



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Efecto de mutaciones del gen AGA2 sobre las
propiedades bioquímicas de una lacasa en un
sistema de despliegue en superficie de levadura

TESIS

Para obtener el título:

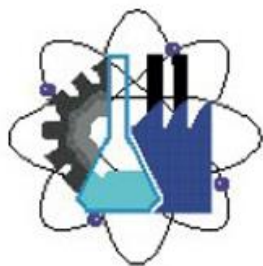
LIC. EN INGENIERÍA QUÍMICA

Presenta:

Ma. De Los Ángeles Montes Brito

Director:

Dra. María del Refugio Trejo Hernández



Agosto

2021

A mi familia, por ser motor.

A cada persona con la que me tocó coincidir, más a aquellas de las que pude aprender.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a Dios, por la vida para poder continuar mi camino.

A la Doctora Maria del Refugio Trejo por su apoyo y confianza. Por brindarme la oportunidad de trabajar en un laboratorio y cultivar en mí el gusto por la investigación científica.

Al Doctor Fernando, por su disponibilidad de enseñanza, por compartir siempre con entusiasmo sus conocimientos, por el apoyo y la motivación a lo largo de este proyecto.

A mi familia por el impulso, por ser mi total motivación, por el amor; Mamá Julita, Papá, Hermana Yuli, Hermano Agus, Abil, Sofita, Gabriel, Angelita.

A mis amigos, compañeros, cómplices, cuates, Abigail, Abisaí, Adriana, Aylin, Daniela, Elizabeth, Franco, Janeth, Karen, Kelley, Pablo, por el amor.

A mi maravillosa Tuna Femenina Universitaria de la UAEM, Apu, Astro, Consciencia, Franklin, Galaxia, Gene, H, Memes, Picky, Pocahontas, Pucca, Qüiji, Tragos, las *sin mote*. Por ser una ventana de escape a la diversión cada jueves, por viajar conmigo, por disfrutar la música y el baile, las rondas y bohemias, por el amor.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, Victoria Baca, Ariana, Daniel, Diana, Nashbly, Nydia, Lucero, Pilar, Victoria Sicairos, Andrés y sobre todo a mi ama Vero por la paciencia y el apoyo aún a la distancia durante todo el proceso, por la enseñanza y esfuerzo. Gracias por recibirme y apoyarme con lo nuevo.

A mis profesores de la universidad y a mis compañeros por el aprendizaje y buenos momentos.

A cada persona que me dio ánimos, creyó en mí y le importo.

Índice

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Polifenol oxidasas	3
2.1.1 Mecanismo de acción de PPO	3
2.2 Lacasas	6
2.2.1 Propiedades estructurales y catalíticas.....	6
2.2.2 Lacasas en el entorno natural.	11
2.2.3 Lacasas en biotecnología ambiental	13
2.2.4 Compuestos fenólicos y su oxidación	14
2.3 Inmovilización de enzimas.....	18
2.5 Ingeniería de proteínas	21
2.6 Despliegue en superficie de levadura	28
2.6.1 Caracterización de la superficie celular de la levadura	31
2.6.2 Características del sistema despliegue	31
2.6.3 Aplicación ambiental de despliegue en superficie	32
3. ANTECEDENTES DIRECTOS	34
4. JUSTIFICACIÓN	34
5. HIPÓTESIS.....	35
6. OBJETIVOS	35
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	35
8. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
8.1 Material biológico.....	36
8.2 Cinética de crecimiento y producción de lacasas en despliegue.....	36
8.3 Caracterización operacional de las mutantes de AGA2	37
8.3.1 Termoestabilidad.....	37
8.3.2 Tolerancia pH	37
8.3.3 Tolerancia a solventes	37
8.3.4 Capacidad de reuso	37
8.4 Oxidación de compuestos fenólicos	38

8.5 Métodos analíticos	38
9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
9.1 Etapa 1. Cinéticas de crecimiento y producción de lacasas	40
9.2 Etapa 2. Caracterización operacional de las mutantes de AGA2	42
9.2.1 Termoestabilidad	43
9.2.2 Capacidad de reuso	45
9.2.1.3 Tolerancia pH	46
9.2.4 Tolerancia a solventes	48
9.3 Etapa 3. Oxidación de compuestos fenólicos	51
10.CONCLUSIONES	55
11. PERSPECTIVAS	56
12. BIBLIOGRAFIA	57

Índice de Figuras

Figura 1 Mecanismo de catálisis de las polifenol oxidasas	4
Figura 2 Polifenol oxidasas durante la transformación de compuestos fenólicos...	5
Figura 3 Ciclo catalítico de lacasa	9
Figura 4 Métodos de evolución dirigida	23
Figura 5 Diagrama de despliegue en superficie de levadura.....	30
Figura 6 Diagrama de pared celular de levadura.....	31
Figura 7 Cinética de crecimiento de mutantes AGA2 y AGA-WT en el sistema de despliegue levadura-lacasa (OB-1)	41
Figura 8 Actividad específica de lacasa (U/g) de las mutantes AGA2 y AGA-WT en el sistema de despliegue levadura-lacasa (OB1).	42
Figura 9 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las mutantes.	43
Figura 10 Efecto de las mutaciones en AGA2 sobre la capacidad de reuso del sistema levadura-lacasa (sustrato ABTS).	45
Figura 11 Efecto del pH en la actividad de las mutantes.....	46
Figura 12 Efecto de la presencia de etanol en la actividad lacasa (A). Efecto de acetonitrilo en actividad lacasa (B).....	49
Figura 13 Porcentaje de oxidación de los fenoles estudiados mediante HPLC....	52
Figura 14 Efecto del pH en el porcentaje de oxidación de los fenoles ácido ferúlico, ácido gálico, catecol y ácido vanílico por AGA-WT y las mutantes AGA-TI13B, AGA-TM11 y AGA-TK14.....	53

Índice de Tablas

Tabla 1 Aplicaciones industriales de lacasas.....	13
Tabla 2 Tiempo de retención de los compuestos fenólicos	39
Tabla 3 Actividad de mutaciones en el gen AGA2- Lacasa OB-1	40

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto de las mutaciones generadas en la subunidad AGA2 de un sistema de despliegue en superficie de la levadura *S. cerevisiae* sobre la actividad de la lacasa OB1 anclada. El efecto de las mutaciones realizadas en esta subunidad AGA2 fue comparado con la subunidad original de AGA2 (pETcon-OB-1) en el sistema levadura–lacasa OB-1. Los resultados obtenidos de la actividad específica de lacasa con las mutaciones realizadas en la subunidad de AGA2 fueron en orden decreciente AGA-TK14> AGA-TM11> AGA-TI13B> AGA-TT8> AGA-TX13A> AGA-WT (WildType, OB-1-Silvestre). Se seleccionaron las mutantes AGA-TI13B, AGA-TM11 y AGA-TK14 que presentaron mayores valores de actividad lacasa. Con la finalidad de comparar el efecto de la mutación sobre la producción de la proteína en la superficie de la levadura se realizaron cinéticas de crecimiento. Los valores de producción de lacasa y actividad específica fueron mayores en las mutantes al comparar con la AGA-WT. Asimismo, se realizaron estudios de estabilidad de las mutantes a temperatura, pH, solventes orgánicos y capacidad de reuso utilizando ABTS como sustrato. Esta caracterización operacional permitió evaluar el comportamiento de las mutantes de AGA2 con respecto al AGA-WT.

Si bien se han realizado varios estudios enfocados en sistemas de despliegue en superficie de levadura, existe poca información de mutaciones realizadas en la subunidad AGA2. En este trabajo se demostró que, cambios realizados en el sistema de despliegue, en particular en la subunidad AGA2, tienen un efecto sobre la estabilidad y la actividad catalítica de la proteína expresada en la superficie. Aún no es posible explicar con certitud a qué se deben las diferencias encontradas. Aunque se puede presumir un efecto de cargas en la superficie o un efecto estérico en la zona de unión del ancla con la lacasa OB1.

1. INTRODUCCIÓN

Las lacasas son enzimas multicobre que contienen cuatro átomos de cobre en el centro catalítico (Baldrian, 2006), capaces de catalizar la oxidación de fenoles, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos contaminantes mediante la reducción del oxígeno molecular a agua (Iimura et al., 2018). Sin embargo, sus propiedades catalíticas naturales no son suficientes para su aplicación eficiente en procesos de detoxificación a gran escala. En este contexto se han desarrollado estrategias de mejoramiento de la estabilidad y actividad catalítica, tales como la evolución dirigida y la inmovilización de enzimas en soportes de diferente naturaleza. Estas estrategias permiten mejorar las características de las enzimas haciéndolas más atractivas para su aplicación en diferentes procesos industriales (Ba et al., 2013). Las mejoras permiten obtener enzimas con mayor estabilidad a cambios de temperatura y pH; se incrementa el tiempo de vida media en almacenamiento, incrementa su capacidad de reuso en procesos bioquímicos, mejora su tolerancia a solventes, entre otras ventajas (Duran et al., 2000). Entre estas estrategias se encuentra el sistema de despliegue de enzimas en la superficie de una levadura, que representa una alternativa viable, como sistema de inmovilización *in vivo*. La expresión funcional de una enzima en la superficie tiene la ventaja de que la enzima no se pierde durante el proceso y puede reutilizarse varias veces. No obstante, también se ha observado que mutaciones realizadas en la cadena genética de la enzima anclada al sistema de despliegue permite aumentar la actividad catalítica de la enzima inmovilizada (Johannes et al., 2006). En estudios realizados en el laboratorio de Biotecnología Ambiental del CEIB, se logró expresar una lacasa en la superficie de *Saccharomyces cerevisiae* (Bertrand et al., 2016). Si bien la enzima fue funcional, la actividad detectada fue baja. Tratando de evaluar si el desempeño podría ser mejorado se plantearon diferentes estrategias de mejora entre ellas el uso de diferentes enzimas, cambios en el medio de cultivo para mejorar la expresión de la lacasa y mutaciones en el ancla (subunidad AGA2). Esta última estrategia permitió obtener una serie de mutantes localizadas en la secuencia de AGA2 a la cual la lacasa está fusionada cuando se despliega en la superficie de la

levadura, lo anterior dio como resultado un cambio en el desempeño de la enzima observándose un efecto en la actividad específica comparadas con el sistema de despliegue silvestre. En este trabajo se propuso evaluar el efecto de las mutaciones producidas en AGA2 sobre la oxidación de diferentes compuestos fenólicos, así como la estabilidad de dichas mutantes a diferentes condiciones fisicoquímicas operacionales con respecto al sistema levadura-enzima WT.

2. ANTECEDENTES

2.1 Polifenol oxidasas

Las PPO, por sus siglas en inglés Poly Phenol Oxidase, son un grupo de proteínas de cobre, ampliamente distribuidas filogenéticamente desde bacterias a mamíferos, que catalizan la oxidación de fenólicos a quinonas que producen pigmentos marrones en los tejidos heridos. Estas enzimas se han implicado en la formación de pigmentos, captación de oxígeno y en mecanismos de defensa contra patógenos vegetales, e insectos herbívoros. Los compuestos fenólicos sirven como precursores en la formación de barreras físicas polifenólicas, limitando la translocación de patógenos. Las quinonas formadas por los PPO pueden unirse a las proteínas vegetales, reduciendo la digestibilidad de las proteínas y su valor nutritivo para los herbívoros (Queiroz et al., 2008).

2.1.1 Mecanismo de acción de PPO

La catálisis enzimática de PPO, es un mecanismo que involucra dos sustratos y la unión del sustrato ocurre secuencialmente en un orden específico. En la PPO primero se une al oxígeno y luego al monofenol con la participación de algunos intermediarios. Se sabe que PPO tiene un sistema redox $\text{Cu}^{+2}/\text{Cu}^{+}$ en cada ion Cu, el grupo proteico de PPO cambia su valencia de Cu^{1+} a Cu^{+2} durante la formación del primer complejo y este complejo posee enlaces O-O fuertemente polarizados (Figura 1) esto da como resultado la hidroxilación del sustrato para o-difenol y finalmente el ciclo se completa con la oxidación o-difenol a o-quinona.

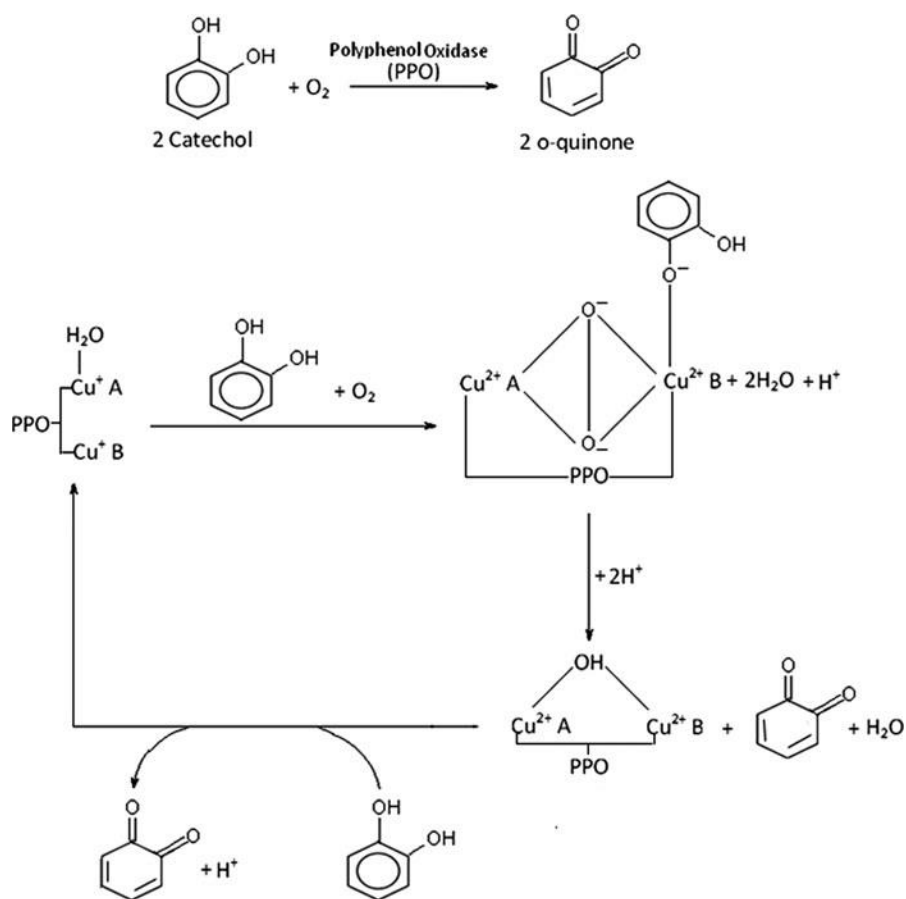


Figura 1 Mecanismo de catálisis de las polifenol oxidasas (Mukherjee et al., 2013)

La capacidad de PPO para oxidar un gran grupo de componentes fenólicos y/o polifenólicos a sus quinonas no tóxicas correspondientes, ha hecho atractivas a estas enzimas en la eliminación de contaminantes fenólicos tóxicos y peligrosos resentes en las aguas residuales (Figura 2). Klibanov et al., (1980), fueron los primeros en introducir el uso de enzimas oxidorreductoras como PPO o peroxidasa (POD) para la eliminación de fenoles y desde entonces es un área de investigación destacada en biotecnología e ingeniería bioquímica. La remoción biológica de fenol con estas enzimas involucra la oxidación de compuestos fenólicos y genera radicales fenoxi, que se combinan para formar oligómeros insolubles en agua y de alto peso molecular que pueden eliminarse fácilmente por sedimentación o filtración.

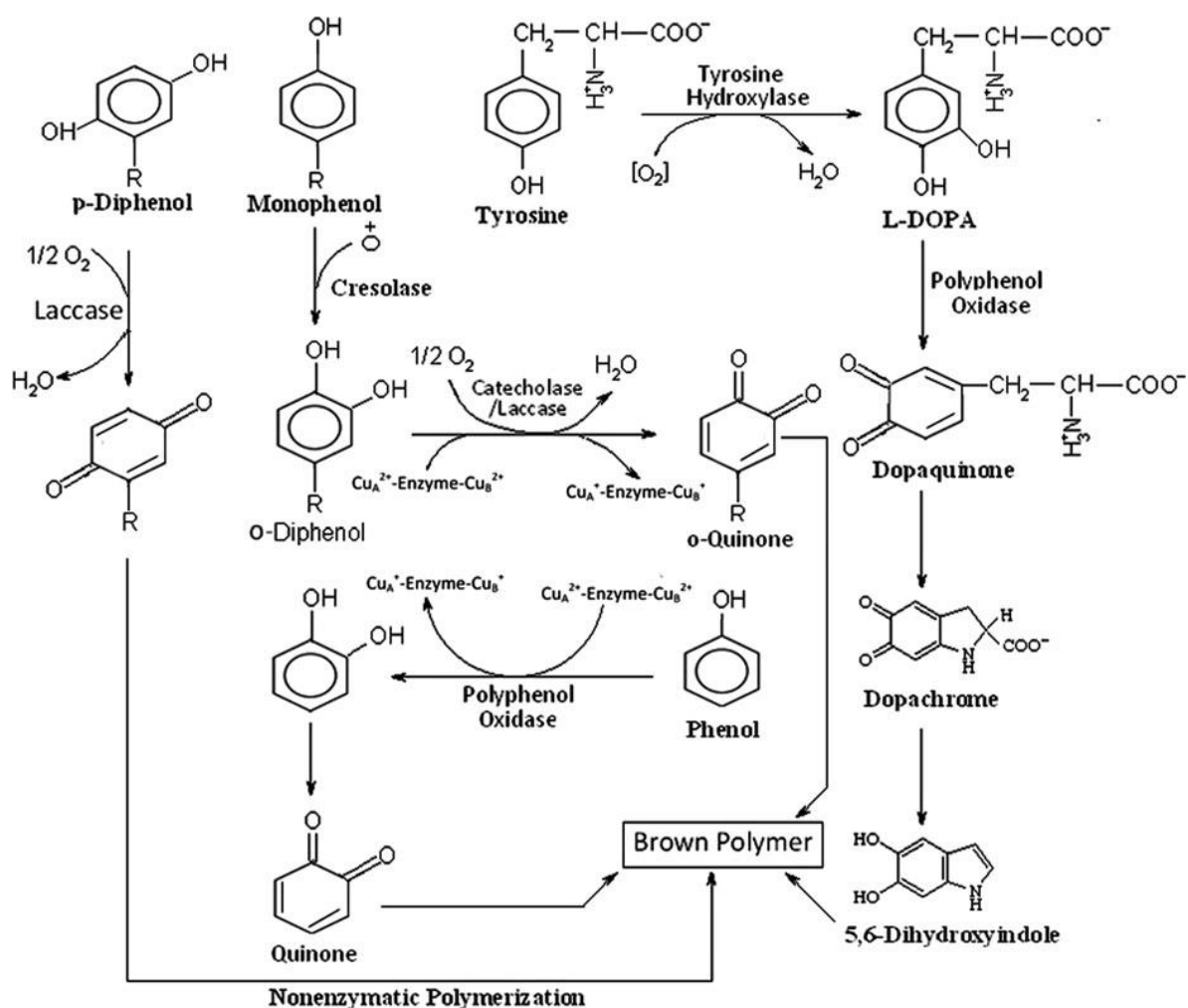


Figura 2 Polifenol oxidasas durante la transformación de compuestos fenólicos (Mukherjee et al., 2013).

