



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**OXIDACIÓN DE ASFALTENOS CATALIZADA POR UNA PEROXIGENASA
FÚNGICA VERSÁTIL**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:
PRISCILA PÉREZ FORCADO**

**TUTOR PRINCIPAL
DRA. MARCELA AYALA ACEVES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

**DR. EDMUNDO CASTILLO ROSALES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM**

**DR. NORMA ADRIANA VALDEZ CRUZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

Cuernavaca, Mor., septiembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo fue realizado en el laboratorio de biocatálisis redox bajo la dirección de la Dra. Marcela Ayala Aceves, que pertenece al departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de estudios de maestría que otorgó el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

Agradecimientos

A la Dra. Marcela Ayala Aceves, por aceptarme en su grupo de trabajo, sobre todo en la situación en la que me incorporé, gracias por su esfuerzo, enseñanzas y paciencia.

Al Dr. Edmundo Castillo y a la Dra. Adriana Valdez, por formar parte de mi comité tutor, gracias por sus aportaciones y conocimientos.

A la Biol. Rosa Román Miranda, Mario Alberto Caro Bermúdez y Fernando González Muñoz por el apoyo técnico. A la Dra. Clarita Olvera, por su asesoría y colaboración en el diseño del gen sintetizado comercialmente. Al Dr. Miguel Alcalde, por proporcionar el sistema de expresión de PaDa-I.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, por el buen ambiente de trabajo que propician, por siempre aportar cosas positivas y sus ánimos de ayudar, fue un privilegio haber compartido estos dos años con ustedes, pero en especial quiero agradecer al M. en C. Joaquín Ramírez por la asesoría que siempre me brindó de buena gana.

A mis amigos de generación, gracias por todos los momentos compartidos.

A mis amigas salvaterrenses, Cecilia y Brenda, gracias por siempre estar ahí.

A mi familia, mis padres Antonio y María Eugenia, a mis hermanos Miriam y Marco Antonio, gracias por su amor, por darme las condiciones para poder llevar a cabo todos mis proyectos, por siempre impulsarme a ser mejor.

ÍNDICE

RESUMEN	6
1. INTRODUCCIÓN	7
1.1 Asfaltenos.....	7
1.2 Los asfaltenos: efecto negativo durante el procesamiento del petróleo pesado y sobre el medio ambiente	8
2. ANTECEDENTES	10
2.1 Degradación microbiana y enzimática de asfaltenos.....	10
2.2 Enzimas hemo-tiolato	14
2.2.1 Cloroperoxidasa	15
2.2.2 Peroxigenasa inespecífica de <i>Agrocybe aegerita</i>	16
3. HIPÓTESIS	23
4. OBJETIVO GENERAL.....	23
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5. MÉTODOS.....	24
5.1 Producción recombinante de enzimas UPOs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Molina-Espeja et al., 2014).	24
5.1.1 Medios de cultivo	24
5.1.2 Crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> recombinante.	24
5.2 Purificación de la PaDa-I (Molina-Espeja et al., 2014)	25
5.3 Ensayo para medir actividad enzimática con ABTS y con NBD, y concentración de proteína por el método de Bradford.....	25
5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida	26
5.5 Medición de la estabilidad enzimática.....	26
5.5.1 Estabilidad en un sistema solvente-buffer.....	26
5.5.2 Estabilidad en un sistema solvente-buffer-peróxido	26
5.6 Oxidación de asfaltenos en el sistema acetona-buffer (60-40%) con PaDa-I	27
5.7 Liofilización de la cloroperoxidasa	27
5.8 Oxidación de asfaltenos en el sistema hexano-isopropanol-buffer (46:47.7:6.3) con CPO	27
5.9 Extracción de asfaltenos del medio de reacción.....	28
5.10 Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR) y Análisis termogravimétrico (TGA).....	28
5.11 Métodos generales de biología molecular.....	28

5.11.1 Síntesis del gen <i>upoT</i>	28
5.11.2 Vector de expresión de la probable UPO.....	29
5.11.3 Purificación del plásmido (www.thermoscientific.com/onebio).....	29
5.11.4 Digestión del plásmido.....	29
5.11.5 Electroforesis en gel de agarosa.....	29
5.11.6 Ligación.....	30
5.11.7 Transformación por choque térmico.....	30
5.11.8 Reacción en cadena de la polimerasa: PCR de colonia (<i>E. coli</i>).....	30
5.11.9 Preparación de células quimio-competentes de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
5.11.10 Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	31
5.11.11 PCR de colonia (<i>S. cerevisiae</i>).....	31
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
6.1 Purificación de PaDa-I.....	33
6.2 Estabilidad de la PaDa-I en solventes orgánicos.....	34
6.3 Solubilidad de asfaltenos en acetona.....	36
6.4 Oxidación de asfaltenos en el sistema acetona-buffer con Pada-I.....	38
6.4.1 Monitoreo de la oxidación de asfaltenos por disminución en la intensidad de la MFEE.....	38
6.4. Cinética de disminución de fluorescencia de asfaltenos durante la reacción enzimática.....	43
6.5 Oxidación de asfaltenos catalizada por la CPO.....	45
6.6. Análisis de los asfaltenos tratados enzimáticamente por FTIR y TGA.....	48
6.5 Selección de la enzima homóloga a <i>AaeUPO</i> proveniente de un ustilaginomiceto por medio de un BLAST.....	51
6.6 Sub-clonación en el vector de expresión.....	53
6.7 Evaluación de las colonias transformadas con pPF2.....	55
7. CONCLUSIONES.....	60
8. PERSPECTIVAS.....	61
9. BIBLIOGRAFÍA.....	62

RESUMEN

Los asfaltenos se definen como la fracción del petróleo que son insolubles en n-alcános de cadena corta como son pentano, hexano y heptano y solubles en tolueno. Al ser una fracción definida por su solubilidad está constituida por una mezcla compleja de moléculas recalcitrantes. Una molécula promedio de asfaltenos está constituida por un centro poliaromático rodeado de cadenas alifáticas y contiene heteroátomos (nitrógeno, azufre u oxígeno) y un alto contenido de metales (Ni, V y Fe). Los asfaltenos ocasionan problemas tanto ambientales como procesamiento del petróleo. Su transformación por las vías tradicionales, como son el hidrocraqueo, requiere de condiciones de presión y temperatura severas. El agotamiento de petróleo ligero y las grandes reservas de petróleo pesado hace interesante la investigación de la transformación de estos compuestos a través de métodos biotecnológicos. En este trabajo se evaluó la oxidación de los asfaltenos catalizada por la enzima UPO, una hemoproteína que utiliza peróxidos como co-sustrato, y que se caracteriza por oxidar una amplia gama de sustratos, que incluyen compuestos poliaromáticos y alcános, entre otros.

Existe el antecedente de que la cloroperoxidasa (CPO) es capaz de oxidar a los asfaltenos, por lo que fue usada como referencia en este trabajo.

Se evaluó la oxidación de la fracción de asfaltenos solubles en acetona, la cual es una fracción polar y de peso molecular menor al promedio. Los productos de reacción se analizaron por medio de tres técnicas: 1) la matriz de fluorescencia de emisión y excitación (MFEE) ya que la modificación de la estructura química afecta la fluorescencia, 2) de espectro de infrarrojo (FTIR), el cual nos indica la aparición o desaparición de grupos funcionales y por último, 3) análisis termogravimétrico (TGA), el cual nos indica la termoestabilidad de los productos generados, en comparación con los asfaltenos sin tratar. La termoestabilidad es un indicativo de su reactividad, y por lo tanto de su posible transformación a productos con mayor valor agregado, o bien compuestos menos recalcitrantes.

Los resultados muestran que tanto la UPO como la CPO abaten la MFEE hasta un 50%, lo cual podría deberse a que los compuestos remanentes y/o moléculas oxidadas ya no son susceptibles a la oxidación catalizada por ninguna de estas dos enzimas. En cuanto a la información resultante de los análisis FTIR vemos que, en los asfaltenos tratados con la UPO y con la CPO, existe un aumento de grupos funcionales como carbonilos, hidroxilos, nitro, sulfatos así como aromáticos con sustituciones, y en el caso del tratamiento con la CPO se observa una señal correspondiente a C-Cl de aromáticos, lo cual representa una desventaja para este sistema.

Paralelamente a esto se realizó la búsqueda en base de datos genéticos de enzimas UPO hipotéticas en genomas de ustilaginomicetos, ya que no existe reporte de UPOs proveniente de esta clase de hongos, se sintetizó el gen de forma comercial y se hizo la construcción en un vector de expresión para levadura.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Asfaltenos

La definición de asfaltenos más común está basada en sus propiedades de solubilidad: son la fracción del petróleo que es insoluble en alcanos de cadena corta, tales como n-pentano, n-hexano o n-heptano, y soluble en solventes aromáticos, como benceno o tolueno. Los asfaltenos son en realidad una mezcla de moléculas con estructura química muy diversa; la estructura promedio contiene un centro policíclico aromático de 7 anillos fusionados (puede haber de 4 a 10 anillos), con alcanos en la periferia, en una arquitectura de “isla molecular”. El peso molecular de los asfaltenos es en promedio de 750 Da, pero puede ir desde 400 a 1000 Da (Mullins, 2011).

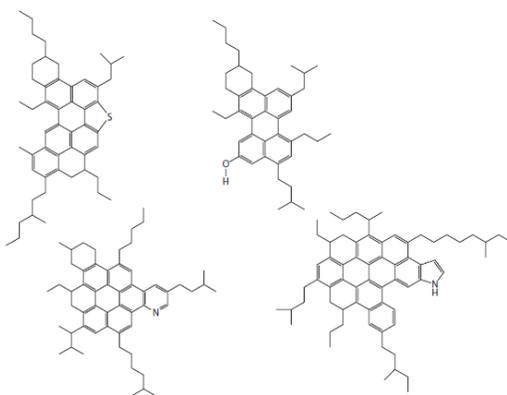


Figura 1. Diversas estructuras moleculares y grupos funcionales encontradas en los asfaltenos (Tomada de Mullins, 2011).

El centro de la molécula de los asfaltenos, el hidrocarburo poliaromático, es el sitio principal de atracción intermolecular, la cual proviene de las fuerzas de dispersión de London y algunos sitios con dipolos. El exterior de la molécula, con sustituyentes alquilo, provoca repulsión por efectos estéricos. Consecuentemente, dependiendo de la concentración y del solvente, se pueden formar nanoagregados de menos de 10 moléculas (Figura 2, centro). Para que se formen dichos nanoagregados, es necesario que se alcance la concentración crítica de asfaltenos, que va de 50 a 150 mg/L. A concentraciones más altas, de aproximadamente 3g/L, los nanoagregados de asfaltenos pueden formar racimos (*cluster*), en soluciones de asfaltenos/tolueno (figura 2, derecha) (Mullins, 2011).

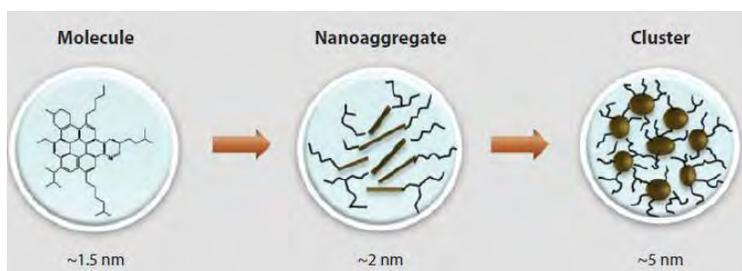


Figura 2. (Izquierda) Estructura molecular de los asfaltenos. (Centro) las moléculas de asfaltenos forman nanoagregados que van desde 4 a 10 moléculas que se apilan de una forma desordenada. (Derecha) los nanoagregados de asfaltenos pueden formar racimos con número de agregación de aproximadamente ocho (Tomada de Mullins, 2011)

Existen problemas relacionados con los asfaltenos, tanto a nivel operacional (en el procesamiento del petróleo) como ambiental relacionados con los asfaltenos, por lo se hablará de ellos en las siguientes secciones.

1.2 Los asfaltenos: efecto negativo durante el procesamiento del petróleo pesado y sobre el medio ambiente

El petróleo extra ligero y ligero son ideales para obtener diésel y gasolina, debido a su bajo contenido de fracciones pesadas (asfaltenos y resinas) y heteroátomos. El agotamiento de petróleo ligero ha provocado el incremento de la explotación y procesamiento de petróleo crudo pesado o extra pesado (Ancheyta Juárez, Trejo, & Rana, 2009), el cual por su mayor contenido de asfaltenos y heteroátomos, hace su procesamiento más costoso en términos energéticos. Además, la presencia de estas moléculas afecta fuertemente las operaciones del refinamiento en particular la del hidro craqueo de las alimentaciones pesadas (Gawel, Bociarska, & and Biskupski 2005).

En la tabla 1 se muestra la proporción y composición química de los grupos de moléculas presentes en petróleo crudo de diferente tipo.

Tabla 1. Propiedades y cantidad de asfaltenos, resinas y aceites en petróleo crudo pesado y ligero, y residuos (Ancheyta Juárez, Trejo, & Rana, 2009).

Clasificación	Hidrocarburos				Contaminantes		
	Gravedad API	Asfaltenos %w	Resinas %w	Aceites %w	S %x	N %w	Metales(Ni+V) ppm
Extra ligero	>50	0<2	0.05-3	-	0.02-0.2	0.0-0.01	<10
Ligero	22-32	<0.1-12	3-22	67-97	0.05-4.0	0.02-0.5	10-200
Pesado	10-22	11-25	14-29	24-64	0.1-5.0	0.2-0.8	50-500
Extra pesado	<10	15-40	-		0.8-6.0	0.11	200-600
Residuo	-	15-30	25-40	<49	-	-	100->1000

El proceso de “hidro craqueo” se ha desarrollado para convertir fracciones pesadas en otras más ligeras, y por lo tanto productos con más valor agregado. Para lograr romper las grandes moléculas de los hidrocarburos pesados en moléculas pequeñas, se hace uso de

calor, presión y de ciertos catalizadores (Ancheyta Juárez, Trejo, & Rana, 2009). Estos procesos son costosos ya que requieren inversión en equipo e infraestructura (Vazquez-Duhalt & Quintero Ramírez, 2004).

La estabilidad del petróleo también se ve afectada por los asfaltenos, ya que los cambios químicos de su estructura favorecen su agregación. Se cree que la agregación de asfaltenos es el primer paso para la formación de partículas que precipitan del petróleo. El modelo más confiable de la naturaleza de la interacción entre los asfaltenos y los componentes del petróleo ligero es tanto de solubilidad como coloidal. Las resinas juegan un papel clave en la solubilización de los asfaltenos ya que reducen su agregación (Gawel, Bociarska, & Biskupski 2005).

Debido a este decremento en la estabilidad de los asfaltenos, se favorece la formación de sedimentos en los equipos. Ha sido reportado que el factor más importante para la formación de sólidos es la aromaticidad y la condensación de sistemas poliaromáticos, (Gawel, Bociarska, & Biskupski 2005). La solubilidad de los asfaltenos decrece debido a que en el proceso se pierden las cadenas alifáticas laterales, con lo cual aumenta su aromaticidad, otra razón es la hidrogenación de maltenos, ya que pierden su capacidad de solubilizar asfaltenos (Gawel, Bociarska, & Biskupski 2005). Los depósitos colectados del equipo de proceso son una mezcla compleja de materiales orgánicos e inorgánicos. La principal característica de estos sedimentos es su alta aromaticidad y su alto contenido de asfaltenos condensados (Gawel, Bociarska, & Biskupski 2005). Además, los depósitos colectados de las instalaciones de los hidrotreatamientos de las refinerías contienen una alta cantidad de metales, los cuales provienen de los catalizadores, corrosión o de la alimentación (petróleo crudo). Se sabe que el contenido de metales en esta última se encuentra principalmente en los asfaltenos (V, Ni y Fe). La remoción periódica de los depósitos formados durante el hidrotreatamiento eleva el costo y rendimiento de producción (Gawel, Bociarska, & Biskupski 2005). El transporte del petróleo pesado representa otro problema, debido a la alta viscosidad provocada por los asfaltenos, de hecho estos crudos necesitan naftas o gas natural condensado para que sea posible su transporte (Vazquez-Duhalt & Quintero Ramírez, 2004).

En contraste con los procesos actuales, los procesos biológicos podrían ofrecer condiciones de proceso menos severas y una alta selectividad para reacciones específicas. Los objetivos químicos de la mejoras del petróleo pesado incluyen la reducción del peso molecular de las fracciones residuales a materiales destilables, la hidrogenación para incrementar el radio C/H y la remoción de heteroátomos en particular de azufre y nitrógeno (Vazquez-Duhalt & Quintero Ramírez, 2004).

Por otro lado, los derrames accidentales y las goteras ocurren regularmente durante la exploración, producción, refinamiento, transporte y almacenamiento del petróleo y de sus productos. La liberación de hidrocarburos al ambiente, ya sea naturalmente o debido a actividades humanas, es la causa principal de la contaminación del agua y del suelo. La contaminación del suelo con hidrocarburos causa grandes daños a los sistemas locales

debido a la acumulación de los contaminantes en tejidos de animales y plantas, la cual puede causar mutaciones o la muerte. Las tecnologías comúnmente usadas para la remediación del suelo incluyen del tipo mecánicas, enterramiento, evaporación, dispersión y lavado. Sin embargo estas tecnologías son caras y la descomposición del contaminante es parcial (Das & Chandran 2011).

La biorremediación es una tecnología que utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para transformar contaminantes orgánicos en compuestos más simples poco o nada contaminantes y, por tanto, se pueda utilizar para limpiar suelos o aguas contaminadas. La biodegradación de hidrocarburos del petróleo es un proceso complejo que depende de la naturaleza y de la cantidad de los hidrocarburos presentes. Los hidrocarburos del petróleo pueden ser divididos en cuatro clases: los saturados, los aromáticos, los asfaltenos y las resinas. Uno de los factores importantes que limitan la biodegradación de contaminantes del petróleo es su limitada disponibilidad para los microorganismos. Algunos compuestos del petróleo se unen a componentes del suelo por lo que son difíciles de remover y degradar. La susceptibilidad de los hidrocarburos del petróleo a la degradación microbiana puede ser ordenada de mayor a menor la siguiente manera: alcanos lineales > aromáticos pequeños > alcanos ramificados > alcanos cíclicos > aromáticos policíclicos, estos últimos tal vez no sean degradados en absoluto (Das & Chandran, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Degradación microbiana y enzimática de asfaltenos

Se ha reportado la biodegradación de asfaltenos con consorcios microbianos, cultivos anéxicos, hongos y enzimas (Hernández-López, Ayala, & Vazquez-Duhalt, 2015). El tiempo que tarda la degradación parcial de asfaltenos llevada a cabo por bacterias, ya sea consorcios o cultivos anéxicos, es del orden de días. Está reportado que el hongo *Neosartorya fischeri* metaboliza 15% del carbono procedente de los asfaltenos (0.4g/L) en once semanas (Uribe-Alvarez et al., 2011).

Por otro lado, se reportó que un consorcio microbiano aislado de petróleo crudo Maya fue capaz de utilizar asfaltenos como única fuente de carbono midiendo su respiración, encontrando que la producción de CO₂ fue de 800µmol en 13 días; los controles sin asfaltenos y sin inocular tuvieron una producción de 200 y 300 µmoles respectivamente (Pineda-Flores, Boll-Argüello, Lira-Galeana, & Mesta-Howard, 2004).

Otro consorcio microbiano donde se aislaron 25 cepas bacterianas a partir de petróleo y suelo contaminado del yacimiento de petróleo de Doorod al sur de Irán, fue evaluado en la degradación de asfaltenos; se encontró que cinco cepas, una del género *Pseudomonas spp* y cuatro de *Bacillus spp*, tuvieron el mayor crecimiento en asfaltenos y degradaron del 40 al 46 % en dos meses, con una concentración inicial de 12 g/L (Tavassoli, Mousavi,

Shojaosadati, & Salehizadeh, 2012). Sin embargo, estos resultados deben de ser tomados con reserva, ya que los métodos utilizados para evaluar la degradación fueron gravimétricos y omiten la posibilidad de la solubilización de asfaltenos debido a la producción de surfactantes por los microorganismos (Hernández-López, Ayala, & Vazquez-Duhalt, 2015).

A pesar de que se ha demostrado que algunos microorganismos son capaces de metabolizar asfaltenos, no se conocen las vías metabólicas que llevan a cabo esta biotransformación (Hernández-López, Ayala, & Vazquez-Duhalt, 2015). Sin embargo, la información del metabolismo de compuestos con alta aromaticidad podría indicarnos la posible vía metabólica de los asfaltenos (figura 3).

La degradación más completa y rápida de los contaminantes orgánicos es llevada a cabo bajo condiciones aerobias. En la figura 3 se muestra la vía principal de la degradación de hidrocarburos. Primero los contaminantes sufren un proceso oxidativo catalizado por oxidoreductasas tales como oxigenasas y peroxidasas. La vía de degradación convierte a los contaminantes en intermediarios del metabolismo central, por ejemplo del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (figura 3), los intermediarios pueden actuar como precursores en la biosíntesis de biomasa celular o bien metabolizarse hasta CO₂ y agua (Das & Chandran, 2011).

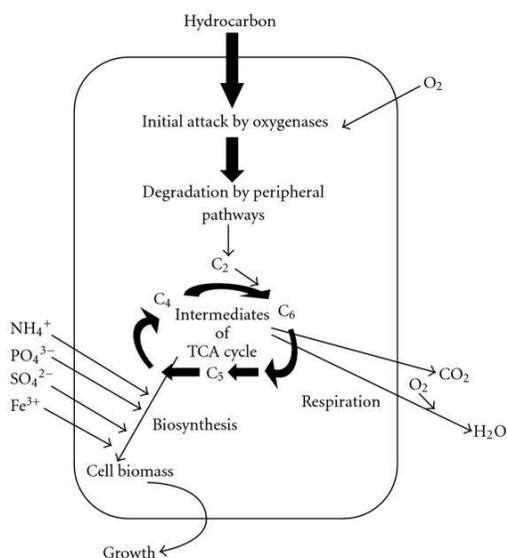


Figura 3. Principales vías de la degradación aerobia de hidrocarburos por microorganismos (Tomada de Das & Chandran, 2011).

