
Query	851	CAGGCCGTTCTTAACACCGGTACAGTCACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	910
Sbjct	921	CAGGCCGTTCTTAACACCGGTACAGTCACCACCGATGGCGGCGTTAACTCTGCCATTCTG	980
Query	911	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCAAA	970
Sbjct	981	CGTTACGACACGGCGGACCCGATCGAACCCGACGCCGCA	1040
Query	971	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCCACCGTC	1030
Sbjct	1041	CTCGTGGAGACAGACCTCGTCCCCTGGAGAACCTCGCAGCGCCCGGAGATCCCACCGTC	1100

Anexo 2

Visita al laboratorio de Francia por la estudiante de doctorado. Mayo 27-Julio 14, 2018

Como se describe previamente (*Mutagénesis sitio dirigido*), se obtuvieron las variantes T270K y D283K, el producto con la mutación deseada fue transformó en *S. cerevisiae* en donde se obtuvieron clonas positivas las cuales mostraron actividad guiacol en medio liquido (Figura 39).



Figura S1. Medio selectivo (MS) con Guaiacol 0.5% (p/v). Colonias transformadas de *S. cerevisiae* con T270K. 72 hrs a 30°C.

Misión Francesa Dr. Thierry Tron Noviembre 17-21, 2018

En una visita del Dr. Tron, ambos equipos de investigación analizaron los resultados obtenidos y planificaron las siguientes etapas del proyecto, como se describe previamente en *Perspectivas a corto plazo*, donde finalmente se obtuvieron las variantes Q238K, D254K, V269K y D291K, las cuales fueron transformadas en *S. cerevisiae* y después de la transformación, las células fueron siembran en medios selectivos y las placas se incuban a 28 ° C durante 4 días.

Actividad lacasa

Las pruebas de selección se pueden realizar en placas de actividad y luego en cultivos líquidos de clonas aisladas. Las micro placas de 96 pozos se adaptan al cultivo de transformantes de *S. cerevisiae*. Este es un método conveniente para la detección rápida de

un gran número de cultivos líquidos paralelos de transformantes, (Figura 41). Se tomarón las muestras cada 12 horas hasta las 72 h y determinó la actividad enzimática y la proteína. La variante UNIk₂₆₉ es la que muestra mayor actividad lacasa, Figura 41A. En la figura 41B, se muestran los resultados de la actividad específica; se observa un pico de mayor actividad a las 48 h para todas las variantes. Posteriormente, este tiempo de 48 horas se utiliza para obtener la mayor producción lacasa de todas las variantes obtenidas.