Las lacasas son otro ejemplo de PPO, y una de las ventajas de usar éstas como biocatalizadores en el tratamiento de aguas residuales reside también en sus productos finales de reacción. De hecho, las lacasas oxidan compuestos fenólicos para formar sus correspondientes radicales libres que son muy reactivos. Estos radicales fenoxilo luego se polimerizan para formar variedades de oligómeros o degradar aún más los oligómeros formados en diferentes fragmentos. Además, se ha descubierto que los diversos metabolitos generados pierden total o significativamente su actividad biológica y toxicidad. Se argumenta que la eliminación de la actividad biológica del compuesto original podría estar relacionada con la eliminación física por precipitación de los oligómeros producidos mediante la

catálisis de lacasas, lo que implica que estos oligómeros son insolubles (Mukherjee et al., 2013).

2.2 Lacasas

Las lacasas (bencenodiol: oxidorreductasa de oxígeno, E.C. 1.10.3.2) son enzimas multicobre ampliamente distribuidas denominadas oxidasas azules, las cuales contienen átomos de cobre en el centro catalítico, comúnmente, las lacasas contienen tres tipos de cobre, uno de ellos es el que les da el característico color azul (Baldrian, 2006). Las lacasas catalizan la oxidación de fenoles, aminas aromáticas y otros compuestos aromáticos contaminantes con la reducción del oxígeno molecular a agua, atrayendo el interés de estas enzimas para aplicaciones industriales, blanqueamiento de tintes textiles y biorremediación de suelos. Las lacasas han sido aisladas de diferentes organismos como hongos, insectos, bacterias y plantas, con diversas funciones biológicas incluidas la morfogénesis, interacciones fúngicas planta patógeno/huésped, defensa ante estrés, degradación de lignina y reciclaje de materia orgánica del suelo. Estas enzimas son uno de los principales componentes del sistema enzimático extracelular responsable de la degradación de lignina en *Trametes versicolor*. Este es un hongo de podredumbre blanca, que cuenta con al menos 8 genes que codifican para diferentes lacasas siendo la lacasa III la isoenzima que se secreta en mayor cantidad (Iimura et al., 2018). Las lacasas son unas de las muy pocas enzimas que han sido estudiadas desde el final del siglo XIX.

2.2.1 Propiedades estructurales y catalíticas

El conocimiento actual sobre la estructura y fisicoquímica de las propiedades de las lacasas fúngicas se basa en el estudio de proteínas purificadas. Con base en los datos publicados, podemos obtener algunas conclusiones generales sobre lacasas, teniendo en cuenta que la mayoría de las enzimas fueron purificadas de hongos basidiomicetos crecidos en madera muerta; otros grupos de hongos productores de lacasas (ascomicetos y hongos imperfectos) se han estudiado en menor grado.

La actividad de la lacasa puede ser observada utilizando la tinción con *p-fenilendiamina*, este método permite evaluar la producción de lacasa en diferentes

hongos de pudrición blanca de la madera. Así se demostraron la presencia de lacasa en los siguientes hongos: *Coprinus plicatilis*, *Fomes fomentarius*, *Heterobasidion annosum*, *Hypholoma fasciculare*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Leptoporus litschaueri*, *Panus stipticus*, *Phellinus igniarius*, *Pleurotus corticatus*, *P. ostreatus*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum*, *Trametes gibbosa*, *T. hirsuta* y *T. versicolor*. Estos hongos exhibieron la producción de más de una isoenzima, típicamente con punto isoelectrico en el rango de pH 3–5.

Las lacasas son glicoproteínas monoméricas, diméricas o tetraméricas con cuatro átomos de cobre (que pertenecen a tres tipos: 1, 2 o 3) por monómero ubicado en el sitio catalítico. El cobre tipo 1 (T1) es responsable de la oxidación del sustrato e imparte el color azul a la enzima. Las lacasas usan oxígeno molecular para oxidar una variedad de donantes de hidrógeno aromáticos y no aromáticos a través de un mecanismo que involucra radicales libres. Estos radicales pueden sufrir más reacciones catalizadas por lacasa y/o reacciones no enzimáticas tales como polimerización, hidratación o extracción de hidrógeno (Majeau et al., 2010).

El grado de glicosilación generalmente varía entre 10% y 25%. La glicosilación de lacasas fúngicas es uno de los mayores problemas para la producción heteróloga de la enzima, que es extremadamente difícil de superar. Se propuso que, además del papel estructural, la glicosilación también puede participar en la protección de la lacasa de degradación proteolítica.

Hasta hace poco, las estructuras tridimensionales de cinco lacasas fúngicas se han reportado: *Coprinus cinereus* (en una forma agotada de cobre tipo 2), *T. versicolor*, *P. cinnabarinus*, *M. albomyces* y *R. lignosus*, las últimas cuatro enzimas con un complemento completo de iones de cobre. A pesar de la cantidad de información sobre lacasas y otras BMCO (Blue MultiCopper Oxidases, siglas en inglés), ni la ruta precisa de transferencia de electrones ni los detalles de la reducción de dióxígeno en BMCO se entiende completamente. Una comparación estructural detallada entre un bajo potencial redox (E_0) en lacasa *C. cinereus* y un (E_0) alto en

lacasa *T. versicolor* mostró que las diferencias estructurales de la coordinación del Cu1 posiblemente explican los diferentes valores de E_0 . Esto fue más tarde confirmado por el estudio de la lacasa *R. lignosus* con un alto potencial redox (Baldrian, 2006)

Es difícil definir la lacasa por su sustrato reductor debido a su amplio rango de sustrato, que varía de una lacasa a otra y se superpone con el rango de sustrato de otra enzima. A pesar de que la lacasa también fue llamada difenol oxidasa, monofenoles como el 2,6-dimetoxifenol o el guaiacol a menudo son mejores sustratos que los difenoles, p.ej. catecol o hidroquinona. La siringaldazina (4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzaldehído azina) a menudo se considera un sustrato único de lacasa, siempre que el peróxido de hidrógeno no esté presente en la reacción, ya que este compuesto también se oxida por las peroxidasas. La lacasa es, por lo tanto, una oxidasa que oxida polifenoles, fenoles sustituidos con sustituidos metoxifenoles, diaminas aromáticas y una gama de otros compuestos aromáticos (Majeau et al., 2010)

Debido a las propiedades de su sustrato, las enzimas que participan en la descomposición de la lignina suelen ser exclusivamente extracelulares, lo que hace que los procedimientos de purificación sean más sencillos y generalmente exhiben un nivel considerable de estabilidad en el entorno extracelular. Si bien esto, es sin excepción cierto para las lignino peroxidasas y las manganeso peroxidasas de hongos de podredumbre blanca, la situación no es la misma con las lacasas. Aunque la mayoría de las lacasas purificadas hasta ahora son enzimas extracelulares, las lacasas de hongos de pudrición blanca son también encontradas intracelularmente. La mayoría de las especies de hongos de podredumbre blanca probadas por Blauch y Esser (1975) produjeron lacasas tanto extracelulares como intracelulares con isoenzimas que muestran patrones similares de tinción de actividad después del enfoque isoeléctrico. Cuando *T. versicolor* fue crecido en un medio con glucosa, paja de trigo y hojas de haya, se produjeron lacasas extracelulares como intracelulares. La mayoría de la actividad enzimática se produjo

extracelularmente (98% y 95% en paja de trigo y madera de haya, respectivamente) (Baldrian, 2006).

La catálisis realizada por todos los miembros de la familia de oxidasas está garantizada por la presencia de diferentes centros de cobre en la molécula enzimática. En particular, todas las BMCO, se caracterizan por la presencia de al menos un cobre tipo 1 (T1), junto con tres iones de cobre adicionales: un tipo 2 (T2) y dos iones de cobre tipo 3 (T3), dispuestos en una agrupación trinuclear. Los diferentes centros de cobre pueden ser identificados sobre la base de sus propiedades espectroscópicas. El cobre T1 se caracteriza por una fuerte absorción alrededor de 600 nm, mientras que el cobre T2 exhibe solo una absorción débil en la región visible. El sitio T2 es activo por resonancia paramagnética electrónica (EPR), mientras que los dos iones de cobre del sitio T3 son silenciosos para EPR.

El potencial redox del sitio de cobre T1 es directamente responsable de la capacidad catalítica de la enzima. El mecanismo de interacción entre un sitio T1 de lacasa y su sustrato parece ser idéntico entre las lacasas fúngicas. En su estado nativo, la enzima contiene átomos de cobre en el estado monovalente como Cu^{+1} , cuando el dioxígeno se une al grupo trinuclear formado por cobre T2 y T3, los cuatro átomos de cobre se oxidan

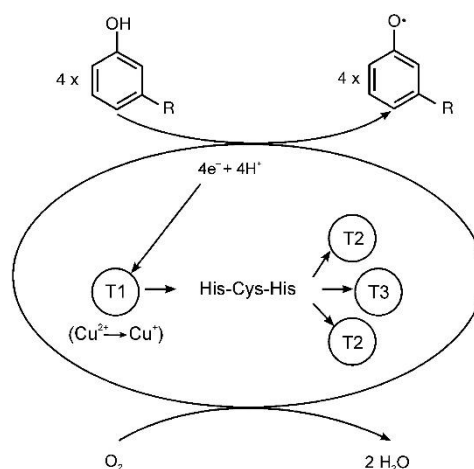


Figura 3 Ciclo catalítico de lacasa (Baldrian, 2006).

en dos pasos, mientras pasan a través de un intermediario de nivel de peróxido. El oxígeno se reduce a oxígeno divalente, y posteriormente se convierte en agua. Los electrones se transfieren desde el sitio T1 al grupo trinuclear por un motivo de tres residuos de aminoácidos His-Cys-His. Cada sustrato se oxida por un paso sucesivo de oxidación de un electrón. La captura de cuatro electrones por el sustrato devuelve a la enzima a su estado nativo. La relación estequiométrica correspondiente a la relación molar de la transformación sustrato/dioxígeno es

generalmente 4/1, es decir, cuatro electrones se retiran de cuatro moléculas de sustrato por cada dioxígeno reducido (Figura 3). (Majeau et al., 2010).

Algunas enzimas carecen de T1 cobre y algunos autores dudan en llamarlos verdaderas lacasas. Otros usan el término "lacasas amarillas" porque estas enzimas carecen de la banda de absorción característica alrededor de 600 nm.

La determinación inequívoca de la actividad lacasa se logra mejor mediante la purificación de la proteína a homogeneidad electroforética seguida de determinación de K_M o K_{cat} con múltiples sustratos. Idealmente, estos deben incluir sustratos como siringaldazina, ABTS o catecol, para los cuales la lacasa tiene una gran afinidad, y algunos (por ejemplo, tirosina) por el cual la lacasa tiene poca o ninguna afinidad. Dado que se requieren cuatro pasos de oxidación de sustrato de un solo electrón para la reducción de agua en cuatro electrones, se ha propuesto la analogía de una "célula de biocombustible" de cuatro electrones para explicar este mecanismo complejo.

Se sabe que las lacasas son altamente oxidantes, E_o varía en *Myceliophthora thermophila* de 450 a 480 mV y en *Polyporus pinsitus* de 760–790 mV y la presencia de cuatro iones cúpricos, cada uno coordinado en una sola cadena polipeptídica, es un requisito absoluto para una óptima actividad. Ha habido pocas mediciones de los potenciales redox de tirosinasa o catecol oxidasa; sin embargo, Ghosh y Mukherjee (1998) estimaron el E_o de un sistema modelo de tirosinasa de 260 mV, considerablemente más bajo que el reportado para lacasa, lo que sugiere que este tipo de enzima es mucho menos oxidante que la lacasa.

Las lacasas en general combinan alta afinidad por ABTS y siringaldazina con alta constante catalítica, mientras que la oxidación de guaiacol y DMP es considerablemente más lenta y las respectivas constantes K_M más altas. Los valores bajos de K_M son típicos para ácido sinápico, hidroquinona y ácido siríngico, mientras que se encontraron valores relativamente altos para fenoles *p*-sustituídos, ácido

vanílico o su aldehído. Para las especies capaces de oxidar hidrocarburos aromáticos policíclicos o pentaclorofenol, solo se detectaron constantes catalíticas muy bajas para estos compuestos xenobióticos; el valor de K_M también es alto para pentaclorofenol con la lacasa de *T. versicolor*.

Incluso los primeros reportes mostraron que las lacasas difieren considerablemente en sus preferencias catalíticas. Las lacasas se pueden agrupar según su preferencia por fenoles orto, meta o para-sustituídos. Compuestos o-sustituído (guaiacol, o-fenilendiamina, ácido cafeico, catecol, dihidroxifenilalanina, ácido protocatéquico, ácido gálico y pirogalol) fueron mejores sustratos que los compuestos para-sustituídos (*p*-fenilendiamina, *p*-cresol, hidroquinona) y se obtuvieron las tasas más bajas con compuestos meta-sustituídos (m-fenilendiamina, orcinol, resorcinol y floroglucinol) con preparaciones de lacasa cruda de *L. litschaueri* y *P. brumalis*. También se obtuvieron resultados similares con *T. versicolor* y los ascomicetos *P. anserina* y *Pyricularia oryzae*, mientras que la lacasa de *Ganoderma lucidum* catalizó la oxidación de solo compuestos orto y para dihidroxifenilo, *p*-fenilendiamina y polifenoles, no en compuestos metahidroximetílicos o ácido ascórbico.

Las lacasas fúngicas típicamente exhiben un pH óptimo ácido. Mientras que el pH óptimo para la oxidación de ABTS es generalmente inferior a 4.0, los compuestos fenólicos como DMP, guaiacol y siringaldazina exhiben valores más altos de entre 4.0 y 7.0. La oxidación de fenoles depende de la diferencia de potencial redox entre el compuesto fenólico y el cobre T1. Los perfiles de temperatura de la actividad lacasa generalmente no difieren de otras enzimas ligninolíticas extracelulares con optima entre 50°C y 70 °C (Baldrian, 2006).

2.2.2 Lacasas en el entorno natural.

La considerable atención dedicada a los basidiomicetos de podredumbre blanca y su sistema ligninolítico en el pasado podría conducir a la conclusión de que la madera en descomposición es el ambiente más típico para la producción de lacasas. En comparación con la madera, el suelo o la basura son ambientes más

complejos y heterogéneos, que pueden dificultar la detección y estimación de enzimas. Otro problema es vincular las actividades enzimáticas en suelo a una especie específica que lo produce, si esto es posible. Varios trabajos realizados por Lang (1997, 1998) y Baldrian (2000) sugirieron la producción de enzimas por hongos introducidos en suelos y una serie de protocolos para la extracción de lacasa se han propuesto para optimizar el rendimiento de extracción. Estos incluyen incubación directa con guaiacol con lacasa como sustrato, extracción con tensoactivos o cloruro de calcio o la extracción más utilizada con buffer de fosfatos, dependiendo de la naturaleza del sustrato.

La actividad lacasa refleja el curso de la degradación de sustancias orgánicas y por lo tanto varía con el tiempo. Se encontró que la actividad aumentaba durante la degradación de la hojarasca, en hojarasca mediterránea de hoja ancha y el patrón de isoenzimas detectadas varió durante la sucesión. La actividad de la lacasa también refleja la presencia de micelios fúngicos. Junto con el gradiente vertical de distribución fúngica en los perfiles del suelo, la disminución de la actividad lacasa también se refleja en la disminución de la lacasa con profundidad del suelo.

Las lacasas como las enzimas ligninolíticas más abundantes en el suelo también atrajeron la atención de los ecologistas que estudian su papel en el ciclo del carbono, especialmente con respecto al nitrógeno. Varios estudios documentaron una disminución significativa de lacasas y peroxidasas en suelos forestales sometidos a elevadas dosis de nitrógeno, con el aumento simultáneo en la capa de arena. Este fenómeno fue acompañado por la disminución de la biomasa fúngica y el hongo: la relación de biomasa bacteriana en el suelo, así como por una mayor incorporación de vainillina como modelo de sustrato derivado de lignina en biomasa fúngica; por lo tanto, parece que la deposición de nitrato dirige el flujo de carbono a través de la red alimentaria heterotrófica del suelo. Por otro lado, un aumento de compuestos fenólicos en el suelo del bosque después de la quema aumentó la actividad de lacasa (Baldrian, 2006).

2.2.3 Lacasas en biotecnología ambiental

Existen muchas aplicaciones potenciales para las lacasas en diferentes sectores industriales y tecnológicos, entre los que destacan los citados en la tabla 1.

Aplicación	Producto o servicio	Referencia
Industria alimentaria	Procesamiento de bebidas. Determinación del ácido ascórbico. Gelificación de la pectina de remolacha azucarera.	(Osma et al., 2010).
Industria papelera	Blanqueo sin cloro de pulpa de papel. Tratamiento de efluentes.	(Couto y Herrera, 2006).
Industria textil	Modificación de fibras. Blanqueo de tejidos. Degradación de tintes de aguas residuales.	(Couto y Herrera, 2006).
Industria mueble y construcción	Reticulación de materiales a base de lignina.	(Alcalde, 2007).
Industria de pinturas	Sistemas mediadores de lacasa para el secado de resinas alquídicas	(Greimel et al., 2013).
Biocombustibles	Para eliminar compuestos fenólicos que inhiben la fermentación de los azúcares presentes en el hidrolizado de materiales lignocelulósicos.	(Kudanga y Le Roes-Hill, 2014).
Biorremediación del suelo	Degradación del 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y PAH	(Couto y Herrera, 2006).
Industria cosmética	En la elaboración de tintes para el cabello y preparaciones para aclarar la piel.	(Couto y Herrera, 2006).
Nanobiotecnología	Desarrollo de células de biocombustible y biosensores para detectar diferentes compuestos y metabolitos.	(Kunamneni et al., 2008), (Mate et al., 2015).

Tabla 1 Aplicaciones industriales de lacasas. (Adaptación de Mate et al., 2015)

Las lacasas son generalmente producidas constitutivamente en al menos algunas etapas del crecimiento de un hongo particular. Se pueden extraer de sustratos lignocelulósicos colonizados por hongos, así como del suelo o basura forestal, o utilizada en forma de sustrato gastado del cultivo de hongos comestibles. La

posibilidad de aumentar la producción de lacasa mediante la adición de inductores a hongos y un proceso de purificación relativamente simple son otras ventajas. Por último, pero no menos importante, la considerable cantidad de datos sobre las propiedades de las lacasas fúngicas acumulado en los últimos años nos permite seleccionar una proteína adecuada para una aplicación específica (p. ej., resistente a la temperatura o pH estable).

