



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE BISFENOLES CATALIZADA POR
VARIANTES DE UNA LACASA FÚNGICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
ALINA ELIZABETH TORRES AGUIRRE

TUTOR PRINCIPAL

DRA. MARCELA AYALA ACEVES
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. WENDY XOLALPA VILLANUEVA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DR. RAMÓN ALBERTO BATISTA GARCÍA
[Centro de Investigación en Dinámica Celular, UAEM](#)

Cuernavaca Morelos. Marzo, 2021



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.

El presente trabajo se realizó en el grupo de Biocatálisis REDOX bajo la asesoría de la Dra. Marcela Ayala Aceves, del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los estudios de maestría se realizaron con apoyo de la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente trabajo fue presentado como ponencia en un congreso: VI Latin American Protein Society Meeting and VII Congreso de la Rama de Físicoquímica, Estructura y Diseño de Proteínas (México-October 2019).

Agradecimientos

A la Dra. Marcela Ayala por brindarme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y principalmente por ayudarme a crecer en el ámbito de la ciencia. Gracias por confiar en mí para desarrollar este gran proyecto.

A los miembros de mi comité tutor: Dra. Wendy Xolalpa Villanueva y Dr. Ramón Batista García por sus aportaciones que enriquecieron este proyecto semestre a semestre.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de maestría, becario 924843.

A la Dra. Clarita Olvera Carranza por sus enseñanzas impartidas con la calidez humana que la caracteriza y a la Biol. Rosa Román Miranda por el apoyo técnico para la realización de esta tesis.

A los integrantes del comité revisor de tesis, a la Dra. Claudia Martínez, a la Dra. María del Rayo, al Dr. Luis Treviño, al Dr. Ernesto Ortiz y al Dr. Ayixon Sánchez por sus aportaciones que enriquecieron este trabajo de investigación.

En especial...

A mis padres, Elizabeth y Guillermo por la educación que recibí de ustedes y que sin ella no sería la persona que soy. Ustedes saben que son lo más importante de mi vida.

A mis hermanos Dalia y Guillermo, y mi sobrina Shadany, por estar siempre conmigo y brindarme esa chispa que necesitaba en la vida.

A mis tías Mónica y Mitzi, y a mi abuelita Mamá Leony, que siempre me han apoyado en todo lo que quiero hacer y han sido como unas amigas para mí.

A Eymard, por el amor y apoyo incondicional durante estos años juntos.

A mis amigos, en especial a Dinora, Andrea, Danel, Martha y Raúl por su sincera amistad y apoyo durante los últimos años.

Y a todos mis compañeros del laboratorio 8 que hicieron muy linda mi estancia en la maestría.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 LOS BISFENOLES COMO PERTURBADORES ENDÓCRINOS	9
1.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN	12
1.1.2 PRESENCIA Y PERSISTENCIA EN EL AMBIENTE	13
1.1.3 EFECTO DE LOS PE EN DIFERENTES ESPECIES	15
1.2 LACASAS: ESTRUCTURA Y CARACTERÍSTICAS.....	16
1.2.1 MECANISMO DE REACCIÓN Y POTENCIAL REDOX.....	17
1.2.2 LAS LACASAS FÚNGICAS.....	19
2. ANTECEDENTES	21
2.1 DEGRADACIÓN DE PE POR LACASAS.....	21
2.2 OBTENCIÓN DE UNA LACASA FÚNGICA CON MAYOR ESTABILIDAD OPERACIONAL	23
3. HIPÓTESIS.....	28
4. OBJETIVOS	28
5. MATERIAL Y MÉTODOS	29
5.1 REACTIVOS Y EQUIPOS.....	29
5.2 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	29
5.3 OBTENCIÓN DE LA VARIANTE F357L/F413A	30
5.3.1 MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA.....	32
5.3.2 TRANSFORMACIÓN DEL PLÁSMIDO F357L/F413A EN <i>P. PASTORIS</i>	32
5.4 EXPRESIÓN DE LA LACASA DE <i>C. GALLICA</i> EN <i>P. PASTORIS</i>	34
5.5 PURIFICACIÓN DE LA ENZIMA	35
5.6 ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	35
5.7 ESTABILIDAD EN SOLVENTES.....	36
5.8 ESTABILIDAD TÉRMICA	36
5.9 MÉTODO DE ANÁLISIS DE LOS BISFENOLES POR HPLC	37
5.10 ESTABILIDAD OPERACIONAL CON BPA	37
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
6.1 CARACTERIZACIÓN DE LA VARIANTE F357L/F413.....	38
6.1.1 PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA.....	38
6.1.2 CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LA LACASA EN LA OXIDACIÓN DE SIRINGALDAZINA	43
6.1.3 PH ÓPTIMO DE ACTIVIDAD EN LA OXIDACIÓN DE SIRINGALDAZINA, 2,6 DIMETOXIFENOL Y BPA	45
6.1.4 ESTABILIDAD TÉRMICA	49