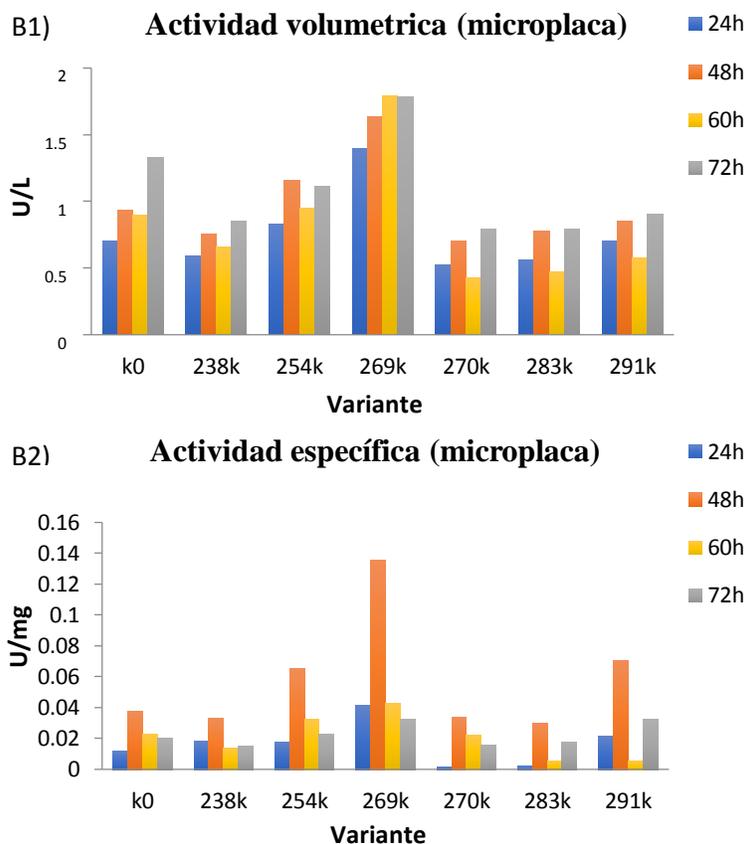
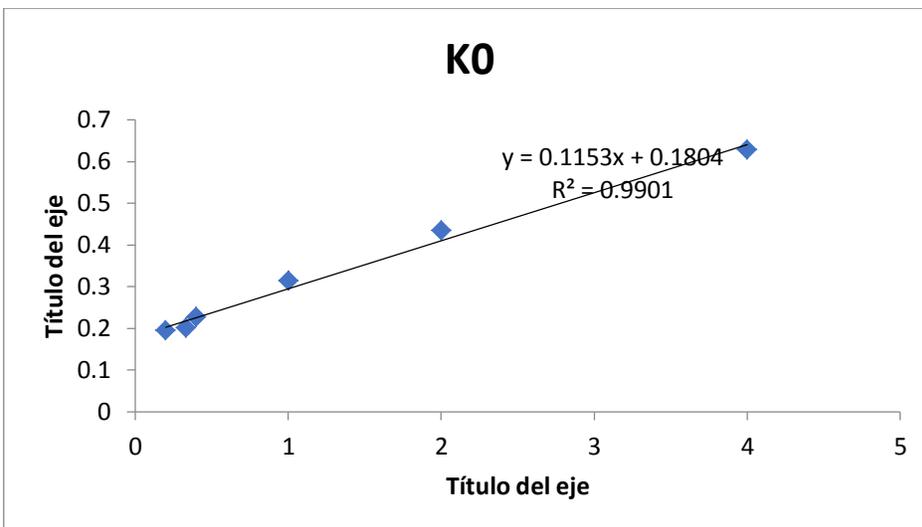
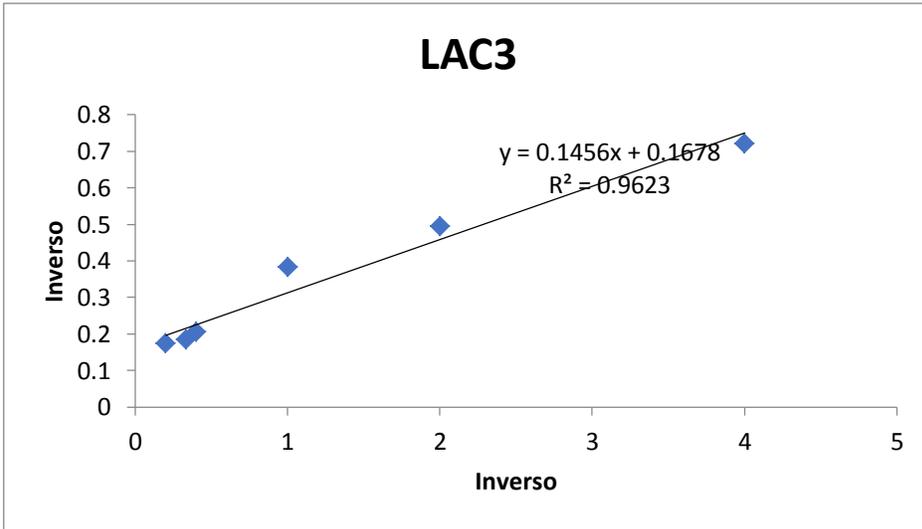
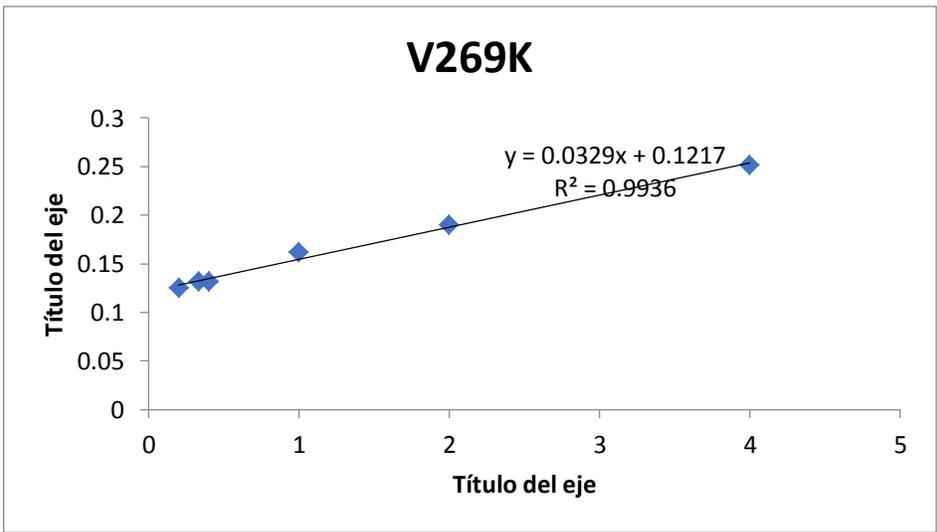
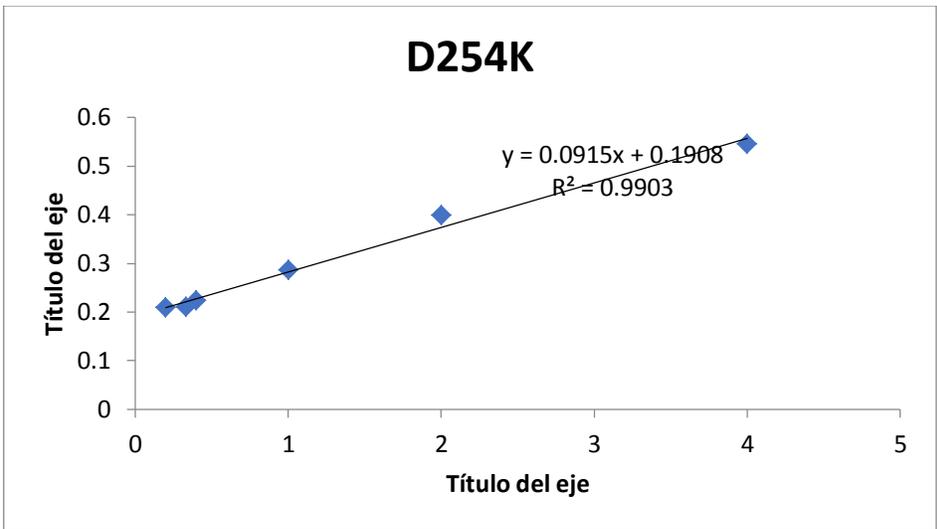
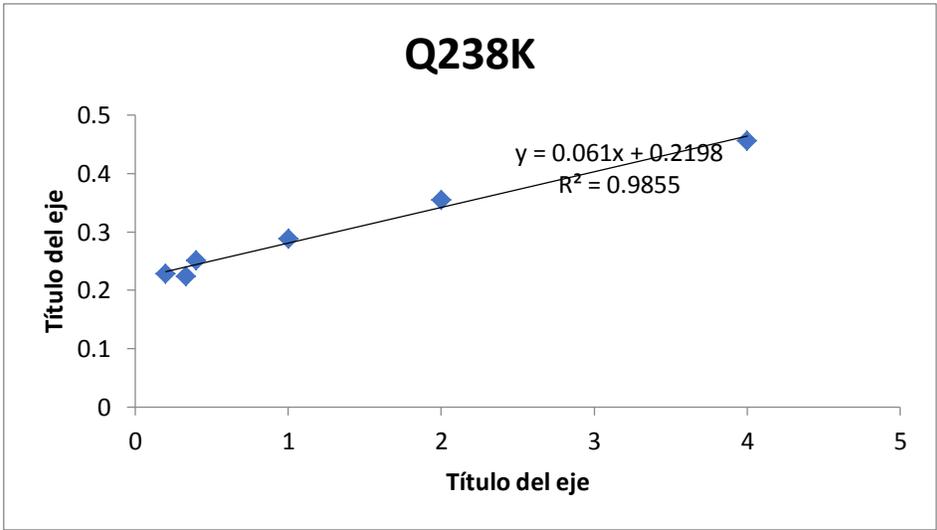
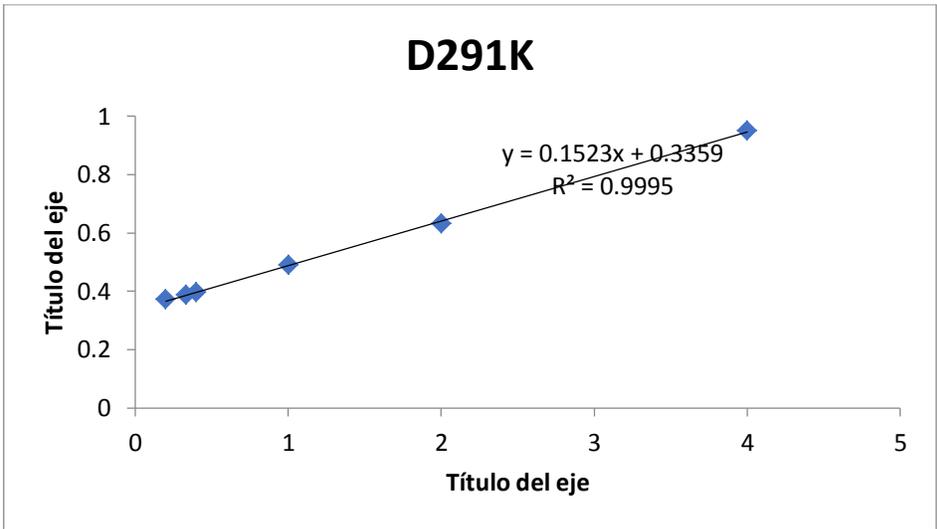
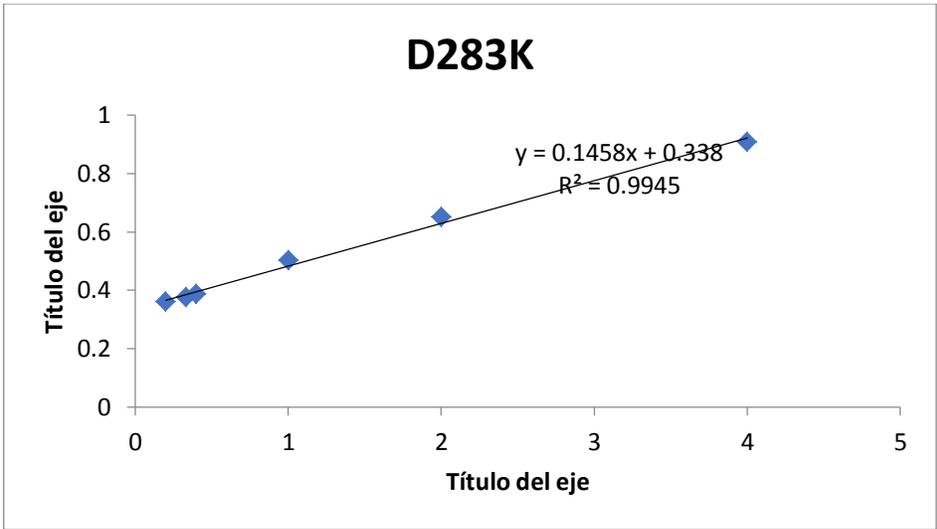
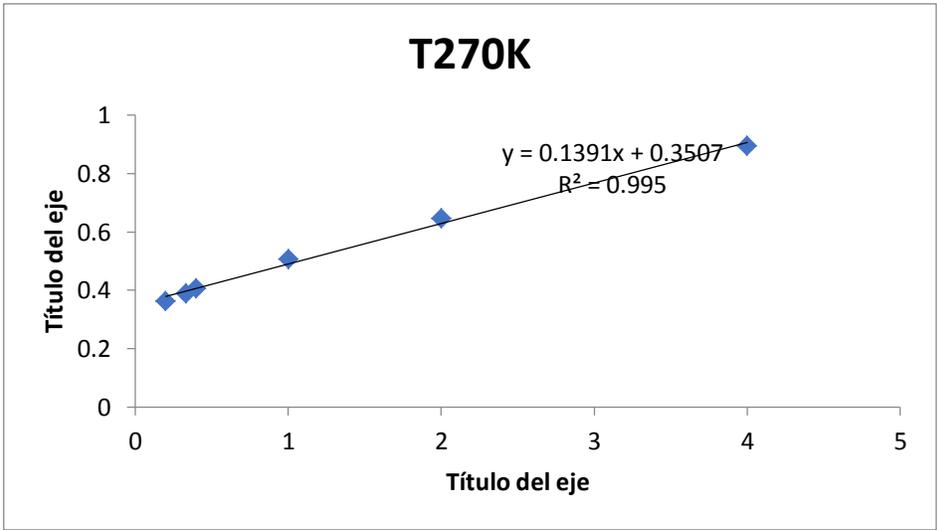