Los citocromos P450 constituyen una súper familia de monooxigenasas hemo-tiolato que juegan un papel muy importante en la degradación microbiana de hidrocarburos. Estas enzimas introducen un átomo de oxígeno a su sustrato para iniciar la biodegradación. La multiplicidad de P450 sólo se encuentra en pocas especies de microorganismos, otras enzimas como la dioxigenasas también participan (Das & Chandran, 2011).

En cuanto a estudios con enzimas aisladas, la primera vez que se reportó que una enzima podía transformar asfaltenos fue en 1993. En este trabajo, se utilizó la cloroperoxidasa del hongo *Caldariomyces fumago* (CPO) para transformar asfaltenos ricos en petroporfirinas. La desaparición de las petroporfirinas se monitoreó por la desaparición del pico Soret (figura 4). Esta señal es característica de las porfirinas y depende de la coordinación de los metales con los anillos pirrólicos que las conforman. Cuando se pierde o cambian los enlaces de coordinación entre el metal y la porfirina, el pico Soret también se ve afectado, es decir, cambia de intensidad y/o de posición ($\lambda_{\text{máx}}$).

Se midió también la liberación de iones metálicos al medio, y se encontró que el contenido de níquel disminuyó hasta un 93% en la fase orgánica, mientras que el contenido de vanadio disminuyó un 53%. Se comprobó que dicha liberación de metales al medio catalizada por la CPO es debido a que el sistema quelante se perturba, es decir, se abren los anillos pirrólicos, y no a la simple liberación del ion metálico, ya que por espectroscopía de masas se determinó que el m/z disminuyó de un 590 a 446. La reacción se llevó a cabo en un sistema ternario de tolueno, isopropanol y agua (20:60:20) (Fedorak, Semple, Vazquez-Duhalt, & Westlake, 1993).

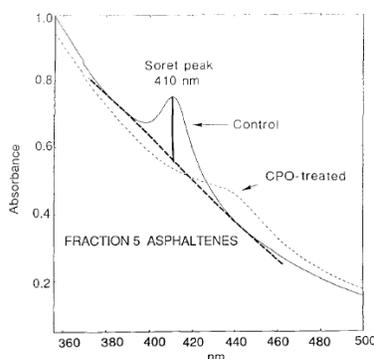


Figura 4. Espectro de UV-visible de la fracción de asfaltenos con y sin tratamiento con CPO (Tomada de Fedorak, Semple, Vazquez-Duhalt, & Westlake, 1993).

En otro reporte sobre la degradación enzimática de petroporfirinas de asfaltenos utilizaron un citocromo c modificado químicamente con polietilenglicol en los grupos amino libres y con metilaciones en los grupos carboxílicos, esto para aumentar la solubilidad de la enzima en solventes orgánicos; la oxidación de petroporfirinas se llevó a cabo en un sistema ternario compuesto por diclorometano, metanol y bajo contenido de agua (65:30:5). Se midió la oxidación de petroporfirinas por la desaparición del pico Soret (figura 5) (García-Arellano, Buenrostro-Gonzalez, & Vazquez-Duhalt, 2004).

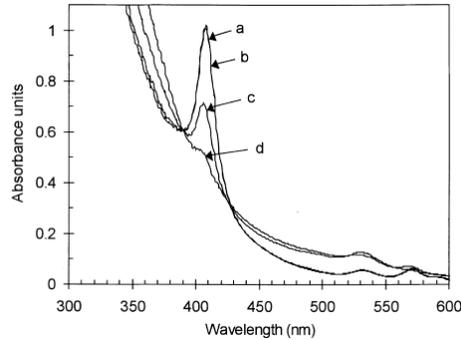


Figura 5. Disminución del pico Soret de la fracción rica en petroporfirinas tratadas con el citocromo c modificado. (a) asfaltenos sin tratar. (b) fracción rica en petroporfirinas con 100mM de hidroxido de terbutilo. (c) primera adición del citocromo c modificado. (d) Segunda adición del citocromo c modificado (Tomada de García-Arellano, Buenrostro-Gonzalez, & Vazquez-Duhalt, 2004).

El producto se analizó por FTIR y NRM y como resultado de la reacción se removieron 95% de vanadio y 74% de níquel de las petroporfirinas, además de la desaparición del pico Soret lo que sugiere la degradación de las petroporfirinas. Con la primera técnica se detectó una mayor cantidad de grupos funcionales con oxígeno como hidroxilos, carbonilos, carboxilos, sulfóxidos, sulfones y sulfonatos. Con ^1H NMR se detectaron diferencias en cadenas hidrocarbonadas de compuestos polares, mientras que en la ^{13}C NMR mostró que el contenido de heterátomos en los anillos aromáticos disminuyó y que el ratio de $-\text{CH}_3/-\text{CH}_2$ aumentó en las muestras tratadas, lo que sugiere un rompimiento de la molécula (García-Arellano, Buenrostro-Gonzalez, & Vazquez-Duhalt, 2004).

Por otro lado, y con el fin de confirmar si el resto de los asfaltenos (además de las petroporfirinas) también eran susceptibles a una oxidación enzimática, en el grupo de la Dra. Marcela Ayala se estudió la degradación de asfaltenos con la fracción libre de petroporfirinas utilizando la CPO como catalizador. En este caso, se monitoreó la disminución de la fluorescencia de los asfaltenos después de ser tratados con la enzima. Como solvente se utilizó un sistema ternario compuesto por hexano, isopropanol y agua (46:47.7:6.3) y la enzima se añadió de forma liofilizada. En este sistema de reacción se comprobó que el volumen bajo la matriz de fluorescencia disminuyó en un 24% (figura 6), lo que comprueba que la enzima puede actuar sobre otros compuestos diferentes de las petroporfirinas, además de que en los productos de la transformación enzimática aumentó el contenido de grupos funcionales como hidróxidos, cetonas, aldehídos, sulfitos, sulfatos y el contenido de cloro tanto en anillos aromáticos como en cadenas alifáticas y disminuyó el contenido los anillos aromáticos. Los productos también fueron más termolábiles y solubles que los asfaltenos sin tratar, lo que implica una menor formación del coque y mayor biodisponibilidad (Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, 2012).

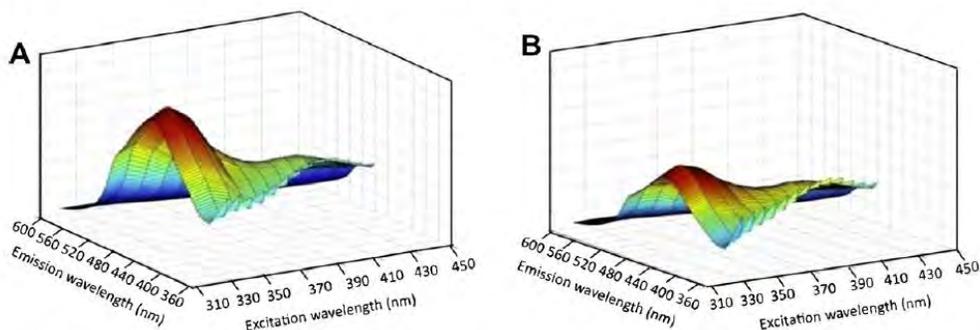


Figura 6. Matriz de fluorescencia de asfaltenos libres de petroporfirinas. (A) Sin tratar y (B) Tratados con CPO (Tomada de Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, 2012).

La cloroperoxidasa es una enzima de la clase hemo-peroxidasa, perteneciente a la familia hemo-tiolato (ya que el residuo que coordina al ion hierro es una cisteína). A continuación se profundiza más sobre esta clase de enzimas.

2.2 Enzimas hemo-tiolato

Las hemo-tiolato peroxidasas son enzimas que se han agrupado como una familia diferente de las peroxidasas clásicas de bacterias, plantas y hongos (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010). Utilizan peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones y donador de átomos de oxígeno. La reacción inicia cuando una molécula de peróxido de hidrógeno reacciona con la enzima en su estado basal para formar el Compuesto I, un complejo oxo-ferril con un radical deslocalizado en la proteína (Poulos, 2014,) (Figura 7).

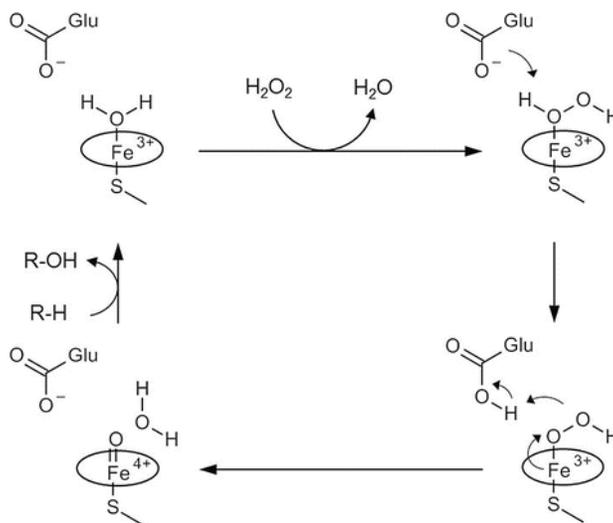


Figura 7. Formación del compuesto I en una hemo peroxidasa (tomada de Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015)

Estas enzimas catalizan una gran diversidad de reacciones, entre las que se encuentran reacciones clásicas de peroxidasa, reacciones de haloperoxidasa, y la reacción de

peroxigenasa que las distingue de las hemoperoxidasas clásicas (Hofrichter & Ullrich, 2011). Las hemo-tiolato peroxidasas han sido encontradas únicamente en hongos (Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015). Tienen un residuo de cisteína coordinando al átomo de hierro en el grupo hemo a través de un enlace S-Fe, a diferencia de las peroxidasas clásicas que tienen un residuo de histidina y un enlace de coordinación N-Fe. Se ha sugerido, al igual que para los citocromo P450, que la coordinación a través de un tiolato tiene el efecto de ceder densidad electrónica al ion férrico y así favorecer el rompimiento heterolítico O-O que ocurre durante la activación del peróxido, además de que modula la reactividad de los intermediarios enzimáticos. En particular se ha sugerido que este enlace de coordinación provoca que la longitud del enlace Fe-O en el compuesto I sea mayor, aumentando la reactividad del compuesto I al aumentar su pKa (Poulos, 2014).

2.2.1 Cloroperoxidasa

La cloroperoxidasa (CPO) pertenece a la familia hemo-tiolato ya que un residuo de cisteína coordina al grupo hemo. Su función natural es catalizar la cloración de compuestos orgánicos, sin embargo se ha considerado como un híbrido entre las peroxidasas clásicas y el citocromo P450 ya que es capaz de catalizar varios tipos de reacciones (figura 8):

- Halogenación de compuestos orgánicos.
- Oxidación de un solo electrón (tipo peroxidasa clásica).
- Transferencia de un átomo de oxígeno proveniente de peróxido de hidrógeno a un sustrato orgánico (tipo “P450 shunt phatway”).
- Dismutación del peróxido de hidrogeno (actividad catalasa).

A pesar de catalizar las mismas reacciones que las peroxidasas y los citocromos P450 no están catalogadas en la misma clase de enzima ya que no tiene similitud a nivel de secuencia o de estructura con estas enzimas. La principal similitud que comparte la CPO con los citocromos P450 es que la cisteína que coordina al grupo hemo tiene a un donador de grupo amino cercano que puede formar un puente de hidrógeno. En el sitio activo es más parecida a las peroxidasas, ya que tiene un ambiente más polar y el par ácido-base que cataliza la formación del compuesto I, aunque en el caso de la CPO, estos residuos son glutamato-arginina en vez de una histidina-arginina (Poulos, 2014).

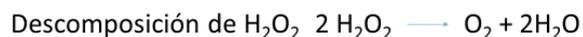
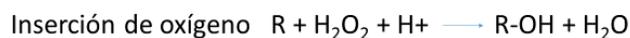
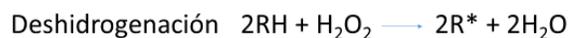
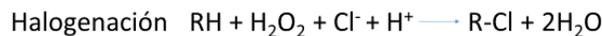


Figura 8. Reacciones que cataliza la cloroperoxidasa.

La principal actividad de la CPO es la oxidación de cloruro (Cl^-) para formar ácido hipocloroso (HClO) a pH bajos ($\text{pH} < 4$), el cual es un fuerte agente oxidante y puede introducir átomos de cloro en compuesto orgánicos (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010).

La CPO es capaz de catalizar reacciones de transferencia de oxígeno, por ejemplo, epoxida dobles enlaces de alquenos y ciclo alquenos así como también la hidroxilación de carbonos bencílicos con un mecanismo de oxidación de dos electrones u oxigenación (peroxigenasa). La transferencia de oxígeno a moléculas menos activadas como a anillos aromáticos o n-alcanos no pueden ser catalizadas por la CPO (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010).

Las CPO fue la única peroxidasa hemo-tiolato caracterizada por casi 50 años, hasta que en el 2004 se descubrió un segundo grupo de hemo-tiolato peroxidasa. La primera fue del hongo conocido como la seta negra del álamo *Agrocybe aegerita*, que resultó ser una peroxigenasa verdadera ya que transfiere átomos de oxígeno provenientes del peróxido de hidrógeno a varios sustratos orgánicos incluyendo compuestos aromáticos, heterocíclicos y alifáticos (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010). Zámocký et al en 2015 clasificaron a la UPO junto con la CPO en la llamada superfamilia peroxidasa-peroxigenasa.

2.2.2 Peroxigenasa inespecífica de *Agrocybe aegerita*

Como ya se mencionó, en 2004 se encontró una enzima con actividad hemo peroxigenasa del hongo *Agrocybe aegerita*, un hongo de la pudrición blanca. Se cree que la función natural de la UPO podría estar relacionada con la oxidación y detoxificación inespecífica de compuestos de plantas (fitoalexinas), metabolitos microbianos o en la conversión de compuestos derivados de la lignina (Hofrichter, Ullrich, Pecyna, Liers, & Lundell, 2010).

Esta enzima fue nombrada peroxigenasa inespecífica (UPO por sus siglas en inglés) y clasificada según el sistema de nomenclatura de enzimas en una subclase separada a las peroxidasa tradicionales: EC 1.11.2 (peroxidasa con H_2O_2 como aceptor y con

incorporación de un átomo de oxígeno en el producto) (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/>).

Se ha encontrado que esta enzima tiene un amplio rango de sustratos. Entre las reacciones que puede catalizar están la hidroxilación de alcanos y alquilo, epoxidación de alquenos y aromáticos, oxigenación de heteroátomos, dealquilación de aminas y éteres y oxidación de un electrón (figura 9) (Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015).

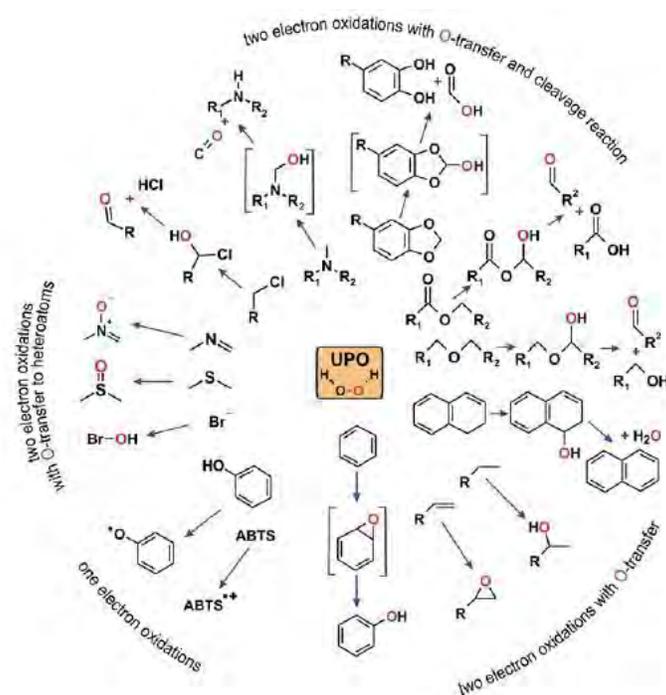


Figura 9. Reacciones catalizadas por UPO (Tomada de Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015).

Una reacción importante de esta enzima es la dealquilación de éteres y aminas secundarias y terciarias. El mecanismo en ambos casos inicia con una hidroxilación de uno de los carbonos adyacentes al heteroátomo produciéndose un intermediario inestable (hemiacetales y hemiaminales) que espontáneamente se rompen al entrar en contacto con el agua (Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015). Cabe mencionar que no se conocían enzimas capaces de catalizar este tipo reacciones.

Se ha reportado que la UPO es capaz de hidroxilar compuestos poliaromáticos como son el naftaleno, fluoreno, fenantreno, antraceno, pireno y dibenzofurano. En comparación con la CPO o con monooxigenasas P450, la UPO tiene una mayor actividad específica para estos hidrocarburos (Aranda, Ullrich, & Hofrichter, 2010).

Como vemos, ésta enzima puede oxidar a compuestos menos activados que su homóloga la CPO, como son compuestos poliaromáticos y alcanos e incluso catalizan reacciones para las cuales no hay reportes de otras enzimas capaces de hacerlo.

Se ha encontrado en base de datos genéticos una gran cantidad de enzimas homólogas a la UPO, aproximadamente 2000 secuencias de estas enzimas hipotéticas han sido encontradas en genomas de hongos pertenecientes a diferentes phyla del reino fungi, así también como a oomycetos, que son protistas filamentosos perteneciente al grupo de los psuedohongos. Las levaduras verdaderas como *Saccharomyces* no tienen UPO en sus genomas (figura 10) (Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015). Tampoco se han encontrado estos genes en otros organismos (plantas, animales, bacterias, arqueas) por lo que hasta la fecha se considera un gen presente exclusivamente en hongos.

Existen dos clases de UPO's, las denominadas largas (de aproximadamente de 50kDa) y las UPO's cortas (30 kDa). En la figura 10 las primeras son denominadas el grupo II y las segundas el grupo I, como vemos las enzimas del grupo I están distribuidas en todos los phyla del reino fungi, mientras que las UPO largas sólo se encuentra en dos phyla: basidiomicetos y ascomicetos. Bajo esta clasificación la CPO de *Caldariomyces fumago* se encuentra clasificada como una UPO corta (Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015).

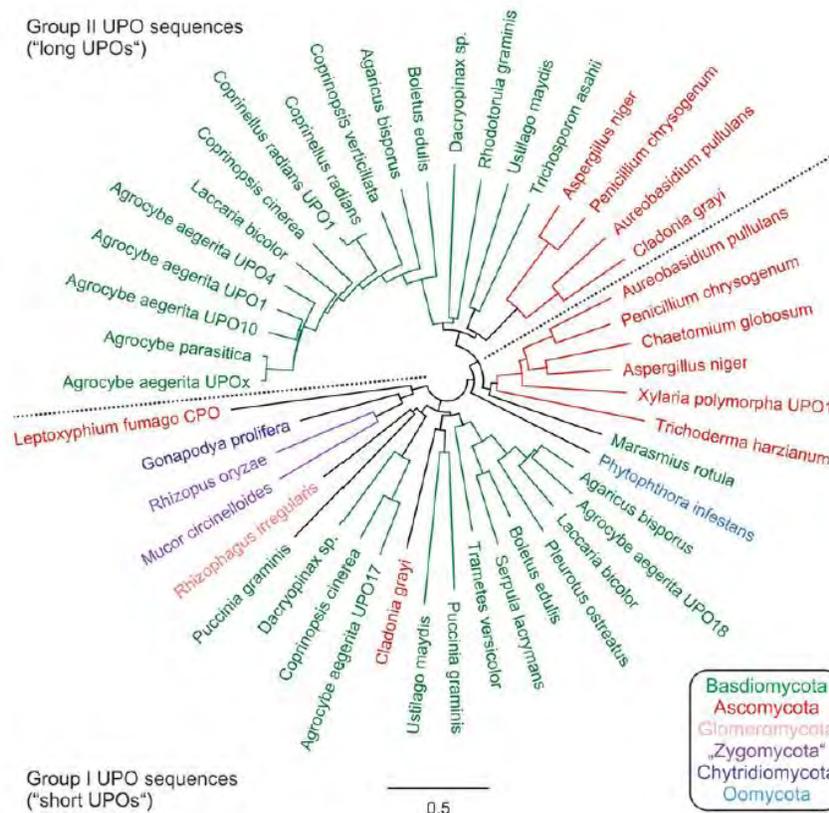


Figura 10. Árbol filogenético de secuencias UPO (Tomada de Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015).

A pesar de haberse encontrado una gran cantidad de secuencias hipotéticas de UPO, una revisión de la literatura científica arroja que solamente se han caracterizado unas cuantas. En la Tabla 2 se muestra un resumen de los genes que codifican para UPOs funcionales, así como los hongos de los cuales provienen. Resalta que las UPOs caracterizadas

experimentalmente a la fecha provienen del grupo de los basidiomicetos, particularmente de los agaricomycetes.

Tabla 2. UPOs que han sido caracterizadas experimentalmente y organismo que expresa la enzima de forma nativa.

UPO	Organismo de donde proviene la enzima	Filo	Clase	Familia
AaeUPO	<i>Agrocybe aegerita</i>	Basidiomicota	Agaricomycetes	Strophariaceae
CraUPO	<i>Coprinellus radians</i>	Basidiomicota	Agaricomycetes	Psathyrellaceae
MroUPO*	<i>Marasmius rotula</i>	Basidiomicota	Agaricomycetes	Marasmiaceae
rCciUPO	<i>Coprinopsis cinerea</i>	Basidiomicota	Agaricomycetes	Psathyrellaceae

*UPO corta

Un análisis del polipéptido de la UPO de *A. aegerita* arroja que contiene 328 aminoácidos, la mayor parte de los cuales se encuentran en hélices alfa, sin embargo los tres primeros residuos no se encuentran en la estructura cristalográfica debido a un rompimiento proteolítico entre la Gly-3 y la Leu-4. La UPO de *A. aegerita* es una glicoproteína que tiene cadenas de carbohidratos extensivamente ramificadas, más de ocho fragmentos del tipo alta manosa (Piontek et al., 2013).