6.2	CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE LAS VARIANTES DURANTE LA OXIDACIÓN DE LOS BISFENOLES	51
6.2.1	ESTABILIDAD EN SOLVENTES.....	55
6.3	ESTABILIDAD OPERACIONAL DURANTE LA OXIDACIÓN DE BPA	60
	61
7.	<u>CONCLUSIONES</u>	64
8.	<u>PERSPECTIVAS</u>	65
9.	<u>REFERENCIAS</u>	66
10.	<u>ANEXOS</u>	72
	ANEXO 1. SECUENCIACIÓN DEL GEN DE LA VARIANTE F357L/F413A DE LA LACASA DE <i>C. GALLICA</i>	72
	ANEXO 3. PRODUCCIÓN DE LA LACASA RECOMBINANTE DE <i>C. GALLICA</i> Y SUS VARIANTES F413A Y F357L/F413A	75
	ANEXO 4. PURIFICACIÓN EN <i>PICHIA PASTORIS</i> DE LA LACASA RECOMBINANTE DE <i>C. GALLICA</i> Y SUS VARIANTES F357L/F413A	76
	ANEXO 5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	79
	ANEXO 6. POSTER, VI LATIN AMERICAN PROTEIN SOCIETY MEETING, OCTOBER 2019.	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos bisfenoles y estrógenos. _____	11
Figura 2. Actividad estrogénica relativa de distintos perturbadores endócrinos. _____	12
Figura 3. Representación de los procesos de transferencia electrónica en el sitio activo de las lacasas fúngicas. _____	17
Figura 4. Sitios T1 de las lacasas de: a) <i>B. subtilis</i> (PDB: 2X88) con la metionina axial y b) <i>T. versicolor</i> con una fenilalanina reemplazando el 4 ligando (metionina) (PDB ID: IGYC) (Jones y Solomon, 2015). _____	19
Figura 5. Reacción de oxidación de fenoles catalizada por la lacasa. _____	23
Figura 6. Sitio activo (T1) de la lacasa de <i>Corioloopsis gallica</i> . _____	26
Figura 7. Plásmido rLcCg. Construcción hecha a partir del vector pPICZ b, el factor α modificado y el gen de la lacasa de <i>C. gallica</i> _____	31
Figura 8. Corroboración de la completa linealización del plásmido F357L/F413A con la enzima <i>Sac I</i> . _____	33
Figura 9. Análisis por la enzima de restricción <i>EcoRI</i> de la identidad del F357L/F413A Carril 1. Marcador de peso 1kb. Carril 2 plásmido superenrollado, Carril 3 Digestión con <i>EcoRI</i> _____	40
Figura 10. Colonias candidatas cultivadas en medio MM adicionado con CuSO_4 y ABTS, En números se muestra las colonias que oxidaron el ABTS. _____	40
Figura 11. Actividad enzimática de las colonias seleccionadas en medio BMM. Se seleccionó la cepa N36 por ser la que produjo mayor actividad volumétrica de la lacasa. _____	41
Figura 12. Crecimiento de la cepa productora de la variante F357L/F413A (naranja) y actividad enzimática (azul). _____	42
Figura 13. Tren de purificación de la variante F357L/F413A. Gel de electroforesis SDS. _____	43
Figura 14. Cinética de actividad de la variante F357L/F413A en la oxidación de siringaldazina. _____	44
Figura 15. Vista ortogonal del sitio de unión de la xilidina con la lacasa de <i>Trametes versicolor</i> . _____	46
Figura 16. Composición del sitio activo de la lacasa parental rLcCg (izquierda) y la variante F357L/F413A (derecha). _____	47
Figura 17. Perfiles de pH óptimo de actividad de la lacasa parental rLcCg (azul) y la variante F357L/F413A (rojo) en la oxidación de 2,6 DMP (izquierda) y siringaldazina (derecha). _____	48
Figura 18. Perfil de pH óptimo de actividad de la variante F413A en la oxidación BPA. _____	48
Figura 19. Estabilidad térmica de la lacasa de <i>C. gallica</i> y las lacasa recombinante y sus variantes F413A y F357L/F413A. Monitoreo de actividad durante 70 min de incubación. _____	49
Figura 20. Eficiencia catalítica de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes en la oxidación de bisfenoles, en 20% de acetonitrilo. _____	53
Figura 21. Velocidad específica de la lacasa de <i>Corioloopsis gallica</i> en la oxidación de BPA en 20% de ACN. _____	55
Figura 22. Estabilidad de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes en diferentes concentraciones de acetonitrilo. Monitoreo de actividad enzimática máxima durante 1 hora de incubación. _____	56
Figura 23. Estabilidad en solventes de la variante F357L/F413A de la lacasa de <i>C. gallica</i> . Monitoreo de actividad durante una hora. _____	57
Figura 24. Cinética de actividad de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes en la oxidación de BPA en 5% de DMSO. _____	59
Figura 25. Estabilidad operacional de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes. Consumo de BPA (izquierda) y actividad residual (derecha) de las variantes durante la oxidación de BPA. _____	61
Figura 26. Alineamiento de la secuencia de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y la variante F357L/F413A. Figura elaborada con el software Serial Cloner. _____	74
Figura 27. Crecimiento y actividad enzimática de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes en medio BMM. _____	76
Figura 28. Actividad específica de las fracciones obtenidas durante la purificación de la lacasa recombinante utilizando por cromatografía de intercambio aniónico débil utilizando una columna DEAE marca Biorad. _____	77
Figura 29. Actividad específica de las fracciones obtenidas durante la purificación de la lacasa recombinante por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephadex G75 marca Biorad. _____	78
Figura 30. Diagrama de cajas de la oxidación de los bisfenoles catalizada por las enzimas estudiadas (rLcCg, F413A y F357L/F413A). _____	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura y peso molecular de los bisfenoles que se estudiaron en este proyecto	27
Tabla 2. Medio LB bajo en sales para la selección de las transformantes DH5 alfa	29
Tabla 3. Medio YPD para el crecimiento de las células X33 para el crecimiento y almacenaje de la cepa	30
Tabla 4. Medio BMM para la expresión de la lacasa en células X33	30
Tabla 5. Medio BMGY para el crecimiento de X33 para la expresión de la lacasa	30
Tabla 6. Descripción de los plásmidos utilizados durante este estudio.	31
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados durante el proceso de obtención de la variante F357L/F413A.	32
Tabla 8. Composición de la reacción de linealización del plásmido con Sac I	33
Tabla 9. Gradiente de concentración de acetonitrilo para el análisis de los bisfenoles A, B y F por HPLC.	37
Tabla 10. Constantes cinéticas de actividad de las variantes en la oxidación de siringaldazina.	44
Tabla 11. Parámetros observados de inactivación térmica de la lacasa recombinante rLcCg y sus variantes F413A y F357L/F413A.	50
Tabla 12. Eficiencia catalítica de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes en la oxidación de bisfenoles, en presencia de 20% de acetonitrilo	53
Tabla 13. Parámetros de inactivación de la variante de la lacasa de <i>C. gallica</i> F357L/F413A al incubarla en presencia de acetonitrilo.	57
Tabla 14. Parámetros de inactivación de la variante F357L/F413A de la lacasa de <i>C. gallica</i> al incubarla en diferentes concentraciones de solventes orgánicos.	58
Tabla 15. Parámetros cinéticos de actividad de la lacasa de <i>C. gallica</i> y las variantes en la oxidación de BPA en 5% de DMSO.	59
Tabla 16. Rendimiento de la lacasa recombinante de <i>C. gallica</i> y sus variantes durante la oxidación de BPA.	61
Tabla 17. Rendimientos de la lacasa nativa de <i>C. gallica</i> , la lacasa recombinante y sus variantes durante la oxidación de 4-metoxifenol (Avelar et al., 2018).	62
Tabla 18. Tren de purificación de la variante F413A.	78

ABREVIATURAS

2,6 DMP	2,6 Dimetoxifenol
Å	Ångstrom ($1 \times 10^{-10} \text{ m}$)
ABTS	Ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ACN	Acetonitrilo
BPs	Bisfenoles
BSA	Albúmina de suero bovino
DEAE	Dietil aminoetil celulosa
DM	Dinámica Molecular
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Receptores endócrinos
EtOH	Etanol
HBT	1-hidroxibenzotriazol
kDa	kilo daltons
LcCg	Lacasa de <i>Coriopsis gallica</i>
MCO	Multicobre oxidasa
MetOH	Metanol
MM	Mecánica Cuántica
PE	Perturbador endócrino
QM	Mecánica Molecular
rLcCg	Lacasa recombinante de <i>Coriopsis gallica</i>
SGZ	Siringaldazina
TNC	Cluster trinuclear de cobre
TTN	Número total de recambio

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que enfrenta el mundo hoy en día es la contaminación del suelo, el agua y el aire por sustancias químicas tóxicas. Millones de toneladas de contaminantes tóxicos y peligrosos se producen anualmente en todo el mundo y solo del 10 al 15% de éstos se eliminan de forma segura. La producción de compuestos sintéticos y su aplicación es esencial, sin embargo, esto involucra descargas indeseables de compuestos orgánicos recalcitrantes y poco biodegradables, como aminas aromáticas, fenoles, pesticidas, polihidroxibifenilos y colorantes (Camarero *et al.*, 2012). Por los riesgos que representan estos compuestos, se ha puesto atención en su eliminación. Entre las estrategias estudiadas utilizadas se encuentran la biorremediación con hongos y el uso de enzimas purificadas.