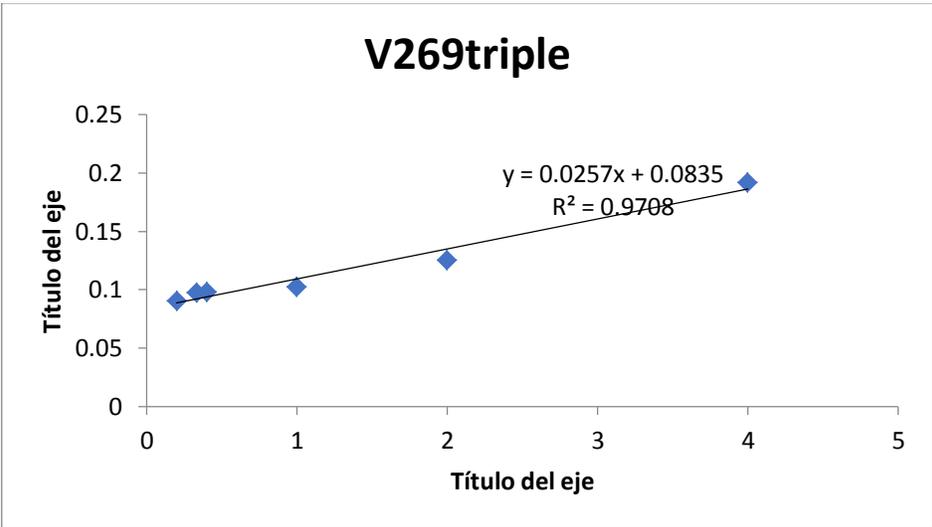
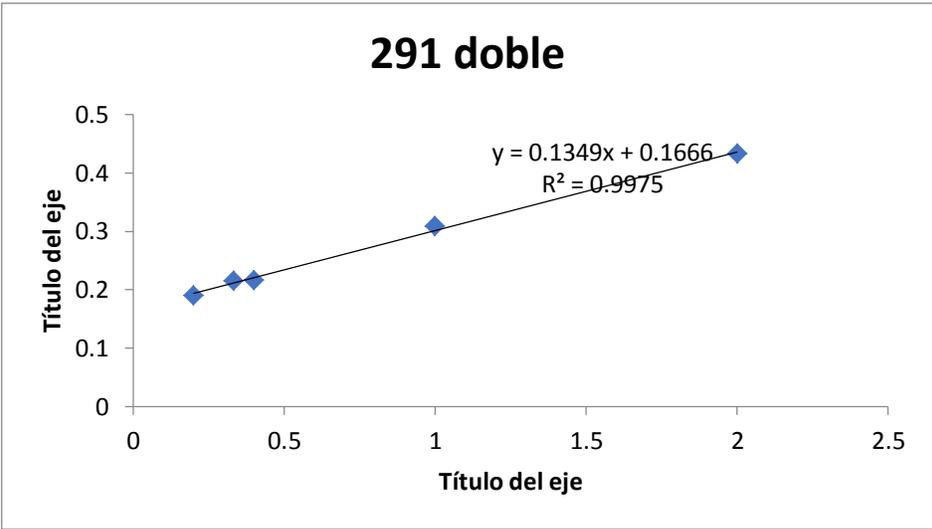
Figura S3. A) *Ensayo en placa para la oxidación ABTS mediada por lacasa.* A) *Actividad volumétrica* y B) *Actividad específica*

Anexo 3









Relevance of Surface-Exposed Lysine Residues Designed for Functionalization of Laccase

A. A. Arteaga-Castrejón^a, M. R. Trejo-Hernández^a, Y. Mekmouche^b, A. Amouric^b, P. Rousselot-Pailley^b, V. Robert^b, T. Tron^b, *, and F. Martínez-Morales^a, **

^a Centro de Investigación en Biotecnología, Morelos, 62209 México

^b Aix Marseille Université, Centrale Marseille, CNRS, Marseille, 13397 France

*e-mail: fernandomm@uaem.mx

**e-mail: thierry.tron@univ-amu.fr

Received September 5, 2021; revised December 2, 2021; accepted December 10, 2021

Abstract—Fungal laccases are oxidoreductases with low-specificity for substrates. The characterization of laccase's surface is a prerequisite used to obtain hybrid catalysts with new properties. Surface-exposed lysine residues are targets in immobilization reactions. In this work, LAC3-K0, an enzyme devoid of lysine, was used as a platform to detect potential surface-exposed sites suitable for replacement with a lysine residue. Seven sites were selected from a LAC3-K0 3-D model, and single lysine mutants (UNIK_n, *n* = residue number) were obtained by site-directed mutagenesis. All mutants were expressed in *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A and detected as functional secreted proteins by their ability to oxidize guaiacol or 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) on agar plates. All variants were active at acidic pH but presented no activity at neutral pH, as expected. Likewise, variants were stable a temperature between 15–55°C, and were completely inactivated at 70°C. Oxidation assays revealed that the replacement of one or two surface residues with lysine greatly affected enzyme activity and substrate specificity. The catalytic parameters (K_M^{app} and $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$) determined with ABTS were found to be different among the variants; the $V_{\text{max}}^{\text{app}}$ was 1.5–2 fold higher in UNIK₂₆₉ and triple mutant, with a K_M^{app} of 0.27 and 0.30, respectively; $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ was 30.25 in UNIK₂₃₈ and 32.34 in the triple mutant. The role of hydrophobic patches detected on the surface of LAC3-K0 was determined to be a favorable factor to be considered in the interaction of hybrid materials. All variants with uniquely surface located lysine created in this work can be in demand for obtaining laccases with a certain substrate specificity in the design of hybrid materials.

Keywords: laccase, oriented functionalization, site-directed mutagenesis, UNIK

DOI: 10.1134/S0026893322040021

INTRODUCTION

Laccases (EC 1.10.3.2, *p*-diphenol:dioxygen oxidoreductases) are multicopper enzymes characterized by the presence of four copper ions organized in two active centers. The surface located type I copper-binding site is involved in the oxidation of phenolic substrates whereas the buried trinuclear copper center participates in the concomitant reduction of O₂ into water [1, 2]. Laccases are considered as “green catalysts” due to their ability to use molecular O₂ as an electron acceptor generating water as the only by-product [3–5]. Their low specificity enables these enzymes to catalyze the oxidation of a wide variety of phenolic compounds, aromatic amines and metal ions. Widely distributed in nature, laccases perform a variety of biological functions including morphogene-

sis, stress defense, and lignin degradation [6]. Despite the fact some fungal laccases have a high redox potential (730–790 mV) certain components of lignin and other substrates of higher redox potential require the presence of redox mediators [7, 8].

In the past decades, laccases have received special attention because of their redox properties and robustness as catalyst. They are used in environmentally friendly applications which include biotechnological processes for textile, cosmetic, food, pharmaceutical, polymers, to the production of biofuels and energy. Recently, laccases have found applications in nanobiotechnology [6, 9], a field that has emerged as a new frontier in biotechnology, in which functionalization and immobilization techniques are used to integrate enzymes in the design of hybrid nanomaterials (NM) with enhanced characteristics and properties not yet discovered in nature.

Immobilization is long known as powerful tool to improve natural properties of enzymes [10], the

Abbreviations: DET, direct electron transfer; HP, hydrophobic patches; NM, nanomaterials; SA, specific activity; UNIK, unique lysine laccase variant.

implementation of which is often hampered with post-production issues such as stability, long term storage, operating conditions (pH and temperature), recovery and recycling of the catalyst. Immobilization processes take advantage of the properties of amino acids scattered on the surface of enzymes, for example, reactive functional groups of cysteine or lysine may be involved in covalent bonding [10]. As recently reviewed by Hoarau et al. [11], chemically well-defined self assembled monolayer surfaces made of short ethylene glycol chains and cysteine-reactive maleimide groups can be used to covalently bind surface-exposed cysteine residues from the enzyme. Progress in the understanding of interactions at molecular level between proteins and supporting materials that contribute to changes in stability and activity allow advance towards techniques that modulate the enzyme–support interaction. One contribution to this approach consists in the rational design of variants with controlled orientation of the enzyme relative to the supporting material surface [11–13]. A given orientation can be attained by site-directed replacement of surface-exposed amino acid residues by a residue with a reactive functional group that will be targeted in a subsequent coupling reaction with the chosen material. Laccase, for instance, has been oriented at the surface of modified carbon nanotubes for the synthesis of efficient biocathodes through specific covalent functionalization of a unique lysine [14, 15]. By increasing the number of “connected” enzymes, the molecular orientation of the enzyme molecules on the electrode surface has allowed to measure a direct electron transfer (DET) from the electrode to the enzyme; the DET can be modulated as function of the orientation of the enzyme [14, 15].