La cristalización y difracción de rayos X de AaeUPO II (correspondiente al gen *apo1*) ha permitido obtener una estructura con una resolución de 2.2.Å en la cual se revela que la proteína UPO contiene diez hélices alfa y cinco hojas beta cortas, así como un grupo prostético hemo ligado por una cisteína y un puente disulfuro (entre Cys-278 y Cys-319) que estabiliza la región C terminal después de la última alfa hélice. Un ion magnesio (que probablemente estabiliza la estructura) está localizado cerca del propionato del hemo y coordinado por un glutamato (Glu122), una serina (Ser126) y una glicina (Gly123) (figura 11). El residuo de glutamato 196 está involucrado en la catálisis ácido-base y en el rompimiento del peróxido, siendo la Arg189 quien forma el par ácido-base que estabiliza la carga (figura 11) (Piontek et al., 2013).

El sitio de unión al substrato tiene forma de cono con una longitud de 17 Å, con un diámetro externo de aproximadamente 10 Å. En el fondo del cono, definido por el Glu196, tres fenilalaninas y una alanina en la cadena lateral, el diámetro es alrededor de 8.5 Å. La pared de esta cavidad está recubierta predominantemente por residuos aromáticos y en menor medida por alifáticos (figura 12) (Piontek et al., 2013).

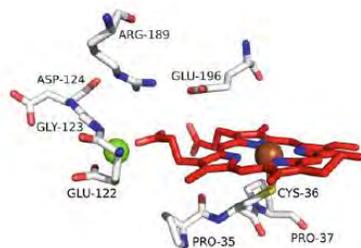


Figura 11. Sitio activo de la UPO de *Agrocybe aegerita* (tomada de Hofrichter, Kellner, Pecyna, & Ullrich, 2015).

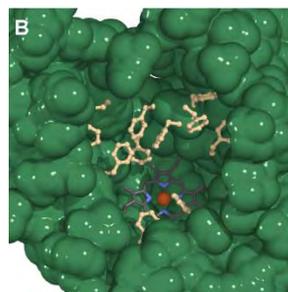


Figura 12. Fenilalaninas que anclan y orientan al sustrato en la cavidad del sitio activo (tomada de Piontek et al., 2013).

Se han hecho estudios *in silico* de acoplamiento molecular de sustratos poliaromáticos que son oxidados por la enzima, como son el naftaleno, antraceno, fenantreno y pireno (figura 13). La cavidad del sitio activo de la enzima es suficientemente grande para albergar a estos sustratos que yacen entre cinco fenilalaninas (Phe-69,-76,-121,-191 y -199). De acuerdo con las simulaciones, el perileno y pentaceno no pueden acomodarse dentro de la estructura de la proteína, lo que concuerda con el hecho de que estos compuestos no son sustratos de la UPO (Piontek et al., 2013).

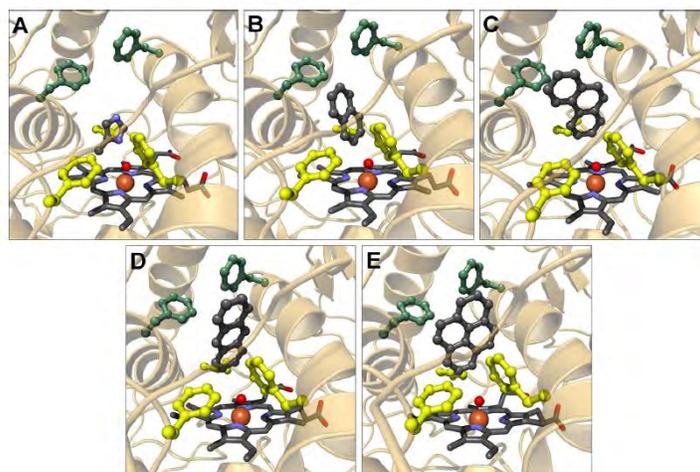


Figura 13. Modelos de unión del sustrato de la UPO de *A. aegerita*. (A) 4(5)-(hidroximetil) Imidazol. (B) Naftaleno. (C) Fenantreno. (D) Antraceno. (E) Pireno. (Tomada de Piontek et al., 2013).

Como ya se mencionó, la UPO es capaz de catalizar la oxidación de carbonos menos activados que la CPO, esto podría deberse en parte a que tiene un potencial redox ligeramente mayor, como vemos en la figura 14, pero además tiene una cavidad del sitio

activo más grande que la CPO (figura 15) con capacidad colocar a los sustratos voluminosos cerca del compuesto I y transferirles un átomo de oxígeno (Wang, Peter, Ullrich, Hofrichter, & Groves, 2013). La suma de estas propiedades estructurales y fisicoquímicas convierte a esta enzima en una alternativa prometedora para la oxidación de compuestos de naturaleza aromática y voluminosa, como son los asfaltenos.

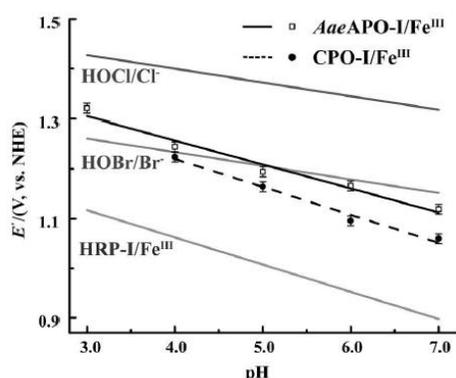


Figura 14. Potencial redox calculado para la AaeAPO-I/Fe^{III} (UPO de *A. aegerita*), la CPO-I/Fe^{III}, HOCl/Cl, HOBr/Br y HRP-I/Fe^{III} (Tomada de Wang, Peter, Ullrich, Hofrichter, & Groves, 2013).

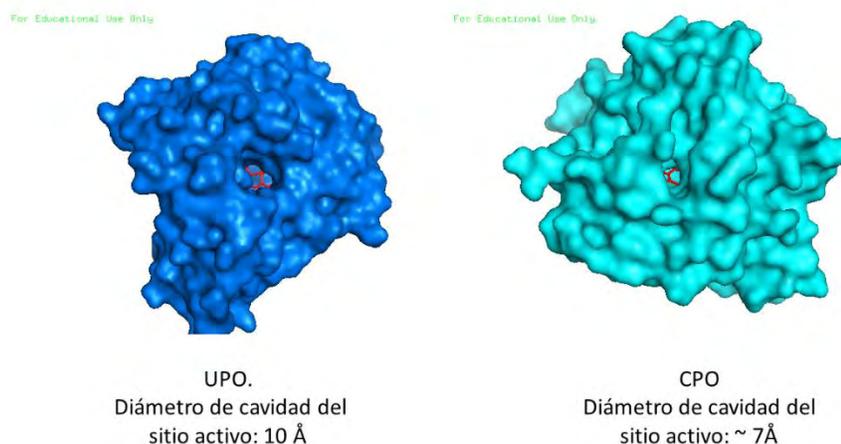


Figura 15. La cavidad del sitio activo de la UPO tiene un diámetro mayor que el de la CPO.

En cuanto a la obtención de la enzima, es posible producirla de forma recombinante, lo cual facilita su manipulación a nivel genético para generar variantes con propiedades mejoradas. Molina-Espeja et al. en el 2014 expresaron esta enzima de forma recombinante, en la cepa BJ5465 de *Saccharomyces cerevisiae*. Utilizando la secuencia nativa de *A. aegerita*, se obtuvo una muy baja expresión (Molina-Espeja et al., 2014). Es bien sabido que las hemoperoxidasas de hongos son un reto para la expresión heteróloga, y aunque hay casos exitosos (Cherry et al., 1999), el tema debe abordarse caso por caso. En el trabajo de Molina-Espeja se siguió una estrategia de evolución dirigida encaminada únicamente a mejorar su secreción. Como resultado de este proceso, se observó la

acumulación de mutaciones tanto en el la zona que codifica para la enzima (tabla 3) como en el péptido señal (F12Y, A14V, R15G, A21D), el cual es el nativo de la *AaeUPO*, obteniéndose un aumento de 3250 veces en la expresión funcional de la enzima. A la mutante obtenida se le llamó PaDa-I.

Tabla 3. Mutaciones en la proteína madura de la mutante PaDa-I (Molina-Espeja et al., 2014).

<i>Mutación</i>	<i>Motivo de estructura secundaria</i>	<i>Posición relativa</i>	<i>Distancia del hemo-Fe (Å)</i>
<i>V57A</i>	Hélice alfa	Superficie	15.7
<i>L67F</i>	Hélice alfa	Cerca del dominio del hemo	8.1
<i>V75I</i>	Hélice alfa	Superficie	12.1
<i>I248V</i>	Hélice alfa	Superficie	17.2
<i>F311L</i>	Hélice alfa	Cerca del C-terminal	14.0

En este trabajo, nos enfocamos en estudiar la transformación de asfaltenos catalizada por la variante PaDa-I de la enzima UPO. Entre las actividades y los retos abordados en este proyecto se encuentran: aprenden a producir y purificar la enzima, así como su caracterización básica (actividad específica, pureza electroforética, estabilidad a almacenamiento, etc); encontrar un sistema de reacción en donde los asfaltenos sean solubles y la actividad de la UPO se mantenga estable; realizar reacciones enzimáticas de transformación de asfaltenos, empleando una metodología basada en fluorescencia para el seguimiento de la reacción; analizar los cambios como resultado de la reacción enzimática. Adicionalmente, exploramos la posibilidad de que secuencias reportadas en otras familias de hongos fueran UPOs verdaderas. Para esto, realizamos minería de genomas, eligiendo a una posible candidata a través de análisis *in silico*. La secuencia elegida fue sintetizada comercialmente y clonada en un sistema de expresión para su posterior estudio.

3. HIPÓTESIS

La mutante PaDa-I de la proteína *AaeUPO* podría tener una mejor capacidad para oxidar asfaltenos que la CPO.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad catalítica la mutante PaDa-I en la oxidación de asfaltenos.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Encontrar un sistema de solventes apto para la oxidación enzimática de asfaltenos por la mutante PaDa-I.
2. Evaluar la actividad y estabilidad de la enzima PaDa-I en el sistema donde se llevará a cabo la reacción de asfaltenos.
3. Caracterizar la oxidación de asfaltenos utilizando PaDa-I y comparar con la reacción catalizada por CPO.
4. Explorar genomas de ustilaginomicetos para seleccionar una probable UPO y clonarla en el vector de expresión.

5. MÉTODOS

La enzima utilizada en este proyecto es la mutante PaDa-I, que se expresa de forma recombinante en la cepa BJ5465 de *Saccharomyces cerevisiae*, amablemente donada por Miguel Alcalde del CSIC, España.

5.1 Producción recombinante de enzimas UPOs en *Saccharomyces cerevisiae* (Molina-Espeja et al., 2014).

5.1.1 Medios de cultivo

Medio de selección sin uracilo:

Cultivo SC-Rafinosa (100mL): 69.9mL de agua, 10mL de YNB (67g/L), 10mL aminoácidos (19.2 g/L), 10mL de rafinosa (20%w/v), 100µL de cloranfenicol (25mg/mL).

Medio de cultivo para la expresión de PaDa-I:

Cultivo con galactosa como inductor y FeCl₃ (1L): 148.85mL de agua, 645.15mL de YP 1.55x, 60mL de buffer de fosfatos de potasio pH 6 (1M), 100mL de galactosa (20%w), 10mL de MgSO₄ (100mM), 30mL de etanol (100%), 5mL de FeCl₃ (100mM), y 1mL de cloranfenicol (25mg/mL).

El medio YP 1.55x se prepara con Bacto yeast extract 10g/L y bacto peptone 20g/L.

El cloranfenicol se disuelve en etanol al 100%, y se filtra con un filtro estéril marca Millex de 0.22µm.

5.1.2 Crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante.

Preinóculo: Se tomó una muestra de células congeladas en glicerol y se agregó a un cultivo de 5mL de medio SC-Rafinosa, incubándolo a 29°C, 220rpm por dos días.

Inóculo: El preinóculo se vertió en 100mL de medio SC-Rafinosa. El cultivo inició con una densidad óptica (D.O. $\lambda=600\text{nm}$) de 0.3 y se incubó a 29°C a 220 rpm hasta que alcanzó una D.O.=1.0.

El inóculo se agregó a 1L de medio de expresión (D.O. inicial= 0.1) y se incubó durante 72 horas a 25°C y 220 rpm. Las células se centrifugaron a 4500 rpm a 4°C.

5.2 Purificación de la PaDa-I (Molina-Espeja et al., 2014)

1. Salting out con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

La enzima se precipitó mediante “salting out” con 85% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se recuperó el precipitado por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos. El pellet se resuspendió en buffer de succinato de sodio pH 4.0 200mM, y se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. Finalmente, se dializó el sobrenadante en buffer de succinato de sodio pH 4.0 10mM.

2. Columna de intercambio catiónico

Se realizó con una resina “High S” de la marca BIORAD. Se lavó la resina con tres volúmenes de buffer de succinato de sodio 10mM pH 4, con un flujo de 3mL/min en una bomba peristáltica. Se pasó la muestra a través de la resina con un flujo lento (0.8mL/min), posteriormente se lava con 4 volúmenes del mismo buffer. La proteína se eluyó una solución de NaCl 150mM y finalmente la resina se lavó con una solución de NaCl 1M (las soluciones de NaCl están disueltas en el buffer utilizado en este paso).

Se midió actividad con ABTS, así como proteína por el método de Bradford para elegir las fracciones a recolectar.

Posteriormente se lleva a cabo una diafiltración en una cámara marca Amicon, con una membrana milipore de celulosa regenerada con un corte de 10kDa, esto con el fin de concentrar la proteína, remover la sal de la solución y cambiar el buffer a tris pH 7.0 10mM para el siguiente paso de purificación.

3. Columna de Intercambio aniónico

En el siguiente paso de purificación, se utilizó una columna de “High Q” de la marca BIORAD. La columna se lavó con tres volúmenes de buffer Tris pH 7.0 10mM. La proteína se pasó por la columna a un flujo lento (0.8 mL/min), posteriormente se eluyó la muestra con una solución de NaCl 100mM (en buffer tris pH 7 10mM). Finalmente, la resina se lavó con una solución de NaCl 1M en el mismo buffer.

Se midió actividad enzimática con ABTS y proteína por el método de Bradford, se recolectaron las fracciones con mayor actividad. Se cambió el buffer a fosfatos pH7 50mM y se concentró la proteína por diafiltración en un tubo marca Amicon ultra-4.

5.3 Ensayo para medir actividad enzimática con ABTS y con NBD, y concentración de proteína por el método de Bradford

Ensayo de actividad con ABTS (Acido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina)-6- sulfónico)

El ensayo de actividad se llevó a cabo en buffer de fosfatos/citratos pH 4.3 10mM, ABTS 0.3mM y peróxido de hidrógeno con una concentración final de 2mM. Se midió el cambio

de absorbancia por minuto ($\Delta\text{Abs}/\text{min}$) a una longitud de onda de 418nm ($\epsilon_{\text{ABTS}^+}=36000\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Molina-Espeja et al., 2014).

Actividad con NBD (5-nitro-1,3-benzodioxol)

Se midió la actividad con NBD en buffer de fosfatos pH 7 50mM, NBD 0.5mM en 100% de acetonitrilo y H_2O_2 a 1mM. El NBD es primero hidroxilado y después por una reacción de naturaleza no enzimática es hidrolizado a 4-nitrocatecol y ácido fórmico; el primero se mide con el $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ a 425nm ($\epsilon_{\text{NBD}}=9700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Poraj-Kobielska, Kinne, Ullrich, Scheibner, & Hofrichter, 2012).

Ensayo de proteína por el método de Bradford

Se midió proteína por el método de Bradford, se siguió el siguiente procedimiento: se mezclaron 200 μL del reactivo de Bradford (BIORAD), la cantidad de muestra necesaria para una buena señal ($\text{Abs}>0.1$) y se aforo con H_2O a 1mL. Después de 5 min, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595nm. La concentración de proteína se calculó utilizando una curva estándar construida con BSA.

5.4 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las muestras de proteína se corrieron en geles de SDS-PAGE utilizando la siguiente receta:

Gel separador (10mL): 2mL de H_2O , 1.3mL de buffer tris pH 8.8, 1.7mL de acrilamida al 30%, 50 μL de SDS al 10%, 50 μL de PSA al 10% y 2 μL de TEMED.

Gel concentrador (2mL): 1.4mL de H_2O , 0.25mL de buffer tris pH 6.8, 0.33mL de acrilamida al 30%, 20 μL de SDS al 10%, 20 μL de PSA al 10% y 2 μL de TEMED.

Las muestras se mezclan con buffer de carga y se desnaturalizaron a 90°C por 10 minutos, se corrieron en el gel a un voltaje de 100V.

Los geles se tiñeron con azul brillante de coomassie g-250 para revelar las proteínas o bien, si la muestra está en baja concentración de proteínas, con nitrato de plata.

5.5 Medición de la estabilidad enzimática.

5.5.1 Estabilidad en un sistema solvente-buffer.

Se incubó una cantidad conocida de enzima en el sistema de solvente-buffer. A intervalos de tiempo definidos se midió la actividad residual (directamente en la mezcla solvente-buffer) añadiendo el sustrato (NBD) y peróxido de hidrógeno.

5.5.2 Estabilidad en un sistema solvente-buffer-peróxido

Se incubó una cantidad conocida de enzima en la mezcla de solvente, buffer y peróxido de hidrógeno. A intervalos de tiempo definidos se tomó una alícuota de esta mezcla y se midió la actividad residual en el buffer correspondiente.

5.6 Oxidación de asfaltenos en el sistema acetona-buffer (60-40%) con PaDa-I

Para 3mL de la mezcla de reacción: se agregó a un tubo de ensaye 1.62mL de acetona, 0.18mL de los asfaltenos disueltos en acetona (aproximadamente 20 µg/mL de asfaltenos), 1.2mL de buffer de fosfatos pH 7 50mM, las unidades de enzima correspondientes, H₂O₂ a una concentración final de 2mM, o bien hidroperóxido de tert-butilo (t-buOOH) a una concentración final de 50mM. El progreso de esta reacción se monitorea por medio de la disminución de fluorescencia de los asfaltenos, como se explica a continuación.

Seguimiento de la oxidación de asfaltenos monitoreando la matriz de fluorescencia de emisión y excitación (MFEE)

Se midió la intensidad de fluorescencia en un espectrómetro de fluorescencia Perkin-Elmer LS55 de la solución de asfaltenos tratados y sin tratar con la PaDa-I. Se realizó a longitudes de onda (λ) de emisión que van desde 350 a 600nm, con longitudes de onda de excitación que van de 320 a 450nm, (10nm entre cada medición), con 20nm de diferencia entre la λ_{excitación} y la λ_{emisión}. El volumen bajo la superficie de la matriz de fluorescencia de excitación y emisión se calculó con la siguiente formula:

$$V = \sum F * \Delta\lambda_{emisión} * \Delta\lambda_{excitación}$$

Donde:

V= Volumen bajo la superficie de fluorescencia (F³).

F= Intensidad de fluorescencia

$\Delta\lambda_{emisión}$ =Diferencia de la longitud de onda de emisión (0.5nm).

$\Delta\lambda_{excitación}$ = Diferencia de longitud de onda de excitación (10nm).

5.7 Liofilización de la cloroperoxidasa

Se realizó una solución de la CPO de una concentración de 150µM, y se agregó un exceso de 1000 veces de sacarosa (0.22g). Esta mezcla se congeló con hielo seco y acetona procurando que la solución congelada quede como una fina capa (para que el área de contacto sea grande). Se liofilizó la muestra durante un tiempo aproximado de seis horas.

5.8 Oxidación de asfaltenos en el sistema hexano-isopropanol-buffer (46:47.7:6.3) con CPO

Para 15mL de la mezcla de reacción: se agregó a un tubo de ensaye 6.9 mL de hexano, 7.155 mL de isopropanol y 0.945 mL de buffer de citratos-fosfatos 100mM pH 2.8 con KCl (6.67mM) y 9 µL de la fracción de asfaltenos soluble en acetona disueltos en DCM (5mg/mL), para llegar a una concentración final de 15 µg/mL. Se agregó alrededor de 5mg del liofilizado enzima-sacarosa (1.7nmoles) y H₂O₂ a una concentración final de 0.5mM.

5.9 Extracción de asfaltenos del medio de reacción

Para analizar los asfaltenos tratados enzimáticamente se extrajeron del medio de reacción para obtenerlos en estado sólido y puro, para ello se realizó una extracción líquido-líquido, en el sistema Acetona/buffer (60%v/v) se extrajo con 10% en volumen de tolueno (10mL de tolueno por 100mL de mezcla de reacción) y se añadió 0.5ml HCl al 5%/100mL de reacción. Para el caso de la extracción del sistema de hexano-isopropanol-agua (46:47.7:6.3) se extrajo con 40% en volumen de agua y 0.5mL de HCl al 5%. Las extracciones se realizaron en un embudo de separación: se agitó la mezcla y posteriormente se dejó que se separen las fases (orgánica y acuosa), se recuperó la fase orgánica (la cual contiene a los asfaltenos). Posteriormente se deshidrató la fase orgánica en una cama de sulfato de sodio anhidro. Se evaporó el solvente en un rotavapor R II de la marca Buchi. Los asfaltenos se recuperaron con diclorometano y se colocaron en un vial, el diclorometano se evaporó en la campana de extracción.

5.10 Espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FTIR) y Análisis termogravimétrico (TGA).

El espectro de infrarrojo fue obtenido en un espectrómetro de la marca Agilent modelo Cary 630. Las muestras secas obtenidas por extracción líquido-líquido de la mezcla de reacción se resuspendieron en diclorometano, asegurando que todo el material estuviera disuelto. Se añadió gota por gota la muestra sobre el cristal de accesorio ATR (Reflectancia Total Atenuada), permitiendo que se evaporara el disolvente entre gota y gota. Una vez que se había evaporado todo el disolvente, se leyó la muestra en el intervalo de 600 a 4000 cm^{-1} .