1.1 Los bisfenoles como perturbadores endócrinos

Los perturbadores endócrinos (PEs) son catalogados como contaminantes emergentes en aguas residuales. Son definidos por la Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en inglés) como aquellos agentes exógenos que intervienen en la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción o eliminación de hormonas presentes en el cuerpo (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

El grupo de moléculas que son identificadas como perturbadores endócrinos es muy heterogéneo e incluye compuestos derivados de procesos industriales, agrícolas y domésticos; como los ftalatos (usados en la fabricación de plásticos), alquilfenoles (presentes en detergentes y surfactantes), bifenilos policlorados y polibromados, dioxinas, pesticidas organoclorados y organohalógenos (utilizados como retardantes de la llama). Estas moléculas tienen una amplia variedad de estructuras químicas, pero todas tienen la capacidad de mimetizar la acción de algunas hormonas. Estos compuestos se unen a los receptores de hormonas por lo cual,

exhiben efectos estrogénicos o androgénicos, mientras que otros alteran las hormonas tiroideas u otras funciones fisiológicas (Husain & Qayyum, 2013).

Un conjunto de compuestos pertenecientes a los PE que reciben gran atención son los bisfenoles, compuestos utilizados ampliamente en la industria. El bisfenol A (BPA) es el más popular y representativo de este grupo debido a su alta producción y uso (Jurgen Svava, Norbert Weferling, 2012).

En 1997, J. E. Biles y colaboradores determinaron la presencia de bisfenol A (BPA) en latas de fórmula para bebés y como consecuencia de este estudio en el 2010, la FDA (La Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos de América, Food Drug Administration) prohibió el uso de este compuesto en dichos productos, mientras que el gobierno canadiense también prohibió la importación y venta de biberones de policarbonato que contenían BPA. En el 2011, la Unión Europea de igual forma prohibió el uso de BPA en biberones (Biles et al., 1997).

Los efectos adversos en la salud humana y la regulación de la producción de bisfenol A provocaron el uso de compuestos estructuralmente similares al BPA (Belfroid et al., 2002); hoy en día se han documentado un total de 16 análogos de este compuesto para aplicaciones industriales. En los últimos años, la demanda y la capacidad de producción de los bisfenoles está creciendo rápidamente en China, principal productor a nivel mundial, por lo cual estos compuestos se han convertido en una gran problemática (Zhang et al., 2019).

Los bisfenoles son compuestos químicos con dos hidroxifenilos funcionales, estos son ampliamente utilizados en la fabricación de plástico de policarbonato, resinas epoxi, revestimiento de latas y papel térmico (Figura 1). El BPF (4,4'-metilendifenol), BPS (4-hidroxifenil sulfona) y BPAF (4,4'-hexafluoroisopropilideno) están entre los principales sustitutos del BPA para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas. El BPF tiene una amplia gama de aplicaciones tales como lacas, barnices, revestimientos, adhesivos plásticos y tuberías de agua, así como en selladores dentales, prótesis orales, sustitutos de tejidos y recubrimientos para el

envasado de alimentos. El BPS se usa comúnmente en pegamentos epoxídicos, recubrimientos de latas y papeles térmicos para recibos y como aditivo en tintes y agentes bronceadores. El BPAF se utiliza como reticulante en fluoroelastómeros, electrónica, fibras ópticas y como un monómero de alto rendimiento para poliimidas, poliamidas, poliésteres, copolímeros de policarbonato y otros polímeros especiales (Chen et al., 2002).

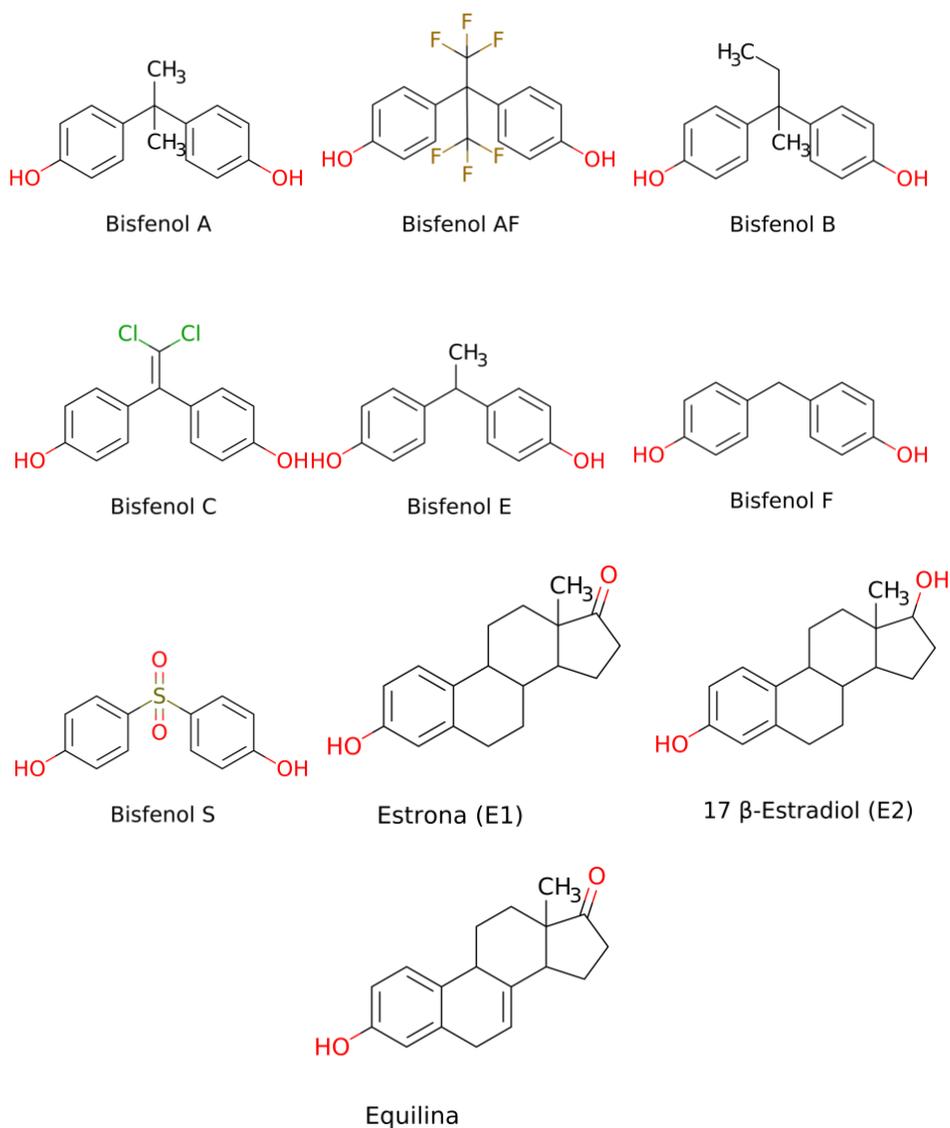


Figura 1. Estructura química de algunos bisfenoles y estrógenos.