Due to their well-known topography some laccases are perfect candidates to gain insights on the modulation of enzyme function triggered from the surface, site-directed mutagenesis and predictive bioinformatic software help to design precise changes. Laccase LAC3 from *Trametes* sp. strain C30 has been studied for the oxidation of natural or synthetic compounds [16, 17], and modulation of its activity has been obtained through different functionalization sites at its surface [14, 15, 18]. With the use of a LAC3 enzyme devoid of lysine group, a unique lysine can be introduced anywhere at its surface [18].

In the present work, we obtained and characterized a set of original single lysine variants of LAC3 with the aim to gain insights on the influence of the lysine localization at the laccase surface on the overall function of the enzyme.

EXPERIMENTAL

Strains, media and plasmids. *Escherichia coli* strain DH5 α F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 λ ⁻thi-1 gyrA96

relA1) was used for all DNA manipulations. Luria-Bertani (LB) broth was used for *E. coli* culture (10 g/L tryptone, 5 g/L yeast extract 10 g/L NaCl), 100 μ g/mL ampicillin was added to LB medium when necessary. Plasmids and primers used in this work are listed in Table 1. For the expression of recombinant laccases, the yeast expression plasmid pAKLAC3-K0 [16, 18] was used as the parent plasmid to obtain the mutant derivatives from laccase. *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A (MATa{leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15}) was used as a host for laccase expression. *S. cerevisiae* transformants were routinely grown in Synthetic Defined (SD) Medium (6.7 g/L YNB without amino acids; 5 g/L casamino acids, 90 mg/L adenine; 40 mg/L tryptophan; 50 mM succinate buffer, pH 5.3; 0.5% v/v guaiacol; 100 μ M CuSO₄) and 20 g/L of glucose as carbon source.

Molecular model. A replacement 3D model was generated from the Swiss Model server (swiss-model.expasy.org) using the laccase crystal structure 1GYC from *T. versicolor* as template (Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). This model was used to predict the surface-exposed amino acid residues on LAC3 (GenBank AAR00925.1) applying the GetArea (www.expasy.org) and PyMOL (pymol.org) software. The protein-sol web server (<http://protein-sol.manchester.ac.uk/>) was used to predict hydrophobic patches (HP) on the surface of proteins [19].

Design and construction of mutants. Plasmid pAKLAC3-K0, encoding a LAC3 variant with no lysine (noted K0 = K₄₀ > M, K₇₁ > H), was used as DNA template to obtain single lysine mutants designed as UNIK_n, where n refers to the position of the lysine residue in the LAC3 sequence. The quick-change mutagenesis kit (Thermo Scientific, USA) was used to obtain the UNIK variants named UNIK₂₃₈ (Q238K), UNIK₂₅₄ (D254K), UNIK₂₆₉ (V269K), UNIK₂₇₀ (T270K), UNIK₂₈₃ (D283K), UNIK₂₉₁ (D291K) and UNIK₂₉₃ (A293K). The sequence of the mutagenic primers designed in this work is shown in Table 1. All mutant sequences were confirmed by DNA sequencing. In two cases, probably due to DNA polymerase mistakes, randomly mutations (highlighted in bold) were detected in variants UNIK₂₆₉ (**D96N/V269K/T479A**) and UNIK₂₉₁ (**A89S/D291K**). Because these mutations mapped at the surface of the 3D model of LAC3-K0 and were found enzymatically active, we decided to include them in this study to compare their activity with the reciprocal single mutant (Fig. 1).

Yeast transformation and laccase activity assay. Plasmid transformation of *S. cerevisiae* W303-1A was performed with the lithium acetate/ssDNA carrier/PEG protocol [20]. After transformation, cells were spread on selective SD medium plates and incubated at 28°C for 4 days. Laccase activity in the transformants was qualitatively detected on SD plates containing 100 μ M CuSO₄ and 0.5% v/v guaiacol. Pro-

Table 1. Plasmids and primers used

Plasmid	Codon position	d (Å) to T1 ^a	Reference
pAK145-LAC3	K ₄₀ /K ₇₁	31.8/27	[16]
pAK-145-KO	M ₄₀ /H ₇₁	31.8/27	[14]
pAK-145-Q238K	238	17.5	This work
pAK145-D254K	254	42	This work
pAK145-V269K	269	20.8	This work
pAK145-T270K	270	24.5	This work
pAK145-D283K	283	41	This work
pAK145-D291K	291	36.4	This work
pAK145-A293K	293	32.8	This work
pAK145-D96N/V269K/T479A	96/269/479	30.6/20.8/33	This work
pAK145-A89S/D291K	89/291	30/36.4	This work
Primer	Sequence (5' → 3') ^b		
Q238KFwd	GTCGACTCGATC <u>AAA</u> ATTTTCGCCGGG		
Q238KRev	CCCGGCGAAAATTTTGATCGAGTCGAC		
D254KFwd	ACCGCGGATCA <u>AAA</u> ATCGGTAACACTAC		
D254KRev	GTAGTTACCGATTTTGTATCCGCGGT		
V269KFwd	CTAACACCGGTACA <u>AAA</u> ACCACCGATGG		
V269KRev	CCATCGGTGGT <u>TTT</u> TGTACCGGTGTTAG		
T270KFwd	GGTACAGTCA <u>AAA</u> ACCGATGGCGGC		
T270KRev	GCCGCCATCGGTTTGTACTGTACC		
D283KFwd	CATTCTGCGTTACA <u>AAA</u> ACGGCGGACCC		
D283KRev	GGGTCCGCCGTTTGTAAACGCAGAATG		
D291KFwd	CGATCGAACCC <u>AAA</u> GCCGCAGACC		
D291KRev	GGTCTGCGGC <u>TTT</u> GGGTTTCGATCG		
A293KFwd	GAACCCGACGCC <u>AAA</u> GACCCACCAG		
A293KRev	CTGGTGGGGTCTTGGCGTCGGGTTC		

^a Distance to T1 site. ^b The mutant lysine codon AAA/TTT is underlined.

duction of LAC3 and LAC3-K0 enzymes, used as controls in this study, was carried out as previously described by Zhou et al. [21].

Yeast production of laccase variants. Yeast cells transformed with laccase variants were cultivated for 60 h with an initial OD₆₀₀ of 0.1 in 50 mL of SD medium in 250-mL flasks at 28°C at 160 rpm. After centrifugation (4200 rpm, 10 min), culture supernatants were filtered through filter paper (Whatman No. 1) then passed through glass-fibre filters (porosity 1.6 µm) and concentrated in an ultrafiltration cell (Amicon, USA) equipped with a 10 kDa cut-off membrane (Millipore, USA). The enzyme concentrate was stored at -80°C in 30% (w/v) glycerol.

Laccase specific activity. Laccase activity (in 5 µL of concentrated supernatant) was determined at 25°C by oxidation of 1 mM ABTS in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.4) in a total volume of 1 mL. The oxidation of ABTS was followed at 436 nm ($\epsilon = 29300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) using Beckman DU-640 UV-Vis spectrophotometer (Beckman, USA). Enzyme specific activity was expressed in international units (U). One unit of the

enzyme activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize 1 µmol of ABTS per minute. Protein concentration was determined according to the Bradford's method [22].

Kinetics parameters (apparent V_{\max} and K_M). The apparent V_{\max} and K_M parameters values were obtained according to Michaelis–Menten equation, k_{cat} was then calculated. The concentration used for ABTS was 0.25, 0.5, 1, 2.5, 3 and 5 mM in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.4) with 5 µL of enzyme concentrate in a total volume of 1 mL. All the assays were carried out in triplicate at conditions as described above. Since the enzymatic reaction catalyzed by laccase involves two substrates, and $[\text{O}_2]$ concentration was invariant and assumed to be saturating in this study, the measured K_M for the various substrates used was considered apparent (K_M^{app}). Since the entire laccase (100%) was assumed to be represented by the active form of the enzyme, the measured k_{cat} and V_{\max} were also be considered apparent ($k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ and V_{\max}^{app}).