El análisis del TGA fue llevado a cabo como servicio externo en la USAII de la UNAM. Las muestras fueron calentadas de 25 a 900°C a una velocidad de 100°C/min bajo una atmósfera de nitrógeno, de acuerdo a lo reportado anteriormente (Ayala et al, 2012).

5.11 Métodos generales de biología molecular.

5.11.1 Síntesis del gen *upoT*.

El gen de la probable UPO proveniente del hongo *Tilletia walkeri* denominado *upoT* fue sintetizado por la compañía GenScript. La secuencia de nucleótidos cuenta con 1165 pares de bases. La secuencia codificante está flanqueada por los sitios de restricción de *Bam*HI y *Xho*I, estos sitios fueron evitados en la secuencia interna del gen; el uso de codones fue optimizada para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. Este gen fue clonado en el vector de muy bajo número de copias pCC1-4K y a esta construcción se le denominó pPF1 el cual tiene un tamaño de 5000pb y resistencia a cloranfenicol. (<http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/copycontrol-bac-cloning-kit.pdf?sfvrsn=8>).

5.11.2 Vector de expresión de la probable UPO.

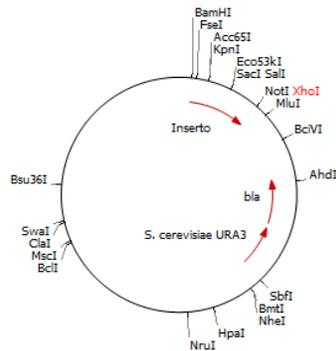


Figura 16. Vector de expresión pJRoC30

Se utilizó al vector lanzadera pJRoC30, el cual confiere resistencia a ampicilina ya que codifica para una beta-lactamasa (bla), así como para la orotidina -5'-fosfato descarboxilasa (URA3), enzima necesaria para la biosíntesis de uracilo en *Saccharomyces cerevisiae*, esta última es la que confiere la presión de selección en levaduras auxótrofas a uracilo.

5.11.3 Purificación del plásmido (www.thermoscientific.com/onebio).

Se realizó según el protocolo del kit de purificación de plásmido Miniprep Kit. Las células se recuperaron del medio de cultivo y fueron expuestas a condiciones alcalinas y SDS, esto para lisar las células y liberar el ADN plasmídico. La solución con las células lisadas se neutralizada para que el ADN plasmídico se una a la membrana de sílica de la columna. Los restos celulares y el SDS fueron separados por centrifugación y el sobrenadante, que contiene el ADN plasmídico, se cargó a la columna de sílica. El ADN adsorbido se lavó para remover contaminantes, y finalmente se eluyó con un volumen pequeño de buffer de elución, o bien con H₂O 50°C.

5.11.4 Digestión del plásmido.

Las enzimas de digestión que se usaron son *Bam*HI y *Xho*I, cuyas reacciones óptimas de reacción según la herramienta de thermo-scientific "DoubleDigest Calculator" son las siguientes:

- Amortiguador tango: 2X
- Enzima *Bam*HI: 2 veces en exceso.
- Incubación a 37°C durante 1 hora.

5.11.5 Electroforesis en gel de agarosa.

Se preparó una solución de agarosa 0.8% en buffer TAE (Tris, ácido acético, EDTA), y se cargó al menos 200ng de ADN. El fluoróforo utilizado (EvaGreen o GelRed) se mezcló con el buffer de carga y se corrió la electrofóresis a un voltaje de 80 a 100 voltios.

5.11.6 Ligación

Se mezcló el producto de digestión pPF1, el producto de digestión del vector pJRoC30 en una relación molar de 9:1, el buffer de la ligasa T4 con una concentración 1x final y 1U de la ligasa T4. Se incubó 12 horas en hielo. Debido a que estos dos vectores confieren resistencias diferentes no es necesario purificar de banda los productos de digestión.

5.11.7 Transformación por choque térmico

Se agregó 10µL del producto de ligación a 100µL de células quimio-competentes. Esta mezcla se incubó 15min en hielo, seguido de un choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido de 5 minutos en hielo. Por último, se agregó 1mL de medio SOC precalentado a 37°C y se incubó 1 hora a esta temperatura. Posteriormente, las células se sembraron en placa (medio LB con ampicilina) y se incubaron durante 12 horas.

5.11.8 Reacción en cadena de la polimerasa: PCR de colonia (*E. coli*)

Se prepara la mezcla mostrada en la tabla 4.

Tabla 4. Mezcla para realizar el PCR de colonia de en *E. coli*

Componente	Concentración de solución "stock"	Concentración final
Buffer taq	10x	1x
MgCl ₂	25mM	2.5mM
dNTPs	2mM	0.2mM
Taq Pol.	-	-
RMLN (oligo forward)	10µL	91nM
RMLC (oligo reverse)	10µL	91nM

- Se tomó la colonia con una punta estéril y se sumergió en la mezcla de reacción.
- Condiciones de PCR:

Volumen: 20 µL.

1. 95°C, 5 minutos.
2. 94°C 15 segundos.
3. 55°C 15 segundos.
4. 72°C 1.5 minutos.
5. 34 ciclos.
6. 72°C 5 minutos.
7. 12°C ∞.

Nota: los sitios donde los oligonucleótidos utilizados se aparean se encuentran en el vector pJRoC30, y franquean el sitio donde se va a insertar el gen:

RMLN: CCTCTATACTTTAACGTCAAGG

RMLC: GGGGGAGGGCGTGAATGTAAGC

5.11.9 Preparación de células quimio-competentes de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se cultivó *S. cerevisiae* en 20mL medio de cultivo YPD (extracto de levadura, glucosa y bactopectona), con 25mg/L de cloranfenicol. Se incubó a 30°C con agitación de 250rpm durante dos días. Posteriormente se inoculó en 100mL del mismo medio y se llevó a una densidad óptica inicial (a 600nm) de 0.3. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica entre 1.0-1.2 se centrifugaron las células, a 5000rpm durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y las células se lavaron dos veces con agua mili-q estéril. Se desechó el agua y el paquete celular se resuspendió en 1mL de buffer de transformación del Yeast Transformation Kit de Sigma. Las células competentes se pueden guardar a 4°C un día.

5.11.10 Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*.

En un tubo eppendorf de 1.5mL se colocaron 10µL de Salmon Testes (Yeast transformation Kit de Sigma), 100ng del plásmido, 100µL de células competentes y 600µL del Plate Buffer del kit de transformación. Se incubaron los tubos a 30°C durante 30 minutos con agitación de 700rpm. Posteriormente, se añadió 71µL de dimetil-sulfóxido (DMSO) y se incubaron los tubos a 42°C durante 15 minutos, se colocaron los tubos en hielo inmediatamente después y se centrifugaron los tubos a máxima velocidad durante 3 segundos. Se desechó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 500µL de H₂O mili-q estéril, finalmente se cultivaron 100µL de células en agar SC-Glucosa (dicho medio no contiene uracilo por lo que sólo las células transformadas por el plásmido podrán crecer). Se incubaron las células a 30°C durante tres días.

5.11.11 PCR de colonia (*S. cerevisiae*)

Las células son lisadas por una combinación de enzima (Liticasa) y por un choque térmico:

1. Se picó una colonia y se resuspendió en 10µL de H₂O tetradestilada.
2. Se agregó 25U de liticasa y se incubó a 37°C 10 durante minutos.
3. Se congeló la muestra a -70°C por 15 minutos.
4. Se realizó una mezcla de reacción para PCR en 50 µL (tabla 5).

Tabla 5. Mezcla para PCR de colonia de *S. cerevisiae*

Componente	Concentración de solución "stock"	Concentración final
Buffer Taq	10X	1X
MgCl	25mM	2.5mM
dNTP's	25mM	0.25mM
RMLN (forward)	10mM	0.2mM
RMLC (reverse)	10mM	0.2mM

5. Se añadió 5µL de la solución de las células lisadas.
6. Se incubó a 95°C por 5 minutos.
7. Se adicionó la enzima Taq polimerasa.
8. La PCR se llevó a cabo a 30 ciclos variando los siguientes parámetros:

95°C 5 minutos
94°C 15 segundos.
55°C 15 segundos.
72°C 1.5 minutos.
30 ciclos.
72°C 5 minutos.
12°C ∞

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Purificación de PaDa-I

Utilizando el sistema de expresión previamente reportado, y que conseguimos gracias a una colaboración con el Dr. Alcalde del CSIC, España, se obtuvieron los siguientes resultados.

La enzima se cosechó a las 72h, que es cuando alcanza una actividad volumétrica alrededor de 1U/mL, al ser una enzima extracelular se midió la actividad al extracto crudo. En la figura 17 se ve que con un tiempo de cultivo de 5 días es posible alcanzar hasta 3U/mL.

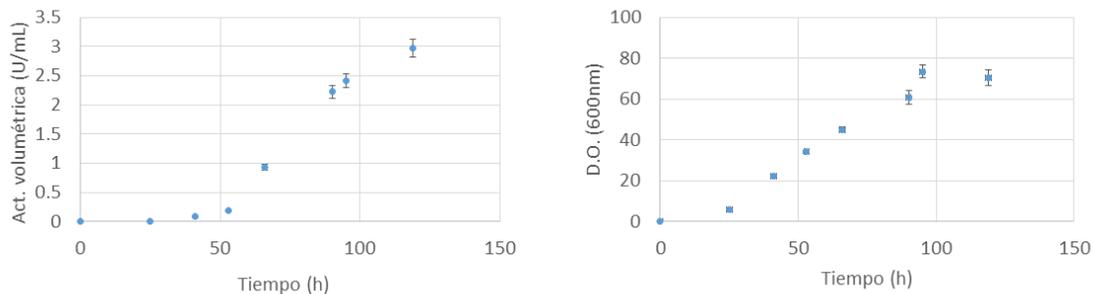


Figura 17. Cinética de crecimiento de la cepa y de producción de la PaDa-I.

Se realizaron varios pasos de concentración y purificación con el sobrenadante del cultivo, una vez que fue separado de las células, como se muestra en la Tabla 6. Se logró un factor de purificación de 72 y un porcentaje de recuperación del 47%. Sin embargo, el factor de purificación no aumentó después de una cromatografía de intercambio aniónico. Se ha observado que en este paso se puede aumentar otro parámetro de pureza, el valor de Reinheitszahl (Rz), el cual se calcula como la relación de la absorbancia del pico Soret (típico de las porfirinas) y la absorbancia a 280 nm (figura 18). Este parámetro proporciona información sobre impurezas de naturaleza tanto proteica como no proteica. Cabe mencionar que cada hemoproteína tiene un factor Rz en particular. Para PaDa-I se ha reportado un valor de Rz alrededor de 2 (Molina-Espeja et al., 2014). En nuestras manos, el valor más alto que hemos obtenido para esta enzima es Rz=1.8 (J. Ramírez, comunicación personal). Para este proyecto no se requiere un alto grado de pureza de la enzima, y dado que en ese paso de purificación la eficiencia de recuperación baja un 24%, decidimos trabajar con un protocolo de purificación que sólo incluía hasta la cromatografía de intercambio catiónico.

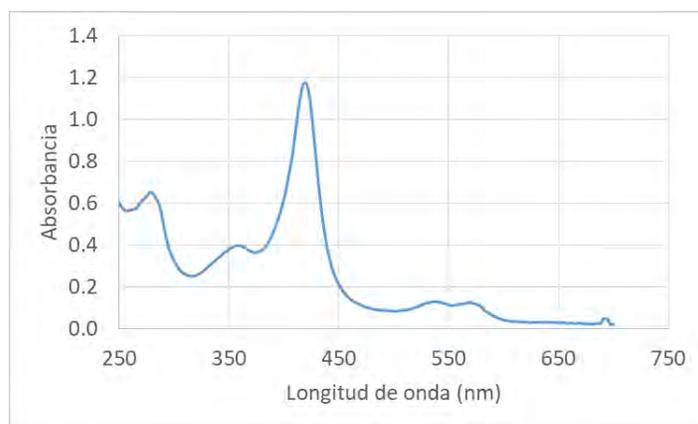


Figura 18. Espectro UV-Vis de la PaDa-I.

Tabla 6. Purificación de la PaDa-I

	Volumen (mL)	Act. Volumétrica (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Act. Específica (U/mg)	U totales	% de recuperación	Factor de purificación
Extracto crudo	930	2	0.1	18.9	1790	100	1
Precipitación con (NH₄)₂SO₄	33	78 ± 2	0.168 ± 0.02	467 ± 46	2580	144	25
Columna de Intercambio catiónico	7	214 ± 6	0.158± 0.006	1360 ±20	1500	84	72
Columna de Intercambio aniónico	18	60 ± 5	0.048 ± 0.003	1230 ± 90	1063	60	65
Concentración por ultrafiltración	0.3	2790± 100	2.1 ± 0.1	1360 ± 130	840	47	72

6.2 Estabilidad de la PaDa-I en solventes orgánicos

En la literatura se ha reportado la oxidación enzimática de asfaltenos, los medios orgánicos que han sido utilizados presentan desventajas tanto para el sistema de reacción con la PaDa-I, como para monitorear la reacción con el método de la MFEE. En la tabla 7 se muestran estos medios de reacción y se mencionan sus desventajas para ser usados con la PaDa-I.

Tabla 7. Sistemas orgánicos donde se ha evaluado la oxidación enzimática de asfaltenos.

Enzima/Sistema orgánico (%v/v)	Desventajas para la oxidación con la PaDa-I	Referencia
CPO/Tolueno-isopropanol-buffer (20:60:20)	El tolueno es sustrato de la PaDa-I y presenta fluorescencia.	Fedorak, Semple, Vázquez-Duhalt, & Westlake, 1993
CPO/Hexano-isopropanol-buffer (46:47.7:6.3)	El hexano es sustrato de la PaDa-I.	Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vázquez-Duhalt, 2012
Citocromo c modificado químicamente/ Diclorometano-metanol-buffer (65:30:5)	La PaDa-I no es activa en esta mezcla.	García-Arellano, Buenrostro-González, & Vázquez-Duhalt, 2004)

Debido a que los medios de reacción reportados no son aptos para el tratamiento con la PaDa-I, se buscó en la literatura y se encontró que Peter et al. (2011), reportó la estabilidad de la enzima UPO de *A. aegerita* en una serie de solventes orgánicos. De estos, resalta una mezcla de acetona-buffer (60-40% v/v), en la que la enzima que mantiene el 100% de actividad después de 120 minutos de incubación a temperatura ambiente.

Con el fin de corroborar esta información, se comprobó que la mutante PaDa-I es estable durante un periodo de 3 horas a 30°C en la mezcla de acetona-buffer (60-40% v/v) (figura 19).

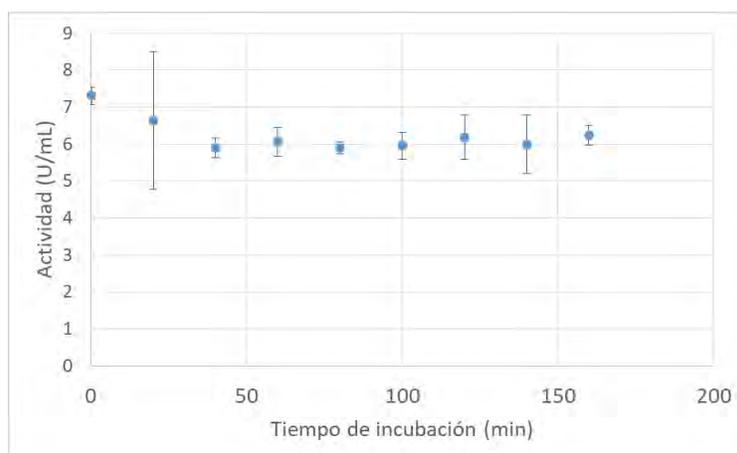


Figura 19. Estabilidad de PaDa-I en sistema acetona-agua (60-40%). La actividad se midió con NBD.

6.3 Solubilidad de asfaltenos en acetona

Una vez que se comprobó que la enzima PaDa-I es estable en la mezcla acetona-buffer, se abordó el tema de la solubilidad de asfaltenos en dicho sistema. Como se mencionó en la introducción, los asfaltenos son solubles en solventes hidrófobos tales como tolueno y diclorometano, pero sólo una fracción es soluble en acetona. Existe un reporte sobre las propiedades de la fracción de asfaltenos que logra solubilizarse en acetona pura. Esta fracción tiene características moleculares particulares (Buenrostro-González, Andersen, García-Martínez, & Lira-Galeana, 2002) las cuales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Características moleculares de la fracción de asfaltenos soluble en acetona y de los asfaltenos totales (Buenrostro-González, Andersen, García-Martínez, & Lira-Galeana, 2002)

Característica	Asfaltenos totales	Fracción de asfaltenos disueltos en acetona
Peso molecular	781 Da	335 Da
Polidispersidad	4.1	2.1
Contenido de N	1.3%	2.6%
Factor de aromaticidad	0.57	0.55
# de C en cadenas alifáticas	9	4
Petroporfirinas (área bajo la curva).	~ 0.1	~0.11

La fracción de asfaltenos soluble en acetona está constituida por moléculas de menor peso molecular y menor polidispersidad que la muestra completa; también se observa que el contenido de nitrógeno y petroporfirinas es mayor en esta fracción. Por otro lado, el factor de aromaticidad (número de carbonos en anillos aromáticos/número de carbonos totales) es similar en ambas fracciones.

Para obtener los asfaltenos solubles en acetona llevamos a cabo el procedimiento que se muestra en la figura 20.

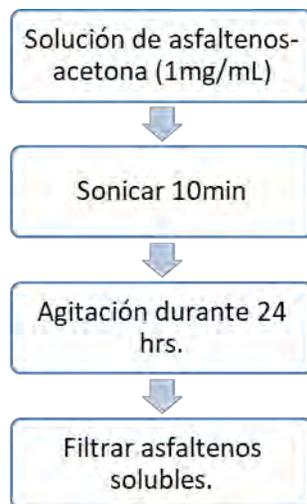


Figura 20. Método para obtener la fracción de asfaltenos solubles en acetona

El primer paso es la sonicación, la cual favorece el rompimiento de agregados presentes en los asfaltenos. Posteriormente, se exploraron dos métodos de agitación, con un agitador magnético y con un orbital. La cantidad de asfaltenos disueltos con ambos métodos se determinó por gravimetría y espectrofotometría, en este último se midió la absorbancia de las soluciones obtenidas a 360 y 403nm (tabla 9).

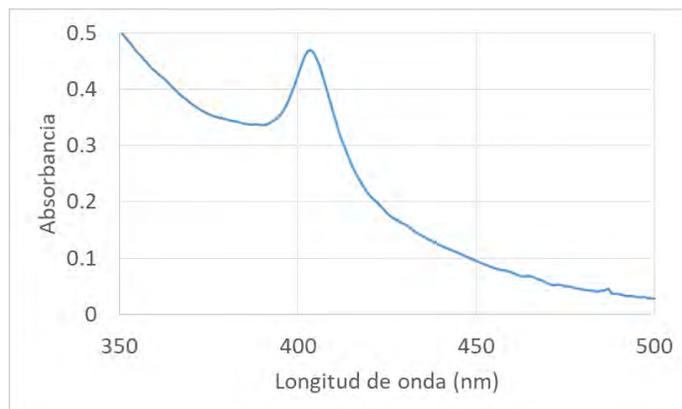


Figura 21. Espectro UV-Vis de asfaltenos solubles en acetona.

El método espectrofotométrico se realizó con el fin de corroborar el gravimétrico, ya que este tiene una desviación estándar alta. Se ha reportado en múltiples ocasiones que la intensidad del pico Soret es proporcional a la concentración de petroporfirinas, las cuales están enriquecidas en la fracción soluble en acetona (Buenrostro-Gonzalez, Andersen, Garcia-Martinez, & Lira-Galeana, 2002), por ello se eligió la longitud de onda de 403nm. Se midió también a 360nm para comprobar que otros compuestos de asfaltenos, y no sólo las petroporfirinas, están en igual proporción en las extracciones obtenidas por ambos métodos (figura 21).

Se encontró que la solución de asfaltenos obtenidos con agitación magnética es tres veces mayor que los obtenidos con el otro tipo de agitación. En cuanto al método gravimétrico

con la agitación magnética aproximadamente el 58% (± 7.5) de los asfaltenos se solubilizan, mientras que con agitación orbital sólo un 33% (± 17.6). La mayor eficiencia en la extracción de asfaltenos solubles en acetona con la agitación magnética puede deberse a la mayor área de contacto entre los asfaltenos y el solvente generada por el esfuerzo mecánico ejercido por el agitador.

Tabla 9. Absorbancia a dos longitudes de onda de la fracción de asfaltenos soluble en acetona y porcentaje de asfaltenos disueltos agitados por dos métodos.

Método de agitación	Abs 360nm	Abs 403nm	%Asfaltenos disueltos
Magnética	1.01 \pm 0.15	1.17 \pm 0.13	57.80 \pm 7.5
Orbital	0.40 \pm 0.05	0.43 \pm 0.04	33.26 \pm 17.6

6.4 Oxidación de asfaltenos en el sistema acetona-buffer con Paa-I

Para llevar a cabo la reacción con la enzima PaDa-I en la mezcla acetona-buffer se exploró qué concentración de asfaltenos era la adecuada. Dicha concentración se determinó con base en dos parámetros: la concentración máxima de asfaltenos que son solubles en la mezcla y la concentración adecuada para poder monitorear la pérdida de fluorescencia en los asfaltenos tratados enzimáticamente. En las reacciones para obtener muestra de asfaltenos tratados enzimáticamente se utilizó la concentración máxima ($\sim 165 \mu\text{g}/\text{mL}$) en un volumen de 100mL (tabla 10), mientras que para monitorear la oxidación enzimática de asfaltenos mediante la MFEE se utilizó $\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$.