Aunque se pensaba que estos análogos eran menos tóxicos que el BPA, investigaciones recientes han demostrado que estos tienen efectos adversos similares o mayores que el BPA (Rochester & Bolden, 2015). En la Fig. 2 se muestra la actividad estrogénica relativa de algunos bisfenoles y estrógenos. El efecto de los bisfenoles sobre los receptores de estrógenos ($ER\alpha$ y $ER\beta$) fue estudiado por medio de ensayos basados en microscopía donde identificaron que los bisfenoles son capaces de unirse a estos receptores (Stossi et al., 2014).

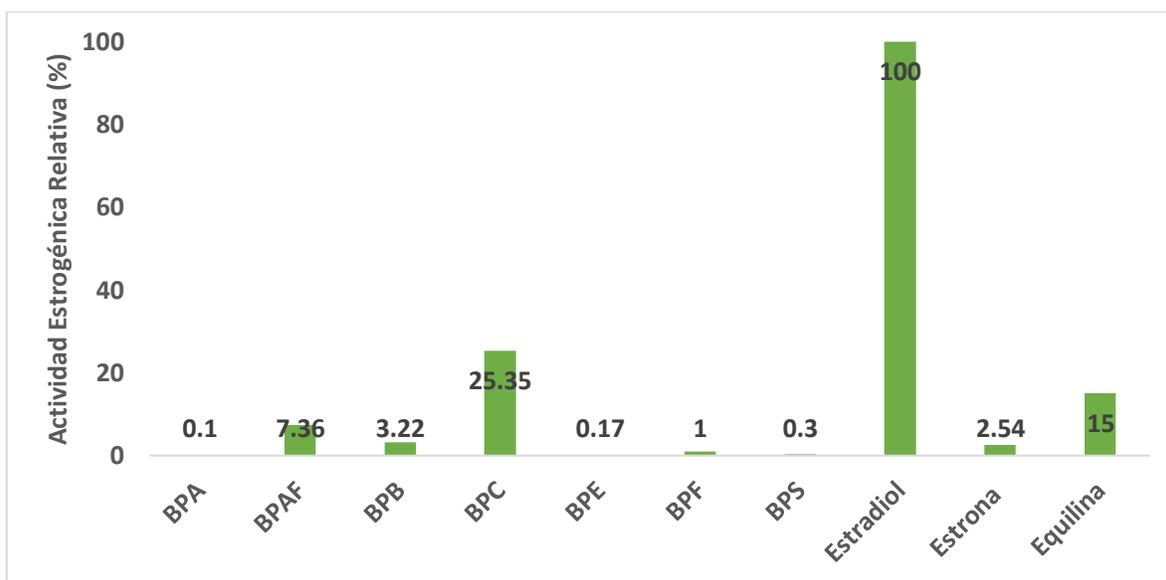


Figura 2. Actividad estrogénica relativa de distintos perturbadores endócrinos.

(D. Chen et al., 2016, Stossi et al., 2014)

1.1.1 Mecanismo de acción

Los mecanismos de acción de estos compuestos pueden ser desde: 1) interrumpir la acción de las enzimas involucradas en la esteroidogénesis, 2) pueden interferir en el transporte de hormonas y 3) pueden unirse con los sitios activos de la globulina fijadora de hormonas sexuales, compitiendo así con los estrógenos endógenos. El modo de acción más estudiado de los perturbadores endócrinos es su capacidad para unirse y activar los receptores endocrinos (ER, por sus siglas en inglés) en el

tejido blanco. Sin embargo, es importante destacar que los dos ER (α y β) se encuentran en distintos tejidos como las glándulas mamarias, huesos, el cerebro y el sistema vascular, tanto en hombres como en mujeres (Yang et al., 2015). Por lo tanto, debido a que los receptores endócrinos (ER) α y β muestran una distribución tisular diferente y funciones fisiológicas distintas, los perturbadores endócrinos muestran una actividad agonista o antagonista dependiendo el tejido con el que interactúan.

Estas interacciones entre los ER y los coactivadores/corepresores son pasos críticos en la regulación transcripcional mediada por ER y, en consecuencia, la modulación de la expresión de los genes diana de ER. Los PE pueden inducir cambios conformacionales distintos en la estructura terciaria de los ER (Yang et al., 2015).

Se ha reportado que los bisfenoles AF, B, E, F y S también poseen un efecto antiandrogénico similar al que ejerce el BPA, e incluso reportan que el BPAF posee mayor afinidad por los receptores de estrógenos (ER) que el BPA (Rochester & Bolden, 2015).

1.1.2 Presencia y persistencia en el ambiente

La contaminación del ambiente acuático por los PE se ha convertido en una preocupación importante debido a la evidencia creciente sobre los efectos adversos sobre los seres vivos causados por la exposición de estos compuestos sobre los seres vivos. El medio ambiente acuático (arroyos, ríos, aguas marinas e incluso subterráneas) es susceptible a los efectos de la mayoría de los contaminantes (Bolong et al., 2009).

Los perturbadores endócrinos (PE) ingresan al medio ambiente, específicamente en las aguas, a través de una gran variedad de vías como aguas residuales

municipales, industriales y vertederos. Una de las principales fuentes de estos contaminantes son las aguas no tratadas y los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales (Owczarek et al., 2018).

Se ha demostrado la presencia de bisfenoles en diversos países. En China se detectaron BPA (34.9 ng/L), BPAF (10.8 ng/L), BPB (14.3 ng/L), BPE (6.2 ng/L), BPF (12.6 ng/L) y BPS (5.2 ng/L) en aguas residuales y agua potable (Zhang et al., 2019). En Eslovenia se observó una alta frecuencia de bisfenoles principalmente en aguas residuales de empresas de limpieza, textiles y de alimentos (Česen et al., 2018). De igual forma, en Xochimilco, México, se detectó la presencia de BPA y otros PE en concentraciones de nanogramos por litro provenientes de aguas residuales agrícolas y urbanas (Díaz-Torres et al., 2013).

La persistencia de estas sustancias es evidente. En China se ha estudiado esta persistencia, y se determinó el rango de biodegradabilidad de algunos bisfenoles en el agua de mar que muestran el siguiente orden de degradación: BPF >> BPA > BPP > BPE > BPB >> BPS. Mientras que en condiciones anaeróbicas (en sedimentos), el rango de biodegradabilidad fue el siguiente: BPF > BPS, BPA > BPE > BPB. El BPF se degrada a una velocidad mayor que el BPA en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, mientras que el BPS, el BPB y el BPP son más resistentes a la biodegradación que el BPA en ambientes acuáticos. Los bisfenoles son en general, más persistentes en los sedimentos (vida media $t_{1/2}$ = 135-1621 días) que en el agua ($t_{1/2}$ = 15–180 días). Se estimó que el BPAF es el más persistente de los otros bisfenoles (D. Chen et al., 2016).

La problemática que representa la presencia y persistencia de los PE ha propiciado el estudio de la exposición a estos compuestos en especies marinas y terrestres. Los efectos que los PE causan a los organismos son diversos y han sido analizados usando organismos modelo e incrementando las concentraciones del perturbador endócrino para observar el efecto.