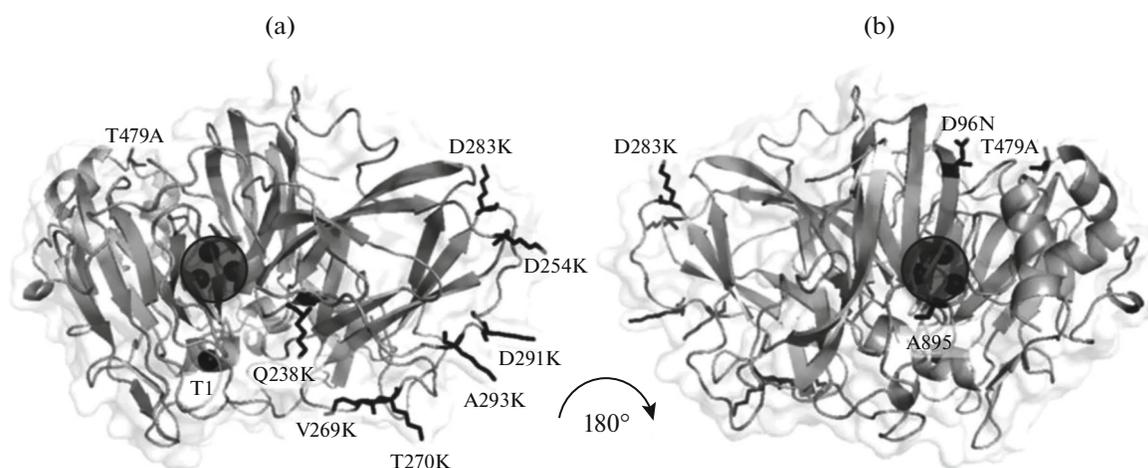


Fig. 1. The 3D model of LAC3-K0 is represented by grey ribbons (a, b). The surface amino acid residues selected for mutagenesis are shown as black sticks; copper in the T1 site is shown as a black sphere, while trinuclear copper site is circled. The coordinates of the crystal structure for laccase from the *Trametes versicolor* (Acc. No. 1GYC) were used as a sample.

Temperature and pH stability of the laccase. The thermostability of selected variants was investigated by incubating the crude concentrated supernatant from the growth culture at various temperatures (15, 25, 37, 55, and 70°C) for 120 min, and left to stand at 4°C before assay. The laccase activity was then assayed at 25°C in the conditions previously described, with 1 mM ABTS as substrate in 100 mM sodium acetate buffer (pH 4.4). The effect of pH on the laccase stability was investigated by incubating the supernatant at distinct pH values in 100 mM acetate buffer (pH 3.5–4.5) or 100 mM phosphate buffer (pH 5.0–7.5) for 180 min at 25°C. Concentrated supernatant was transferred to standard reaction conditions for laccase activity with 1 mM ABTS as substrate (pH 4.4), then specific activity (SA) was calculated for each variant.

Effects of temperature and pH on laccase activity. To study the effect of the temperature, concentrated the supernatant was incubated at 15, 25, 37, 55, and 70°C for 30 min, and laccase activity was then assayed at the corresponding temperature under standard conditions [21].

To study the influence of pH, the laccase activity was assayed in the concentrated supernatant in

100 mM acetate buffer/100 mM phosphate buffer (pH 3.5–7.5) at 25°C with 1 mM ABTS as substrate, then SA was calculated for each variant.

Screening for the oxidation of phenolic compounds. Oxidation assays were carried out following the protocol described by Pardo et al. [7] with minor changes. Catechol, vanillic acid, gallic acid, ferulic acid and vanillin (purchased from Sigma-Aldrich, Germany) were used as substrates. Ten-millimolar stock solutions were prepared in 20% ethanol except catechol, which was dissolved in water. Reactions were performed in 96-well plates by adding 10 µL of laccase concentrate extract, 180 µL of 100 mM acetate buffer, pH 5.0, and 20 µL of stock solution per well; a control reaction without enzyme was included. Reactions were run in duplicate for each variant in a Model 680 microplate reader (Bio-Rad, USA) for each substrate at the appropriate wavelength (400–450 nm), and readings were taken after 0, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, and 24 h incubation. The mean optical absorbance difference (ΔAbs) per µg of protein was calculated for each variant and normalized against parent type (LAC3). The relative activity for each variant with respect to the control LAC3 was calculated according to the following formula [7]:

$$\left[\frac{(\Delta\text{Abs}_x - \Delta\text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{protein})_x}{(\Delta\text{Abs}_{\text{control}} - \Delta\text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{protein})_{\text{control}}} \right],$$

where ΔAbs is the change in absorbance; ΔAbs_x is the change in absorbance for a single mutant; $\Delta\text{Abs}_{\text{control}}$ is the change in absorbance for the parent enzyme LAC3; $\Delta\text{Abs}_{\text{blank}}$ is the change in absorbance for the reaction without the enzyme.

RESULTS

Design and Expression of Laccase UNIK Variants

In order to obtain a single exposed functionalizable lysine residue located at different distances from the

Table 2. Kinetic parameters for LAC3 variants' enzymatic activity in the concentrated crude extract^a

	K0	Q238K	D254K	V269K	T270K	D283K	D291K	A293K	D96N/ V269K/ T479A	A89S/D291
SA ^b , U/mg	2.52 ± 0.20	3.92 ± 0.27	3.58 ± 0.15	4.44 ± 0.21	2.80 ± 0.08	2.90 ± 0.11	2.42 ± 0.06	6.07 ± 0.36	18.58 ± 0.27	21.02 ± 0.24
V_{\max} , μM min ⁻¹	5.54 ± 0.27	4.55 ± 0.18	5.24 ± 0.10	8.22 ± 0.29	2.85 ± 0.075	2.96 ± 0.10	2.98 ± 0.09	3.94 ± 0.06	11.98 ± 0.21	6.00 ± 0.07
K_M , mM	0.64 ± 0.08	0.28 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.27 ± 0.001	0.40 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.45 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.30 ± 0.004	0.81 ± 0.01
k_{cat} , s ⁻¹	16.7376	30.2539	11.8157	18.0768	3.7858	4.8349	5.5861	10.1747	32.3469	10.0784

^a ABTS at different concentrations was used as a substrate. ^b Specific activity.

T1 or T2/3 copper sites, the surface of a 3D model of the LAC3-K0 enzyme was first examined. Among the 115 residues exposed at the surface of K0, glycine and proline residues were not here considered to avoid potential major changes to the protein structure–function relationship. From the remaining 85 amino acid residues with different degrees of exposure to the solvent, seven residues were selected in domain 2 (which present few conserved residues) for replacement with a lysine; these residues are located at different distances to copper 1, only Q238 is a conserved residue in laccases (Fig. 1). For all potential UNIK variants of the LAC3 enzyme, the distance from the site of the mutation to the T1 was calculated from the model. Thus, as first approach, we introduced K residues that would be located at a distance ranging from 17.5 to 41 Å to the T1 (Table 1). In this study, all laccase UNIK variants expressed in *S. cerevisiae* as secreted enzymes were able to oxidize guaicol, ABTS and selected substrates (Fig. S1, see Supplementary Information on the web-site http://www.molecbio.ru/downloads/2022/4/supp_Arteaga-Castrejon_engl). Noteworthy, spontaneous mutations occurred during the mutagenesis leading to additional replacement at the surface of two UNIK derivatives (i.e. UNIK₂₆₉, **D96N/V269K/T479A**, and UNIK₂₉₁, **A89S/D291K**) without jeopardizing their enzymatic activity. Therefore, these mutants were kept in the study and compared with the corresponding UNIK single mutant. The biochemical properties of the variants were then explored using the crude supernatants (without further purification). Activity was normalized to the protein content (i.e. relative specific activity).

Determination of Apparent Kinetic Parameters

Apparent kinetic parameters V_{\max}^{app} , $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$, and K_M^{app} were calculated from the $V_i = f([\text{ABTS}])$ curve using the Michaelis–Menten equation. The K_M^{app} values were sub-milimolar (~ 0.3 to 0.9 mM) and in the range

of that of the control enzyme values (0.27), and 0.30 for UNIK₂₆₉ for the triple mutant. The V_{\max}^{app} values were also relatively homogeneous among the variants, except for those bearing the V269K mutation, for which they were slightly higher (1.5–2 fold) (Table 2). On the other hand, UNIK₂₃₈ and UNIK_{D96N/V269K/T479A} had similar $k_{\text{cat}}^{\text{app}}$ values (30.25 and 32.24, respectively), and higher from the others.

pH and Temperature Stability

The stability of laccase variants was evaluated by pre-incubating enzymes at different pH or temperature values prior to testing their residual ABTS oxidation activity. The stability of the variants remained steady from pH 5.5 to pH 7.5 with ABTS as substrate with a slight increase at pH 5.5 for most of the variants, in contrast to the laccase stability of UNIK₂₉₁ that presented ca. 20% decrease at pH 5.5 and 6.5. LAC3-K0 was found to be the more stable that the variants, showing a 53% increase at pH 6.5 (Fig. 2a). All variants were found to be stable between 15 to 37°C; while the variants kept 63 to 75% of their initial activity after 120 min of incubation at 55°C. All the variants were completely inactivated after a prolonged incubation at 70°C (Fig. 2b).