6.4.1 Monitoreo de la oxidación de asfaltenos por disminución en la intensidad de la MFEE.

Para llevar a cabo la reacción enzimática se probaron dos peróxidos como agentes oxidantes, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hidroperóxido de tert-butilo (t-buOOH). Se utilizaron concentraciones diferentes de H_2O_2 (2 mM) y de t-buOOH (50 mM) ya que la reactividad de cada peróxido es muy diferente. Para la cloroperoxidasa, que es una enzima de la familia de la UPO y la más estudiada a la fecha, se sabe que la constante de velocidad de formación del compuesto I con el H_2O_2 es $2.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ mientras que para un peróxido orgánico (hidroperóxido de metilo) es $4.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Araiso, Rutter, Palcic, Hager, & Dunford, 1981). Dado esta diferencia en la reactividad se requiere usar una concentración mayor del peróxido orgánico que del peróxido de hidrogeno. Una de las ventajas de usar un peróxido orgánico radica en su mayor solubilidad en medios orgánicos, además de que se ha sido reportado que la CPO exhibe una menor actividad catalasa con este tipo de peróxidos en comparación con H_2O_2 , es decir, en lugar de tener tres vías catalíticas (oxidación de compuestos orgánicos, dismutación del H_2O_2 e inactivación enzimática mediada por peróxidos), sólo tiene dos (oxidación de compuestos

orgánicos e inactivación enzimática). Al disminuir o eliminar esta reacción secundaria, se favorece que la reacción deseada se lleve a cabo (Manoj & Hager, 2001).

Se monitoreó la oxidación de asfaltenos mediante la disminución en la intensidad de fluorescencia, de acuerdo con un método reportado por el grupo (Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vázquez-Duhalt, 2012). Debido a que es un sistema que no ha sido estudiado se realizaron diferentes controles, en los cuales se determinó la estabilidad de la señal de fluorescencia al tiempo cero y después de 2 h de incubación en las condiciones señaladas a continuación:

- Mezcla de reacción con asfaltenos sin enzima ni peróxido, con el fin de asegurar que la fluorescencia de estos es estable por si misma (figura 22A)
- Mezcla de reacción con asfaltenos y el agente oxidante (2 mM de H_2O_2 o de 50 mM de t-buOOH), para descartar oxidación química (figura 22B y 22C).
- Mezcla de reacción con asfaltenos y proteína: 1U de PaDa-I o en presencia de albúmina de suero bovino (BSA), sin peróxido, para descartar algún efecto en la señal de fluorescencia debido exclusivamente a la presencia de la proteína (figura 22D y 22E).

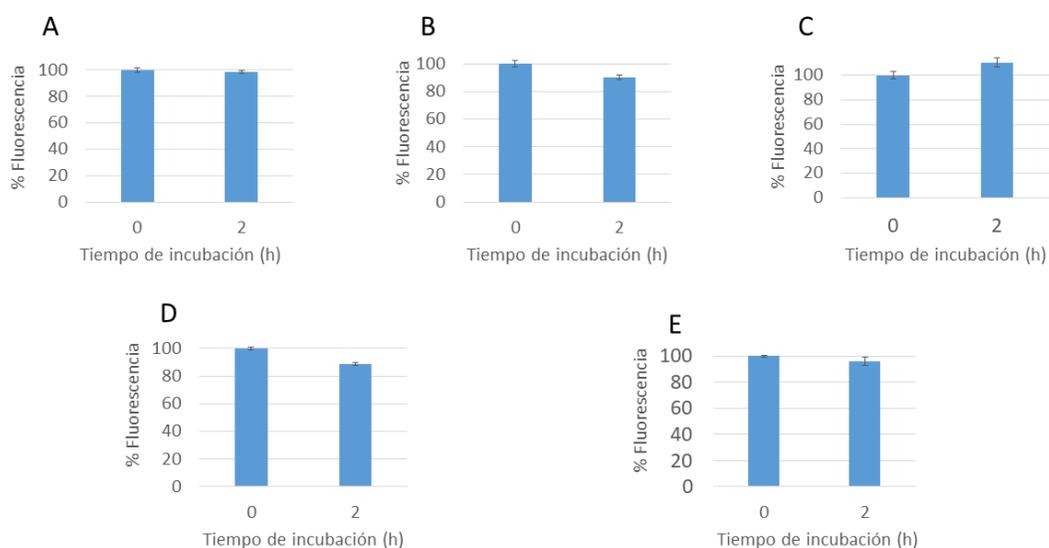


Figura 22. Señal de fluorescencia (medida con el volumen de MFEE) de asfaltenos en acetona-agua, al tiempo cero y después de 2 h de incubación. (A) Asfaltenos. (B) Asfaltenos + 2mM de H_2O_2 . (C) Asfaltenos + 50Mm de t-buOOH. (D) Asfaltenos + 1U Pada-I. (E) Asfaltenos + 17 nM de BSA.

La reducción de la fluorescencia en presencia de los peróxidos pudieran deberse a una oxidación no enzimática. Pero la disminución de ésta en presencia de la enzima sin peróxido no era esperada y podría deberse a un efecto de agregación en presencia de un componente proteico, ya que la enzima no tiene actividad en ausencia de peróxido. Para explorar esto, se realizó un control en presencia de BSA, sin embargo en este caso no se observó cambio en la fluorescencia (figura 22E).

Con el fin de encontrar una condición en la cual la PaDa-I catalizara la oxidación en asfaltenos, se realizaron tratamientos enzimáticos en presencia de los dos peróxidos. En la figura 23 se observa que los asfaltenos tratados con PaDa-I y con el H_2O_2 presentan una variación muy pequeña (5.92%), incluso menor que el control, mientras que el tratamiento con t-buOOH muestra una disminución en la señal de fluorescencia de alrededor del 50%, lo que claramente indica que se está llevando a cabo una transformación enzimática.

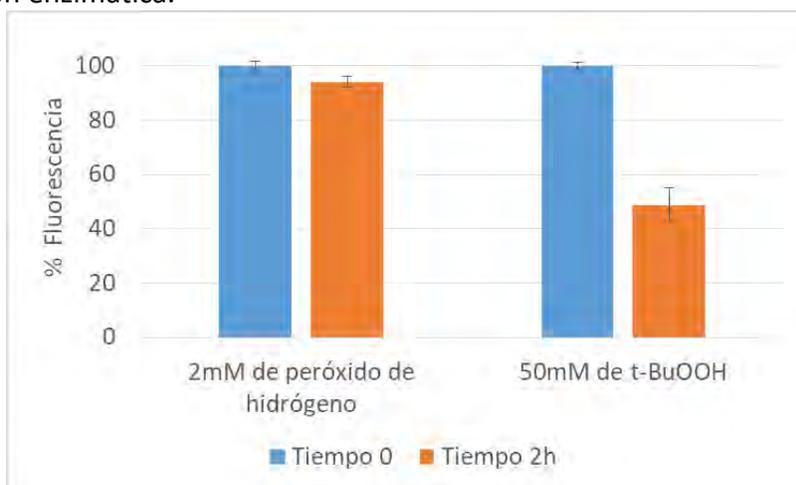


Figura 23. Disminución de la MFEE de la fracción de asfaltenos solubles en acetona tratados y sin tratar con 10U de PaDa-I/3mL utilizando H_2O_2 o t-buOOH como co-sustrato.

La ausencia de reacción en presencia de H_2O_2 puede deberse a varios factores. Uno de ellos es la alta reactividad de este peróxido, que puede conducir a la rápida inactivación de la enzima en ausencia de un buen donador de electrones. Otro factor es la actividad catalasa, ya que está reportado que para esta reacción la CPO es más eficiente con H_2O_2 que con peróxidos orgánicos (Manoj & Hager, 2001). Una vez que se ha formado el compuesto I, éste puede catalizar varias reacciones (figura 24). Los sustratos que van a competir por dicho compuesto actúan como donadores de electrones. Sin embargo, en ausencia de un buen donador otras reacciones secundarias e indeseables pueden ocurrir. Por ejemplo, si la enzima es poco eficiente con un determinado sustrato y hay suficiente peróxido en el medio, la actividad catalasa puede jugar un papel importante y consumir el peróxido en el medio, limitando la conversión del sustrato. Por otro lado, tanto los residuos de la proteína o el grupo hemo pueden actuar como sustratos. Cuando la propia proteína es la donadora de electrones, generalmente ocurre la inactivación de la enzima (Valderrama, Ayala, & Vazquez-Duhalt, 2002). La reacción que se lleva a cabo es aquella en la que la enzima es más eficiente catalíticamente, es decir, depende de la constante de velocidad para cada reacción (Manoj & Hager, 2001).

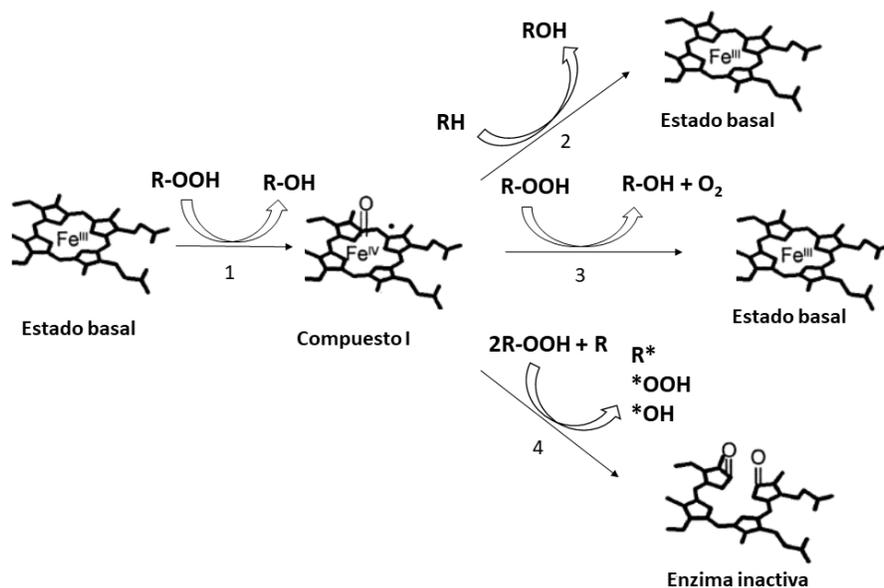


Figura 24. Vías catalíticas que puede llevar a cabo la PaDa-I. (1) Formación del compuesto I. (2) Oxidación de un sustrato orgánico. (3). Dismutación del H_2O_2 vía actividad catalasa. (4) Inactivación de la enzima en ausencia de un donador de electrones.

Con el fin de elucidar que vía catalítica está impidiendo la oxidación de asfaltenos cuando son tratados con H_2O_2 (actividad catalasa o inactivación enzimática), se midió la estabilidad oxidativa de la enzima con ambos peróxidos en el medio de reacción (figura 25).

Al evaluar la actividad residual de la enzima en presencia de H_2O_2 , se observa que pierde rápidamente el 54% de actividad para después mantenerse constante, cuando se agrega una segunda adición de H_2O_2 la inactivación total se lleva a cabo (figura 25B). Este comportamiento indica que la inactivación se detiene por que el H_2O_2 se agota en la solución, sugiriendo que la actividad catalasa está predominando. Este fenómeno ya ha sido observado en otros trabajos. Manoj y Hager en el 2001 reportaron que la eficiencia catalítica de la actividad catalasa (k_{cat}/K_m) de la CPO para el H_2O_2 es de $1.73 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, mientras que para el hidropéroxido de metilo y etilo fue de 1×10^4 y $1.55 \times 10^4 M^{-1}s^{-1}$ respectivamente. En el caso del t-buOOH mencionan que la velocidad de la reacción catalasa fue tan lenta que no fue posible medirla. Estos datos concuerdan con lo observado en la figura 25A, en donde vemos que con t-buOOH la actividad se abate hasta un 90% en el primer minuto, sugiriendo el t-buOOH no es un buen sustrato para la reacción de catalasa, por lo que queda disponible conducir a la auto-oxidación de la enzima o para reaccionar con sustratos orgánicos. Un comportamiento similar lo observaron Manoj y Hager (2001) ya que el rendimiento de la de epoxidación de indeno catalizada por la CPO fue mayor cuando utilizaron t-buOOH como donador del átomo de oxígeno que cuando se utilizó H_2O_2 , y como se mencionó anteriormente, determinaron

que esto se debe a que la reacción secundaria de dismutación de H_2O_2 es 1500 veces más rápida que la reacción de epoxidación.

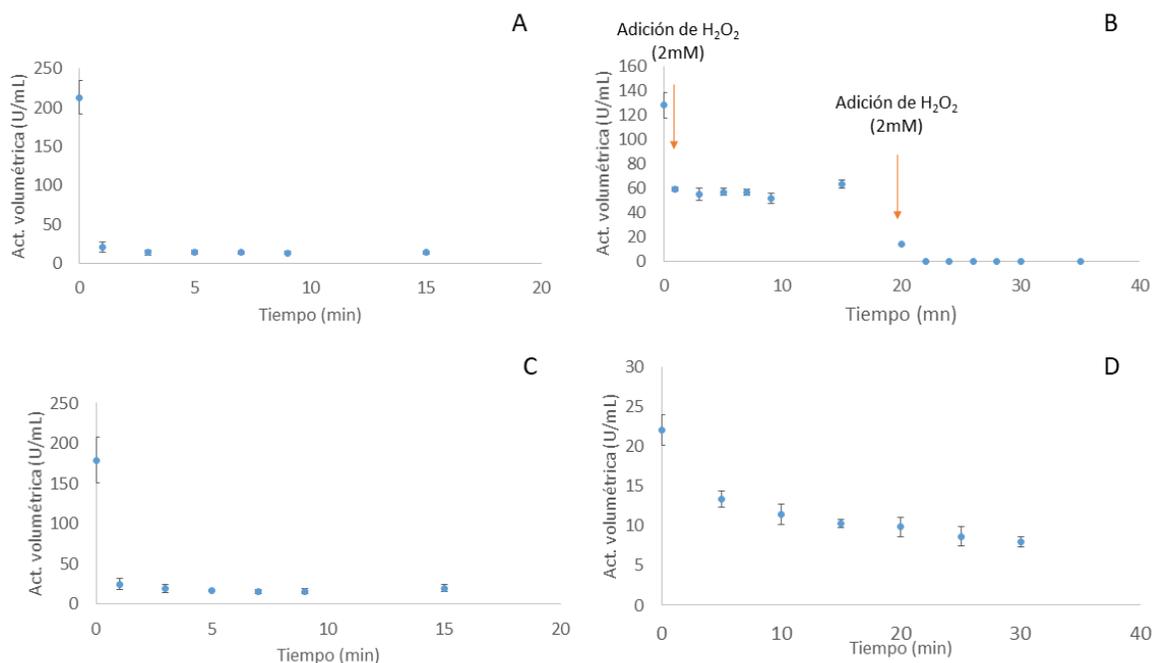


Figura 25. Actividad residual de la PaDa-I en diferentes condiciones. En presencia de (A) *t*-buOOH (50mM), (B) con dos adiciones de H_2O_2 (2mM). (C) *t*-buOOH (50mM) y asfaltenos y (D) *t*-buOOH (50mM) con guayacol (5mM).

Por otro lado la inactivación enzimática por auto-oxidación, o inactivación “suicida”, ha sido descrita para diversas hemo-peroxidasas. Entre los fenómenos que se observan concomitantes con la inactivación están la oxidación de residuos de la proteína e incluso la degradación del grupo hemo. Este proceso de inactivación puede ser muy complejo e incluir a las especies catalíticas (por ejemplo compuesto I) pero también a otras especies como el compuesto III, el cual se forma bajo condiciones de exceso de peróxido. Otra vía que conduce a la inactivación de estas enzimas es la formación de radicales libres, basados en los sustratos o formados por decaimiento de las especies enzimáticas reactivas; estos radicales libres pueden reaccionar con la proteína, oxidando incluso residuos lejanos al sitio activo (figura 24, reacción 4) (Valderrama, Ayala, & Vázquez-Duhalt, 2002).

En el caso de la UPO de *Agrocybe aegerita*, así como de la CPO se ha demostrado que el mecanismo principal de inactivación es la destrucción del hemo con la subsecuente producción de biliverdina, así como la formación de radicales hidroxilos bajo condiciones de exceso de H_2O_2 . Se sabe que hay una competencia entre el sustrato (molécula orgánica) y otras especies oxidables (grupo hemo, residuos de la proteína), es decir, en presencia de un buen sustrato la inactivación de la enzima es una reacción secundaria minoritaria que sólo se observa después de varios cientos de miles de ciclos catalíticos (Karich, Scheibner, Ullrich, & Hofrichter, 2016). Por tanto la eficiencia del catalizador, calculado como el número total de recambio (TTN), es diferente según el sustrato. El número total de recambio se define como el número de ciclos catalíticos que una enzima puede llevar a cabo a lo largo de su vida útil, es decir, antes de su total inactivación

(Rogers & Bommarius, 2010). Se encontró para la UPO de *Agrocybe aegerita* que el TTN disminuye conforme aumenta el tamaño de la molécula (Kluge, Ullrich, Scheibner, & Hofrichter, 2012), es decir, la inactivación de la enzima depende también del sustrato objetivo, como vemos en la figura 25D, en donde la inactivación de la enzima se lleva a cabo más lentamente cuando el sustrato es guayacol ($t_{1/2}=30\text{min}$) que cuando hay asfaltenos en el medio, los cuales no ejercen protección alguna a la inactivación oxidativa de la enzima (figura 25C), esto probablemente se debe a que los asfaltenos, al ser sustratos recalcitrantes, son malos donadores de electrones.

Con el objetivo de profundizar en esta reacción, se ensayaron varias concentraciones de enzima para explorar si la fluorescencia podría reducirse aún más. Como se muestra en la Figura 26, la reducción de la fluorescencia parece tener un límite, ya que después de 2 h de reacción la reducción máxima está entre 50- 60% independientemente de la cantidad de enzima utilizada.

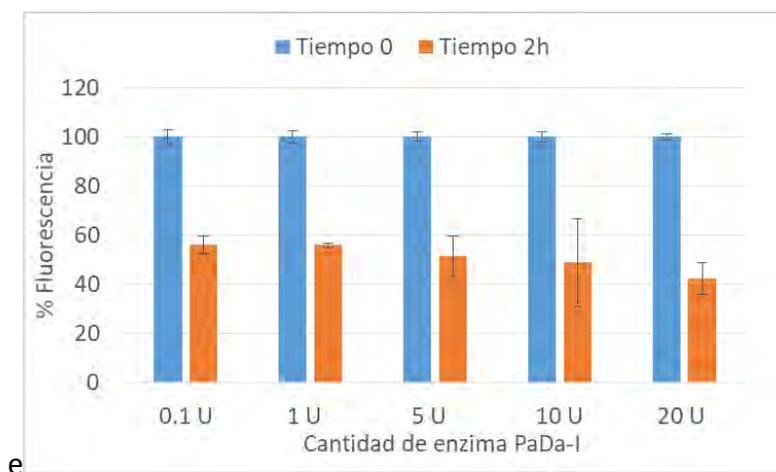


Figura 26. Diminución de fluorescencia medida como MFEE con diferentes cantidades de PaDa-I (se muestra enzima total/3 mL de medio de reacción).

Con la técnica de MFEE no es posible determinar si la concentración de enzima si afecta en la velocidad de reacción, aunque la disminución de fluorescencia tenga un límite. Con el fin de hacer una cinética del avance de la reacción y verificar si la concentración de enzima influye sobre la velocidad de reacción se simplificó el método de MFEE, como se explica en la siguiente sección.

6.4. Cinética de disminución de fluorescencia de asfaltenos durante la reacción enzimática

El análisis de esta reacción compleja a través del método de la matriz de fluorescencia tiene como ventaja que muestra el efecto de la oxidación enzimática sobre las moléculas que conforman a los asfaltenos; sin embargo tiene la desventaja de que toma 20-30 min hacer una lectura. Con el objetivo de contar con una cinética de la reacción más detallada, se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión en donde se observó la mayor disminución de fluorescencia (330nm y 442nm respectivamente) para analizar el progreso de la reacción. Una vez que se determinó con cual longitud de onda de

excitación había una mayor disminución de la fluorescencia, se determinó la longitud de onda de emisión adecuada (Figura 27).

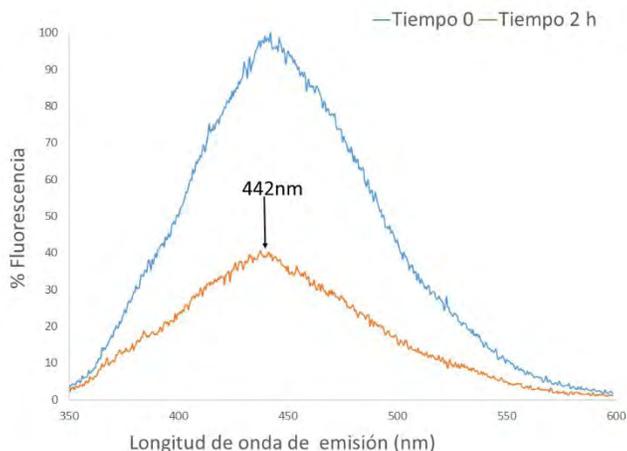


Figura 27. Espectro de fluorescencia de asfaltenos al tiempo 0 y a 2h de tratamiento con la PaDa-I a una $\lambda_{excitación}=330nm$. La $\lambda_{emisión}$ que se seleccionó para seguir la cinética de reacción fue 442nm.

En la figura 28 se muestra una curva de progreso de reacción medida como la disminución de fluorescencia y se observan al menos dos etapas. En los primeros 5 minutos hay una fase rápida y posteriormente la reacción se lleva a cabo más lentamente, durante varias horas. Se debe tener en cuenta que los asfaltenos son una mezcla de moléculas de diferente tamaño, aromaticidad, polaridad, etc. es probable que algunos compuestos sean más fácilmente oxidados que otros. Esto explica que el 50% de la reducción de fluorescencia ocurra entre los primeros 8 a 15 minutos de la reacción (este tiempo varía con la concentración enzima).