Sin embargo, el bajo potencial redox de las lacasas (450–800 mV) en comparación con los de las peroxidasas ligninolíticas (>1V) solo permite la degradación directa de compuestos de bajo potencial redox y no la oxidación de más compuestos aromáticos recalcitrantes, incluidos algunos colorantes sintéticos o hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Xu et al., 1996). Los compuestos con mayor potencial redox solo se pueden transformar si el producto de reacción está sujeto a una reacción inmediatamente posterior o cuando su potencial redox se baja, por ejemplo, por quelación (Baldrian, 2006).

La producción de lacasa por hongos lignolíticos ha sido investigada debido a la capacidad de estos microorganismos para crecer en sustratos económicos, la secreción de enzimas y su capacidad para oxidar compuestos xenobióticos. Sin embargo, la producción de enzimas en general conlleva grandes inconvenientes (baja producción de enzimas, baja actividad catalítica, largos períodos de producción y altos costos de purificación), que dificulta el equilibrio ideal de demanda / oferta, para la aplicación industrial deseada. Como resultado, grupos académicos y las empresas han centrado sus energías en el uso de ingeniería genética, ingeniería de proteínas, estrategias de inmovilización en soportes inertes o vivos, búsqueda de nuevas fuentes microbianas, sustratos disponibles de bajo costo (Bertrand et al., 2015).

2.2.4 Compuestos fenólicos y su oxidación

Los polifenoles son compuestos orgánicos; compuestos monocíclicos (fenoles y ácidos fenólicos) y propanoides de fenilo, ambos caracterizados por contar con un

bajo peso molecular y los compuestos poliméricos (taninos, ligninas y melaninas) se caracterizan por un grupo oxhidrilo unido a un anillo aromático (por ejemplo, catequina, ruteno, ácido gálico, flavonona, flavonoles, etc.). Estos compuestos causan fitotoxicidad de las aguas residuales agroalimentarias y la biodegradación microbiana convencional no se puede aplicar ya que estos contaminantes poseen inhibición de la actividad bacteriana. Este problema es de gran importancia cuando las aguas residuales se descargan en el suelo, los compuestos polifenólicos biológicamente recalcitrantes causan una alteración de los ciclos biogeoquímicos como la inhibición de los procesos de nitrificación al inhibir el crecimiento de la fijación de nitrógeno y las bacterias nitrificantes y, por lo tanto, causan fitotoxicidad (Mukherjee et al., 2013).

Los fenoles y compuestos fenólicos son importantes para muchas industrias. Ellos son encontrados en los residuos de procesos de industrias, tales como refinerías de petróleo, manufactura industrial de resina, plantas procesadoras a base de petróleo, farmacéuticas y manufactura plástica (Afzal et al., 2007). Son altamente tóxicos y estables, también exhiben capacidad de bioacumulación; por lo tanto, todavía pueden existir en el medio ambiente durante un período de tiempo más largo. Son típicamente cancerígenos; por lo tanto, no solo dañan significativamente y ponen en peligro el ecosistema acuático, sino que también afectan negativamente la salud humana. Algunos fenoles, por ejemplo, alquilfenoles, BPA, 2,4-diclorofenol y pentaclorofenol, pueden alterar la función de las hormonas sexuales y eventualmente pueden conducir a la esterilidad animal y humana. Todos los isómeros de cresol son tóxicos y pueden tener efectos adversos en los sistemas nervioso, cardiovascular y respiratorio y han sido catalogados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos (Singh et al., 2020).

Su uso extenso ha llevado a la contaminación generalizada de suelos, ríos, efluentes industriales y aguas de escorrentía de relleno. Los compuestos fenólicos también pueden actuar como inhibidores de sustrato durante el proceso de

biotransformación. Por lo tanto, es necesario eliminarlos de manera efectiva para proteger el medio ambiente y salvaguardar la salud de los seres humanos (Wei et al., 2008).

Se han aplicado métodos físicos, químicos y biológicos para eliminar tales contaminantes tóxicos de las aguas residuales industriales. El método físico aplicado recientemente incluye sorción rápida en el lodo activado, adsorción por adsorbentes de bajo costo como los negros de humo, carbón activado en polvo y cascarilla de arroz pirolizada, etc. El sistema de descarga pulsado de alto voltaje también es un buen método físico para eliminar contaminantes orgánicos. Mientras que el método químico incluye la reacción de Photo-Fenton para la eliminación de compuestos aromáticos naturales o sintéticos y un sistema de resina impregnada de solvente para la eliminación de fenoles y tiofenoles del agua mediante la formación de complejos por enlaces de hidrógeno de óxidos de fosfina y fosfatos. La desintoxicación electroquímica de las aguas residuales puede lograrse mediante membranas de intercambio iónico como electrolitos poliméricos sólidos (Heyl y Jorissen, 2006).

La degradación microbiana es una estrategia valiosa para eliminar compuestos fenólicos y desintoxicar ambientes contaminados y aguas residuales. El fenol y sus compuestos, como el fenol sustituido con metilo (orto, meta y para), son productos de la industria del petróleo y son degradados por varios microorganismos, como levaduras, bacterias y hongos. La degradación por bacterias es más eficiente que la de otros microbios.

La biodegradación aeróbica incluye la degradación microbiana de compuestos orgánicos por oxidación; por lo tanto, la química del sistema, organismo o ambiente se caracteriza por condiciones aeróbicas. En las reacciones químicas, el oxígeno se usa para descomponer los contaminantes orgánicos en agua y dióxido de carbono. Al igual que otros compuestos aromáticos, los fenoles y sus derivados en ambientes contaminados son degradados por diversos microorganismos aerobios.

Los métodos convencionales antes mencionados para el tratamiento de fenoles poseen varias desventajas, como que estos compuestos no son particularmente bi-refractarios y sufren varios inconvenientes, tales como alto costo, eliminación incompleta, formación de subproductos peligrosos que son aún más tóxicos que los fenoles originales, baja eficiencia, altos requerimientos de energía y/o aplicabilidad solo en un rango de baja concentración. Por lo tanto, existe la necesidad de algunas estrategias novedosas de buen desempeño, alta eficiencia y máxima aplicabilidad.

El tratamiento enzimático es simplemente la mejor forma biológica de eliminar los fenoles de las aguas residuales industriales. El tratamiento de fenoles acuosos con enzimas oxidorreductoras es un método eficiente y rentable, propuesto primero por Klibanov et al., en 1980, según ellos, las peroxidasas o PPO pueden utilizarse mejor para la eliminación de contaminantes fenólicos.

Similar al tratamiento biológico, el tratamiento enzimático utiliza un biocatalizador, a saber, una enzima, para transformar compuestos fenólicos para su eliminación del agua. Los microorganismos degradan el fenol utilizando sus diferentes sistemas enzimáticos. Entre todas las enzimas, las oxidorreductasas como las peroxidasas, así como las lacasas y tirosinasas, que son enzimas que contienen cobre, pueden catalizar la eliminación de contaminantes fenólicos. Los monofenoles son hidroxilados por tirosinasas a o-difenoles, que posteriormente se oxidan a o-quinonas. El oxígeno molecular (cuatro electrones) y el peróxido de hidrógeno (dos electrones) son necesarios para la activación de la lacasa y la peroxidasa de hemo-proteína (Mukherjee et al., 2013).

Sin embargo, como la enzima libre actualmente no es adecuada para el uso a gran escala en los procesos de biorremediación, debido a que esta no se recupera, por ello se han intentado varias técnicas de inmovilización que permitan su reutilización. Por ejemplo, Nicolucci et al., (2011), utilizando la lacasa de *T. versicolor* inmovilizada en perlas de poliacrilonitrilo en un FBR, pudieron eliminar completamente el bisfenol A, el bisfenol B, el bisfenol F y convertir el 96% de

tetraclorobisfenol A, después de 90 minutos de tratamiento enzimático de aguas contaminadas. En un reactor discontinuo, Zhang et al., (2009) reportaron la eliminación del 88.8% de 2,4-diclorofenol en solución acuosa usando la lacasa de *Coriolus versicolor* inmovilizada en quitosano. En otros estudios por D'Annibale et al., (2000) con fenoles y orto-difenoles reportaron la eliminación de un 67 y 72%, respectivamente en el efluente de la almazara después de 24 h de aplicación de lacasa de *Lentinula edodes* inmovilizada en quitosano. Aunque la aplicación de lacasa inmovilizada para la eliminación de contaminantes en solución acuosa es poco reportada en la literatura, los ejemplos anteriores son ilustrativos del potencial de lacasa inmovilizada en la biorremediación de aguas residuales (Ba et al., 2013).

2.3 Inmovilización de enzimas

Cuando las enzimas se aíslan de las células, se convierten en catalizadores solubles que generalmente son muy inestables. Por esta razón, la conversión de biocatalizadores solubles e inestables en derivados enzimáticos heterogéneos y muy estables es un punto clave en la ingeniería enzimática.

Desde un punto de vista práctico, la falta de estabilidad de la mayoría de las enzimas constituye una limitación crítica. Los biocatalizadores y reactores con enzimas inmovilizadas no pueden usarse durante largos períodos de tiempo debido a que presentan diversas limitaciones; no se puede forzar la condición experimental para solubilizar altas concentraciones de sustrato y productos; el diseño de sistemas de reacción sin disolventes es muy complejo, etc.

Por otro lado, las enzimas han evolucionado para funcionar en el contexto del metabolismo celular; utilizan preferentemente sustratos naturales a baja concentración y sufren inhibición de producto/sustrato debido a la estricta regulación que presentan las redes metabólicas. Todas estas limitaciones impuestas por la naturaleza deben abordarse a través de diferentes técnicas biológicas (ingeniería de proteínas), fisicoquímicas (ingeniería de enzimas) y mediante ingeniería de reacción y reactores.

La enzima producida a partir de células activas es un catalizador muy eficaz. Comparado con el catalizador químico, tiene muchas ventajas, como alta especificidad, alta eficiencia catalítica y una actividad ajustable que fomenta en gran medida su uso en la industria farmacéutica, química y alimentaria. Sin embargo, su baja estabilidad, baja reutilización y alto costo de un solo uso limitan su aplicación en el contexto industrial. A menudo se requiere la inmovilización de enzimas para resolver su problema de la solubilidad y las dificultades de reutilización de las mismas en aplicaciones industriales. Por ello, la selección de las técnicas de inmovilización adecuadas también puede mejorar algunas propiedades enzimáticas (en muchos casos, fisiológicas) que pueden ser una desventaja en el reactor industrial, como estabilidad moderada, inhibición por sustratos o productos, y selectividad o especificidad moderada para sustratos relacionados industrialmente.

Hasta el día de hoy, se han utilizado diversos soportes y métodos para la inmovilización enzimática con el fin de mejorar las propiedades de la enzima libre. Como los métodos utilizados en los procedimientos de inmovilización influyen en gran medida en las propiedades del biocatalizador resultante, la selección de una estrategia de inmovilización determina las especificaciones del proceso para el catalizador. Incluyen varios parámetros, como la actividad catalítica general, la eficacia de la utilización del catalizador, la cinética de desactivación y regeneración, y el costo. Además, la toxicidad de los reactivos de inmovilización debe considerarse en relación con el proceso de inmovilización, la eliminación de residuos y la aplicación final del catalizador de enzima inmovilizada (Duran et al., 2000).

La inmovilización de las lacasas puede protegerlas de la desnaturalización por disolventes orgánicos, aumentar su estabilidad en general, facilitar la separación de los productos de reacción y mantener una buena eficiencia catalítica durante muchos ciclos de reacción.

Las lacasas inmovilizadas han demostrado ser efectivas para la eliminación de fenol tanto en aguas residuales sintéticas como industriales. La naturaleza del soporte y

la metodología empleada para la inmovilización dan como resultado diversas propiedades catalíticas, estabilidad, costos y propiedades de manipulación. Es importante tener en cuenta la morfología del portador para optimizar la inmovilización (tamaño de poro, química del grupo de anclaje, densidad), pero también es importante elegir el valor de pH adecuado y la concentración de enzima durante la inmovilización. El injerto covalente evita la lixiviación de la lacasa y mejora la estabilidad de la enzima en condiciones extremas. Por otro lado, las complicaciones comunes de menor actividad específica y mala fijación de lacasa se encuentran con menos frecuencia cuando se utiliza la adsorción (Majeau et al., 2010).

Los sistemas de expresión heteróloga que emplean a la levadura permiten la expresión exitosa de moléculas de proteínas grandes, no solo de proteínas de una sola subunidad sino también de múltiples subunidades hetero oligoméricas. Además, se pueden mostrar varias proteínas diferentes simultáneamente. Las proteínas quedan inmovilizadas en la superficie celular, y esta característica se transmite a las células hijas siempre y cuando que las células mantengan el sistema de expresión estable. La capacidad de producir enzimas debería mejorar aún más el estado de *S. cerevisiae* como un microorganismo adecuado y conveniente capaz de actuar como un biocatalizador de células completas. Esto es particularmente importante cuando las células no pueden tomar sustratos específicos. Además, el sistema permite la producción de biocatalizadores renovables.

En la ingeniería de la superficie celular, la modificación de la superficie celular se combina con la dotación de células de levadura con funciones metabólicas adicionales. Las cepas de levadura resultantes tienen una amplia variedad de aplicaciones industriales. Los diversos tipos de bibliotecas de proteínas que se despliegan en la superficie de la célula de levadura prometen suministrar nuevas moléculas de proteínas con una afinidad y estabilidad de unión significativamente elevadas y dotadas de nuevas funciones (Kondo et al., 2004).

2.5 Ingeniería de proteínas

Los biocatalizadores se utilizan cada vez más en la química sintética industrial, particularmente en los casos en que las rutas químicas son difíciles de implementar. La mayoría (65%) de las enzimas industriales son de acción hidrolítica y se usan ampliamente en las industrias textil, de almidón, pulpa y papel, cuero, cuidado personal y detergentes; el resto se usa principalmente en el procesamiento de alimentos (25%) o en suplementos alimenticios para animales (10%). Las enzimas ofrecen varias ventajas importantes sobre los catalizadores químicos tradicionales, ya que las enzimas son biodegradables, por lo general ofrecen una selectividad, estereoselectividad, regioselectividad y quimioselectividad excelentes, y por lo tanto producen productos enantioméricamente puros y funcionan a temperaturas, pH y presiones relativamente suaves.

Desafortunadamente, a menudo existe una brecha funcional entre lo que la naturaleza nos proporciona y lo que requerimos de una enzima para que funcione correctamente en condiciones de proceso industrial. Las características de la enzima, como su actividad, estabilidad, selectividad, solubilidad y pH óptimo, con frecuencia deben optimizarse para un proceso dado. Se han desarrollado varias técnicas y se utilizan para adaptar enzimas para aplicaciones industriales específicas (Johannes et al., 2006).

La definición del diccionario de biocatalizador es: “aquella sustancia, en especial una enzima, que inicia o modifica la velocidad de una reacción química sin ser ella misma afectada por esta reacción”. Estas enzimas o biocatalizadores son energéticamente eficientes y prácticamente todas llevan a cabo su función bajo condiciones moderadas: temperatura ambiente, presión atmosférica y en ambientes acuosos. Además, generan muy pocos productos de desecho. Sin embargo, para poder llevar a cabo procesos aplicados de manera rentable, las capacidades de las enzimas pueden mejorarse mediante métodos de ingeniería de proteínas (Peña-Montes, 2008). Estos métodos tienen la finalidad de generar variantes enzimáticas que sean aún más activas o duraderas, o que puedan actuar sobre sustratos diferentes al original o funcionar en condiciones diferentes a las que trabajan de

manera fisiológica dentro de su organismo de origen, tales como: temperaturas elevadas, presencia de compuestos inhibitorios o solventes diferentes al agua. La creciente presión para llevar a cabo procesos ambientalmente amigables es un motor para el uso de enzimas, por lo que su mejoramiento en el laboratorio es deseable.

Al emplear técnicas que intentan imitar la evolución natural en un proceso de generación de variabilidad-selección, la ingeniería de proteínas utiliza diferentes estrategias dependiendo del grado de conocimiento que se tenga sobre ellas. De una enzima es posible conocer la secuencia del gen que la codifica, que es indicativa de su secuencia de aminoácidos, según el código genético.

El diseño racional de proteínas utiliza información estructural de la enzima, como los datos de la estructura cristalina o los datos obtenidos de modelos de homología, para identificar residuos específicos que pueden mutarse para mejorar una propiedad específica, como la especificación del sustrato o la termoestabilidad. El diseño racional de proteínas y la evolución dirigida se basan en una comprensión detallada de la relación entre la estructura y la función de las proteínas. A partir de un solo gen objetivo o un conjunto de genes blanco, se crea una biblioteca de genes mutantes mediante mutagénesis aleatoria y/o recombinación de genes. La biblioteca resultante se clona en un vector de expresión y se inserta en microorganismos para la expresión de proteínas. Las proteínas mutantes funcionalmente mejoradas se identifican a través de una selección cuidadosamente diseñada o un método robusto de detección de alto rendimiento, y luego se utilizan como plantillas para la próxima ronda de mejora. El mismo proceso se repite hasta que se alcanza el objetivo o no es posible una mejora adicional. Como resultado, la elección de métodos de generación de diversidad y métodos de selección o selección adecuados son a menudo cruciales para el éxito de los experimentos de evolución dirigida. En general, los métodos de ingeniería de proteínas pueden dividirse ampliamente en dos tipos: a) métodos de evolución dirigida, y b) métodos de diseño racional. (Martínez et al., 2014).

En la última década, la evolución dirigida se ha convertido en una herramienta poderosa para adaptar varias funciones enzimáticas. Permite el desarrollo de enzimas adecuadas con especificidad, actividad, estabilidad y solubilidad mejoradas que operan en condiciones de proceso industrial (Johannes et al., 2006).

Cuando la información estructural de una enzima es limitada, la producción adecuada de la proteína en el laboratorio es suficiente para llevar a cabo ensayos de evolución dirigida. En este caso, la teoría de la evolución conocida para las especies, en la que la acumulación de mutaciones genera variabilidad, es aplicada en la evolución dirigida de proteínas, aunque en escalas de tiempo miles de veces más cortas.