Effect of pH and Temperature on Laccase Activity

For all variants, the laccase activity was found to be the highest at the acidic pH 4.5 (Fig. 3a). In all cases, at higher pH values, laccase activity decreased steadily almost to zero at pH 7.5 (98% loss of activity). The activity of laccase variants was fairly stable between 15 and 55°C, with a sharp decrease over 55°C for most of the variants. In contrast, the relative activity of the K0 control and that of the UNIK_{A89S/D291K} variant was stable at up 70°C (Fig. 3b).

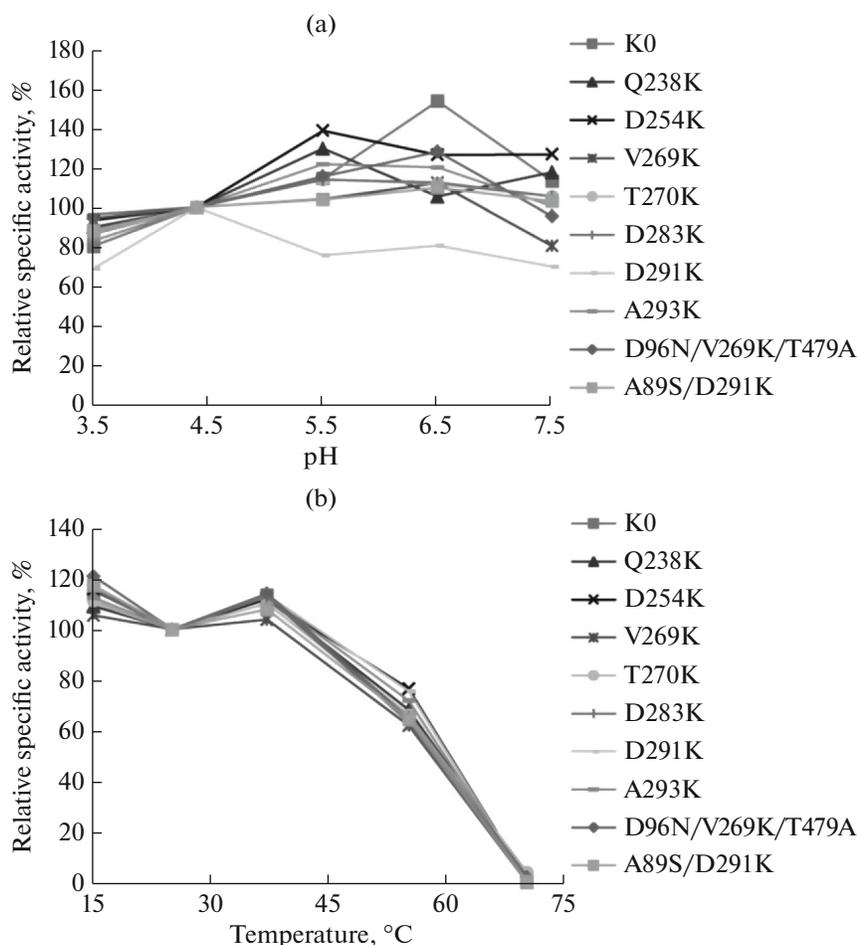


Fig. 2. Analysis of pH (a) and temperature (b) stability of laccases. All tests were performed with 1 mM ABTS as a substrate. The specific activity was calculated for each variant and normalized to LAC3.

Oxidation of Phenolic Compounds

Fungal laccases are known for their ability to oxidize compounds derived from lignin [23]. Five phenolic compounds with different chemical structures (Table S1, see Supplementary Information) were selected as substrates. In order to study the oxidation of phenolic compounds the laccase concentrated extract from each variant was used. All variants and the control K0 maintained the ability to oxidize all five compounds (Fig. 4). The relative activity was normalized to that of LAC3 for each substrate.

The UNIK₂₉₃ and UNIK_{D96N/V269K/T479A} mutants were found having the best oxidizing activity for vanillin, whereas UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ and UNIK₂₇₀ performed better than the others for ferulic acid. UNIK₂₃₈ oxidized gallic acid up to 1.4 times more compared to K0. Catechol oxidation was enhanced in all variants, especially in UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ and UNIK_{D96N/V269K/T479A}. Finally, UNIK₂₃₈ oxidized vanillic acid up to 10-fold more than LAC3, making this variant the best for the oxidation of the tested compounds.

DISCUSSION

Fungal laccases are green-biocatalysts with considerable biotechnological potential in many applications [9]. In recent times, these enzymes have been used to develop hybrid NM. Covalent binding of laccases to the surface of NM can produce novel properties not yet found in nature. A controlled vectorial binding of the enzyme at the surface of a NM is a prerequisite to fine-tune the performance of a hybrid material. Therefore, the solvent exposed surface of each enzyme is a landscape to be studied in order to define hot-spots for a rational functionalization of lysine residues involved in further coupling reactions. In this study, we used an enzyme devoid of lysine residue (K0) derived from LAC3 laccase (that carry two natural lysine residues) produced by *Trametes* sp. strain C30. K0 functions as platform to introduce novel solo-lysine residues at selected sites in the enzyme surface (Fig. 1). In the first approach, seven out of 85 surface-exposed residues, at different distances to the T1 copper site, were replaced by a lysine residue. All UNIK derivatives, including variants with spontaneous sur-

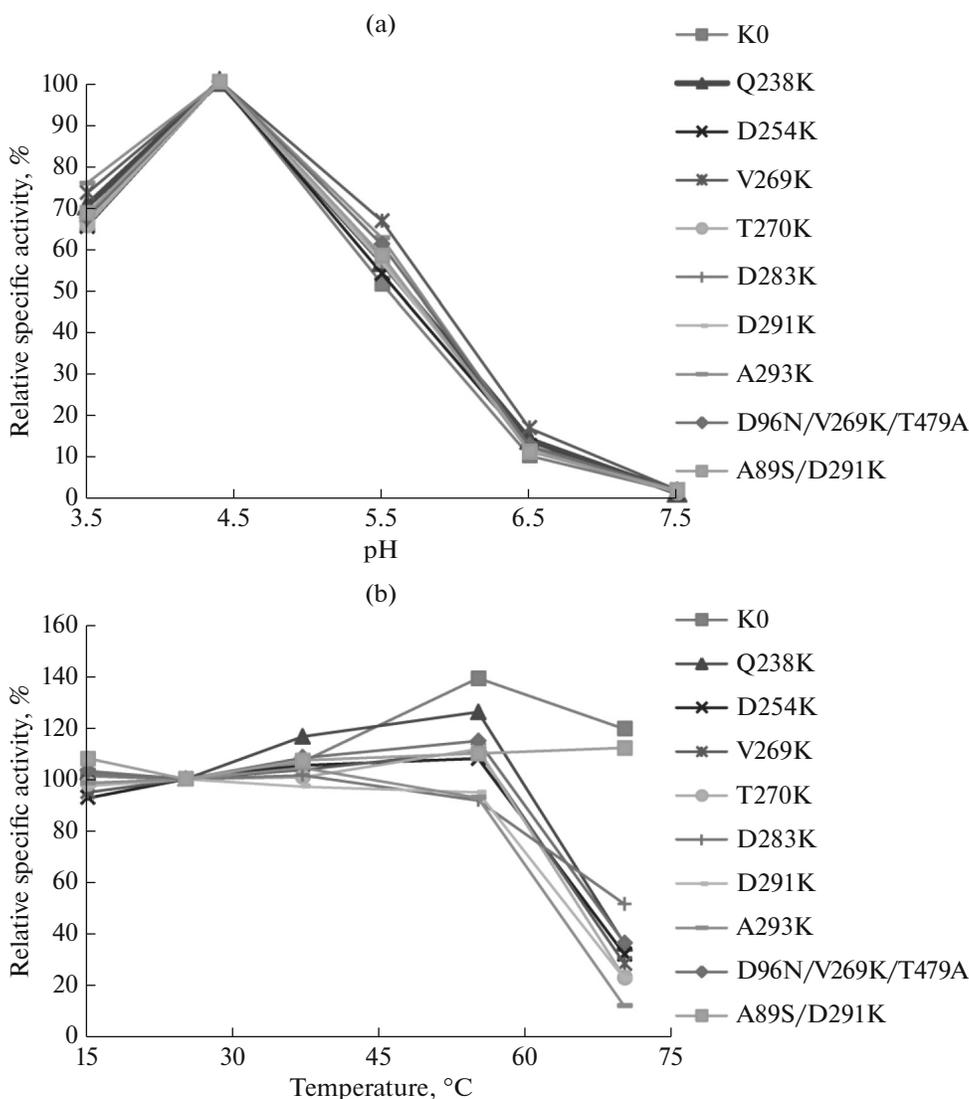


Fig. 3. Effect of pH and temperature on the activity in the crude extract of the concentrated laccases. The reactions were carried out at pH values varied in a range of 3.5–7.5 and temperature of 25°C (a), or at temperatures varied in a range of 25 to 70°C and pH 4.5. All tests were performed with 1 mM ABTS as the substrate.