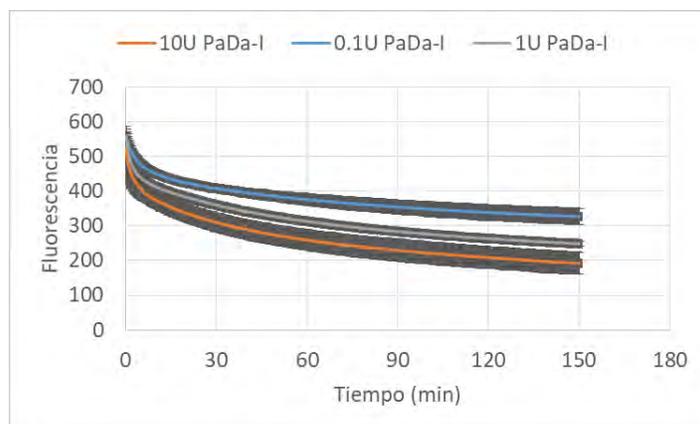


Figura 28. Cinética de disminución de fluorescencia de los asfaltenos solubles en acetona tratados con diferentes cantidades de PaDa-I (U totales) y t-buOOH, con una longitud de onda de emisión de 442nm y de excitación de 330nm.

La pendiente de la disminución de fluorescencia (con unidades de F/min) en los primeros 5 minutos de reacción con 10, 1 Y 0.1U/3 mL es de 20, 21 y 16 F/min respectivamente. La velocidad de reacción es similar con las dos concentraciones mayores de enzima, sin embargo las pendientes en el intervalo de tiempo de 5 a 10 min son de 6.4 y 4.8 F/min con

10 y 1U respectivamente, lo que sugiere que la concentración del biocatalizador tiene un efecto distinto en las diferentes pendientes o fases de la reacción.

Para determinar si el decaimiento de la velocidad de la reacción se debe a la inactivación de la enzima (que como se mencionó anteriormente se lleva a cabo rápidamente mediada por t-buOOH) o a que las moléculas presentes después de la reacción ya no son fácilmente oxidables por esta, se agregó PaDa-I fresca así como PaDa-I y t-buOOH a las 2 horas de reacción. En la figura 29 se puede ver que la velocidad de la reacción no cambia al hacer esto, como se ve en las pendientes de la curva antes y después de agregar la enzima o enzima/peróxido.

- Adición de 10U de enzima: Pendiente en el intervalo de tiempo de 80 a 120min: **0.86 F/min** y al tiempo 120 a 180 min: **0.67 F/min**.
- Adición de 10U de enzima y t-buOOH (50mM): Pendiente al tiempo 80 a 120min: **0.76 F/min** al tiempo de 120 a 180 min: **0.65 F/min**.

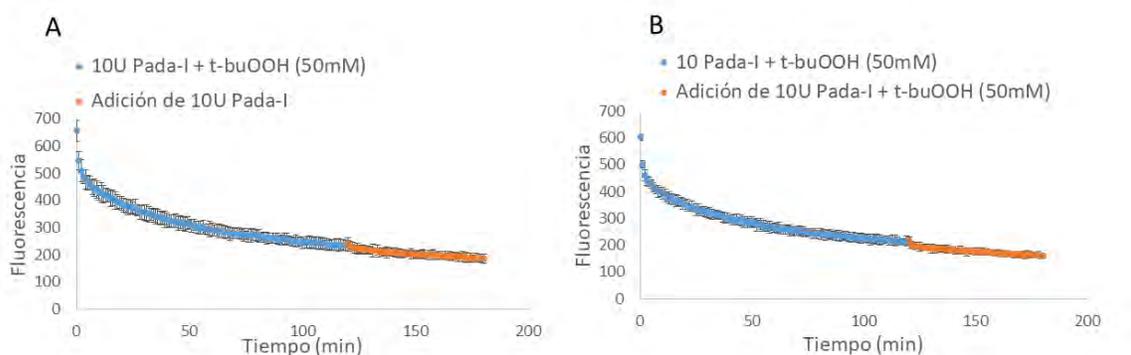


Figura 29. Cinética de la reacción con adición a las 2h de (A) 10U de PaDa-I y (B) 10U de PaDa-I y t-buOOH (50mM).

6.5 Oxidación de asfaltenos catalizada por la CPO

Con el fin de comparar la eficiencia de la oxidación de asfaltenos solubles en acetona de la PaDa-I con la CPO se evaluó la actividad de ésta última en la mezcla de acetona-buffer (60-40%) con los sustratos guayacol y tionina, pero en ninguno de los casos se encontró actividad. Con el primer sustrato la CPO exhibe su actividad peroxidasa, mientras que con la tionina actúa como halogenasa. Estos dos métodos de detección son adecuados para esta solución, ya que las longitudes de onda a la que absorben los compuestos medidos están por arriba del "cutoff" de la acetona (330nm). Ambas mediciones se realizaron con a pH 2.8 y en presencia de iones cloruro.

Ante la imposibilidad de medir ambas enzimas en el mismo sistema de solventes, se decidió utilizar a la CPO en un sistema previamente reportado en el que es capaz de oxidar asfaltenos de petróleo. El sistema ternario de hexano-isopropanol-buffer (46:47.7:6.3) requiere que se añada la enzima en forma liofilizada, debido a su bajo contenido de agua

(Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, 2012). Para utilizar la misma fracción de asfaltenos estudiados con la UPO, los asfaltenos solubles en acetona se recuperaron por evaporación y se resuspendieron en diclorometano, se agregaron a la mezcla de reacción en una concentración final de 15 $\mu\text{g/mL}$ (para medir la MFEE). Se agregó un exceso de enzima (5mg totales de sacarosa-enzima o 1.7nmoles enzima/15 mL de medio de reacción).

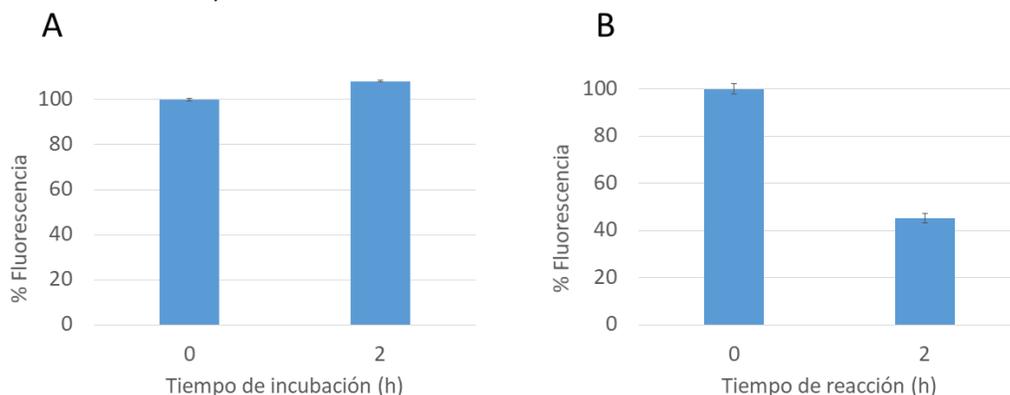


Figura 30. Disminución de MFEE de los asfaltenos tratados con la CPO en el sistema ternario de hexano-isopropanol-buffer (46:47.7:6.3). (A) Control con 0.5mM de H₂O₂ sin enzima. (B) Asfaltenos tratados con la CPO y 0.5 mM de H₂O₂.

En la figura 30 se muestran un control con H₂O₂, en donde la fluorescencia varía un poco (aumenta un 8%). En cambio, en presencia de la enzima, vemos que la fluorescencia de la fracción de asfaltenos solubles en acetona disminuye un 55%. Comparativamente, es la misma disminución porcentual encontrada en el caso de los asfaltenos tratados con PaDa-I.

La CPO, al igual que la UPO, puede catalizar varios tipos de reacciones. El tipo de actividad enzimática se puede modular con el pH. A pH ácido la actividad que predomina es del tipo halogenasa (Thomas, Morris, & Hager, 1970). El mecanismo por el cual la enzima cataliza halogenaciones involucra al hipoclorito, producto de la oxidación del ion cloruro, el cual difunde al medio y lleva a cabo la halogenación a través de un mecanismo no enzimático (Valderrama, Ayala, & Vazquez-Duhalt, 2002). En las condiciones de reacción, a pH 2.8 y en presencia de iones cloruro, la oxidación pero también la halogenación de asfaltenos es llevada a cabo por este intermediario (Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, 2012), lo que representa una desventaja ya que los compuestos orgánicos clorados tienden a ser recalcitrantes.

Por otro lado, para estudiar la cinética de la reacción se determinó el volumen bajo la MFEE de los asfaltenos tratados con la CPO a diferentes tiempos (figura 31). Se puede observar en la primera hora la reacción llega a su fin. En la reacción catalizada con la CPO no se hizo una cinética de reacción a una sola longitud de onda de emisión y excitación debido a que, como ya se mencionó, la enzima se agrega de forma sólida por lo que requiere agitación e imposibilita que se lleve a cabo en la celda del fluorímetro.

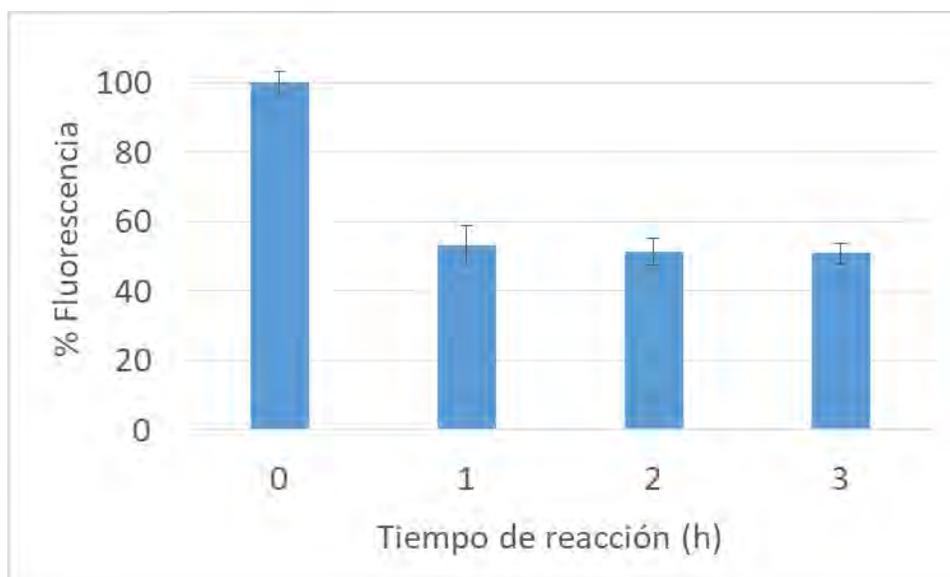


Figura 31. Cinética de reacción los asfaltenos tratados con la CPO, medida como MFEE.

En la tabla 10 se comparan algunos parámetros del tratamiento de asfaltenos con cada enzima. En ambos medios se puede alcanzar una concentración de asfaltenos similar. En el caso de la concentración de enzima, la CPO se utiliza 50 veces más concentrada que la PaDa-I, sin embargo se debe tomar en cuenta que no se optimizó la cantidad mínima de enzima en ninguno de los dos casos. En el caso de la PaDa-I se puede buscar una concentración de peróxido en la que la enzima sea más estable, y por lo tanto disminuir su concentración inicial. Una ventaja que presenta el tratamiento con PaDa-I es que no hay introducción de átomos de cloro en las moléculas.

Tabla 10. Comparación de los sistemas de reacción con la CPO y la PaDa-I

Parámetros	Método enzimático	
	CPO	PaDa-I
Asfaltenos solubles en cada sistema de reacción ¹	150µg/mL	165µg/mL
Concentración de enzima	0.04 nmoles/mL ²	8x10 ⁻⁴ nmoles/mL ³
Tiempo de reacción	1 h	2 h
Características del solvente	Amortiguador pH 2.8, presencia de iones Cl ⁻ , 6.3% de medio acuoso.	Amortiguador pH 7, 40% de medio acuoso.

¹Cantidad máxima de asfaltenos que se pueden solubilizar, no los usados para medir la MFEE, estos son indicados en las secciones 5.6 y 6.5.

²Se calculó con la cantidad de enzima que se utilizó en trabajo realizado por Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, 2012, debido a que en este caso se puso un exceso.

³Cuando se agrega 0.1U PaDa-I/3mL, que fue la concentración mínima evaluada en la MFEE.

Como se mencionó anteriormente, entre las limitaciones del método de la MFEE está que es imposible determinar si la fluorescencia residual es debida a moléculas que ya no son

sustratos de la enzima, o simplemente que los productos fluorescen en cierta medida, o una combinación de ambos. En la caracterización de mezclas complejas, normalmente es necesario incluir una combinación de técnicas para determinar los efectos de una transformación.

6.6. Análisis de los asfaltenos tratados enzimáticamente por FTIR y TGA

Una observación muy relevante es que el contenido de compuestos aromáticos en la fracción de asfaltenos solubles en acetona es muy reducido, comparado con los asfaltenos totales, en la figura 32 se muestra el espectro infrarrojo de los asfaltenos totales tratados y sin tratar con la CPO, podemos observar claramente un pico ancho en 1600cm^{-1} (señal de aromáticos) el cual no aparece en los espectros de la fracción soluble en acetona (figura 33), esto puede deberse a que las señales de los carbonilos los ocultan al estar en menor proporción.

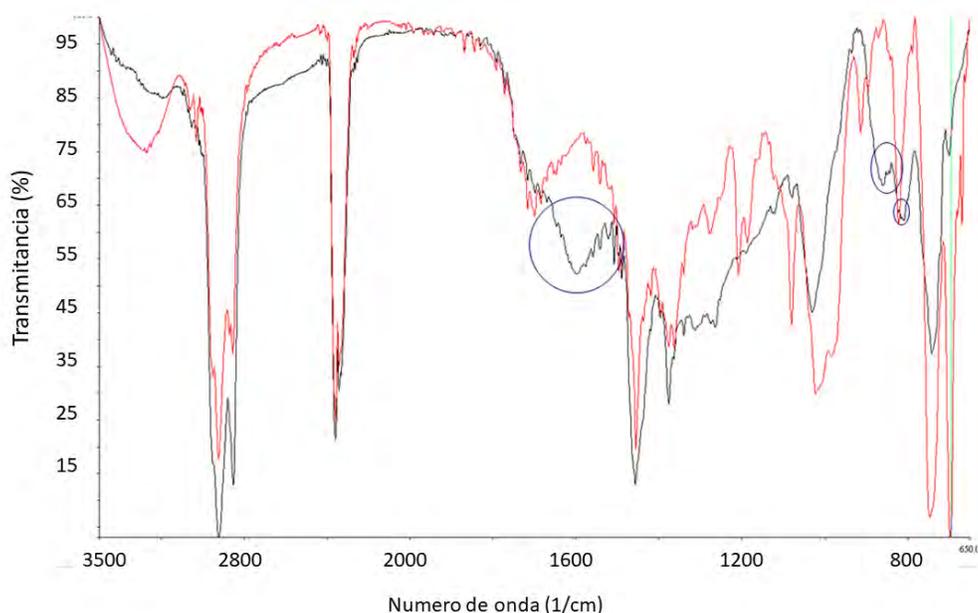


Figura 32. Espectro de infrarrojo de asfaltenos totales tratados con la CPO (rojo) y sin tratar (negro). Las señales de los aromáticos están señaladas en círculos.

En la tabla 11 se muestran los grupos funcionales que aumentaron, con respecto al control, y disminuyeron en proporción a la señal de 2922cm^{-1} , (%transmitancia correspondiente a un grupo funcional/%T a 2922cm^{-1}) que corresponde a los metilenos ($2935\text{-}2915\text{cm}^{-1}$ y $2865\text{-}2845\text{cm}^{-1}$), tanto en el tratamiento con PaDa-I como con CPO. En la figura 33 podemos ver las señales correspondientes a la numeración.

Para las dos enzimas es clara el incremento de grupos polares como hidroxilos (alcoholes), carbonilos (aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos), sulfatos, grupos nitro, metilos (lo que sugiere rompimiento de las moléculas) y aumento en la señal de aromáticos mono sustituidos (tabla 11). Estos cambios son los esperados debido al tipo de reacción que cataliza la enzima. Hay un aumento en la señal grupos hidroxilos en el enlace C-OH, sin

embargo no hay aparición de bandas en el intervalo de número de onda de 3600 a 3200 cm^{-1} pero si se observa que aumenta la señal de agua, lo que tal vez oculte otras señales correspondientes a alcoholes (figura 33B). Al igual que lo reportado en el 2012 por Ayala, Hernandez-Lopez, Perezgasga, & Vazquez-Duhalt, en la reacción catalizada por la CPO se observa la aparición de una señal correspondiente a cloruros halogenados a 1078 cm^{-1} , lo cual representa una desventaja para el caso del tratamiento con la CPO (figura 33A)

Tabla 11. Grupos funcionales que cambiaron en los asfaltenos tratados con PaDa-I y con CPO.

PaDa-I			CPO	
No.	Grupo funcional que aumentó	Intervalo de número de onda (cm^{-1})	Grupo funcional que aumentó	Intervalo de número de onda (cm^{-1})
1	Carbonilo	1765-1645	Carbonilo	1765-1645
2	Metilo	1470-1450 1385-1365	Metilo	1470-1450 1385-1365
3	Sulfatos y sulfitos	1420-1350	Sulfatos y sulfitos	1420-1350
4	Alcoholes	1075-1025	Cloruros aromáticos o alcoholes	1100-1130
5	Nitro aromático	1180-865	Nitro aromático	1180-865
6	Aromático mono-sustituido	710-690 810-750 885-870	-	-

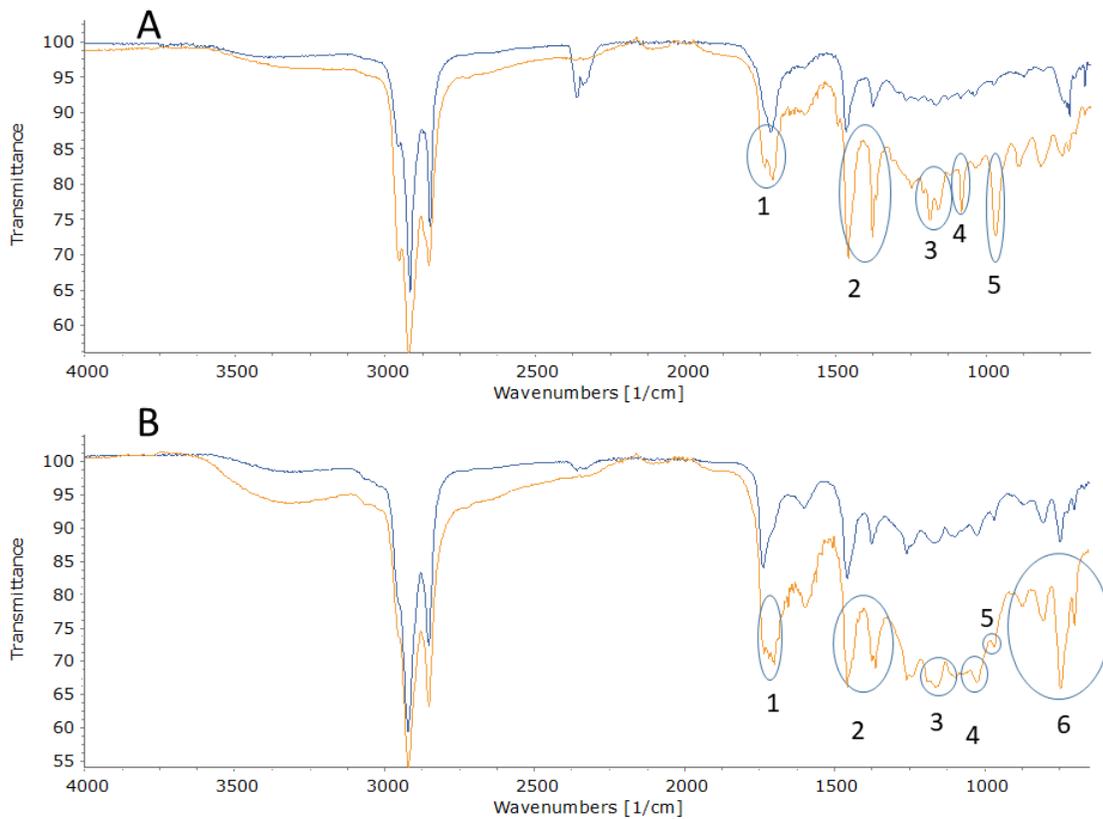


Figura 33. Espectros de infrarrojo de la fracción de asfaltenos tratados enzimáticamente (naranja) con el respectivo control (azul). (A) Reacción con la CPO y (B) Reacción con la UPO. En la tabla 11 se explica la numeración.

Finalmente, se realizaron análisis de TGA sobre las muestras tratadas con las enzimas. Los resultados se muestran en la Figura 34.

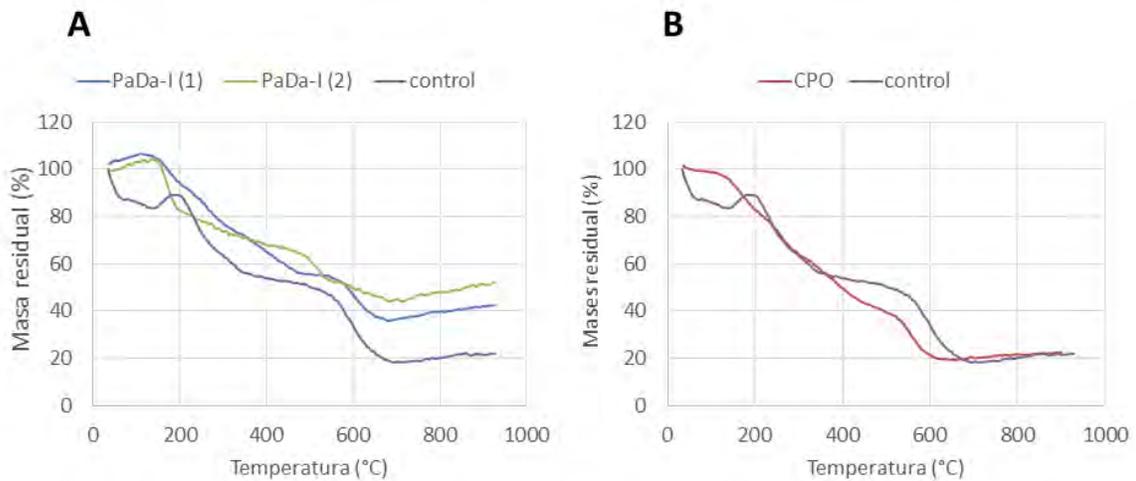


Figura 34. Perfiles de TGA de los asfaltenos antes del tratamiento enzimático (control) y después del tratamiento con PaDa-I (panel A) y CPO como control (panel B).