Para este propósito el gen de la enzima de interés es sometido a la técnica conocida como PCR (por sus iniciales en inglés: Polymerase Chain Reaction), en la que el fragmento de ADN que codifica a la enzima es copiado y replicado millones de veces por una enzima polimerasa de ADN. Si esta polimerasa replica al ADN introduciendo errores que no son reparados, al final de la reacción de PCR se tendrán millones de moléculas

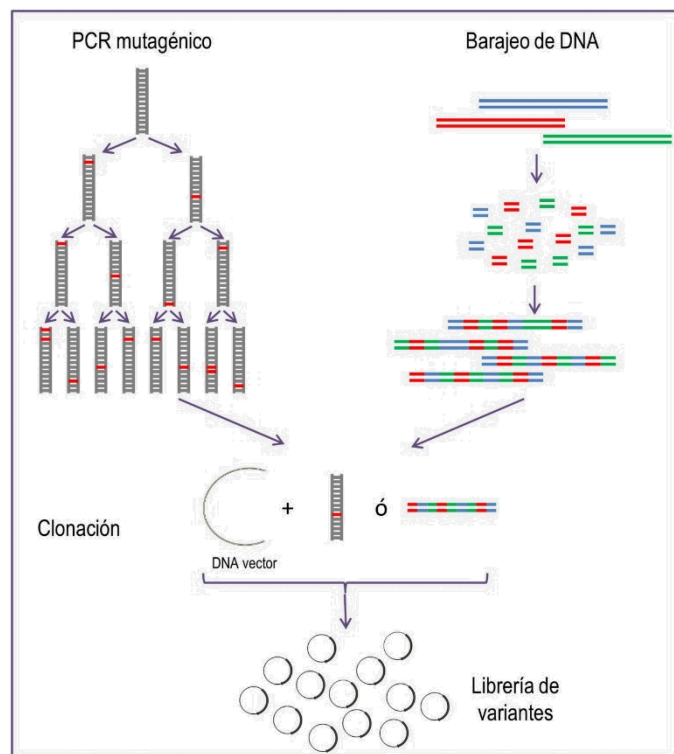


Figura 4 Métodos de evolución dirigida (Martínez et al., 2014)

(o mutaciones) con respecto a la original. Cuando se desconoce qué secuencia de aminoácidos es la que conferirá una mejor actividad a la enzima, es deseable que

los cambios que se producen en la reacción de PCR ocurran al azar y con poca frecuencia (para evitar generar muchas variantes inactivas) (Figura 4).

Las técnicas actuales en el laboratorio permiten manipular o controlar la tasa de error durante la replicación de un gen, pudiendo llegar a tener de 2 a 8 mutaciones por cada 1000 pares de bases replicadas. Las poblaciones de moléculas variantes que llegan a obtenerse con este método deben ser posteriormente clonadas en un vector para su producción y la verificación del cambio enzimático buscado. Los genes de la o las variantes que presenten cambios positivos pueden ser sometidos a nuevos ciclos de PCR para intentar obtener aún mejores actividades. Cuando la mutagénesis ocurre a lo largo de toda la secuencia proteica, el número de variantes generadas es inmenso y en la práctica es posible el análisis de sólo una fracción infinitesimal de estas colecciones (Martínez et al., 2014).

Uno de los principales obstáculos al diseñar lacasas fúngicas es su escasa expresión funcional en huéspedes heterólogos y su secreción limitada. Por su naturaleza eucariota y simples requerimientos de fermentación, *Saccharomyces cerevisiae* es un microorganismo adecuado para mejorar las lacasas recombinantes por evolución dirigida.

Durante los últimos 10 años, las lacasas de potencial redox medio y alto se han expresado heterológamente mediante la evolución de laboratorio en levaduras, principalmente *S. cerevisiae*. Hay cuatro razones principales para usar *S. cerevisiae* para la evolución dirigida de las lacasas fúngicas: i) tiene una alta eficiencia de transformación (10 UFC de unidades formadoras de colonias por μg de ADN), comparable a la de *E. coli* (10 UFC por μg de ADN); ii) puede secretar lacasas al medio extracelular, evitando los complicados pasos de lisis celular requeridos en las bacterias; iii) existe una amplia variedad de vectores episomales uni y bidireccionales disponibles en el mercado que facilitan la recuperación de variantes mejoradas; y iv) muestra una alta frecuencia de recombinación de ADN homólogo, lo que permite la reorganización in vivo de bibliotecas mutantes y el desarrollo de

nuevas herramientas para la creación de diversidad genética (Gonzalez-Perez et al., 2012).

El primer estudio exitoso sobre la evolución dirigida de una lacasa de hongos se realizó con la lacasa de potencial redox medio del ascomiceto termofílico *M. thermophila* (MtL) (Bulter et al., 2003). El gen de la lacasa completo sometido a evolución comprendía la secuencia madura unida a la secuencia prepro-líder nativa y la cola C-terminal, las dos últimas se escinden de la proteína madura durante la maduración. En total, se exploraron 20.000 clonas en 10 rondas de mutagénesis aleatoria combinadas con el proceso de extensión escalonada (StEP) y la reorganización in vivo, dando lugar a los niveles de expresión más altos de una lacasa en *S. cerevisiae* reportados hasta ahora (18 mg/L). La mejor mutante generado en este proceso (la variante T2) acumuló 14 mutaciones que fueron responsables de una mejora de 170 veces en la actividad total, 8 veces en los niveles de expresión y 22 veces en la k_{cat} para ABTS.

El éxito con MtL condujo a la posterior evolución en el laboratorio de la expresión funcional en *S. cerevisiae* de dos HRPL (High Redox Potencial Laccases): los de los basidiomicetos ligninolíticos PM1 y *Pycnoporus cinnabarinus* (Camarero et al., 2012; Mate et al., 2010). La lacasa PM1 (PM1L) se sometió a ocho rondas de evolución dirigida combinada con un diseño semirracional (Mate et al., 2010). La secuencia señal nativa fue reemplazada por el factor α prepro-líder de *S. cerevisiae*, y el gen de fusión completo evolucionó para mejorar la actividad total de lacasa 34,000 veces comparado sobre el tipo parental. Después de seleccionar más de 50.000 clones, se localizaron 15 mutaciones beneficiosas en la señal preprolíder (cinco mutaciones) y la proteína madura (diez mutaciones), mientras que la estabilidad de la proteína se conservó mediante una estrategia combinada. La mutante con mejor desempeño de este proceso (la variante OB-1) tuvo los niveles más altos de secreción jamás reportados para un HRPL en *S. cerevisiae* (~ 8 mg/L), valores cinéticos mejorados para sustratos fenólicos y no fenólicos, así como altos

en términos de tolerancia a pH, tolerancia a los codisolventes orgánicos y temperatura.

De hecho, la evolución de PM1L fue elegida recientemente como modelo para validar protocolos computacionales que permiten la cuantificación de la estabilidad relativa de mutantes de HRPL. Los protocolos desarrollados se aplicaron a nueve mutantes de PM1L diferentes, mostrando en todos los casos una buena correlación con los valores experimentales.

En un estudio de evolución dirigida en paralelo, PcL se adaptó utilizando una estrategia similar a la empleada para PM1L. Después de seis rondas de evolución acopladas a un ensayo de HTS basado en la oxidación de mediadores naturales y sintéticos, la actividad de lacasa total mejoró 8000 veces con respecto al α -PcL original. La mutante final de este estudio (la variante 3PO) acumuló un total de 15 mutaciones en el gen de fusión. Las cinco mutaciones localizadas en el prepro-líder del factor α fueron responsables de un aumento de 40 veces en la secreción por *S. cerevisiae* (~2mg/L), mientras que las diez mutaciones beneficiosas en la proteína madura condujeron a un aumento de 13,7 veces en la k_{cat} para ABTS. En particular, el perfil de actividad de pH se cambió a valores de pH más neutros a lo largo de esta evolución, mientras que se mantuvo la termoestabilidad.

Además, la lacasa POXA1b de *Pleurotus ostreatus* se desarrolló con el objetivo de aumentar su actividad utilizando *S. cerevisiae* como hospedador. Se analizó una biblioteca de 2300 variantes mutadas aleatoriamente mediante el análisis de la actividad hacia ABTS y DMP, produciendo mutantes de lacasa con actividad específica mejorada y/o estabilidad mejorada. Además, las simulaciones de dinámica molecular de la enzima de tipo salvaje y dos mutantes permitieron comprender los cambios observados en las propiedades de las lacasas a nivel molecular. Entre el conjunto de variantes evolucionadas, la mutante más estable y el que tenía la mayor eficiencia catalítica se seleccionaron como tipos parentales para mejorar aún más la actividad de lacasa frente a ABTS. La estrategia implicó la

incorporación de las mutaciones de ambos genes parentales en el mismo andamio de genes de lacasa, que posteriormente fue sometido a mutagénesis aleatoria y cribado.

La mutante de lacasa POXA1b de mejor rendimiento (la variante 1H6C) tenía una actividad específica 5 veces mayor hacia ABTS en comparación con el tipo silvestre (Wild Type), así como una mayor estabilidad en todo el rango de pH.

El gen *lcc1* que codifica la lacasa de *T. versicolor* se clonó en el genoma de *Y. lipolytica*. Después de comprobar la secreción satisfactoria en el medio de cultivo, se seleccionó la cepa con una sola integración para la expresión y el posterior conjunto de bibliotecas mutantes. La mejor variante (la mutante rM-4A) contenía dos mutaciones (L185P/Q214K), que dieron lugar a un aumento de 5,8 veces en la actividad total en comparación con el WT, junto con una mejora de 2,4 y 2,8 veces de la eficiencia catalítica hacia ABTS y DMP, respectivamente. Además, la lacasa del patógeno vegetal *Fomes lignosus* se expresó funcionalmente en *P. pastoris*, la mejor variante de lacasa (la mutante PPM5) albergaba cuatro mutaciones que eran responsables de un aumento de 3,7 veces en la expresión (144 mg/L), así como una k_{cat} 1,4 veces mayor para ABTS. Dos de las mutaciones (específicamente G160D y A167T) se encontraron en la proximidad del canal de agua y se convirtieron en aminoácidos hidrófilos, que podrían ayudar a las moléculas de agua a salir del grupo trinuclear, explicando así el aumento de k_{cat} .

Los HRPL son un claro ejemplo de biocatalizadores generalistas que hacen virtud de la promiscuidad de sus sustratos. Impulsados por oxígeno molecular, transforman cientos de sustratos de diferente naturaleza y complejidad, que van desde xenobióticos hasta biopolímeros (lignina y almidón). Por tanto, los HRPL tienen aplicaciones potenciales. Desafortunadamente, su diseño práctico por evolución dirigida se ha visto obstaculizado hasta ahora por la falta de enfoques apropiados para sortear los complejos problemas de su expresión funcional. El HRPL hecho a medida se puede exportar fácilmente en formas solubles, activas y estables, lo que abre una nueva gama de posibilidades para una mayor ingeniería

de proteínas. El meticuloso diseño experimental empleado, que involucra evolución dirigida y mutagénesis dirigida al sitio, ha sido crucial para diseñar un biocatalizador termoestable y altamente activo que ahora se puede adaptar para enfrentar nuevos desafíos (Mate et al., 2015).

2.6 Despliegue en superficie de levadura

La ingeniería genética se estableció en la década de 1970. Desde entonces, se han desarrollado diferentes métodos para la ingeniería de microorganismos con habilidades especiales. Uno de estos métodos es una tecnología llamada tecnología de despliegue molecular o ingeniería de superficie celular. Esta tecnología permite mostrar proteínas o péptidos en células vivas como levaduras, mamíferos, células bacterianas y virus, nos permite también producir células modificadas con las propiedades de superficie deseadas.

El despliegue en la superficie celular bacteriana se estableció en 1986. Debido a sus ventajas, como la rápida proliferación, el tamaño celular y el estilo de vida independiente de las bacterias, este sistema progresó rápidamente. Sin embargo, la expresión de proteínas eucariotas heterólogas ha sido en ocasiones difícil en este sistema debido a que algunas de estas proteínas necesitan modificaciones post-traduccionales, como la glicosilación, la fosforilación, etc., para ser activas o estables. En estos casos, las células de levadura son buenas candidatas.

Las lacasas fúngicas están glicosiladas con n cadenas de carbohidratos que son involucradas en el proceso de estabilización contra la proteólisis. Entonces, es necesario expresar lacasas fúngicas en microorganismos eucariotas quienes hacen posible el procesamiento de proteínas post-traduccionales (Tafakori et al., 2012)

El despliegue en superficie celular garantiza una baja resistencia a la transferencia de masa y una alta accesibilidad a las enzimas, al tiempo que proporciona una matriz estable para la inmovilización de las enzimas, así como una regeneración y recuperación simples, una alta capacidad de crecimiento, fácil manipulación de

organismos unicelulares y capacidad de modificaciones post-traduccionales (Lu et al., 2012).

S. cerevisiae es ideal como huésped para la producción de proteínas heterólogas a partir de hongos porque combina el fondo genético y la tecnología de clonación molecular madura, entonces hasta el momento, varias lacasas han sido funcionalmente expresadas de manera heteróloga en *S. cerevisiae*, siendo este un sistema de células hospedero intensamente estudiado para el despliegue en superficie enzimática. La cual ha recibido la aprobación al considerarse generalmente en estado seguro (GRAS) por parte de la Administración de Alimentos y Medicamentos, y es adecuada para uso industrial y alimentario (Chen et al., 2016).

Se han desplegado de forma funcional varias enzimas heterólogas en la superficie celular de la levadura, que tiene aplicaciones potenciales en biosensores, producción de biocombustibles, detección de drogas y adsorción de metales. Las lacasas fúngicas serían adecuadas para el despliegue en superficie celular porque no dependen del entorno intracelular para mantener la actividad y solo necesita oxígeno (sin otros cofactores biológicos) para que se produzca la biocatálisis. Por lo tanto, razonamos que el despliegue en superficie de las lacasas fúngicas podría explotarse como una estrategia de tratamiento de biocatálisis eficaz y eficiente que combina las ventajas de la alta actividad de las enzimas libres con las ventajas del proceso de inmovilización (Chen et al., 2016; Kondo et al., 2004).

El sistema de expresión en superficie fue inicialmente reportado cuando se demostró que los péptidos podrían fusionarse con el conjunto de proteínas (pIII) de un fago filamentoso sin afectar su capacidad de infectar *Escherichia coli*. *S. cerevisiae* también es útil como hospedero para la ingeniería genética, ya que permite el plegamiento y la glucosilación de proteínas eucariotas heterólogas expresadas y puede ser sometido a muchas manipulaciones genéticas.

Las células que muestran enzimas son efectivas para la bioconversión, y las que muestran anticuerpos y receptores de proteínas son útiles para aplicaciones analíticas y de bioseparación. Algunas proteínas de superficie se extienden a través de la membrana plasmática, y otras están unidas por interacciones no covalentes o covalentes a los componentes de la superficie celular. Las células tienen sistemas para anclar proteínas específicas a dominios particulares en la superficie celular.

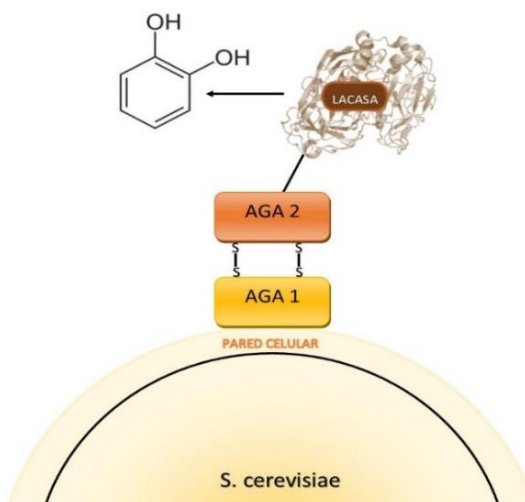


Figura 5 Diagrama de despliegue en superficie de levadura.

El despliegue en superficie de levadura, Yeast Surface Display (YSD), es una herramienta biotecnológica potencialmente poderosa, el potencial de esta tecnología incluye la expresión de proteínas de membrana, péptidos y enzimas, fusionándolas con los componentes funcionales de otras células que son expuestas en el medio ambiente de estas (Figura 5) (Bertrand et al., 2016). En el futuro será fundamental en las aplicaciones, tales como adhesión celular, reconocimiento molecular, transducción de señales, plegamiento de proteínas, fisiología celular, ingeniería de proteínas, inmovilización de biocatalizadores, cambio en la función celular, biosensores y en biorremediación (Tafakori et al., 2012).

Las enzimas desplegadas en levadura como células completamente biocatalizadoras tienen muchas ventajas, como la fácil proliferación, manipulación genética simple, procedimiento de producción fácil (solo por cultivo y centrifugación), termoestabilidad mejorada, tolerancia al pH y fácil de reciclar y reutilizar de la mezcla de reacción; por lo tanto, estas son más favorables que las enzimas inmovilizadas (Chen et al., 2011).

2.6.1 Caracterización de la superficie celular de la levadura

S. cerevisiae tiene la capacidad de producir y expresar muchas de las proteínas funcionales necesarias para la modificación postraducciona y en una variedad de tamaños diferentes. Además, es capaz de conferir nuevas habilidades adicionales a las células vivas (Chen, 2017).

La levadura *S. cerevisiae* tiene una pared celular rígida, cerca de 20 nm de ancho, compuesta principalmente de manoproteínas

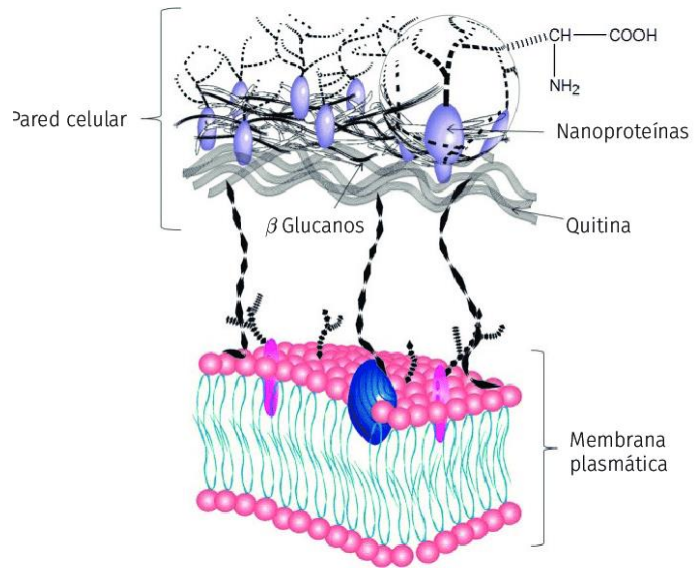


Figura 6 Diagrama de pared celular de levadura (Sifontes, 2014).

y glucanos β-unidos. La estructura bicapa de la pared celular consiste en una capa esquelética interna de glucano, compuesta de β-1,3- y β-1,6- glucosa ligada y una capa externa fibrilar o en forma de cepillo, compuesta predominantemente de manoproteínas ligada al glucano por enlaces covalentes (Figura 6). Hay dos tipos de manoproteínas presentes: las manoproteínas débilmente asociadas con la pared celular a través de enlaces no covalentes son extraíbles con SDS, y unas 60 de estas proteínas de bajo peso molecular se liberan cuando la célula aislada la pared se solubiliza con SDS caliente; las manoproteínas del otro tipo se pueden liberar mediante digestión con β-1, 3- o β-1, 6-glucanasa de la capa de glucano de la pared celular, pero no mediante extracción con SDS.

2.6.2 Características del sistema despliegue Proteínas GPI-ancradas en levadura

Entre las manoproteínas extraíbles con glucanasa en la superficie celular de *S. cerevisiae*, están, por ejemplo, aglutinina (Aga1 y Aga1) y flocculin Flo1, Sed1, Cwp1, Cwp2, Tip1, y Tir1/Srp1, tienen glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclas que juegan un papel importante en la expresión de proteínas en superficie y son esenciales para la viabilidad de la levadura. En el caso de la levadura *S. cerevisiae*,

α -agglutinin o flucculin se ha utilizado como proteína ancla. Estas proteínas existen en la superficie celular de la levadura y tienen anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI) que desempeñan papeles importantes en la localización superficial de proteínas.