face substitutions additional to the lysine one, remained active for the range of substrates tested that indicates the conservation of a *sine qua non* property of laccases and a desired to conserve. The proximity to the T1 copper from a functionalization site could amplify positive effects following covalent immobilization of laccase, e.g. a DET efficiency increase was detected in the controlled orientation of the enzyme to the electrode material [18, 24]. The covalent binding to the surface of NM obtained through the alkylation of a lysine residue generates a bimolecular interface defined by the chemical nature of the material and the microenvironment of surface-exposed residues around the functionalization point.

All laccase UNIK variants designed in this study, and two single mutants with the lysine residue natu-

rally present in LAC3, UNIK₁₅₇ and UNIK₁₆₁, previously characterized by Robert et al. [18], presented comparable or even slightly improved activity, pH and thermal stability similar to LAC3 and K0 controls (Fig. 3 and Table 2). In the first instance, we selected non-conserved amino acid residues (including spontaneous mutations) to avoid enzymatic activity loss, only Q238 is a conserved residue in laccases [25].

All UNIK variants conserved the ability to oxidize all five selected phenolic compounds at different extend. A decrease in K_M^{app} was observed for Q238K (68%), V269K (69%), D96N/V269K/T479A (66%) compared to LAC3. Also, the k_{cat} increased from 2.2- to 7-fold in most variants, the higher increment was in UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ and UNIK_{D96N/V269K/T479A} (see

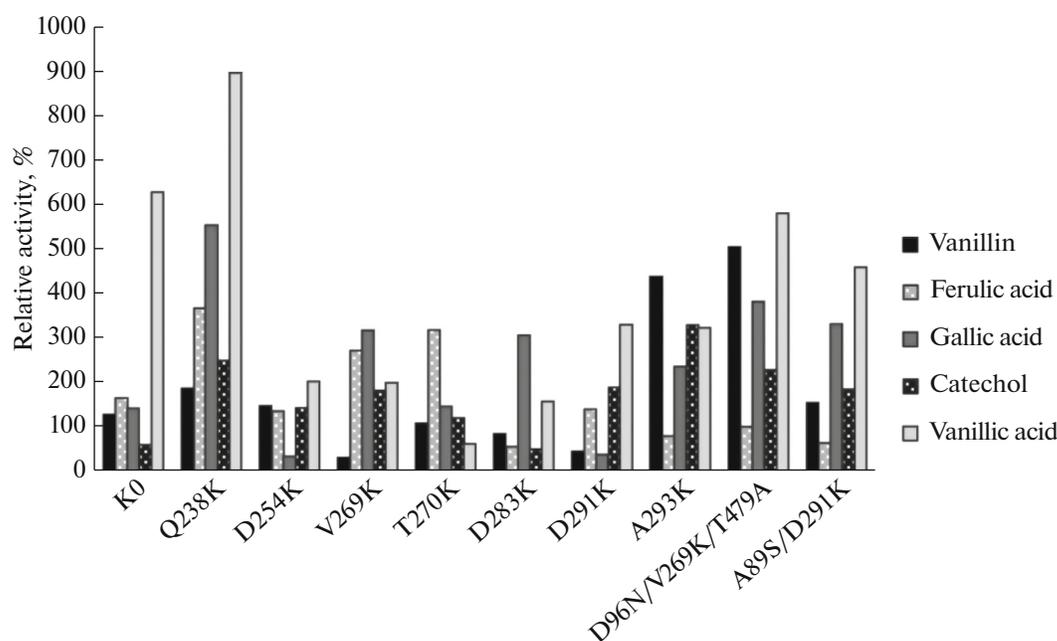


Fig. 4. Relative enzymatic activity of the laccase variants for different phenols used as substrates. The activity was normalized to that of LAC3 for each substrate.

Table 2). The effect on K_M and k_{cat} of these mutations was similar to that reported by Mollania et al. [26]. Among the single mutants the UNIK₂₃₈ located at 17.5 Å from T1 site presents the highest catalytic performance towards all substrates tested. This reveals that Q238 (a conserved residue in laccases from basidiomycetes) may have a crucial influence in substrate affinity due to the flexibility of the lysine side chain and to the increase of a local hydrophobic network as explained below. Furthermore, most of the variants maintained the ability to oxidize the derivatives of *p*-hydroxybenzoic acid (gallic acid and vanillic acid). In contrast, vanillin, a *p*-hydroxybenzaldehyde, was efficiently oxidized by the variants UNIK_{D96N/V269K/T479A} and UNIK₂₉₃; meanwhile low percentages of oxidation were detected in the other variants. On the other hand, UNIK₂₃₈, UNIK₂₉₃ and UNIK_{D96N/V269K/T479A} showed a better performance in the oxidation of catechol. Ferulic acid, a derivative of *p*-hydroxycinnamic acid, presented good oxidation percentages by the UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ and UNIK₂₇₀ variants. These results confirm the statement by Festa et al. [27] that mutations in laccases, although not directly involved in the catalysis pocket, may influence the efficiency and stability of the enzyme albeit the presence of highly conserved and functionally essential wide regions in these proteins. Among the variants obtained by serendipity, the relative specific activity of UNIK_{D96N/V269K/T479A} was markedly higher than the single mutant UNIK₂₆₉. The additional surface variations, D96N and T479A, found in this variant do not spatially cluster with the initially targeted V269K.

However, from a close examination of our model, it appears that positions 96 and 479 are facing each other at the interface between cupredoxin-like domain 1 and domain 3. Therefore, it is plausible that this new combination of amino acids (i.e. N96, A479) is locally affecting the tertiary structure of the laccase at the D1/D3 boundaries with a long distance influence over substrate oxidation. In general, it is thought that, if the mutated sites are not in close contact, the chances of additive mutational effect are high, on the contrary, if such mutations are in contact, their contribution is low [28, 29]. The phenomenon of additivity could explain the positive effect observed in UNIK_{D96N/V269K/T479A} although this effect is not clear in the UNIK_{A89S/D291K} variant.

Although there is not a common trend between the substrate structure and the activity of the different variants, the high redox potential of laccase does not always guarantee more efficient substrate oxidation [30]. The hydrophobic environment surrounding T1Cu is one of the major biochemical determinants in modulating the redox potential in fungal laccases and by introducing an even more extensive hydrophobic network close to T1Cu site could have a positive effect. The redox potential could be raised without fully modifying the catalytic pocket as substrate interaction could otherwise be impeded [31]. Protein elements such as local charges, HP and glycosylation moieties could contribute importantly in the novel intermolecular interface formed after the covalent binding of the NM and the laccase. It is well documented that HP are a major elements modulating ligand–receptor interac-

tions [32]. Distribution of HP is probably a main factor affecting the laccase NM interface or the interface formed with neighboring LAC3 molecules on the NM surface. The different HP scattered over the surface of K0 (Fig. S2, see Supplementary Information) can be important to design areas of interaction depending of the nature of the NM used. Notably, the distribution of lysine residues appears to be a main contributor to the polar/apolar surface boundary in different HP [32, 33] and seems to positively influence laccase structure–function relationship. Therefore, beyond the rationale of selecting a lysine residue for functionalization (selectivity of the reaction, distribution in the natural enzyme), the use of this specific amino acid is particularly appropriate as it may play a major role in the design of heterogeneous interfaces. For example, for the Q238K variant, residues surrounding position 238, namely N211, S236, F240, P300 (see Fig. S3 in Supplementary) are forming a *bona fide* HP that could benefit from the hydrophobic contribution of lysine that may have a positive effect in the hydrophobic pocket close to T1. However, the behavior of each mutant is unique and requires a close examination to understand the role that HP plays when functionalization processes are desired.