1.1.3 Efecto de los PE en diferentes especies

A continuación, se describen algunos efectos de la presencia de bisfenoles en diferentes especies por la presencia de bisfenoles.

Se ha demostrado que invertebrados como larvas y copépodos muestran una inhibición del crecimiento a concentraciones bajas de BPA (0.08 y 0.1 $\mu\text{g/L}$ respectivamente); cuando las concentraciones son más elevadas (11.4 $\mu\text{g/L}$ BPA por una hora) causa metamorfosis prematura de las larvas (Jacobs et al., 2012). La exposición con BPA en una dosis de 2.28 $\mu\text{g/L}$ durante 9 días puede inhibir la metamorfosis de distintas especies de ranas. La metamorfosis es controlada por la circulación de hormonas tiroideas, lo que sugiere que el BPA también puede actuar como antagonista de estas hormonas (Flint et al., 2012)

En el caso de los peces, se ha estudiado que la presencia de bisfenoles (80 $\mu\text{g/L}$) altera la actividad de los receptores de estrógenos teniendo implicaciones en la reproducción y desarrollo del pez arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). De igual forma, los embriones machos de pez cebra expuestos a 228 $\mu\text{g/L}$ de BPA muestran señales de feminización de cerebros, es decir, muestran niveles más altos de estrógenos que presentan los embriones femeninos (Flint et al., 2012). En reptiles, como los caimanes, La exposición a estos compuestos impacta en su desarrollo, similar a lo observado después de la exposición al estradiol, como la reversión del sexo y la alteración gonadal (Stoker et al., 2003).

La presencia de sustancias que perturban el sistema endócrino de organismos acuáticos genera un gran problema ambiental, por lo que es de vital importancia estudiar la degradación de estos compuestos. Debido a que los PE se encuentran en bajas concentraciones en el ambiente, el estudio de enzimas oxidativas de estos compuestos resultan de gran interés por las altas afinidades que algunas de ellas pueden mostrar por compuestos orgánicos (del orden de μM) (Reddy, 1995). De

esta manera, es interesante estudiar la transformación enzimática de estos y otros contaminantes, con el objetivo de evaluar su eliminación.

1.2 Lacasas: Estructura y características

Las lacasas son enzimas con gran potencial biotecnológico debido a su capacidad de oxidar compuestos orgánicos como mono, poli, amino y metoxifenoles empleando oxígeno como aceptor de electrones, y produciendo agua como subproducto (Česen et al., 2018). Son enzimas pertenecientes a la familia de las oxidasas multicobre (MCOs), usadas para diversas aplicaciones biotecnológicas, como en las industrias del papel y de textiles, en la biorremediación de suelo, tratamiento de aguas, entre otras (Guimarães et al., 2017) (Cañas & Camarero, 2010).

Las lacasas fueron descubiertas en 1883 por Yoshida, quien las identificó en el árbol de la laca *Rhus vernicifera* (Society & Yoshida, 1883). Posteriormente se encontró que también eran producidas por hongos de la podredumbre blanca al igual que algunas especies de bacterias e insectos (Morozova et al., 2007).

Estas enzimas son típicamente glicoproteínas monoméricas, con un peso molecular entre 50-130 kDa; los carbohidratos presentes en estas enzimas son principalmente manosas, N-acetilglucosaminas y galactosas que pueden constituir hasta el 45% del peso de la proteína, en el caso de las encontradas en plantas. Las lacasas fúngicas poseen un bajo contenido de carbohidratos, aproximadamente del 10 al 20% con respecto a su peso molecular, en comparación con las encontradas en otras especies, como plantas, bacterias e insectos (Morozova et al., 2007).

Las lacasas actúan sobre una gran variedad de compuestos recalcitrantes como: herbicidas, pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos, fenoles clorados, bisfenoles y otros compuestos estructuralmente similares a la lignina (Torres-Duarte et al., 2012).

La amplia especificidad de estas enzimas las hace excelentes candidatas para catalizar la oxidación de contaminantes presentes en el ambiente como los bisfenoles. Una de las grandes ventajas de las lacasas es que solamente requieren oxígeno para catalizar la oxidación de los sustratos, a diferencia de otras enzimas como las peroxidasas, que requieren peróxido de hidrógeno (Ramírez-Cavazos et al., 2014).

Aunque las lacasas pueden catalizar la oxidación de una amplia gama de sustratos, está limitada por su potencial redox (0.3 a 0.8 V), debido a que solo pueden catalizar la oxidación de compuestos que poseen potenciales redox menores al de la enzima.

1.2.1 Mecanismo de reacción y potencial redox

Estas enzimas poseen en su estructura 4 iones de cobre que conforman dos sitios, T1 y T2/T3, en los que dichos iones son clasificados de acuerdo a sus características espectroscópicas. En el estado oxidado, el cobre Tipo 1 (T1) muestra una intensa absorción a 600 nm debido a una transferencia de carga ligando-metal entre el Cu^{2+} y el cisteinato al que se encuentra enlazado (Jones & Solomon, 2015).

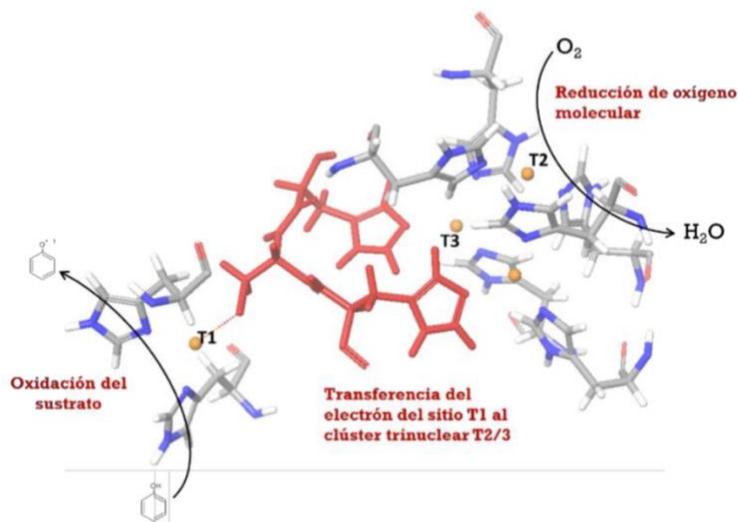


Figura 3. Representación de los procesos de transferencia electrónica en el sitio activo de las lacasas fúngicas.

En rojo se muestra el motivo conservado de His-Cys-His Fuente: Avelar, Olvera, Aceves-Zamudio, Folch, & Ayala, 2017

El ion cobre del sitio T1 está coordinado por dos histidinas y una cisteína. Los iones cobres en los sitios T2 y T3 están arreglados en un cluster trinuclear (TNC) aproximadamente a 13 Å de distancia del Cu²⁺ T1. El sitio T3 es un centro binuclear de cobre y el sitio T2 es mononuclear. El sitio T1 está conectado con los dos iones cobre presentes en el sitio T3 por medio de un motivo conservado His-Cys-His (ver [Fig. 3](#)). El cluster T2/T3 está localizado entre ellos aproximadamente 4 Å, ambos sitios tienen ocho histidinas como ligandos (Xu et al., 1999).