La localización de proteínas ancladas a GPI en la superficie celular ocurre a través de la vía secretora de *S. cerevisiae*. Debido al anclaje lipídico unido covalentemente, la proteína permanece unida a la membrana, expuesta inicialmente en el lado luminal del retículo endoplasmático (RE); la proteína luego se transporta desde el RE al aparato de Golgi y desde allí a la membrana plasmática en vesículas cubiertas por la membrana (Kondo et al., 2004).

2.6.3 Aplicación ambiental de despliegue en superficie

Hay dos tipos de contaminantes: materiales orgánicos e inorgánicos. Los contaminantes orgánicos contienen insecticidas, pesticidas, compuestos orgánicos volátiles, aceites, hidrocarburos poliaromáticos, colorantes, etc. Los contaminantes inorgánicos incluyen fertilizantes y metales. Estos pueden causar daños graves a la salud humana y a otros organismos. La contaminación con compuestos orgánicos puede llevarse a cabo por la actividad enzimática y las contaminaciones inorgánicas pueden eliminarse mediante la absorción o la estrategia de adsorción.

La degradación enzimática de contaminantes orgánicos puede ser realizada por las células que contienen enzimas degradativas, libres o inmovilizadas en su superficie. Las ventajas de las enzimas inmovilizadas sobre las solubles surgen de su mayor estabilidad y facilidad de separación de los medios de reacción, lo que lleva a ahorros significativos en el consumo de enzimas.

Los diferentes métodos convencionales utilizados para inmovilizar enzimas implican la interacción covalente, no covalente o de inclusión de enzimas libres juntas o con un vehículo. Sin embargo, todos ellos necesitan un paso de purificación de enzimas que conduzca a un aumento de los costos. La expresión de enzimas recombinantes

en la superficie de bacterias vivas, esporas bacterianas y levaduras, resuelve este problema. Esto se usa para hacer una célula completa y un biocatalizador reciclable. Hasta ahora, se reportan muchas enzimas diversas utilizando la estrategia de despliegue en la superficie celular fúngica. Estos incluyen β -galactosidasa, quitinasa, amilasa, lipasa, etc. (Tafakori et al., 2012).

El establecimiento de sistemas para despliegue de proteínas heterólogas en la superficie celular de microorganismos se espera que sea útil en la separación de polipéptidos producidos; la producción de biocatalizadores microbianos, adsorbentes de células enteras y vacunas vivas; y la proyección de proteínas modificadas o nuevas, por tanto, estos sistemas tienen un enfoque prometedor en la ingeniería de proteínas (Kondo et al., 2004).

3. ANTECEDENTES DIRECTOS

En el laboratorio de Biotecnología Ambiental del Centro de Investigación en Biotecnología se han realizado algunos estudios enfocados en producción de lacasas y su aplicación en la oxidación de compuestos aromáticos. Recientemente, Bertrand et al., (2016) expresó funcionalmente una lacasa de *T. versicolor* en el sistema de despliegue en superficie. Posteriormente, Teymennet (2019) obtuvo mutantes mediante evolución dirigida del ancla AGA2, incrementando la expresión de una lacasa en este sistema, las cuales presentaron valores de actividad elevados e interesantes y que requieren el estudio del efecto de las mutaciones en la subunidad AGA2 (ancla) sobre su estabilidad a condiciones fisicoquímicas y propiedades oxidativas.

4. JUSTIFICACIÓN

Muchas reacciones de procesos industriales se ven afectadas por la presencia de compuestos fenólicos, llegando a inhibir diferentes agentes catalíticos, las lacasas, un grupo de oxidorreductasas capaces de oxidar muchos de estos contaminantes, atraen la atención ya que, si bien en estado natural presentan limitaciones, implementando un sistema de inmovilización se pueden mejorar sus propiedades catalíticas, como el incremento de producción de estas, su termoestabilidad, capacidad de reuso, tolerancia a pH, solventes orgánicos, etc., haciéndolas cada vez más específicas, además de que mediante la incorporación de la evolución dirigida por ingeniería de proteínas se puede llegar a tener ventajas que muchas de las veces muestran beneficios considerablemente superiores a los ya conseguidos en, por ejemplo, un sistema de despliegue en superficie, para así obtener un sistema de mayor aprovechamiento. Evaluar el efecto de mutaciones sobre la capacidad operacional de la enzima permite conocer el rendimiento del sistema, encontrando aquellas que favorezcan su aplicación en diferentes áreas de la biotecnología.

5. HIPÓTESIS

Mutaciones en el gen AGA2 del sistema de despliegue mostrarán diferencias en las propiedades de la lacasa anclada, así como en la oxidación de compuestos fenólicos.

6. OBJETIVOS

Evaluar las propiedades de la lacasa anclada al introducir mutaciones en el gen AGA2 del sistema de despliegue.

Objetivos particulares

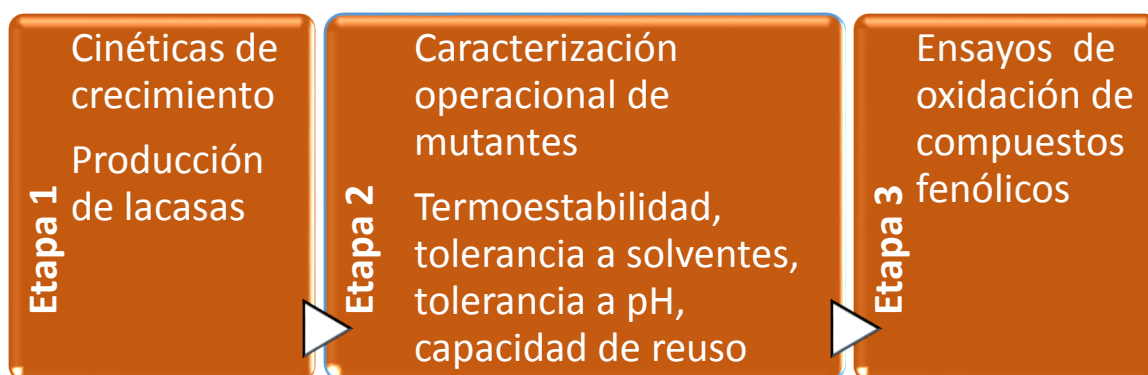
1. Evaluar la producción de lacasas de las mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa
2. Caracterizar operacionalmente las mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa (termoestabilidad, perfil pH, reuso, tolerancia a solventes)
3. Evaluar la capacidad oxidativa de las mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa sobre diferentes sustratos fenólicos.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Etapas 1. Evaluar la producción de lacasas de las mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa y de la silvestre, AGA-WT (sin mutación en el AGA2), determinando crecimiento y producción de lacasas.

Etapas 2. Caracterizar las mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa. Evaluar la capacidad oxidativa de las mutantes y su estabilidad a condiciones operativas (termoestabilidad, pH y tolerancia a solventes orgánicos, y capacidad de reuso) utilizando como sustrato ABTS.

Etapas 3. Oxidación de compuestos fenólicos. Evaluar la capacidad oxidativa de las diferentes mutantes de AGA2 obtenidas en el sistema de levadura-lacasa utilizando diferentes sustratos fenólicos.



8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

El gen de lacasa OB-1 fue donado por el Dr. Miguel Alcalde, miembro investigador del grupo de Evolución dirigida de enzimas del Instituto de Catálisis y Petroleoquímica en Madrid, este fue clonado en pETcon (ADDGENE) y expresado en un sistema de despliegue en superficie celular de levadura (Teymennet, 2019). *Saccharomyces cerevisiae* EBY100 (ATCC® MYA-4941™) MATaAGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-Δ 200 his3-Δ 200 pep4::HIS3 prb11.6R can1 GAL fue utilizada para la expresión de la lacasa en despliegue. Las mutaciones se originaron en el gen AGA2 del sistema de despliegue.

8.2 Cinética de crecimiento y producción de lacasas en despliegue

La expresión funcional de la lacasa OB-1 usando la tecnología de despliegue en superficie se llevó a cabo en un trabajo previo (Teymennet, 2019). La levadura EBY100, que fue transformada con el sistema de despliegue en superficie pETcon, se creció en matraces de 125 mL, utilizando 50 mL del medio EML que contenía (g/L): 20 de glucosa, 6.7 de YNB-base de nitrógeno de levadura y 1.92 de casaminoácidos. Las condiciones del cultivo fueron 150 rpm y 30°C durante 48 horas. Después del tiempo de incubación, el medio de cultivo fue centrifugado y la biomasa obtenida fue lavada con buffer de fosfatos 100 mM (pH 6). Posteriormente, la biomasa de la levadura EBY100 fue inoculada (densidad óptica inicial 0.3, se ajustó a 600 nm) en el medio de inducción (TRPE) para la expresión de la lacasa

en despliegue. El medio TRPE contenía (g/L): 20 de galactosa, YP 1X: 10 de peptona de caseína y 5 de extracto de levadura, 2 mM sulfato de cobre disueltos en una solución de buffer de fosfatos pH 6. Los cultivos fueron realizados en matraces de 125 mL con 50 mL del medio e incubados durante 6 días a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras de 1 mL cada 24h, se determinó la actividad lacasa y concentración de biomasa en peso seco.

8.3 Caracterización operacional de las mutantes de AGA2

8.3.1 Termoestabilidad

Para el perfil de termoestabilidad se utilizó ABTS como sustrato. La actividad fue determinada con un espectrofotómetro (DU 640 Beckman) dejando la muestra en incubación durante 1h a diferentes temperaturas, desde 30 hasta 80 °C cada una. La actividad relativa fue calculada en relación a la actividad de la enzima a temperatura ambiente.

8.3.2 Tolerancia pH

La actividad lacasa en la tolerancia a pH fue determinada con un espectrofotómetro UV/Vis (DU 640 Beckman), dejando la muestra en incubación durante 2 horas en buffer a diferentes pH, desde uno tan ácido como 2 hasta uno más básico como 7, agregando 1 mM de ABTS para cada medición de actividad.

8.3.3 Tolerancia a solventes

Los solventes utilizados fueron etanol, en porcentajes de 10, 20, 30, 40 y acetonitrilo con 10 y 20 % de concentración con cada muestra, se midió la actividad lacasa con 1 mM ABTS en buffer de acetatos 100 mM (pH 3.8).

8.3.4 Capacidad de reuso

Se estudió la capacidad de reutilización de la lacasa con las diferentes mutantes. El estudio se realizó en las condiciones óptimas para ABTS durante siete ciclos. La actividad relativa después de cada ciclo se calculó en relación con la actividad inicial.

8.4 Oxidación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos utilizados en los ensayos de oxidación fueron ácido ferúlico, ácido gálico, catecol y ácido vanílico. Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas de 96 pozos, los compuestos se adicionaron a buffer de acetatos (pH 4 y 5) o a buffer de fosfatos (pH 6). La oxidación de los compuestos fenólicos fue determinada por cromatografía líquida (HPLC) con un detector de matriz de fotodiodos (Waters 996) y mediante el método de fenoles totales (Folin-Ciocalteu).

8.5 Métodos analíticos

Actividad lacasa

La actividad lacasa fue determinada a temperatura ambiente por la oxidación de ABTS 1 mM (2,2-azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]) en buffer de acetato de sodio 100 mM (pH 4.0). La oxidación fue monitoreada a 436 nm ($\lambda=436\text{nm}$, $\epsilon=29,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) usando un espectrofotómetro UV/Vis (DU 640 Beckman). La actividad enzimática fue expresada en unidades internacionales (U); una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima requerida para oxidar $1\mu\text{mol}$ de ABTS por minuto.

Determinación de biomasa de levadura EBY100

La determinación de biomasa (gL^{-1}) se realizó gravimétricamente. Las muestras de cultivo de levadura se centrifugaron y la biomasa se separó de los medios por decantación. Los sedimentos de biomasa se secaron a 50°C durante 24 h.

Cuantificación de los compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos fueron cuantificados en un cromatógrafo de líquidos Waters HPLC con un detector de matriz de fotodiodos (Waters 996). Todos los compuestos fueron separados en una columna AMINEX HPX-87H (Bio-Rad Laboratories Inc.) a 50°C . La fase móvil fue ácido sulfúrico 5mM y 10% de acetonitrilo a un flujo de 0.6mL/min . El tiempo de retención y espectro UV para cada compuesto fenólico evaluado se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2 *Tiempo de retención de los compuestos fenólicos*

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Espectro UV (nm)
Ácido ferúlico	54.1	322.0 (máx)
Ácido gálico	17.1	215.9 (max), 271.1
Catecol	23.1	204.2 (max), 275.9
Ácido vanílico	30.5	218.3 (max), 260.5

Cuantificación de fenoles totales mediante método Folin-Ciocalteu

A 5 μL de muestra diluidos en 103 μL de agua Mili-Q en microplaca de Elisa, se agregaron 12 μL de solución Folin, dejando en incubación por 5 min a temperatura ambiente en oscuridad. La reacción se detuvo agregando 80 μL de carbonato de sodio (7.5%) y se mantuvo en incubación durante 2h en las mismas condiciones. Finalmente, la oxidación de los compuestos fenólicos fue determinada a 430nm utilizando un lector de microplaca (Microplate Reader 680 BIO-RAD).

9.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Etapa 1. Cinéticas de crecimiento y producción de lacasas

En esta primera parte del trabajo se realizó la selección de las mutantes de la subunidad AGA2 del sistema levadura-lacasa OB-1 obtenidas por Teymennet (2019). Para ello se realizaron cultivos de cada una de ellas para confirmar lo resultados obtenidos previamente e iniciar la selección de aquellas mutantes de AGA2 más interesantes. En la tabla 3, se presentan los resultados de 6 de las mutantes de la subunidad AGA2 del sistema levadura-lacasa OB-1 y aquella que no fue modificada que denominaremos AGA-WT, ya que la lacasa OB-1 es la misma para todas mutantes.

Tabla 3 *Actividad de mutaciones en el gen AGA2- Lacasa OB-1*

Ancla	Densidad Óptica	Biomasa (g/L)	U/g
AGA-WT	7.070	3.875	924.805
AGA-TT8	3.742	1.950	6458.388
AGA-TI13B	6.286	2.800	14337.518
AGA-TX13A	5.097	1.725	5673.443
AGA-TF13C	3.980	1.225	7000.070
AGA-TM11	4.474	1.525	11609.691
AGA-TK14	6.912	0.400	10964.164

Se seleccionaron 3 mutantes que presentaron las mayores actividades de lacasa para ser estudiadas en este trabajo, las cuales fueron: AGA-TI13B, AGA-TK14, AGA-TM11. Con la finalidad de evaluar el efecto sobre la actividad catalítica (U/g) y estabilidad a condiciones fisicoquímicas de dichas mutaciones se incluye a la AGA-WT que no fue modificada.

Se realizaron las cinéticas de crecimiento y producción de lacasas de cultivos control monitoreadas en función del tiempo. Se prepararon preinóculos para disminuir la duración de la etapa de adaptación. Los resultados se muestran en las figuras 7 y 8.

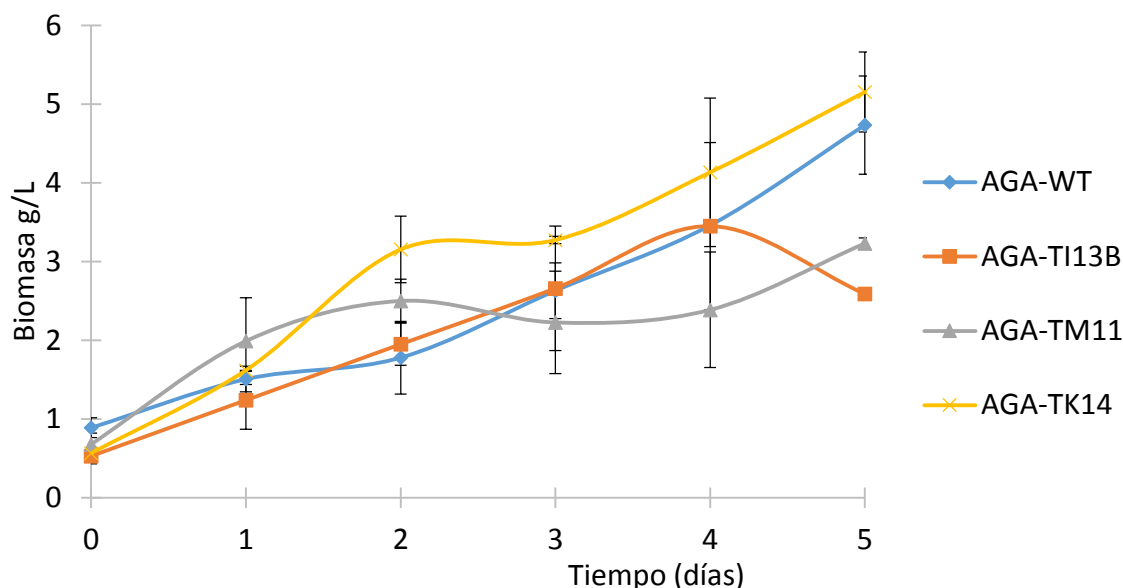


Figura 7 Cinética de crecimiento de mutantes AGA2 y AGA-WT en el sistema de despliegue levadura-lacasa (OB-1)

En el crecimiento de las mutantes se observaron algunas diferencias en la concentración final de la biomasa, no obstante, el comportamiento diaúxico fue observado en dos de las mutantes y la AGA-WT, excepto por la mutante AGA-TI13B. La mutante AGA-TM11 presentó un crecimiento menor durante toda la cinética. De acuerdo a la cinética, la mutante AGA-TK14 presentó los valores más altos, sin embargo, en el análisis por comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) los resultados mostraron diferencias poco significativas entre cada muestra, pudiendo decir que el crecimiento fue similar para todas las mutantes.

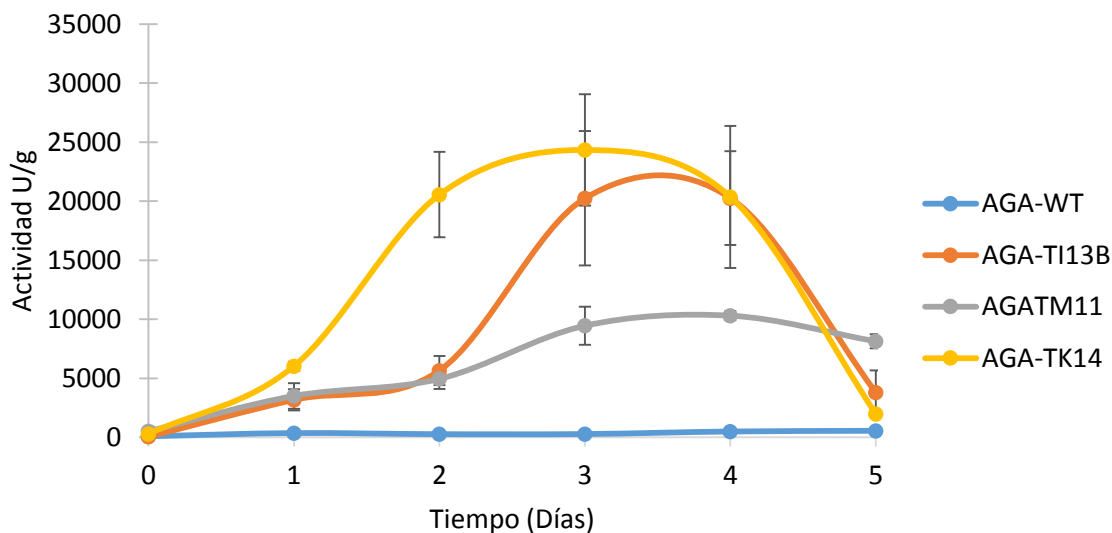


Figura 8 Actividad específica de lacasa (U/g) de las mutantes AGA2 y AGA-WT en el sistema de despliegue levadura-lacasa (OB1).