CONCLUSIONS

All UNIK variants preserved enzymatic properties such as oxidative capacity and operational stability. Thus, a relative large area of the surface of LAC3 exposed to solvent appears can tolerate mutations at different sites without a dramatic alteration of structure–function relationships. This strengthens the idea that laccase functionalization can be pertinently addressed from any surface location grafted to a redox entity (i.e. electrode material or transition metal complex). Following this reasoning, UNIK₂₃₈, UNIK₂₆₉ and UNIK₂₇₀ can be proposed for future electrode grafting from which the orientation should favor a DET to the T1. On the other hand, UNIK₂₅₄, UNIK₂₈₃, UNIK₂₉₁ or UNIK₂₉₃ provide an anchor point at the tip of domain 2, and therefore should offer the opportunity to probe a no DET orientation. Multiple sites need to be evaluated to fine-tune the interaction between immobilized LAC3 and the grafted material.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Bertrand B. (ICF, UNAM) for the critical reading of the manuscript, Yolande Charmasson and Elise Courvoisier-Dezord from the plateforme AVB for technical support.

FUNDING

We are grateful to CONACYT–ANUIES ECOS NORD and ECOS NORD UNIVERSITÉ PARIS 13 proj-

ect no. 277027, and the CONACYT scholarship to Ariana Arteaga.

COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS

The authors declare that they have no conflict of interest. This article does not contain any research involving humans or animals as subjects of research.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1134/S0026893322040021>.

ADDITIONAL INFORMATION

The text was submitted by the authors in English.

REFERENCES

1. Mate D.M., Alcalde M. 2017. Laccase: A multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microb. Biotechnol.* **10**, 1457–1467.
2. Stanzione I., Pezzella C., Giardina P., Sannia G., Piscitelli A. 2020. Beyond natural laccases: Extension of their potential applications by protein engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **104**, 915–924.
3. Bertrand B., Martinez-Morales F., Trejo-Hernandez M.R. 2017. Upgrading laccase production and biochemical properties: Strategies and challenges. *Biotechnol. Prog.* **33**, 1015–1034.
4. Martínez A.T., Ruiz-Dueñas F.J., Camarero S., Serrano A., Linde D., Lund H., Vind J., Tovborg M., Herold-Majumdar O.M., Hofrichter M., Liers C., Ullrich R., Scheibner K., Sannia G., Piscitelli A., et al. 2017. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol. Adv.* **35**, 815–831.
5. Pardo I., Rodríguez-Escribano D., Aza P., de Salas F., Martínez A.T., Camarero S. 2018. A highly stable laccase obtained by swapping the second cupredoxin domain. *Sci. Rep.* **8**, 15669.
6. Su J., Fu J., Wang Q., Silva C., Cavaco-Paulo A. 2018. Laccase: A green catalyst for the biosynthesis of polyphenols. *Crit. Rev. Biotechnol.* **38**, 294–307.
7. Pardo I., Camarero S. 2015. Exploring the oxidation of lignin-derived phenols by a library of laccase mutants. *Molecules.* **20**, 15929–15943.
8. Yin Q., Zhou G., Peng C., Zhang Y., Kües U., Liu J., Xiao Y., Fang Z. 2019. The first fungal laccase with an alkaline pH optimum obtained by directed evolution and its application in indigo dye decolorization. *AMB Express.* **9**, 151.
9. Pezzella C., Guarino L., Piscitelli A. 2015. How to enjoy laccases. *Cell. Mol. Life Sci.* **72**, 923–940.
10. Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.* **40**, 1451–1463.
11. Hoarau M., Badiéyan S., Marsh E.N.G. 2017. Immobilized enzymes: Understanding enzyme–surface in-

- teractions at the molecular level. *Org. Biomol. Chem.* **15**, 9539–9551.
12. Shen L., Zhu J. 2016. Oriented protein nanoarrays on block copolymer template. *Macromol. Rapid Commun.* **37**, 494–499.
 13. Liu Y., Ogorzalek T.L., Yang P., Schroeder M.M., Marsh E.N.G., Chen Z. 2013. Molecular orientation of enzymes attached to surfaces through defined chemical linkages at the solid–liquid interface. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12660–12669.
 14. Lalaoui N., Rousselot-Pailley P., Robert V., Mekmouche Y., Villalonga R., Holzinger M., Cosnier S., Tron T., Le Goff A. 2016. Direct electron transfer between a site-specific pyrene-modified laccase and carbon nanotube/gold nanoparticle supramolecular assemblies for bioelectrocatalytic dioxygen reduction. *ACS Catalysis*. **6**, 1894–1900.
 15. Gentil S., Rousselot-Pailley P., Sancho F., Robert V., Mekmouche Y., Guallar V., Tron T., Le Goff A. 2020. Efficiency of site-specific clicked laccase–carbon nanotubes biocathodes towards O₂ reduction. *Chemistry*. **26** (21), 4798–4804.
 16. Klonowska A., Gaudin C., Asso M., Fournel A., Réglie M., Tron T. 2005. LAC3, a new low redox potential laccase from *Trametes* sp. strain C30 obtained as a recombinant protein in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 34–41.
 17. Mekmouche Y., Schneider L., Rousselot-Pailley P., Faure B., Simaan A.J., Bochot C., Réglie M., Tron T. 2015. Laccases as palladium oxidases. *Chem. Sci.* **6**, 1247–1251.
 18. Robert V., Monza E., Tarrago L., Sancho F., De Falco A., Schneider L., Npetgat Ngoutane E., Mekmouche Y., Pailley P.R., Simaan A.J., Guallar V., Tron T. 2017. Probing the surface of a laccase for clues towards the design of chemo-enzymatic catalysts. *ChemPlusChem*. **82**, 607–614.
 19. Hebditch M., Warwicker J. 2019. Web-based display of protein surface and pH-dependent properties for assessing the developability of biotherapeutics. *Sci. Rep.* **9**, 1969.
 20. Gietz R.D., Woods R.A. 2006. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Methods Mol. Biol.* **313**, 107–120.
 21. Zhou S., Rousselot-Pailley P., Ren L., Charmasson Y., Dezord E.C., Robert V., Tron T., Mekmouche Y. 2018. Production and manipulation of blue copper oxidases for technological applications. *Methods Enzymol.* **613**, 17–61.
 22. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
 23. Wang X., Yao B., Su X. 2018. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3373.
 24. Li Y., Zhang J., Huang X., Wang T. 2014. Construction and direct electrochemistry of orientation controlled laccase electrode. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 201–205.
 25. Koschorreck K., Schmid R.D., Urlacher V.B. 2009. Improving the functional expression of a *Bacillus licheniformis* laccase by random and site-directed mutagenesis. *BMC Biotechnol.* **9**, 12.
 26. Mollania N., Khajeh K., Ranjbar B., Hosseinkhani S. 2011. Enhancement of a bacterial laccase thermostability through directed mutagenesis of a surface loop. *Enzyme Microb. Technol.* **49**, 446–452.
 27. Festa G., Autore F., Fraternali F., Giardina P., Sannia G. 2008. Development of new laccases by directed evolution: Functional and computational analyses. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **72**, 25–34.
 28. Ming D., Chen R., Huang H. 2018. Amino-acid network clique analysis of protein mutation non-additive effects: A case study of lysozyme. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1427.
 29. Konishi A., Ma X., Yasukawa K. 2014. Stabilization of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by site-directed mutagenesis of surface residue Val433. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 75–78.
 30. Glazunova O.A., Trushkin N.A., Moiseenko K.V., Filimonov I.S., Fedorova T.V. 2018. Catalytic efficiency of basidiomycete laccases: Redox potential versus substrate-binding pocket structure. *Catalysts*. **8**, 152.
 31. Mateljak I., Monza E., Lucas M.F., Guallar V., Alekseeva O., Ludwig R., Leech D., Shleev S., Alcalde M. 2019. Increasing redox potential, redox mediator activity, and stability in a fungal laccase by computer-guided mutagenesis and directed evolution. *ACS Catalysis*. **9**, 4561–4572.
 32. Lijnzaad P., Berendsen H.J.C., Argos P. 1996. Hydrophobic patches on the surfaces of protein structures. *Proteins: Struct. Funct. Bioinf.* **25**, 389–397.
 33. Ernst H.A., Jørgensen L.J., Bukh C., Piontek K., Platner D.A., Østergaard L.H., Larsen S., Bjerrum M.J. 2018. A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases. *PLoS One*. **13**, e0206589.