La transferencia de electrones del sustrato hacia el oxígeno se lleva a cabo en dos pasos. Primero se abstrae un electrón del sustrato en el sitio T1; éste se transfiere por medio de una secuencia conservada de His-Cys-His hacia el TNC en donde el oxígeno molecular (O₂) se reduce formando agua (H₂O) como subproducto (Jones & Solomon, 2015).

El potencial redox es una característica importante de las lacasas debido a que está directamente relacionado con la energía requerida para remover un electrón, constituyendo una de las características fundamentales de estas enzimas (Arregui et al., 2019).

Muchos factores influyen en el potencial de reducción de los sitios metálicos de las proteínas, en el caso de las MCOs es la presencia o ausencia del ligando axial de metionina ([Figura 4](#)).

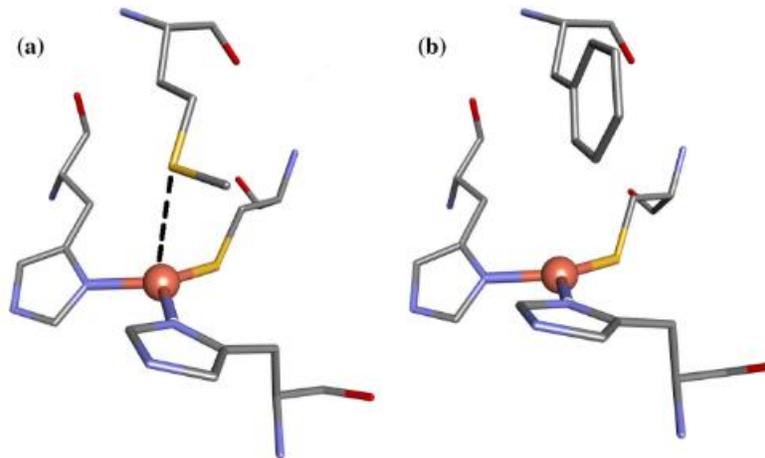


Figura 4. Sitios T1 de las lacasas de: a) *B. subtilis* (PDB: 2X88) con la metionina axial y b) *T. versicolor* con una fenilalanina reemplazando el 4 ligando (metionina) (PDB ID: IGYC) (Jones y Solomon, 2015).

El sitio T1 está coordinado por un mínimo de dos histidinas y una cisteína. En muchas MCOs, existe un cuarto ligando (C4), una metionina que se une axialmente como se muestra en la [Figura 4a](#). Este enlace Cu-S(Met) es más largo y débil que el de los otros tres ligandos. Esta estructura se mantiene en lacasas de bacterias y de plantas. Alternativamente, existe una estructura de geometría trigonal planar (3C) en las lacasas fúngicas ([Fig. 4b](#)), donde el residuo axial es hidrofóbico, como fenilalanina o leucina. Los potenciales de reducción (E^0) de las lacasas oscila entre 400 a 800 mV (Jones & Solomon, 2015).

Las lacasas se dividen en tres grupos de acuerdo con su potencial redox: de alto, medio y bajo potencial redox. Las de bajo potencial redox incluyen enzimas con valores por debajo de 430 mV como la encontradas en plantas, potencial medio 470-710 mV como las encontradas en ascomicetos y las de alto potencial arriba de 710 mV como las lacasas encontradas en basidiomicetos (Kaczmarek et al., 2017).

1.2.2 Las lacasas fúngicas

Las lacasas de hongos reciben una atención considerable debido a su participación en la transformación de una variedad de compuestos fenólicos. Hasta ahora, más

de 100 enzimas se han purificado a partir de cultivos de hongos y se han caracterizado en términos de sus propiedades bioquímicas y catalíticas. La mayoría de las especies de hongos ligninolíticos producen constitutivamente al menos una isoenzima de lacasa. El hecho de que solo requieran oxígeno molecular para la catálisis las hace adecuadas para aplicaciones biotecnológicas como la transformación de compuestos xenobióticos (Petr Baldrian, 2006).

Típicamente, son proteínas de aproximadamente 60 a 70 kDa con un punto isoeléctrico ácido de alrededor de 4.0 (Petr Baldrian, 2006).

Las lacasas fúngicas son extracelulares debido a su función biológica, participan en la degradación de la lignocelulosa presente en los árboles, esporulación, producción de pigmento y defensa contra estrés (Thurston, 1994; Wood, 1980) . El polímero de lignina es altamente resistente a degradación química y biológica, sin embargo, las lacasas fúngicas especialmente las nombradas de la podredumbre blanca, al poseer un potencial redox cercano a 800 mV, tienen la capacidad de abstraer los electrones de la lignina provocando su degradación (Ruiz-Dueñas & Martínez, 2009).

Poseen un grado de glicosilación que generalmente oscila entre el 10% y el 25% del peso de la proteína y se compone principalmente de carbohidratos que incluyen arabinosa, xilosa, manosa, galactosa y glucosa (Marbach et al., 1984). Limura y colaboradores en 1993 propusieron que además del papel estructural, la glicosilación también puede participar en la protección de la lacasa contra la degradación proteolítica (Yoshitake et al., 1993).

Sin embargo, su aplicación en la biorremediación y el tratamiento del agua a gran escala están limitados por la composición compleja de los medios contaminados que puede afectar la estabilidad, recuperación y reciclaje de proteínas. Por lo tanto, se ha estudiado que manipulando propiedades de las enzimas en general (pH, temperatura, estabilidad operacional) y de las lacasas en particular, ayudará en el

desarrollo de enzimas más robustas, generando y/o descubriendo nuevas lacasas que se puedan utilizar en condiciones complejas para desarrollar estrategias y procesos novedosos para lograr su aplicación eficiente en tratamiento de agua contaminada (Arregui et al., 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Degradación de PE por lacasas

La remoción de contaminantes representa un gran desafío para la biotecnología, esta biorremediación se espera que sea eficiente, de bajo costo y segura para el medio ambiente. La degradación biológica de compuestos aromáticos ha recibido gran atención debido a los grandes problemas que estos compuestos provocan a diferentes especies.

Se han propuesto diferentes métodos para remover PE como los bisfenoles. La transformación por oxidorreductasas parece ser una de las más efectivas. Las lacasas son enzimas prometedoras en la transformación de estos compuestos, debido a que solo necesitan oxígeno como co-sustrato, produciendo radicales libres y agua (Torres-Duarte et al., 2012).

Muchos estudios se han realizado para evaluar la degradación de los PE con lacasas, ya sea utilizándolas en extracto (Sei et al., 2008), inmovilizadas (Nicolucci et al., 2011) o en conjunto con otras oxidorreductasas (Cabana et al., 2007). A lo largo de estos antecedentes se describirán algunos ejemplos.