Con respecto a la actividad específica se observaron diferencias significativas entre las mutantes y la AGA-WT. Estas diferencias fueron importantes a partir del segundo y hasta el cuarto día de incubación para las mutantes AGA-TK14 y AGA-TI13B hay descenso drástico de la actividad al quinto día de incubación, debido posiblemente al agotamiento del sustrato inductor o por baja expresión de la proteína.

Si bien las mutantes presentaron crecimiento simultaneo, la actividad catalítica se vio mejorada en las mutantes respecto a la AGA-WT.

9.2 Etapa 2. Caracterización operacional de las mutantes de AGA2

Parte fundamental del trabajo realizado fue determinar la estabilidad de las mutantes AGA2 obtenidas, ya que hasta ahora hay poca información reportada de mutantes en sistema de despliegue en superficie de levadura, por lo que surgió el interés en determinar el comportamiento operacional de este sistema. El objetivo principal, es observar los efectos de las mutaciones en la estabilidad del sistema levadura-lacasa, partiendo del hecho que estas mutaciones fueron realizadas en la subunidad AGA2, que, si bien está unida a la lacasa OB-1 mediante puentes

disulfuro, en ningún momento se modifica a la lacasa. Se sabe que la inmovilización de las lacasas puede protegerlas de la desnaturalización en presencia de disolventes orgánicos, así como aumentar su estabilidad en general (D'Annibale et al., 2000), facilitar la separación de los productos de reacción (Duran et al., 2002) y mantener una buena eficiencia catalítica durante muchos ciclos de reacción (Brandi et al., 2006) es interesante saber si esta inmovilización presenta algún efecto por la mutación en el ancla.

9.2.1 Termoestabilidad

Para el perfil de termoestabilidad se utilizó ABTS como sustrato. La actividad fue determinada incubando la muestra durante 1h a diferentes temperaturas, en un rango de 30 a 80 °C (Figura 9). La actividad relativa fue calculada en relación a la actividad inicial de la enzima.

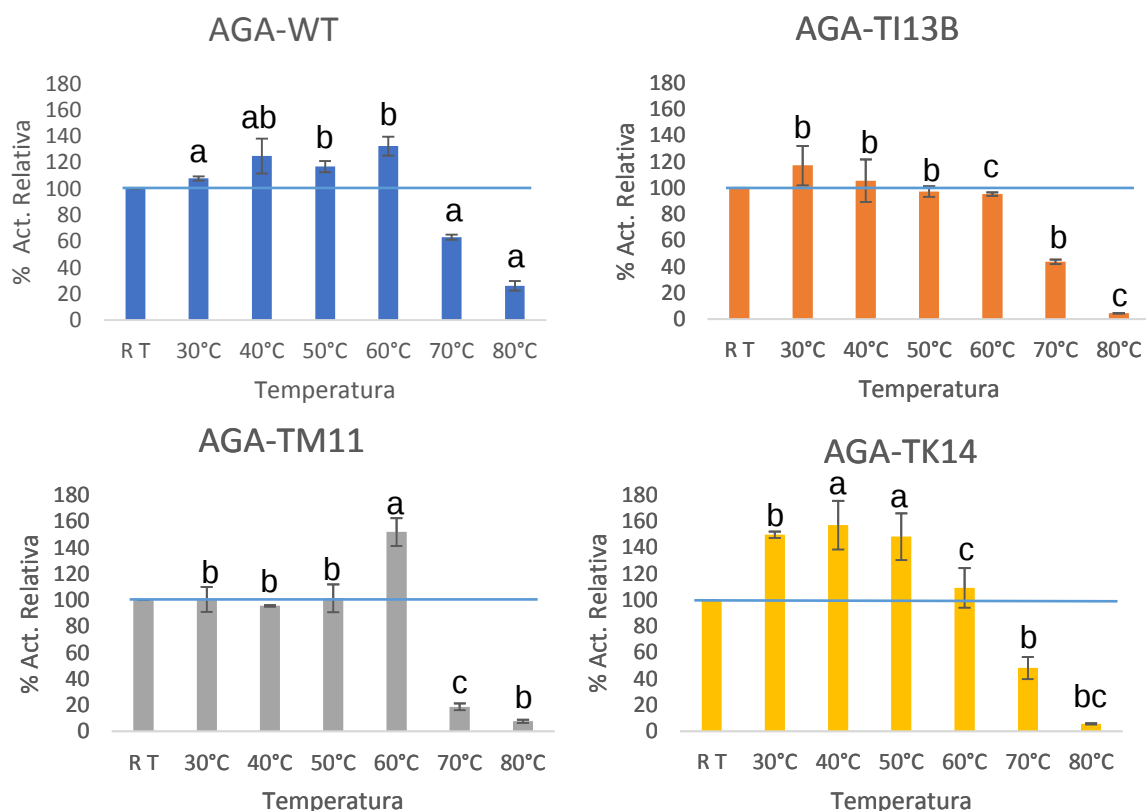


Figura 9 Efecto de la temperatura en la estabilidad de las mutantes.

Como se puede observar en la Figura 9, la temperatura óptima para la enzima se encuentra entre 30 y 60 °C, la mutante AGA-TK14, es más activa en la mayoría de

las temperaturas probadas y la AGA-TM11 presentó mayor actividad que todas a 60° C, pero también los valores más bajos en todas en las demás temperaturas. La mutante AGA-TK14 muestra valores considerablemente superiores a temperaturas entre 30 y 70 °C, pero a 80 °C pierde casi toda la actividad. Además, de acuerdo a la comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) es sólo en 60, 70 y 80 °C donde presentan valores significativamente distintos. La estabilidad de temperatura no se ve afectada por las mutaciones realizadas, es decir la enzima mantiene su estabilidad catalítica aun cuando es sometida a cambios de temperatura. En general la estabilidad térmica de las enzimas inmovilizadas es uno de los factores más importantes en su aplicación como biocatalizador.

Leonowicz et al., (1988), demostraron la estabilidad de una enzima inmovilizada que mostró un amplio rango de temperatura óptima entre 47 y 80 °C, la cual no coincidió con el de la enzima libre. A 23°C, la lacasa inmovilizada era aproximadamente un 50% más activa que la lacasa libre. Sin embargo, a temperaturas más altas, las diferencias fueron aún más evidentes; a 80 °C, la lacasa inmovilizada seguía siendo muy activa (90% de la actividad original), mientras que la enzima libre mostraba sólo el 35% de la actividad original. Esta observación confirma que la inmovilización generalmente amplía el rango de temperatura de la actividad enzimática.

Bertrand et al., (2016) utilizando la lacasa 6C en el sistema de despliegue en superficie de levadura, obtuvieron valores de entre 40 y 70% de actividad relativa de la enzima a un intervalo de temperaturas de 25 a 70 °C. A diferencia, García-Ruiz et al., (2010) en su estudio de termoestabilidad de lacasas evolucionadas y desplegadas en levadura, reportaron actividades residuales de al menos 50% en todas las mutantes hasta temperatura de 60 °C. En general, la inmovilización de enzimas sobre diferentes soportes mejora sus actividades, debido a la limitación del movimiento enzimático y una mejor difusión del sustrato a temperaturas más altas.

En este estudio se demostró que, si bien la termoestabilidad no se ve afectada, al menos una de las mutantes exhibió valores superiores de actividad relativa con

respecto a las demás. Un estudio de la estructura conformacional de la proteína y su ancla podría dar indicios de porqué se observa mayor termoestabilidad en esta mutante, para así demostrar la causa del aparente incremento de resistencia.

9.2.2 Capacidad de reuso

La capacidad de reuso evita la producción de la enzima n número de veces, permitiendo así reducir los costos de fabricación, teniendo a su vez menos desechos al final del proceso siendo esto un gran beneficio industrial. Se estudió la capacidad de reutilización de la lacasa anclada a las diferentes mutantes. El estudio se realizó utilizando ABTS como sustrato, durante siete ciclos como se muestra en la Fig.10.

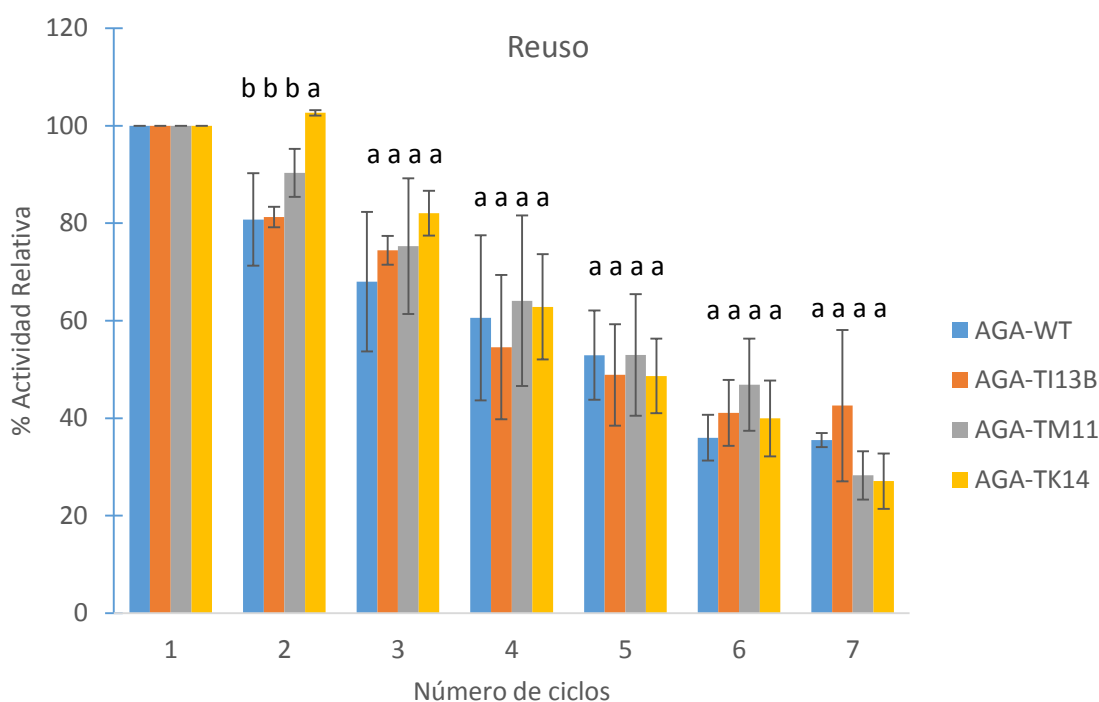


Figura 10 Efecto de las mutaciones en AGA2 sobre la capacidad de reuso del sistema levadura-lacasa (sustrato ABTS).

Según el análisis estadístico comparación múltiple de medias (prueba de Tukey) las mutantes y AGA-WT no muestran diferencias significativas en este ensayo. Aun así, en el séptimo ciclo las muestras mostraron al menos el 40% de actividad relativa.

Bertrand et al., (2016) reportaron que el sistema levadura-lacasa (YSD-6c) presentaba una capacidad de reuso deficiente, ya que tan solo en el segundo ciclo

la enzima había perdido más del 50% de actividad y después del octavo ciclo, la actividad no fue mayor de 10%, este caso particular, el ancla no había sido modificada, por lo que se concluye que la modificación del ancla es decir la subunidad AGA2 no conduce a efecto significativo en la capacidad de reuso del sistema.

9.2.1.3 Tolerancia pH

Se utilizaron buffer con pH 2, 3, 4, 5, 6 y 7 para determinar la estabilidad del sistema levadura-lacasa (mutantes de AGA2 y AGA-WT)., las muestras se dejaron en incubación durante 2h, utilizando ABTS 100mM como sustrato, la actividad relativa fue calculada en relación a la actividad pH 4 (Figura 11).

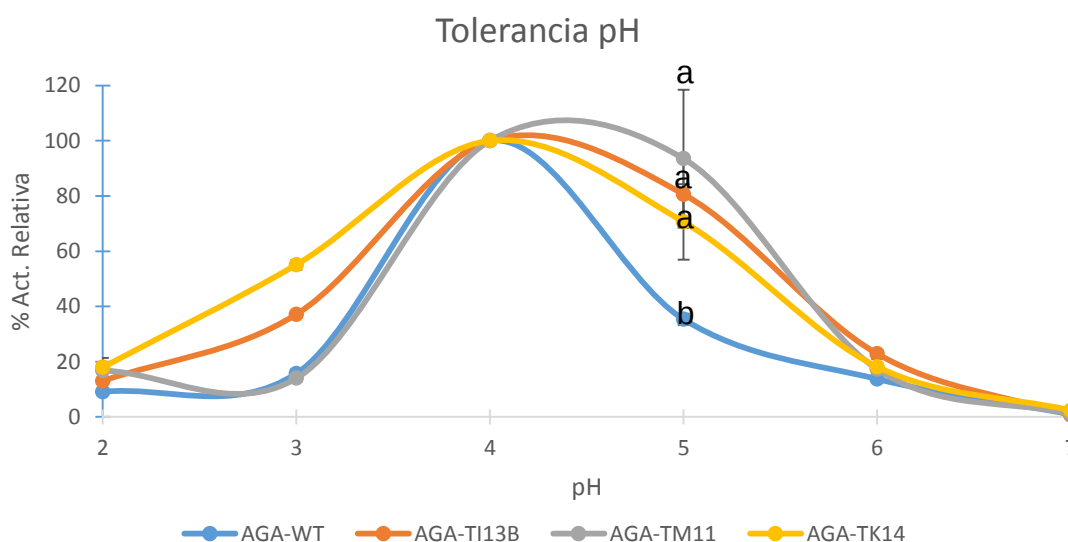


Figura 11 Efecto del pH en la actividad de las mutantes.

Se observa que, si hay efecto significativo en la actividad relativa de dos de las mutantes a pH 3 y 5, mientras que a pH 4 las mutantes y la AGA-WT presentan valores similares. El AGA-TM11 presenta mayor estabilidad en el intervalo de 4 a 5. No obstante, las mutantes de AGA2 y silvestre pierden más del 80 % de actividad, a pH 2 y 7 son inactivas. En pH4 tanto las mutantes como silvestre mostraron el 100% de actividad. Por otra parte, en pH 5 las tres mutantes tuvieron valores cercanos, conservando al menos el 60 % de actividad, mientras que la silvestre mostró el 35% de actividad.

El pH de la solución es un factor importante, ya que puede afectar significativamente la actividad, por pérdida de su estructura de las enzimas porque determinan el estado de ionización de los aminoácidos. Sólo en pH 3 y 5 se obtuvieron valores distintos entre cada mutante, siendo estos los valores en los que se pudo incrementar la estabilidad.

Xu et al., (2013) reportaron valores de una lacasa inmovilizada que pudo mantener al menos el 40% de actividad relativa en un pH 8 y la lacasa libre en ese punto mostró tener todavía 20% de actividad, de forma similar, Naghdi et al., (2017) mostraron una lacasa inmovilizada y una libre, las dos con valores de alrededor de 35% de actividad en ese mismo pH, a pH más alcalinos mostraron estabilidad y pérdida total de actividad, respectivamente.

El desplazamiento de la actividad de la enzima inmovilizada hacia una región menos ácida en comparación con la de la enzima libre se ha descrito previamente para diferentes catalizadores inmovilizados. Podría deberse al reparto de protones en el sitio activo de la enzima, derivado de la presencia de grupos ionizados en la levadura. La posición del centro activo en la proteína enzimática y el tamaño de la molécula de biocatalizador son dos factores que intervienen en la determinación de la distancia entre la superficie del portador y el centro catalítico y, en consecuencia, su exposición a cargas superficiales. Por lo tanto, si una enzima se acopla a un portador polianiónico, su pH óptimo generalmente cambia a la dirección alcalina (Lante et al., 2000).

Zofair et al., (2020) reportaron que tanto la enzima soluble como la inmovilizada mostraron una actividad máxima a pH 3.0 y se encontró que estaba completamente desactivada a pH alcalino. La mayoría de las lacasas fúngicas muestran una actividad máxima en el rango de pH ácido. El perfil de actividad de pH de la enzima inmovilizada fue más amplio en comparación con el de la enzima soluble, lo que indica que la enzima inmovilizada es más tolerante a la variación del pH. Mientras que la forma soluble de lacasa exhibió 20 y 43% de actividad a pH 2,0 y 4,0, la forma

inmovilizada retuvo 40 y 60% de actividad en condiciones similares. Tanto las preparaciones de lacasas solubles como las inmovilizadas no mostraron ninguna actividad en el rango de pH neutro o alcalino, ya que hay más iones OH en este pH y estos iones tienden a unirse al sitio T2/T3 de la enzima evitando la transferencia de electrones de T1 a T2/T3 sitio.

El perfil de pH de la lacasa también depende del tipo de sustrato utilizado. La mayoría de los sustratos fenólicos muestran una tasa de oxidación comparativamente alta a un pH mayor que el de los sustratos no fenólicos como ABTS.

9.2.4 Tolerancia a solventes

Parte fundamental de este trabajo consiste en demostrar que un sistema evolucionado correctamente presenta una mayor tolerancia a solventes, los sistemas de despliegue en superficie de levadura son empleados, entre otras cosas, en la generación de etanol, ya que durante el proceso de detoxificación y posteriormente fermentación la enzima puede verse afectada en presencia de etanol, es por ello que se realizó el ensayo de tolerancia de solventes por las enzimas presentando los siguientes resultados.

Los solventes utilizados fueron etanol, en porcentajes de 10, 20, 30, 40 y acetonitrilo con 10 y 20 % de concentración con cada muestra, se midió la actividad lacasa con 1 mM ABTS en buffer de acetatos 100 mM, los resultados se muestran en la Figura 12.