Debido a la complejidad de la muestra, fue difícil obtener datos reproducibles, por lo que la interpretación queda sujeta a repetir estas mediciones. Estas pruebas preliminares sugieren que sólo con el tratamiento con CPO los asfaltenos resultantes son más sensibles a la degradación térmica, como se observa en el panel B. Por ejemplo, a una temperatura de 600°C la masa residual del control representa el 34% de la masa inicial, mientras que después del tratamiento con CPO la masa residual a esa temperatura es del 21%. Este decremento en la masa residual significa que los asfaltenos son más termosensibles después del tratamiento enzimático y por tanto, menos estables y más reactivos. Por otro lado, en dos tratamientos independientes con PaDa-I se observa lo contrario. Los asfaltenos tratados con PaDa-I no son más termosensibles, y el residuo a 600°C representa 48% de la masa inicial. Sin embargo, como se mencionó antes, estas mediciones deben repetirse, pues con base en lo observado a través de otras técnicas, hay oxidación y este tipo de transformación por lo general aumenta la reactividad de las moléculas. Otras técnicas tales como cromatografía de permeación en gel podría ayudar a discernir si este aparente incremento en la termorresistencia se debe a una mayor agregación, fenómeno que también podría ocurrir a consecuencia de la oxidación (García-Arellano, Buenrostro-Gonzalez, & Vazquez-Duhalt, 2004).

6.5 Selección de la enzima homóloga a *AaeUPO* proveniente de un ustilaginomiceto por medio de un BLAST.

Con el fin de detectar posibles enzimas UPO en ustilaginomicetos, se realizó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) con la secuencia de la UPO de *A. aegeirita* contra organismos pertenecientes a los ustilaginomicetos en la base de datos NCBI. La proteína hipotética que tuvo un mejor alineamiento proviene del microorganismo *Tilletia walkeri*, denominada UpoT, con un 99% de cobertura de secuencia y un 53% de identidad (ID: OAJ19358.1). En el alineamiento (figura 35 y 36) se puede ver que en la secuencia de una probable UPO se encuentran residuos y motivos importantes de la *AaeUPO*, por ejemplo: la alfa hélice que contiene a la cisteína que coordina el hemo; los residuos del sitio catalítico como son el Glu-196 y la Arg-189; las cisteínas que forman un enlace disulfuro y los residuos que coordinan a un ión Mg^{2+} . Las fenilalaninas que se encuentran en la cavidad del sitio activo también se encuentran presentes, a excepción de Phe69 ya que en la posición equivalente se observa un residuo de metionina.

hypothetical protein A4X09_g2443 [Tilletia walkeri]
 Sequence ID: [gb|OAJ19358.1](#) Length: 387 Number of Matches: 1

Range 1: 56 to 387 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
333 bits(855)	1e-112	Compositional matrix adjust.	180/337(53%)	217/337(64%)	20/337(5%)
Query 3	PGPLENSSAKLVNDEAHPWKPLRPGDIRGPPGLNLTASHGYLPRNGVATPVQIINAVQE	62			
Sbjct 56	P P N++AKLVND AHP+K RGP PGLNLA+HG YL R+G+ TP I+ AVQ	115			
Query 63	GLMFDNQAAVFATYAAHLVDGNLITDLLSIGRKRITGPDPPPASVGGLEHGTIFEGDA	122			
Sbjct 116	G N A V F + AHLVDGN++T+L+SIG K+ TG +PP PA+VGG LN HG FEGDA	175			
Query 123	SMTRGDAFFGNNHDFNETLFEQLVDYSNRFGGGKYNLTVAGELRFKRIQDSIATNPNSF	182			
Sbjct 176	S TRGDA FG+NH FNETLF+ LV S ++GGGKYNLT A E+R+ RIQDSIA NPNF F	235			
Query 183	VDIRFTAYGELTFPANLFVDGRRDDGQLDMAARFFQFSRMPDDFFRAPSPRSGT---	239			
Sbjct 236	RHFTAYGE+HFP FVDGR L M AR FFQ + P DF+R RSG	291			
Query 240	-----GVEVVIQAHPMQPGRNVGKINSYTVDPDPTSSDFS-TPCLMYEKFNITVKSLYPNP	293			
Sbjct 292	+ + Q H +QPG N G N Y VD FS C +Y+K V ITV S YP	350			
Query 294	TVQ--LRKALNTNLDFFFQGVAAAG---CTQVFPYGR 324				
Sbjct 351	+ LR AL NL F+QG +G C ++FPYG+	387			

Figura 35. Alineamiento de una proteína hipotética de *Tilletia walkeri* (UpoT) con la UPO de *A. aegerita*. En los recuadros azules vemos los residuos que forman la alfa hélice que contiene a la Cys que coordina al grupo hemo, en recuadros verdes las fenilalaninas que orientan y anclan al sustrato, en azul los tres residuos que coordinan al ion Mg^{2+} , en rojo los residuos de Glu y Arg catalíticos y en amarillo el par de Cys que forman el enlace disulfuro.

Se obtuvo un modelo con el programa I-TASSER, y se obtuvieron las siguientes calificaciones: $C\text{-score}=1.88$ y $TM\text{-score}=0.98 \pm 0.05$.

El $C\text{-score}$ es una medición de confiabilidad para estimar la calidad del modelo, puede tener valores de -5 a 2, donde una $C\text{-score}$ con valores más altos significa que el modelo es más confiable y viceversa. La $TM\text{-score}$ es una escala para medir la similitud estructural de dos proteínas un $TM\text{-score}>0.5$ indica un modelo con topología correcta y un $TM\text{-score} < 0.17$ significa una similitud al azar (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/about.html>).

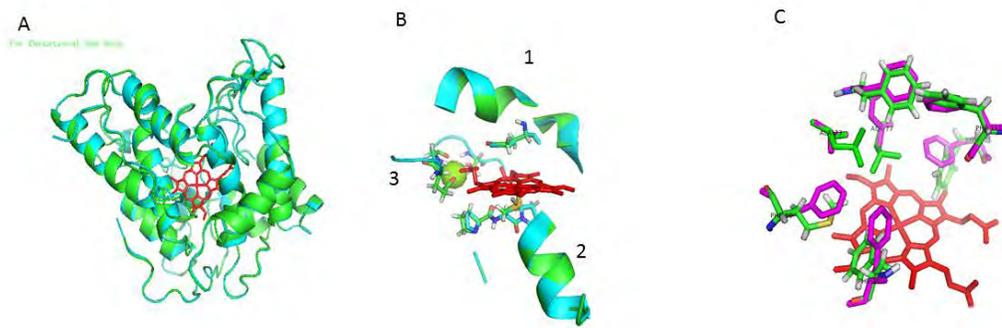


Figura 36. (A) Alineamiento de la UPO de *A. aegerita* y el modelo de *UpoT* (B) Se conservan residuos y motivos importantes. (1) Residuo catalítico (E196), (2) Motivo de unión al hemo, (3) Residuos que unen al ion Mg^{2+} . En azul la estructura de *AaeUPO* y en verde el modelo de la proteína hipotética *T. walkeri*. (C) Cuatro de las cinco fenilalaninas que orientan y anclan al sustrato se encuentran conservadas, existen dos residuos de lisina en la enzima hipotética que están alineados con dos residuos de alanina (Ala-73 y -77) en la *AaeUPO*. En morado se muestran los residuos de la *Aaeupo* y en verde los correspondientes al modelo de *UpoT*.

Según las calificaciones obtenidas por el modelamiento de I-TASSER es probable que la proteína hipotética *UpoT* sea una UPO verdadera. En cuanto a los motivos importantes para la catálisis se observa que la hélice alfa que contiene al Glu-196 tiene una orientación adecuada (figura 36B, 1), también se conserva la hélice que contiene la cisteína que coordina al grupo hemo (figura 36B, 2) y los residuos que coordinan al ion Mg^{2+} (figura 36B, 3). En la figura 36C se puede comparar el empalme de algunos residuos importantes que se encuentran en la cavidad del sitio activo, como son las fenilalaninas que anclan al sustrato y delimitan su tamaño. Los residuos que no son iguales en ambas estructuras son la Phe69, y un par de alaninas, en cuyo lugar se encuentran 2 residuos de lisina.

6.6 Sub-clonación en el vector de expresión

El gen de la probable UPO proveniente del hongo *Tilletia walkeri* denominado *upoT* fue sintetizado por la compañía GenScript. Este gen fue clonado en el vector de muy bajo número de copias pCC1-4K y a esta construcción se le denominó pPF1 el cual tiene un tamaño de 5000pb y resistencia a cloranfenicol.

Para la expresión de la enzima *UpoT*, el gen (*upoT*) fue obtenido de la construcción pPF1 y fue subclonado en el vector de expresión pJRoC30 en los sitios de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y por *Xho*I en el extremo 3'. Esta construcción fue denominada pPF2, que confiere resistencia a ampicilina, y tiene una secuencia codificante para la orotidina 5'-fosfato descarboxilasa, necesaria para la síntesis de uracilo, el cual es utilizado como marcador de selección en cepas incapaces de sintetizar uracilo.

Para realizar la subclonación, los vectores pPF1 y pJRoC30 se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Xho*I (figura 37 A y B, respectivamente). En el caso del vector pPF1 la digestión con sólo una enzima de restricción produce el vector linealizado (figura 36A, carriles 2 y 3) de un peso molecular aproximado de 5000 pb, mientras que con la doble digestión libera un fragmento de aproximadamente 1100 pb, correspondiente al peso molecular del gen *upoT* (figura 37A carril 4, recuadro azul). En el caso de la digestión del vector pJRoC30, la digestión con una enzima (figura 37b carriles 2 y 3) produce el vector linealizado (peso molecular: 11000pb), mientras que la doble digestión produce un vector de aproximadamente 10000pb. Posteriormente, los productos de las digestiones (de pPF1 y pJRoC30) se ligaron y transformaron (no se purificó de banda, debido a que los plásmidos confieren resistencias a diferentes antibióticos) en *E. coli* DH5 α y para seleccionar las colonias candidatas que contuvieran la ligación correcta se realizó PCR de colonia. Se encontraron 3 colonias con el amplicón del peso molecular esperado (figura 37C, carriles 3, 5 y 9, recuadro azul). Estas colonias se denominaron 1, 3 y 7. La secuencia de los genes fue corroborada por secuenciación. Posteriormente se produjo y purificó esta construcción (pPF2) y se transformó en *S. cerevisiae*. De algunas colonias resultantes, se realizó un PCR de colonia para verificar que se integró el plásmido (figura 37D).

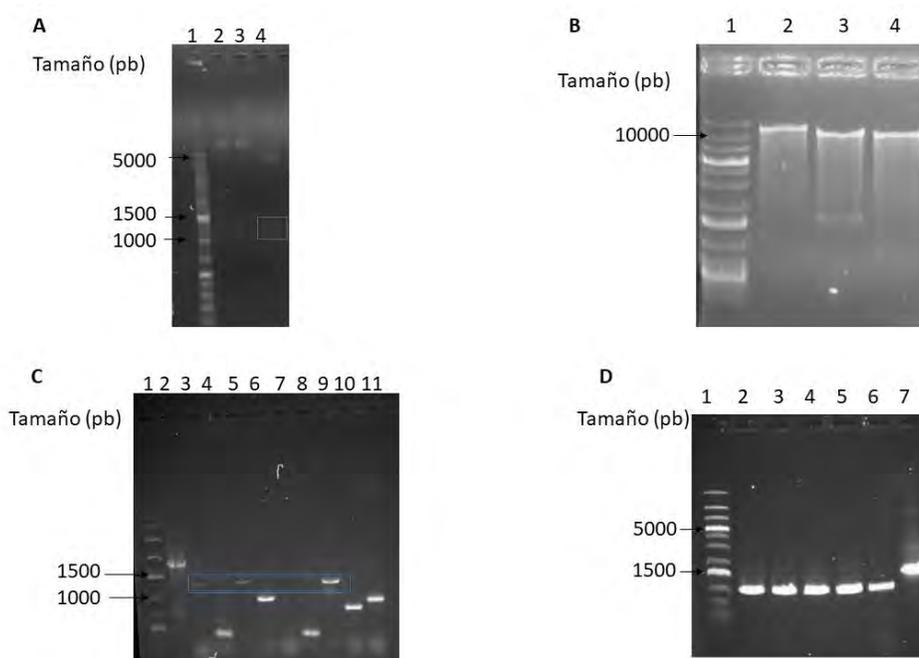


Figura 37. Subclonación del gen *upoT* en pJRoC30 y transformación en *Saccharomyces cerevisiae*. (A) Digestión de pPF1. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Digestión con *Bam*HI, 3. Digestión con *Xho*I, 4. Doble digestión con *Bam*HI y *Xho*I. (B) Digestión del vector de expresión pJRoC30. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Digestión con *Bam*HI, 3. Digestión con *Xho*I, 4. Doble digestión con *Bam*HI y *Xho*I. (C) PCR de colonia de *E. coli*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Plásmido pJRoC30 con otro inserto, del carril 3 al 11 colonias del 1 al 9. (D) PCR de colonia de *S. cerevisiae*. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, del 2 al 5 colonias transformadas con pPF2, 6. Control positivo con cepa pJRoC30-PaDa-I. 7. Control positivo con pJRoC30 con otro inserto.

6.7 Evaluación de las colonias transformadas con pPF2.

Seis colonias transformadas con el gen de *upoT* fueron evaluadas en el medio de expresión, se monitoreó la producción de enzima midiendo actividad con ABTS durante 7 días, en el cual sólo la cepa que producía PaDa-I presentó actividad (5.2 U/mL). Como control positivo se cultivó la cepa de *S. cerevisiae* con el plásmido pJRoC30-PaDa-I y como control negativo la cepa BJ5465 de *S. cerevisiae* sin transformar, suplementando el medio de selección (SC-Rafinosa) con uracilo (0.02g/L). En un intento por investigar si la ausencia de actividad se debía a un problema de secreción se realizó un cultivo durante 3 días (para medir actividad en el extracto celular). Nuevamente el único que presentó actividad en el medio extracelular fue el control positivo, teniendo una actividad de 0.9 ± 0.12 U/mL a las 72 horas. En la figura 38 se observa que todas las cepas crecen similar lo cual sugiere que la ausencia de actividad no fue debido a una deficiencia en crecimiento.



Figura 38. Cinética de crecimiento de las colonias transformadas con el plásmido UPOTW-PM1

Con el fin de poder detectar una cantidad mínima de enzima activa, el extracto crudo fue concentrado por medio de una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (85%), pero sólo se detectó actividad en el medio que contenía a la cepa que produce PaDa-I, la cual tuvo una actividad volumétrica de 5 ± 1.2 U/mL (figura 39B) y una actividad específica de 156U/mg. Una posibilidad es que la proteína obtenida del genoma de *Tilletia walkeri* no sea una enzima funcional, con el fin de comprobar si la proteína UpoT se sobreexpresa en nuestro sistema se analizó el extracto proteico por SDS-PAGE; sin embargo, en la figura 39C no se observa expresión de la proteína UpoT en las colonias transformadas con pPF2, pues en el control positivo es en el único caso donde se observa una banda del tamaño de la PaDa-I (alrededor de 50 kDa). El peso molecular de la secuencia de aminoácidos de la UpoT es de 35.5 kDa, (mientras que el de PaDa-I es de 35.9 kDa), se espera un grado de glicosilación del 30%, (al igual que la PaDa-I) por lo que su peso molecular final esperado es alrededor de 50 kDa.

Con el fin de investigar por qué no había actividad en el extracto crudo, y con la hipótesis de que era un problema de secreción de la proteína al medio extracelular se realizó una

lisis celular para evaluar si había actividad intracelular. La lisis se realizó por sonicación, con 10 pulsos de 10 segundos con intervalos de 30 segundos y 70% de amplitud.

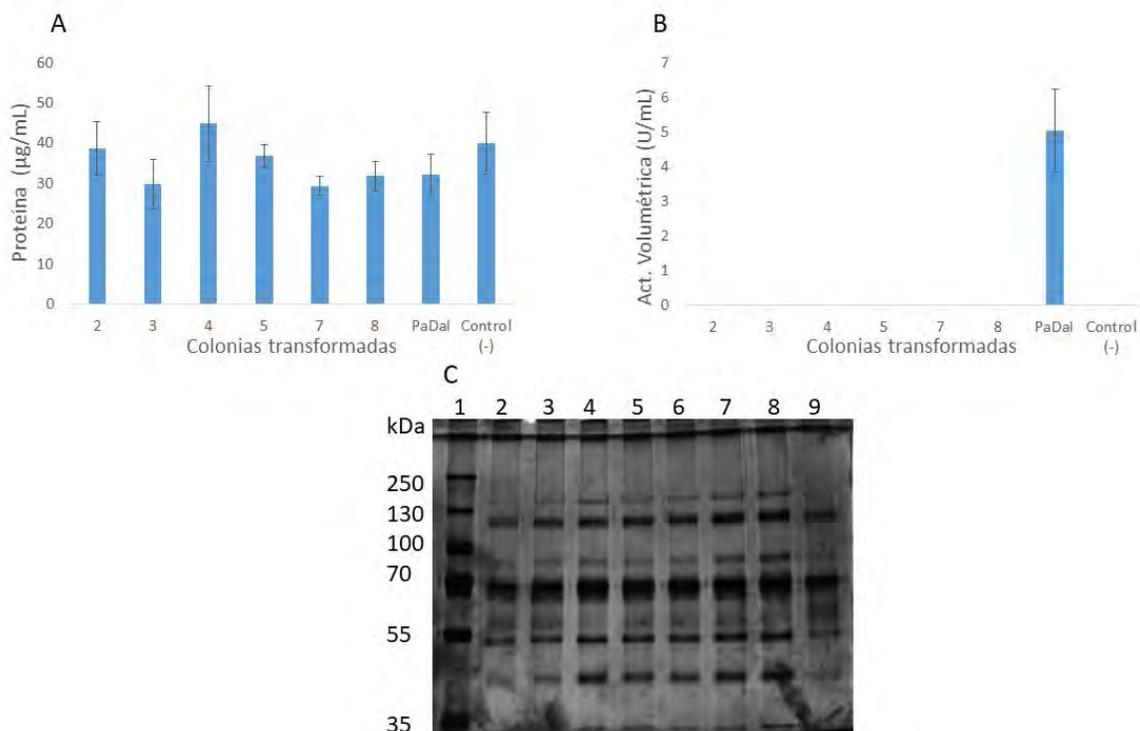


Figura 39. Extracto crudo concentrado con sulfato de amonio. (A) Concentración de proteína. (B) Actividad volumétrica con ABTS. (C) SDS-PAGE. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Colonia 2, 3. Colonia 3, 4. Colonia 4, 5. Colonia 5, 6. Colonia 7, 7. Colonia 8, 8. Control negativo y 9. Control PaDa-I. En cada carril se cargó 1µg de proteína. Se realizó una tinción con plata.

En la figura 40A y 40B vemos que en el extracto celular la cepa que produce PaDa-I es la única que presenta una actividad superior a la encontrada en el control negativo. En el caso de las colonias 2 y 4 no se detectó actividad con ABTS, sin embargo esto puede deberse a que la lisis celular no fue eficiente, como se puede observar en la concentración de proteína de esas muestras. Por SDS-PAGE (figura 40C) no se observa sobre-expresión en las colonias transformadas.

Se decidió buscar la proteína en la fracción insoluble, con la hipótesis de que se encontrara en esta fracción a causa de un plegamiento incorrecto (figura 41).

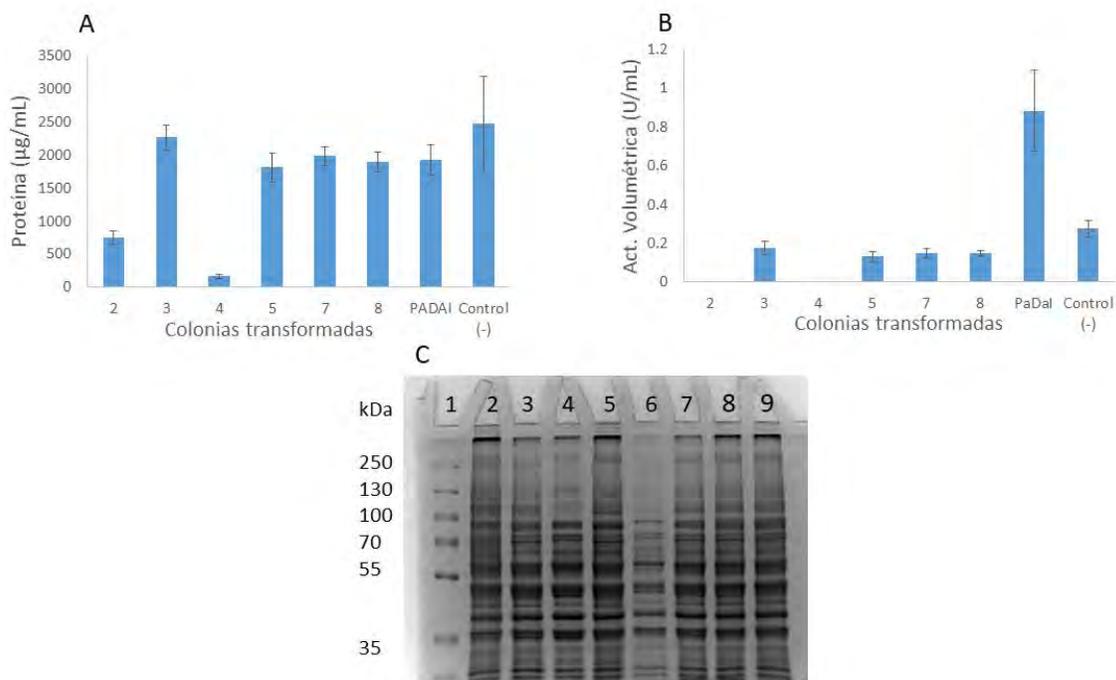


Figura 40. Fracción soluble del extracto celular de las diferentes colonias evaluadas. (A) Concentración de proteína. (B) Actividad volumétrica con ABTS, y (C) SDS-PAGE. Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Control negativo, 3. Colonia PaDa-I, 4. Colonia 2, 5. Colonia 3, 6. Colonia 4, 7. Colonia 5, 8. Colonia 7 y 9. Colonia 8. En cada carril se cargaron 30µg de proteína, excepto en el carril 6, en el cual se cargaron 10 µg, debido a la baja concentración de proteína en la muestra.