En el 2018, Beck y colaboradores estudiaron la oxidación de diferentes PE por la lacasa de *Trametes versicolor*, principalmente la formación del producto precipitado de esta reacción; algunos PE, como el etinilestradiol, el estradiol y el BPA, formaban precipitados de sus productos, sin embargo, cuando se realizaba la reacción con

BPS no ocurría tal evento. La espectrometría de masas con ionización por electrospray relevó que los productos de la oxidación eran oligómeros, esto fue consistente con el mecanismo acción de las lacasas, puesto que produce radicales libres que posteriormente polimerizan sin intervención de la enzima (Beck et al., 2018).

Nicolucci y colaboradores en el 2011 estudiaron la degradación de algunos bisfenoles con actividad endócrina como el BPA, BPB, BPF y TCVPA (tetracloro bisfenol A) mediante dos enzimas, una lacasa y una tirosinasa, inmovilizadas en perlas de poliacrilonitrilo. Los resultados que obtuvieron demostraron que tanto la lacasa de *Trametes versicolor* como la tirosinasa de manera independiente podían oxidar los bisfenoles propuestos en este estudio. En particular, el BPF es el sustrato mayormente oxidado hacia el cual las enzimas tienen mayor capacidad de biorremediación (Nicolucci et al., 2011).

Otro estudio realizado en la Universidad de Osaka, Japón, evaluó la remoción de 11 PE por 5 lacasas fúngicas. Entre los principales PE evaluados en este estudio fueron la estrona, estradiol, estriol, BPA, BPB, BPE, BPF y el BPS. Para la mayoría de los PE no hubo necesidad de utilizar un mediador en la reacción para su degradación, sin embargo, para el BPS no resultó oxidado por ninguna de las 5 lacasas catalizó la oxidación, por lo cual se utilizó 2,2 ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS) y 1-hidroxibenzotriazol (HBT) como mediadores, dando como resultado una mejor degradación del BPS (aproximadamente del 90%) cuando se utilizaba ABTS en la reacción. Los autores concluyeron que el tratamiento con lacasas es una de las opciones atractivas para la eliminación de una gran variedad de PE, especialmente en un medio acuoso (Sei et al., 2008).

También se ha estudiado la oxidación de algunos PE por la lacasa del basidiomiceto *Coriolopsis gallica*, que es la enzima en la cual se basan las variantes que se estudiarán a lo largo de este trabajo. En el 2012 Torres Duarte y colaboradores

utilizaron esta enzima para transformar el 17 β -estradiol, BPA, nonilfenol (NP) y el triclosán (TCS). La enzima fue capaz de transformarlos eficientemente en polímeros. Los productos de la oxidación de los PE no tuvieron actividad estrogénica ya que no tenían afinidad por los receptores, en un modelo de pez cebra (Torres-Duarte et al., 2012).

Por tanto, el uso de lacasas puede ser una alternativa para la remoción de los PE ya que al polimerizar éstos pueden ser fácilmente eliminados debido a que el polímero puede ser eliminado por sedimentación, y también con la ventaja de que los productos de su oxidación no tienen actividad estrogénica.

2.2 Obtención de una lacasa fúngica con mayor estabilidad operacional

La actividad enzimática de las lacasas disminuye rápidamente durante la oxidación de diferentes fenoles, este fenómeno se describe como inactivación, la que está relacionada con la producción de radicales libres (Ramirez-Ramirez, 2014).

La reacción general que catalizan estas enzimas consiste en la oxidación de cuatro moléculas de un compuesto fenólico con la reducción conjunta de una molécula de oxígeno a dos moléculas de agua (Fig. 5) (Jones & Solomon, 2015).

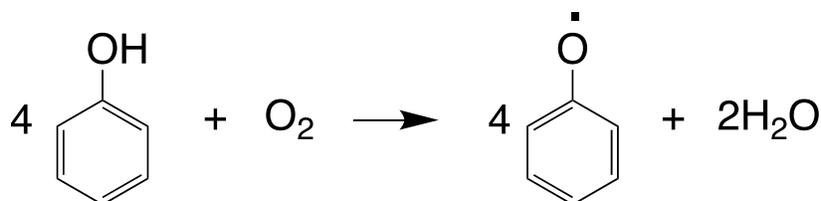


Figura 5. Reacción de oxidación de fenoles catalizada por la lacasa.

Uno de los productos de la oxidación es un radical libre fenoxilo. Esta especie se considera altamente reactiva y la inactivación de la lacasa involucra una reacción con estos radicales libres producidos durante la catálisis, donde el potencial redox

del sustrato determina la velocidad de inactivación de la enzima (Ramirez-Ramirez, 2014).

En los últimos años, el potencial de las lacasas sobre una amplia gama de aplicaciones ha motivado el progreso de estudios experimentales y computacionales. Por ejemplo, se han desarrollado varias estrategias para aumentar la estabilidad operacional de las lacasas, como la evolución dirigida y diseño racional (Kunamneni et al., 2008). La evolución dirigida es un enfoque extremadamente poderoso para adaptar las enzimas para propósitos particulares de aplicación, imitando en el laboratorio los procesos clave de la evolución natural. La evolución dirigida no requiere previa conocimiento de la estructura de la proteína o mecanismo de reacción, pero requiere un esfuerzo de detección significativo para análisis de miles de clones. En el diseño racional de proteínas se realizan estudios computacionales usando algoritmos de predicción de estructura de proteínas, dinámica molecular (DM) y cálculos de mecánica cuántica / mecánica molecular (QM / MM) para ayudar al diseño de nuevas variantes al reducir el esfuerzo experimental requerido para obtener las propiedades deseadas (García-Guevara et al., 2016; Pardo et al., 2016).

(Cregg et al., 2000) Para facilitar el estudio de las proteínas, comúnmente se expresan heterológamente, es decir, en un organismo distinto. La expresión heteróloga de lacasas fúngicas se ha llevado a cabo en varios sistemas, aunque las levaduras y otros hongos han sido los más exitosos hasta la fecha para la expresión de este tipo de enzimas debido a su crecimiento rápido, la facilidad de manipulación de genes, su habilidad de secretar altas concentraciones de enzima y por las modificaciones post-traduccionales que le pueden brindar a la enzima (Cregg et al., 2000; Giardina et al., 2010)

La lacasa del basidiomiceto *Corioloopsis gallica* (Ryvarden, 1972) presenta una de las eficiencias catalíticas más altas con sustratos estándar respecto a otras lacasas

como las encontradas en *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Calvo et al., 1998).

Esta lacasa tiene una masa molecular de 66 kDa (SDS-PAGE) o de 56.6 kDa (MALDI- TOF), un punto isoeléctrico de 3.4 y un 21% de glicosilación (Vandertol-Vanier et al., 2002). Posee dos unidades de N-acetilglucosamina unidas a residuos de asparagina (Asn75 y Asn 454) (PDB: 4A2E).

En el presente trabajo se utilizaron variantes de la lacasa de *Coriolopsis gallica* que se lograron expresar heterológamente en la levadura *Pichia pastoris* (Avelar, et al., 2017). Las variantes de la lacasa que se emplearon en este trabajo poseen mayor estabilidad operacional que la enzima parental, debido a que son menos susceptibles a la inactivación durante la reacción de oxidación de un fenol modelo (4-metoxifenol).