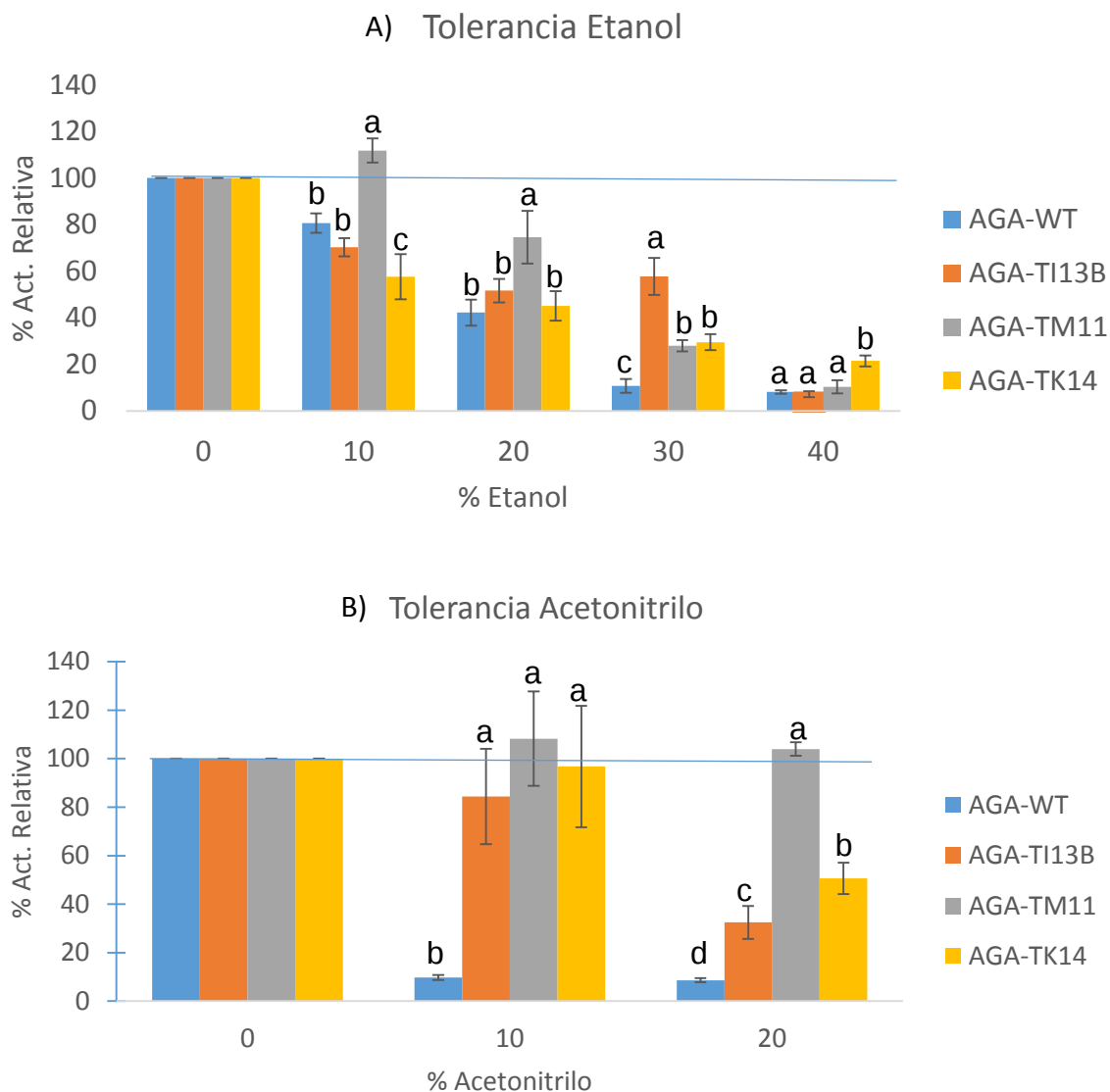


Figura 12 Efecto de la presencia de etanol en la actividad lacasa (A). Efecto de acetonitrilo en actividad lacasa (B)

En concentraciones de 10 hasta 20%, según el análisis estadístico, los valores obtenidos fueron cercanos entre la mutante AGA-TI13B, AGA-TK14 y la silvestre, mientras que la mutante AGA-TM11 la cual mostró resistencia a 10% de etanol y mayor actividad que las otras a 20%, a niveles más altos de etanol la actividad relativa fue similar a las otras mutaciones, aún en 30% de etanol, las mutantes se mostraron más resistentes con respecto a la silvestre. A 40% de etanol, la silvestre y AGA-TI13B mostraron no ser resistentes, pero la 11A1 y 14E7 tienen un poco más del 10% de actividad (Figura 12A).

La estabilidad de las mutantes también fue evaluada a dos concentraciones de acetonitrilo (10 y 20% v/v). Los resultados obtenidos (Figura 12B) demostraron que todas las mutantes resultaron ser más resistentes que la AGA-WT en este solvente, ya que al 10% de concentración esta había perdido más del 80% de actividad, las mutantes mostraron estabilidad y fue hasta aumentar la concentración a 20% de acetonitrilo que AGA-TI13B Y AGA-TK14 disminuyeron a 30 y 50%, respectivamente, su actividad relativa. La mutante AGA-TM11 fue más estable en las dos concentraciones estudiadas.

Existen diferentes reportes de tolerancia de enzimas a solventes en los que se utilizan alcohol y acetonitrilo; Zumarraga et al., (2007) evaluaron el efecto de la concentración de etanol y acetonitrilo sobre las mutantes de MtLT2, *M. thermophila* expresada funcionalmente en *S. cerevisiae*, las cuales fueron obtenidas mediante evolución dirigida. La última mutante del experimento evolutivo, llamado R2, mostró una tolerancia notable hacia los solventes, reteniendo casi el 20% de su actividad en etanol al 50% (v/v). Además, R2 mostró prácticamente la misma actividad en etanol al 40% (v/v) o en acetonitrilo al 30% (v/v). Por el contrario, MtLT2 retuvo menos del 10% de su actividad en las mismas condiciones.

Por otro lado, Mate et al., (2010) en la caracterización de la lacasa mutada OB-1, reportaron actividades residuales entre 50 y 60 % en porcentajes de 20, 30, 40 y 50 de etanol y entre 60 y 30 de actividad en los mismos porcentajes de Acetonitrilo, evaluando así la estabilidad de la mutación. Como se esperaba de una enzima altamente termoestable, la lacasa PM1 evolucionada fue bastante tolerante a la presencia de solventes orgánicos (reteniendo 30% -90% de su actividad después de 4 horas a concentraciones de solvente tan altas como 50%).

9.3 Etapa 3. Oxidación de compuestos fenólicos

Las últimas décadas han sido testigos de un mayor interés en el uso de lacasas como biocatalizadores para reemplazar los procesos químicos convencionales en diferentes industrias. Además, las lacasas tienen un lugar en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos como materia prima. De hecho, el uso potencial de las lacasas con fines industriales y biotecnológicos es un área de investigación próspera (Mate et al., 2017). La complejidad de los hidrolizados derivados de los materiales lignocelulósicos reduce la eficiencia de las lacasas, ya que además de presentar una mezcla de compuestos fenólicos existen otros compuestos que pueden disminuir su eficiencia. Por ello es deseable contar con lacasas con mayor actividad catalítica y mayor estabilidad operacional. Para ello se han planteado estrategias de ingeniería de proteínas y de evolución dirigida para mejorar sus propiedades catalíticas y de estabilidad.

Los compuestos fenólicos frecuentemente encontrados en los hidrolizados lignocelulósicos son principalmente ácidos. Para evaluar la capacidad oxidativa de las mutantes obtenidas de AGA2, se estudió la oxidación de los más representativos entre ellos: ácido ferúlico, ácido gálico, catecol y ácido vanílico. Los porcentajes de oxidación de los compuestos fenólicos se calcularon basados en la diferencia entre las concentraciones de fenoles iniciales y finales. En la figura 13 se presentan los resultados obtenidos del estudio de la capacidad oxidativa de las mutantes AGA2 y silvestre.

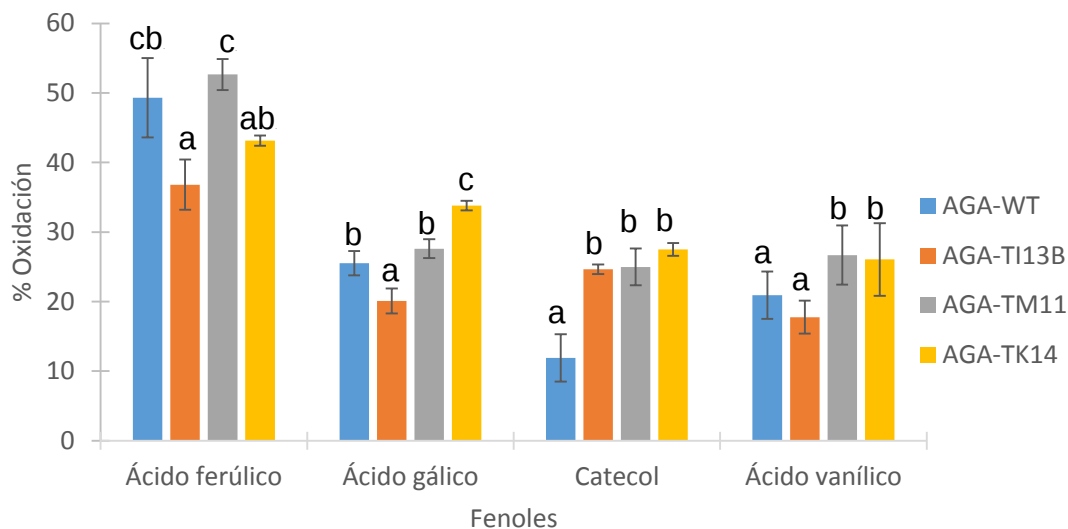


Figura 13 Porcentaje de oxidación de los fenoles estudiados mediante HPLC

El compuesto mejor oxidado mostró ser el ácido ferúlico, seguido del ácido gálico, ácido vanílico y catecol, la silvestre mostró valores bajos en los fenoles, a excepción con ácido ferúlico, las mutantes muestran mayor capacidad de oxidación de los compuestos fenólicos probados, esto basado en el análisis estadístico comparación múltiple de medias (prueba de Tukey).

Mediante el método de Folin-Ciocalteu por un lector de microplaca, se utilizaron tres diferentes pH, 4, 5 y 6, cada muestra fue probada en cada uno y con los cuatro compuestos fenólicos el porcentaje de oxidación fue distinto entre cada mutante, pH y compuesto fenólico, como se muestra en la Figura 14.

Los porcentajes menores de oxidación se mostraron con pH 6, con valores de entre 10 y 40 % de oxidación, en ácido gálico el porcentaje de oxidación fue ligeramente parecido entre mutantes, las mutantes AGA-TM11 y AGA-TK14 muestran valores más altos de oxidación de catecol, alrededor del 50%, siendo estos los más altos en este pH.

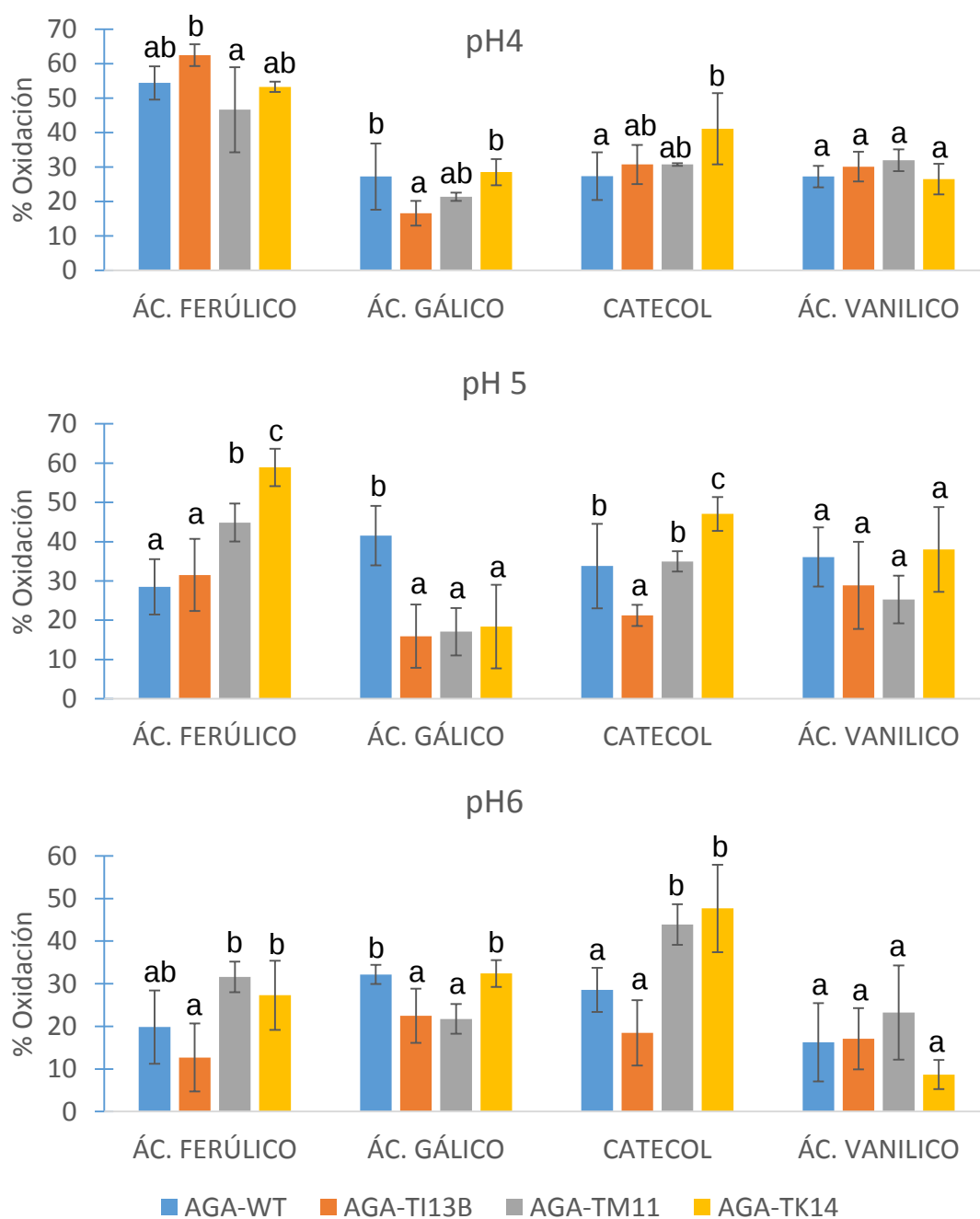


Figura 14 . Efecto del pH en el porcentaje de oxidación de los fenoles ácido ferúlico, ácido gálico, catecol y ácido vanílico por AGA-WT y las mutantes AGA-TI13B, AGA-TM11 y AGA-TK14.

En pH 5 se pueden observar diferencias entre la mutante AGA-TK14 que mostró mayor porcentaje de oxidación de ácido ferúlico, catecol y ácido vanílico, la mutante AGA-TM11 mostró valores bajos de oxidación con los ácidos gálico y vanílico, mientras que AGA-TI13B tiene mayor porcentaje de oxidación de los compuestos.

La oxidación de los compuestos en un pH 4 es, en general, igual entre mutantes pero diferente entre fenoles, el compuesto con mayor oxidación es el ácido ferúlico seguido del catecol y con valores cercanos el ácido gálico y ácido vanílico, sí hay mayor oxidación con este pH al menos del ácido ferúlico.

El catecol muestra valores cercanos en los tres pH y las cuatro mutantes, el ácido gálico mostró ser mejor oxidado en un pH 5 y 6 por todas las mutantes, a diferencia del ácido vanílico que presentó mayor oxidación en pH 4 y 5.

En un estudio reportado por Lante et al., (2000) presentaron la conversión de diferentes compuestos fenólicos por una lacasa inmovilizada en un reactor de membrana en espiral, obteniendo valores desde 10 hasta 70 % de conversión. Concordando con que una sola lacasa puede oxidar de diferente forma cada sustrato.

En la remoción de algunos fenoles, Xu et al., (2013) mostraron la eficiencia de eliminación de 2,4-Diclorofenol por lacasa inmovilizada que alcanzó el máximo (87.6%) en torno a pH 6 y 50° C. Este hallazgo indicó que la lacasa inmovilizada era menos sensible al pH y la temperatura que la lacasa libre. La mejora fue similar a la lograda en investigaciones previas, posiblemente debido a la limitación conformacional en el movimiento de la enzima como resultado de la formación de enlaces covalentes entre la enzima y el portador.

Liu et al., (2020), reportó el parámetro de estabilidad de la lacasa inmovilizada que se estimó reutilizando la misma muestra durante 7 ciclos sucesivos de degradación del *p*-clorofenol. Cada ejecución tuvo una duración de 24 h, se midió la conversión de la lacasa inmovilizada para cada ciclo presentando más del 60% de conversión del compuesto después del último ciclo.

10.CONCLUSIONES

Se evaluaron las propiedades de la lacasa anclada de las diferentes mutantes obtenidas, sometiénolas a estudios de termoestabilidad, perfil pH, reuso, tolerancia a solventes y capacidad oxidativa de compuestos fenólicos.

Con base en los estudios de estabilidad operacional y capacidad catalítica de cada una de las mutantes podemos decir que, en general, las propiedades de la enzima desplegada mostraron diferencias significativas, dado que los resultados tienen variación entre una y otra, sin embargo, es necesario realizar un estudio en la secuencia primaria del ancla modificada (AGA2).

Atribuimos estas diferencias al espacio en el que se ven obligadas a desarrollarse, pues las mutaciones generan alteraciones estructurales en las proteínas y estas tienen relación directa con la interacción de la lacasa anclada siendo este el punto de unión a la superficie de la levadura. Por lo tanto, la mutación añadida influye en la catálisis de reacción de la enzima desplegada en el sistema.

Las mutantes obtenidas ofrecen grandes ventajas en la tolerancia a solventes, siendo esta una característica esencial para diferentes aplicaciones en las que pudiese ser utilizado el sistema, tal como la producción de bioetanol. Además, el perfil de pH se amplió en las mutantes, de pH 3 a 5, con respecto a la silvestre. La capacidad de reuso y la termoestabilidad no mostraron ser valores adversos en las mutantes, sin embargo, mayor resistencia complementaria las ventajas de tolerancia a solventes y pH haciéndolas cada vez más eficientes.

Generalmente, la mutante AGA-TK14 resultó ser el más competente en la oxidación de los fenoles, las mutantes AGA-TI13B y AGA-TM11 mostraron buenos porcentajes de oxidación en la mayoría de los fenoles y pH, la AGA-WT tuvo igualdad entre algunos fenoles y pH con estas dos últimas mutantes.

11. PERSPECTIVAS

Analizar genéticamente las estructuras de la subunidad AGA2 en cada mutante y conocer la orientación de la lacasa para poder justificar las diferencias entre una mutante y otra.

Realizar ensayos de estabilidad y oxidación fenólica de las mutantes restantes (las que presentaron valores de actividad más bajos).

Caracterización de las mutantes de AGA2 (proteína fusionada AGA2-LAC) libres.

Realizar ensayos de tolerancia con otros solventes como DMSO, acetona, metanol, DMF, dimetilacetamida.

Realizar pruebas de oxidación con otros compuestos fenólicos como *p*-cumárico, catecol, vainillina.

Determinación de parámetros cinéticos (K_m y V_{max} para cada sustrato utilizado).

12. BIBLIOGRAFIA

Afzal, M., Iqbal, S., Rauf, S., & Khalid, Z. M. (2007). Characteristics of phenol biodegradation in saline solutions by monocultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas pseudomallei*. *Journal of hazardous materials*, 149(1), 60-66. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.03.046>

Alcalde, M. (2007). Laccases: Biological Functions, Molecular Structure and Industrial Applications. In J. Polaina & A. P. MacCabe (Eds.), *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (pp. 461-476). Dordrecht: Springer Netherlands.