En la fracción insoluble sólo se detectó actividad con la cepa que produce PaDa-I (figura 41B), para la cual se encontró que la actividad volumétrica de $0.16 \pm 0.05\text{U/mL}$, y una actividad específica de 0.18U/mg . En el SDS-PAGE no se observó sobre-expresión (figura 41C).

Los datos obtenidos con estos experimentos sugieren que la proteína (aunque se trate de una proteína sin función enzimática) no se encuentra ni intra ni extracelularmente. Esto se puede deber a que la proteína no se está expresando (no se está transcribiendo o traduciendo), o bien a que no se pliega correctamente por lo que puede ser degradada por los mecanismos celulares que responden a proteínas mal plegadas. Sobre el último punto se planteó una hipótesis y una propuesta para solucionar este problema, sin embargo, también existe la posibilidad de que la proteína producida este en muy baja concentración y no sea detectada por el método de detección (actividad enzimática y SDS-PAGE).

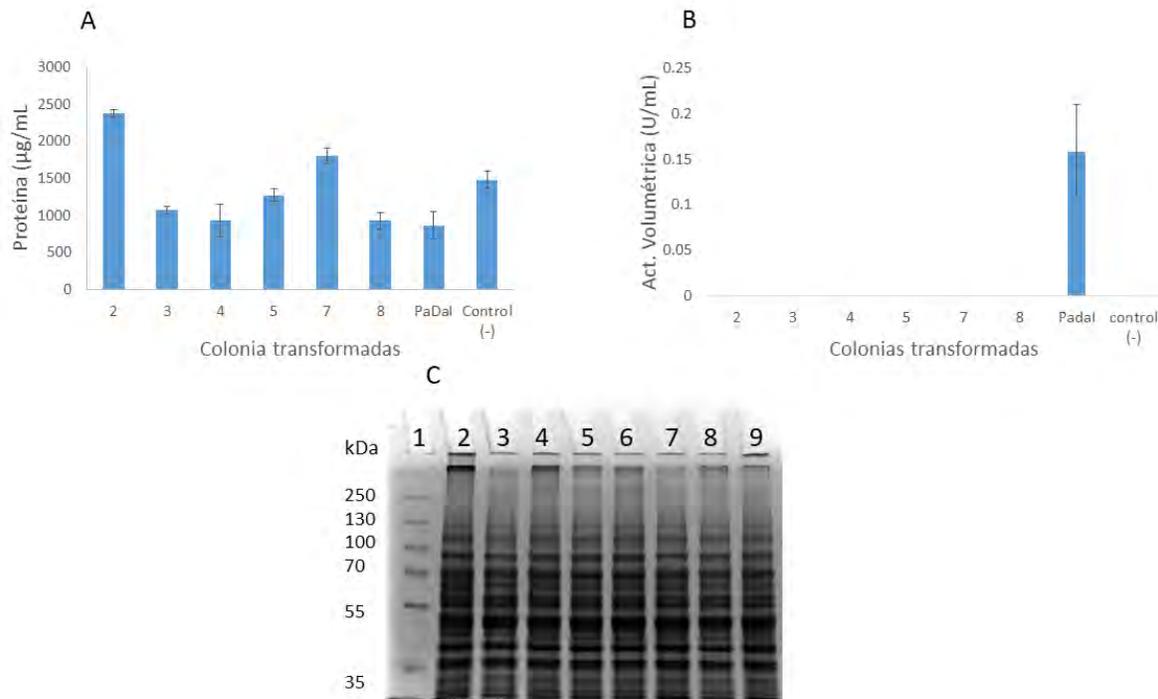


Figura 41. Fracción insoluble del extracto celular. (A) Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\text{mL}$). (B) Actividad volumétrica con ABTS. (C) Carriles: 1. Marcador de peso molecular, 2. Control negativo, 3. PaDa-I, 4. Colonia 8, 5. Colonia 7, 6. Colonia 5, 7. Colonia 4, 8. Colonia 3 y 9. Colonia 2. Se cargaron $30\mu\text{g}$ de proteína en cada carril.

Propuesta para lograr la expresión de la probable UPO de *Tilletia walkeri*

Como se mencionó anteriormente el gen de *upoT* se sintetizó comercialmente y se realizó una optimización de codones tanto en la secuencia del péptido señal como en la proteína madura. Debido a que los organismos no utilizan todos los codones sinónimos a la misma velocidad, se ha observado un “uso preferencial de codones” que depende de cada microorganismo. En la expresión heteróloga de proteínas es una práctica común optimizar el uso de codones para el microorganismo hospedero, con el fin de maximizar la expresión de la proteína.

Sin embargo, cabe señalar que no es una práctica común optimizar la secuencia nucleotídica del péptido señal (secuencia señal). En nuestro caso se optimizaron los codones tanto de la proteína madura como del péptido señal. Se ha visto que el uso de codones en la secuencia señal tiene una función en una fase temprana de la exportación de proteínas en *E. coli*. El uso de codones raros tiene influencia sobre varias funciones biológicas, por ejemplo en el inicio de la traducción y el correcto plegamiento de las proteínas multidominio. El uso más alto de codones raros en todo el genoma de *E. coli* está en las secuencias señales y hay evidencia de que estos codones no óptimos en las secuencias señales son necesarios para el correcto plegamiento de las proteínas a exportar (Power, Jones, Beacham, Bucholtz, & Jennings, 2004). Además se han hecho estudios del uso de codones en secuencias señales de algunas proteínas como la proteína

de unión a maltosa (MBP) (Zalucki & Jennings, 2007) y la beta-lactamasa (Zalucki, Gittins, & Jennings, 2008). El resultado de la optimización de codones resultó en una disminución en la producción de estas enzimas; sin embargo, se pudo recuperar parcialmente cuando se expresaron en cepas deficientes en proteasas, o disminuyendo la temperatura a la cual se expresan las proteínas. Esto indica que el uso de codones no óptimos en la secuencia señal permite el correcto plegamiento de la proteína que se va a exportar. El aumento en la producción de estas enzimas en las cepas deficientes en proteasas implica que la región madura de la MBP es reconocida como una proteína mal plegada

La secuencia de aminoácidos del péptido señal en el gen *upoT* es la misma que la del péptido señal de la mutante PaDa-I, sin embargo difieren mucho en su secuencia nucleotídica como se muestra a continuación:

- El péptido señal de la UPOTW tiene los codones optimizados:

ATG AAA TAT TTT CCA TTG TTT CCA ACT TTG GTT TAT GCT GTT GGT GTT GTT GCT TTT CCA
GAT TAT GCT TCT TTG GCT GGT TTG TCT CAA CAA GAA TTG GAT GCT ATT ATT CCA ACT
TTG GAA GCT AGA

- El péptido señal de la PaDa-I:

ATG AAA TAT TTT CCC CTG TTC CCA ACC TTG GTC TAC GCA GTG GGG GTC GTT GCT TTT
CCT GAC TAC GCC TCA TTG GCC GGC CTC AGC CAG CAG GAA TTG GAC GCT ATA ATC CCA
ACA CTC GAG GCC CGA

En verde se muestran los codones óptimos y en rojo los codones raros para *Saccharomyces cerevisiae*. El 35% de codones en la secuencia señal sin optimizar son raros. Con esto en mente, es probable que la razón por la que no vemos producción de la probable UPO es el cambio efectuado en la secuencia señal. Por tanto, se propone realizar una construcción con el gen de la probable UPO pero utilizando la secuencia señal original que se utilizó para expresar PaDa-I.

7. CONCLUSIONES

Al ser los asfaltenos moléculas de alto peso molecular y poliaromáticos es de esperarse que la PaDa-I sea poco eficiente oxidándolos, y esto se ve reflejado en la utilización del oxidante, ya que con H_2O_2 los resultados sugieren que la actividad catalasa predomina, y esto sucede ya que otras vías catalíticas (oxidasa/peroxigenasa) son más lentas o que no hay sustrato para ellas. Por ello en este trabajo se utilizó hidroperóxido de tert-butilo, ya que este, según nos sugieren los resultados de inactivación enzimática y reportes previos sobre la CPO, no actúa como sustrato eficiente para la actividad catalasa, permitiendo así que las reacciones de peroxidasa/peroxigenasa se lleven a cabo. Sin embargo esto sucede a costa de la inactivación de la enzima, se sabe que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de los sustratos, en este caso debido a que para la actividad catalasa son necesarias dos moléculas de H_2O_2 por ciclo catalítico mientras que para las actividades peroxidasa/peroxigenasa se necesita 1 molécula, una forma de aumentar la estabilidad de la enzima y dirigir la reacción hacia vía catalítica de interés es manteniendo una baja concentración de H_2O_2 .

Se comprobó que la fluorescencia de los asfaltenos tratados con PaDa-I disminuía como máximo alrededor del 50% por medio de la MFEE. En la cinética de reacción medida por fluorescencia se observa que la reacción ocurre en varias etapas, lo sugiere que la PaDa-I transforma a diferentes sustratos en la mezcla a diferentes velocidades. Se comprobó que esto no se debe a una rápida inactivación enzimática ya que al agregar enzima fresca no se observa diferencia en la velocidad de disminución de fluorescencia. Tampoco hay una relación directa entre cantidad de enzima/velocidad de disminución de fluorescencia, es decir, si hay cambio en dicha disminución pero no es proporcional a la cantidad de enzima, lo cual tal vez se deba a la naturaleza de los asfaltenos, los cuales al ser una mezcla compleja puede ser que para ciertos sustratos la enzima esté en exceso, mientras que para otros no sea así.

Tanto la enzima PaDa-I como la CPO tienen la capacidad de oxidar en cierta medida la fracción de asfaltenos soluble en acetona. La fluorescencia es un método grueso, que indica solamente si hubo modificaciones en las moléculas presentes en los asfaltenos. La disminución de la fluorescencia de los asfaltenos tratados con CPO y con PaDa-I es similar, sin embargo, al analizar los espectros de infrarrojo se observa que con ambas enzimas aumentan señales de grupos funcionales correspondientes a carbonilos, sulfatos, sulfitos, hidroxilos, grupos nitro, así como un aumento en señales correspondientes al grupo metilo, lo que sugeriría un rompimiento de las moléculas, sin embargo también se observan diferencias entre los tratamientos. En el caso del tratamiento con CPO se observa la aparición de un pico correspondiente a aromáticos halogenados (1081cm^{-1}), y en el caso del tratamiento con la PaDa-I aparecen bandas correspondientes a aromáticos

sustituidos (744 cm^{-1}), lo que nos indica que en el tratamiento con esta última se modifican compuestos aromáticos que no son modificados por la CPO, además de contar con la ventaja de que no introduce átomos de cloro.

Existe enorme variedad de enzimas homólogas a la UPO, dichas enzimas hipotéticas podrían tener propiedades interesantes, sin embargo se debe desarrollar un método para expresarlas eficientemente, como ejemplo está el método de Molina-Espeja et al. (2014), en el cual, por medio de evolución dirigida se logró aumentar la expresión funcional de la UPO de *Agroclybe aegerita*, usando este método tal vez se podrían expresar UPO's interesantes de forma eficiente.

8. PERSPECTIVAS

1. Evaluar diferentes mezclas de solventes orgánicos que disuelvan asfaltenos y encontrar una condición para mantener a la PaDa-I activa en dicho medio, para de esta forma caracterizar la oxidación de asfaltenos totales.
2. Cambiar la secuencia nucleotídica del péptido señal del gen de la *upoT*, para evaluar su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Si es el caso, caracterizar la UPOTW tanto con sustratos modelos como en la oxidación de asfaltenos.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ancheyta Juárez, J., Trejo, F., & Rana, M. S. (2009). Asphaltenes: chemical transformation during hydroprocessing of heavy oils. Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis.

Araiso, T., Rutter, R., Palcic, M. M., Hager, L. P., & Dunford, H. B. (1981). Kinetic analysis of compound I formation and the catalytic activity of chloroperoxidase. *Canadian Journal of Biochemistry*, 59(4), 233-236. <https://doi.org/10.1139/o81-031>

Aranda, E., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2010). Conversion of polycyclic aromatic hydrocarbons, methyl naphthalenes and dibenzofuran by two fungal peroxygenases. *Biodegradation*, 21(2), 267-281. <https://doi.org/10.1007/s10532-009-9299-2>

Ayala, M., Hernandez-Lopez, E. L., Perezgasga, L., & Vazquez-Duhalt, R. (2012). Reduced coke formation and aromaticity due to chloroperoxidase-catalyzed transformation of asphaltenes from Maya crude oil. *Fuel*, 92(1), 245-249. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.06.067>

Buenrostro-Gonzalez, E., Andersen, S. I., Garcia-Martinez, J. A., & Lira-Galeana, C. (2002). Solubility/Molecular Structure Relationships of Asphaltenes in Polar and Nonpolar Media. *Energy & Fuels*, 16(3), 732-741. <https://doi.org/10.1021/ef0102317>

Cherry, J. R., Lamsa, M. H., Schneider, P., Vind, J., Svendsen, A., Jones, A., & Pedersen, A. H. (1999). Directed evolution of a fungal peroxidase. *Nature Biotechnology*, 17(4), 379-384. <https://doi.org/10.1038/7939>

Colonna, S., Gaggero, N., Casella, L., Carrea, G., & Pasta, P. (1992). Chloroperoxidase and hydrogen peroxide: An efficient system for enzymatic enantioselective sulfoxidations. *Tetrahedron: Asymmetry*, 3(1), 95-106. [https://doi.org/10.1016/S0957-4166\(00\)82316-2](https://doi.org/10.1016/S0957-4166(00)82316-2)

Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13. <http://doi.org/10.4061/2011/941810>

Fedorak, P. M., Semple, K. M., Vazquez-Duhalt, R., & Westlake, D. W. S. (1993). Chloroperoxidase-mediated modifications of petroporphyrins and asphaltenes. *Enzyme and Microbial Technology*, 15(5), 429-437. [http://doi.org/10.1016/0141-0229\(93\)90131-K](http://doi.org/10.1016/0141-0229(93)90131-K)

García-Arellano, H., Buenrostro-Gonzalez, E., & Vazquez-Duhalt, R. (2004). Biocatalytic transformation of petroporphyrins by chemical modified cytochrome C: Enzymatic Transformation of Petroporphyrins from Asphaltenes. *Biotechnology and Bioengineering*, 85(7), 790-798. <https://doi.org/10.1002/bit.20023>

Gawel, Irena, Dagmara Bociarska, and Piotr Biskupski. 2005. Effect of Asphaltenes on Hydroprocessing of Heavy Oils and Residua. *Applied Catalysis A: General* 2 95(1): 89–94. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926860X05005727>, accessed August 4, 2016.

Hernández-López, E. L., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2015). Microbial and Enzymatic. Biotransformations of Asphaltenes. *Petroleum Science and Technology*, 33(9), 1017-1029. <http://doi.org/10.1080/10916466.2015.1014960>

Hofrichter, M., Kellner, H., Pecyna, M. J., & Ullrich, R. (2015). Fungal Unspecific Peroxygenases: Heme-Thiolate Proteins That Combine Peroxidase and Cytochrome P450 Properties. En E. G. Hrycay & S. M. Bandiera (Eds.), *Monooxygenase, Peroxidase and Peroxygenase Properties and Mechanisms of Cytochrome P450* (Vol. 851, pp. 341-368).

Hofrichter, M., Ullrich, R., Pecyna, M. J., Liers, C., & Lundell, T. (2010). New and classic families of secreted fungal heme peroxidases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 871-897. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2633-0>

Karich, A., Scheibner, K., Ullrich, R., & Hofrichter, M. (2016). Exploring the catalase activity of unspecific peroxygenases and the mechanism of peroxide-dependent heme destruction. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 134, 238-246. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.10.014>

Kluge, M., Ullrich, R., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2012). Stereoselective benzylic hydroxylation of alkylbenzenes and epoxidation of styrene derivatives catalyzed by the

peroxygenase of *Agrocybe aegerita*. *Green Chem.*, 14(2), 440-446.
<https://doi.org/10.1039/C1GC16173C>

Manoj, K. M., & Hager, L. P. (2001). Utilization of peroxide and its relevance in oxygen insertion reactions catalyzed by chloroperoxidase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1547(2), 408-417.
[https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00210-2)

Molina-Espeja, P., Garcia-Ruiz, E., Gonzalez-Perez, D., Ullrich, R., Hofrichter, M., & Alcalde, M. (2014). Directed Evolution of Unspecific Peroxygenase from *Agrocybe aegerita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(11), 3496-3507. <https://doi.org/10.1128/AEM.00490-14>

Mullins, Oliver C. 2011. The Asphaltenes. *Annual Review of Analytical Chemistry* 4(1): 393–418. <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-anchem-061010-113849>, accessed August 2, 2016.

Peter, S., Kinne, M., Wang, X., Ullrich, R., Kayser, G., Groves, J. T., & Hofrichter, M. (2011). Selective hydroxylation of alkanes by an extracellular fungal peroxygenase: Hydroxylation of alkanes by a fungal peroxygenase. *FEBS Journal*, 278(19), 3667-3675.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08285.x>

Pineda-Flores, G., Boll-Argüello, G., Lira-Galeana, C., & Mesta-Howard, A. M. (2004). A microbial consortium isolated from a crude oil sample that uses asphaltenes as a carbon and energy source. *Biodegradation*, 15(3), 145-151.

Piontek, K., Strittmatter, E., Ullrich, R., Grobe, G., Pecyna, M. J., Kluge, M. Plattner, D. A. (2013). Structural Basis of Substrate Conversion in a New Aromatic Peroxygenase: CYTOCHROME P450 FUNCTIONALITY WITH BENEFITS. *Journal of Biological Chemistry*, 288(48), 34767-34776. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.514521>

Poraj-Kobielska, M., Kinne, M., Ullrich, R., Scheibner, K., & Hofrichter, M. (2012). A spectrophotometric assay for the detection of fungal peroxygenases. *Analytical Biochemistry*, 421(1), 327-329. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.009>

Poulos, T. L. (2014). Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews*, 114(7), 3919-3962. <https://doi.org/10.1021/cr400415k>

Power, P. M., Jones, R. A., Beacham, I. R., Bucholtz, C., & Jennings, M. P. (2004). Whole genome analysis reveals a high incidence of non-optimal codons in secretory signal sequences of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 322(3), 1038-1044. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.08.022>

Rogers, T. A., & Bommarius, A. S. (2010). Utilizing simple biochemical measurements to predict lifetime output of biocatalysts in continuous isothermal processes. *Chemical Engineering Science*, 65(6), 2118-2124. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2009.12.005>

Tavassoli, T., Mousavi, S. M., Shojaosadati, S. A., & Salehizadeh, H. (2012). Asphaltene biodegradation using microorganisms isolated from oil samples. *Fuel*, 93, 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2011.10.021>

Thomas, J. A., Morris, D. R., & Hager, L. P. (1970). Chloroperoxidase VII. Classical peroxidatic, catalatic, and halogenating forms of the enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 245(12), 3129-3134.

Ullrich, R., Nuske, J., Scheibner, K., Spantzel, J., & Hofrichter, M. (2004). Novel Haloperoxidase from the Agaric Basidiomycete *Agrocybe aegerita* Oxidizes Aryl Alcohols and Aldehydes. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(8), 4575-4581. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.8.4575-4581.2004>

Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., & Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of

Uribe-Alvarez, C., Ayala, M., Perezgasga, L., Naranjo, L., Urbina, H., & Vazquez-Duhalt, R. (2011). First evidence of mineralization of petroleum asphaltenes by a strain of *Neosartorya fischeri*: Asphaltenes degradation by *Neosartorya fischeri* strain. *Microbial Biotechnology*, 4(5), 663-672. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2011.00269.x>

Valderrama, B., Ayala, M., & Vazquez-Duhalt, R. (2002). Suicide Inactivation of Peroxidases and the Challenge of Engineering More Robust Enzymes. *Chemistry & Biology*, 9(5), 555-565. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00149-7)

Vazquez-Duhalt, R., & Quintero Ramírez, R. (Eds.). (2004). Petroleum biotechnology: developments and perspectives. Amsterdam ; Boston: Elsevier.

Zalucki, Y. M., Gittins, K. L., & Jennings, M. P. (2008). Secretory signal sequence non-optimal codons are required for expression and export of β -lactamase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 366(1), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.093>

Zalucki, Y. M., & Jennings, M. P. (2007). Experimental confirmation of a key role for non-optimal codons in protein export. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 355(1), 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.126>

Zámocký, M., Hofbauer, S., Schaffner, I., Gasselhuber, B., Nicolussi, A., Soudi, M., Obinger, C. (2015). Independent evolution of four heme peroxidase superfamilies. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 574, 108-119. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.12.025>

Tilletia walkeri strain DAOM 236422 scaffold_63, whole genome shotgun sequence
gi|1028548970|gb|LWDG01000063.1|gn:LWDG01|scaffold_63

Referencias de internet

Yang Zhang's Research Group, disponible en <<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/about.html>>

Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), disponible en <<<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/>>>

Protocol for CopyControl™ pCC1BAC™ (BamH I, Hind III, EcoR I Cloning-Ready) Vector, Epicentre an Illumina Company, disponible en << [http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/copycontrol-pcc1bac-\(bamh-i-hind-iii-ecor-i-cloning-ready\)-vector.pdf?sfvrsn=8](http://www.epibio.com/docs/default-source/protocols/copycontrol-pcc1bac-(bamh-i-hind-iii-ecor-i-cloning-ready)-vector.pdf?sfvrsn=8)>>