Ba, S., Arsenault, A., Hassani, T., Jones, J. P., & Cabana, H. (2013). Laccase immobilization and insolubilization: from fundamentals to applications for the elimination of emerging contaminants in wastewater treatment. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(4), 404-418. doi: 10.3109/07388551.2012.725390

Baldrian P, in der Wiesche C, Gabriel J, Nerud F & Zadrazil F (2000) Influence of cadmium and mercury on activities of ligninolytic enzymes and degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pleurotus ostreatus* in soil. *Appl Environ Microbiol* 66: 2471–2478.

Baldrian P. (2006). Fungal laccases- occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 30(2), 215–242. <https://doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>

Bertrand, B., Martínez-Morales, F., Tinoco-Valencia, R., Rojas, S., Acosta-Urdapilleta, L., & Trejo-Hernández, M. R. (2015). Biochemical and molecular characterization of laccase isoforms produced by the white-rot fungus *Trametes versicolor* under submerged culture conditions. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 339-347. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.10.009>

Bertrand, B., Trejo-Hernández, M., Morales, D., Caspeta, L., Suárez, R., & Martínez-Morales, F. (2016). Functional expression, production and biochemical characterization of a laccase using yeast surface display technology. *Fungal Biology*, 120, 1609–1622. doi: 10.1016/j.funbio.2016.08.009

Blaich R & Esser K (1975) Function of enzymes in wood destroying fungi. 2. Multiple forms of laccase in white rot fungi. *Arch Microbiol* 103: 271–277.

Brandi, P., D'Annibale, A., Galli, C., Gentili, P., & Pontes, A. S. N. (2006). In search for practical advantages from the immobilisation of an enzyme: the case of laccase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 41(1), 61-69. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.012>

Bulter, T., Alcalde, M., Sieber, V., Meinhold, P., Schlachtbauer, C., & Arnold, F. H. (2003). Functional Expression of a Fungal Laccase in *Saccharomyces cerevisiae* by Directed Evolution. *Applied and environmental microbiology*, 69(2), 987. doi: 10.1128/aem.69.2.987-995.2003

- Camarero, S., Pardo, I., Cañas, A. I., Molina, P., Record, E., Martínez, A. T., Alcalde, M. (2012). Engineering platforms for directed evolution of Laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and environmental microbiology*, 78(5), 1370-1384. doi: 10.1128/aem.07530-11
- Chen, M.-l., Guo, Q., Wang, R.-z., Xu, J., Zhou, C.-w., Ruan, H., & He, G.-q. (2011). Construction of the yeast whole-cell *Rhizopus oryzae* lipase biocatalyst with high activity. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(7), 545-551. doi: 10.1631/jzus.B1000258
- Chen, X. (2017). Yeast cell surface display: An efficient strategy for improvement of bioethanol fermentation performance. *Bioengineered*, 8(2), 115-119. doi: 10.1080/21655979.2016.1212135
- Chen, Y., Stemple, B., Kumar, M., & Wei, N. (2016). Cell Surface Display Fungal Laccase as a Renewable Biocatalyst for Degradation of Persistent Micropollutants Bisphenol A and Sulfamethoxazole. *Environmental Science & Technology*, 50(16), 8799-8808. doi: 10.1021/acs.est.6b01641
- D'Annibale, A., Stazi, S. R., Vinciguerra, V., & Giovannozzi Sermanni, G. (2000). Oxirane-immobilized *Lentinula edodes* laccase: stability and phenolics removal efficiency in olive mill wastewater. *Journal of Biotechnology*, 77(2), 265-273. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(99\)00224-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(99)00224-2)
- Durán, N., & Esposito, E. (2000). Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 28(2), 83-99. doi: [https://doi.org/10.1016/S0926-3373\(00\)00168-5](https://doi.org/10.1016/S0926-3373(00)00168-5)
- Durán, N., Rosa, M. A., D'Annibale, A., & Gianfreda, L. (2002). Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 907-931. doi: [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00214-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00214-4)
- García-Ruiz, E., Mate, D., Ballesteros, A., Martinez, A. T., & Alcalde, M. (2010). Evolving thermostability in mutant libraries of ligninolytic oxidoreductases expressed in yeast. *Microbial Cell Factories*, 9(1), 17. doi: 10.1186/1475-2859-9-17
- Ghosh D & Mukherjee R (1998) Modeling tyrosinase monooxygenase activity. Spectroscopic and magnetic investigations of products due to reactions between copper(I) complexes of xylyl-based dinucleating ligands and dioxygen: aromatic ring hydroxylation and irreversible oxidation products. *Inorg Chem* 37: 6597–6605.
- Gonzalez-Perez, D., Garcia-Ruiz, E., & Alcalde, M. (2012). *Saccharomyces cerevisiae* in directed evolution: An efficient tool to improve enzymes. *Bioengineered bugs*, 3(3), 172-177. doi: 10.4161/bbug.19544

- Greimel, K. J., Perz, V., Koren, K., Feola, R., Temel, A., Sohar, C., Guebitz, G. M. (2013). Banning toxic heavy-metal catalysts from paints: enzymatic cross-linking of alkyd resins. [10.1039/C2GC36666E]. *Green Chemistry*, 15(2), 381-388. doi: 10.1039/c2gc36666e
- Heyl A, Jorissen J (2006) Electrochemical detoxification of waste water without additives using solid polymer electrolyte (SPE) technology. *J Appl Electrochem* 36: 1281–1290.
- limura, Y., Sonoki, T., & Habe, H. (2018). Heterologous expression of *Trametes versicolor* laccase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expression and Purification*, 141, 39-43. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.09.004>
- Johannes, T. W., & Zhao, H. (2006). Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Current Opinion in Microbiology*, 9(3), 261-267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.03.003>
- Klibanov AM, Alberti BN, Morris ED, Felshin LM (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters. *J Appl Biochem* 2:414–421
- Kondo, A., & Ueda, M. (2004). Yeast cell-surface display—applications of molecular display. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(1), 28-40. doi: 10.1007/s00253-003-1492-3
- Kudanga, T., & Le Roes-Hill, M. (2014). Laccase applications in biofuels production: current status and future prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(15), 6525-6542. doi: 10.1007/s00253-014-5810-8
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(1), 32. doi: 10.1186/1475-2859-7-32
- Lang E, Eller G & Zadrazil F (1997) Lignocellulose decomposition and production of ligninolytic enzymes during interaction of white rot fungi with soil microorganisms. *Microb Ecol* 34: 1–10.
- Lang E, Nerud F & Zadrazil F (1998) Production of ligninolytic enzymes by *Pleurotus* sp. and *Dichomitus squalens* in soil and lignocellulose substrate as influenced by soil microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* 167: 239–244.
- Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., & Spettoli, P. (2000). Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochemistry*, 36(1), 51-58. doi: [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00180-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00180-1)
- Leonowicz, A., Sarkar, J. M., & Bollag, J.-M. (1988). Improvement in stability of an immobilized fungal laccase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 129-135. doi: 10.1007/bf01982891

Liu, J., Shen, X., Zheng, Z., Li, M., Zhu, X., Cao, H., & Cui, C. (2020). Immobilization of laccase by 3D bioprinting and its application in the biodegradation of phenolic compounds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, 518-525. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.144>

Lu J, Guo Q, Cui M, Yang L, Du S, Ruan H, Guo-qing H, 2012. Construction of a yeast cell-surface display system and expression of *Trametes* sp. laccase. *Advanced Materials Research* 347e353: 3635e3640.

Majeau, J; Brar, S; Tyagi, R. (2010). Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. *Bioresour Technol* 101 (7): 2331-2350.

Martinez, Anaya Claudia; José Fernando García Guevara. (2014). Ingeniería de proteínas para el mejoramiento de enzimas. *Revista Digital Universitaria [en línea]*, Vol. 15, No.12. Disponible en Internet: <<http://www.revista.unam.mx/vol.15/num12/art93/index.html>> ISSN: 1607-6079.

Mate, D. M., & Alcalde, M. (2015). Laccase engineering: from rational design to directed evolution. *Biotechnology advances*, 33(1), 25–40. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.12.007>

Mate, D. M., & Alcalde, M. (2017). Laccase: a multi-purpose biocatalyst at the forefront of biotechnology. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1457–1467. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12422>

Mate, D., García-Burgos, C., García-Ruiz, E., Ballesteros, A. O., Camarero, S., & Alcalde, M. (2010). Laboratory Evolution of High-Redox Potential Laccases. *Chemistry & Biology*, 17(9), 1030-1041. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.07.010>

Mukherjee, S., Basak, B., Bhunia, B., Dey, A., & Mondal, B. (2013). Potential use of polyphenol oxidases (PPO) in the bioremediation of phenolic contaminants containing industrial wastewater. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(1), 61-73. doi: 10.1007/s11157-012-9302-y

Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S. K., Kermanshahi-pour, A., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2017). Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. *Science of The Total Environment*, 584-585, 393-401. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.021>

Nicolucci C, Rossi S, Menale C, Godjevargova T, Ivanov Y, Bianco M, Mita L, Bencivenga U, Mita DG, Diano N. (2011). Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation* 22: 673–683.

Osma, J. F., Toca-Herrera, J. L., & Rodríguez-Couto, S. (2010). Uses of Laccases in the Food Industry. *Enzyme Research*, 2010, 918761. doi: 10.4061/2010/918761

Peña-Montes, C., Farrés, A. (2008). Evolución Dirigida en la Generación de Biocatalizadores: Biocatalizadores Hechos a Medida. *Revista de la sociedad mexicana de biotecnología y bioingeniería*, 12, 5-23.

Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E., & Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol Oxidase: Characteristics and Mechanisms of Browning Control. *Food Reviews International*, 24(4), 361-375. doi: 10.1080/87559120802089332

Rodriguez-Couto, S., & Toca-Herrera, J. L. (2006). Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology advances*, 24, 500-513. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.003

Sifontes, A. (2014). Biosíntesis de nanomateriales: hacia el avance de la nanotecnología verde. *Mundo Nano*, 7, 56-68. doi: 10.22201/ceiich.24485691e.2014.13.48709

Singh, T., Bhatiya, A. K., Mishra, P. K., & Srivastava, N. (2020). Chapter 11 - An effective approach for the degradation of phenolic waste: phenols and cresols. In P. Singh, A. Kumar & A. Borthakur (Eds.), *Abatement of Environmental Pollutants* (pp. 203-243): Elsevier.

Tafakori, V., Torktaz, I., Doostmohammadi, M., & Ahmadian, G. (2012). Microbial cell surface display; its medical and environmental applications. *Iranian Journal of Biotechnology*, 10(4), 231-239.

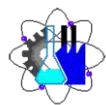
Wei, G., Yu, J., Zhu, Y., Chen, W., & Wang, L. (2008). Characterization of phenol degradation by *Rhizobium* sp. CCNWTB 701 isolated from *Astragalus chrysopterus* in mining tailing region. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 111-117. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.05.058

Xu, R., Zhou, Q., Li, F., & Zhang, B. (2013). Laccase immobilization on chitosan/poly(vinyl alcohol) composite nanofibrous membranes for 2,4-dichlorophenol removal. *Chemical Engineering Journal*, 222, 321-329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.02.074>

Zhang J, Xu Z, Chen H, Zong Y. (2009). Removal of 2,4-dichlorophenol by chitosan-immobilized laccase from *Coriolus versicolor*. *Biochem Eng J* 45:54–59.

Zofair, S. F. F., Arsalan, A., Khan, M. A., Alhumaydhi, F. A., & Younus, H. (2020). Immobilization of laccase on Sepharose-linked antibody support for decolourization of phenol red. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 78-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.009>

Zumárraga, M., Bulter, T., Shleev, S., Polaina, J., Martínez-Arias, A., Plou, F. J., Alcalde, M. (2007). In Vitro Evolution of a Fungal Laccase in High Concentrations of Organic Cosolvents. *Chemistry & Biology*, 14(9), 1052-1064. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2007.08.010>



Cuernavaca, Mor., a 16 de junio de 2021

DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ
DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ
M.B. DANIEL MORALES GUZMÁN
DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES
DRA. YOLANDA FLORES VELÁZQUEZ

P R E S E N T E

Me permito comunicarles que han sido designados integrantes del **COMITÉ REVISOR** del trabajo de: **TESIS**

Titulado:

Efecto de mutaciones del gen AGA2 sobre las propiedades bioquímicas de una lacasa en un sistema de despliegue en superficie de levadura

Que presenta (el) o (la) **C. MA. DE LOS ÁNGELES MONTES BRITO**, del programa educativo de:
INGENIERÍA QUÍMICA

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA

Se anexa firma electrónica

D I C T A M E N

DRA. VIRIDIANA AYDEÉ LEÓN HERNÁNDEZ
DIRECTORA DE LA FCQeI
P R E S E N T E

En respuesta a su amable solicitud para emitir DICTÁMEN sobre el trabajo que se menciona, me permito informarle que nuestro voto es:

VOTO	NOMBRE	FIRMA
	DRA. CONSTANZA MACHÍN RAMÍREZ	
	DRA. MARÍA DEL REFUGIO TREJO HERNÁNDEZ	
	M.B. DANIEL MORALES GUZMÁN	
	DR. FERNANDO MARTÍNEZ MORALES	
	DRA. YOLANDA FLORES VELÁZQUEZ	

El voto del comité es aprobatorio, se anexan firmas electrónicas

VALH/fmg



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

VIRIDIANA AYDEE LEON HERNANDEZ | Fecha:2021-06-16 22:10:07 | Firmante

S0HrADbvzxAw3gGf9j04NLawacNFfTyWegKlf5lh9W/UYDJxgasZbjwMsXeSR3oqtBvf7mhO6ggFJKwhNaRpiNVAZkPM1ZLgUsPuZ2tMA9Z+gHyXCdjoTa+QHz1mKFWCGxpc9PwT5596UiK/fS6unkPs4b3lLwU9CcuVfh3+ff7+bDW34qwlkKEuxwCUA40yjoK0E1rTmqGyGXU1X3cr0vITXijR0i3kXLlImaxcrsDO9ZezyXE4PGlMGkbctUgjcSQ6FnyR2P9gGpFt6tYOvNkzO6bmCuMDQ3qUfNb8J+/+GoJX7hdryb6vB9UxobsO2xJRrQUcNOwy/6odpTdXA==

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



1q3oUY

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ToTugFI5TscqIRDnN2UyYB08ZQ1NqNkg>



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

CONSTANZA MACHIN RAMIREZ | Fecha:2021-06-24 21:53:55 | Firmante

b4hzWXXQR9Sg/9XAHkh4B4HyVzyPW1vtYtEyB0ZnVxaXTcnSzz2K8BX6Py5fZwHAQJ+Y85Rb8WMPZ6IVaw9KgJDuxTIEO4Pp4ZF2D2zwh4gK0rse662w5CHZQTM3D9HzT3Wa
EVXTgKq4CQ171ERMkdR9g9dfhjbHPTZHRmt/AnWB7aWvgVbnv4Hb90c2r2Rzq1yVJ2UOm09/Sk3ZlmKh5ukm009I+xGKCDXa8TqpfV+pRHQITbAW0j9F1IHfuVKSa4YEhm/
hwBbD+BKdfyHo6YXf5mjHDQ1uho1GO5I/Fauxo9nCKUOO6yZYeF+Xs89Bvkm/wz1Yj2KQpAd+xmBw==

MARIA DEL REFUGIO TREJO HERNANDEZ | Fecha:2021-06-25 08:46:58 | Firmante

Ea3ma/BsPZzGLDysPQAJGPKh0aF7b1PpWHSsgchjtIOFIGWAFln+kDwKXlqbJIHGL10TgVQEGCQaF1ZT013IsWoBTnZd9pMaMcMk7Q9AXCiwJ3f5BU2v05QhiA29iSjhXXjHL
/RBbo086QL+vvD12hJRtmwWoToBigx81BK/RM4mc1ElndXWJ03igNdMsSnqM9UEf93OaV61bQZet0Q78JeuxP8tFBNrqpYwZPAOhCS2WYKO5FNsPcuuAUJZCTLElligY/V
0M9TJZ8SP23xTCv/J19kEdDYXLYeFE0R4bVLEgSke4RAz3fnjsB9uRIM9thL1xG3q02irwhrlaA==

FERNANDO MARTINEZ MORALES | Fecha:2021-06-25 10:26:50 | Firmante

YzyaRHMwi4UAcnGE4lon/I+NOSqUUN5ppDAUlkYzFlcpfctFyNj2MMgzZJ+89Ke6qCRzBQXSVj/3OxAbBhk2ErpO0gYPncDvimL02yTImIWlZfJwyDZzeN6hzVYmjWKDhZbhrX
R144qSb63ICYBvHprAvUhh3lj1dC4PUtrWbOnH8I5zTjir35LUPvudG+XL9Knbvau5UaWS9924v18kf6OH2og57nch7dQDQ3Z/CkxVmT7tw2zCNitRNAfomQvz+HoAZ80d4lrKfyYu
rJs6ZLb8J1Ss6glBpc/ztQ5NLJ4UsNXGMH4niRr0x/L8t9yt3bo+WXJl064ePeK7WuQ==

DANIEL MORALES GUZMAN | Fecha:2021-06-25 10:33:51 | Firmante

JfCtsexMVLvJOyy620PAKhrFt6HO/IT/Jy2EByNW7EDR01twmbSF9isQFHH7q8IIE4twlGbdjHfEP/BQo3Ri2b+3zk9o2wg6j1fi+gZX9Pa9CvDpc/pb7WpvgRmN9y4bnGBAXOt0aT
q3vGygvVMyfJwSfCUIJc2mM4FmTflmPi8lddTPi7ZXhm2VRYSGtXilz38BzG6TR+JpcHso4Rg7TcCdTvsvVDokeQHorgQtKwYImAmz53M7UEzyHlo5q6lrb4LI+/G+nLMDSuPNV
+D1Tuj5xhRCFTVLneN23oF7Tiy7GoGtWfCNMMbGCK0ZlIXhmF93/6NEvDE8G85oRg==

YOLANDA FLORES VELAZQUEZ | Fecha:2021-07-05 17:57:42 | Firmante

CVqHLACXrmMDJ2KXiBAqdZcVscgXLWf/OG3k0T0SyKN7GK8dSJgM/1mQOAKPZJeh6+BduoUhs4h/0M8ITW3jtCrW6RY/xMW//Yzfm5S0iQ19R4vszzt3Yds9qU7967yZhEQYa
G9bDXcwktnNyxgFJOPRdFCJO3zgSo4Gv/BLvVmfxiQnaeRL0gAodYJxQi15C+Fd3HaS58jpls40E0J5LjZ1itQu8XG4w8OctZZU46vmLWb2Jec2zReB7IUVIZmo6B0HHWzaRpkO
FaRT5mBUJJsJZIDVdK/n5Ilcy74VZQo54DIRI8TSy9duFVBfQOMDX3mWvAwqzL05aASDrbh12nw==

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



wjnedy

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/jEbPeqxwPuaxnsbp0YtqhYmQx1VDw9X9>