Dichas variantes fueron obtenidas a través de un estudio teórico en donde se emplearon herramientas de QM/MM (Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular) para predecir la susceptibilidad a oxidarse de residuos en la vecindad del sitio activo (ver Fig. 6). Los residuos más susceptibles a oxidación en la vecindad del sitio catalítico T1 se reemplazaron por residuos menos susceptibles elegidos mediante un alineamiento de secuencias con otras lacasas. Las mejores variantes fueron F357L y F413A que presentaron un aumento en el rendimiento en la oxidación de 4-metoxifenol de 1.9 y 2.6 veces respectivamente, en relación con la nativa (Avelar et al., 2018).

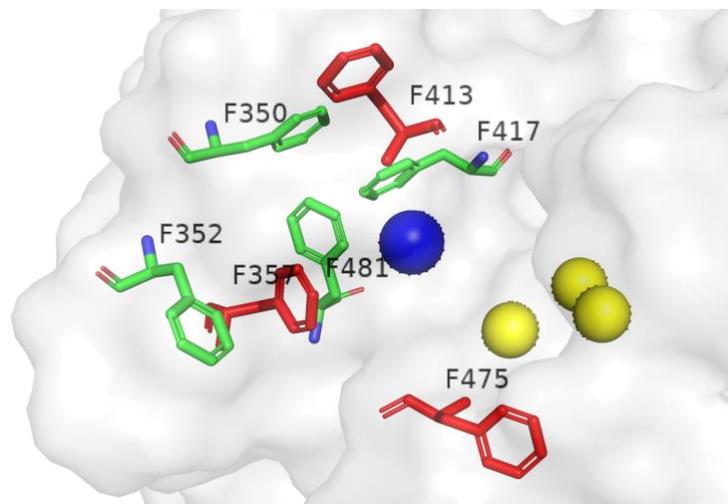


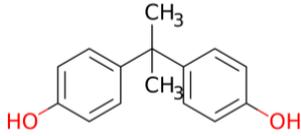
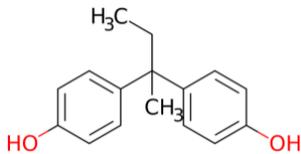
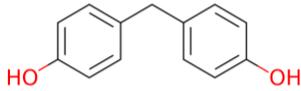
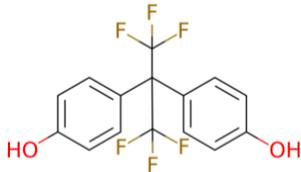
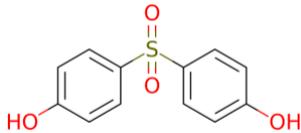
Figura 6. Sitio activo (T1) de la lacasa de *Corioloopsis gallica*.
En rojo se muestran los residuos susceptibles a oxidación.

Se obtuvo una variante nueva con las dos mutaciones presentes en las variantes sencillas, es decir, las mutaciones F357L y F413A; esto se realizará con el fin de estudiar su estabilidad operacional y la afinidad por sustratos hidrófobos debido a que al sustituir residuos de fenilalanina por residuos de naturaleza alifática podría verse reducida la afinidad por el sustrato.

El objetivo de este trabajo es estudiar el comportamiento cinético de actividad de la lacasa recombinante de *Corioloopsis gallica* (rLcG) y sus dos variantes (F413A y F357L/F413A) durante la degradación los bisfenoles BPA, BPAF, BPB, BPF y BPS (ver [Tabla 1](#)). El estudio cinético de actividad de estas variantes con alta estabilidad operacional puede brindar mayor conocimiento sobre los alcances de las metodologías moleculares y electrónicas que se utilizaron para su obtención.

Los PE fueron elegidos debido a su presencia y persistencia en el ambiente, como se describió en la sección 1.1.2.

Tabla 1. Estructura y peso molecular de los bisfenoles que se estudiaron en este proyecto

Compuesto	Abreviación	Estructura	Peso molecular
Bisfenol A	BPA		228.29
Bisfenol B	BPB		242.32
Bisfenol F	BPF		200.24
Bisfenol AF	BPAF		336.23
Bisfenol S	BPS		250.27

3. HIPÓTESIS

Las variantes F413A y F357L/F413A de la lacasa de *Coriolopsis gallica* podrán catalizar la oxidación de bisfenoles con mayor eficiencia operacional que la enzima parental.

4. OBJETIVOS

General

Estudiar la oxidación de una serie de bisfenoles catalizada por la enzima recombinante de la lacasa de *Coriolopsis gallica* y sus variantes F413A y F357L/F413A.

Específicos

- Caracterizar cinética y bioquímicamente la variante F357L/F413A con sustratos estándar.
- Determinar las diferencias en la afinidad por el sustrato a través de las constantes cinéticas de la reacción con los bisfenoles, entre la enzima parental y sus dos variantes.
- Comparar el rendimiento de las variantes (moles de sustrato convertido/mol de enzima) con la enzima parental.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y equipos

Todos los reactivos utilizados en los medios de cultivo fueron adquiridos de Difco (extracto de levadura, peptona, base nitrogenada de levadura y agar). El metanol y el acetonitrilo grado HPLC, así como la glucosa y todas las sales fueron de J.T. Baker. La biotina, el sorbitol, el acetonitrilo, el ácido succínico, el ácido cítrico, el 2,6 DMP, el DMSO, la alanina, la siringaldazina, el 17 β estradiol y todos los bisfenoles, se adquirieron de Sigma.

5.2 Cepas y medios de cultivo

La cepa de *E. coli* DH5 α fue donada por la Dra. Clarita Olvera. La obtención de células electrocompetentes de la cepa mencionada se realizó siguiendo el protocolo Elaboración de células electrocompetentes de *E. coli* (Gonzales et al., 2013). Dicha cepa fue transformada con el vector pPICZ B con el gen de la lacasa de *C. gallica* y las dos variantes de la enzima (F357L y F413A). Se cultivaron en medio LB bajo en sales con 50 μ g/mL de zeocina (Tabla 2).

La cepa X33 Mut⁺ de *Pichia pastoris* (Y.Yamada et al., 1956) fue adquirida de Invitrogen. Esta cepa fue utilizada para la expresión de las variantes de la lacasa de *C. gallica* siguiendo los protocolos del manual del vector pPICZ B (Thermo Fisher). Estas cepas fueron cultivadas en medio YPD, BMM y BMGY (Tabla 2, 3, 4 y 5).

Tabla 2. Medio LB bajo en sales para la selección de las transformantes DH5 alfa

Reactivo	Concentración (g/L)
Triptona	10
Cloruro de sodio	5
Extracto de levadura	5
Zeocina	0.05

Para cajas Petri se utilizan 15 g/L de agar

Tabla 3. Medio YPD para el crecimiento de las células X33 para el crecimiento y almacenaje de la cepa

Reactivo	Concentración (g/L)
Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Zeocina	0.1

Para cajas Petri se utilizan 20 g/L de agar

Tabla 4. Medio BMM para la expresión de la lacasa en células X33

Reactivo	Concentración
Fosfato de potasio	100 mM pH 6.0
YNB	13.4 g/L
Biotina	4×10^{-3} g/L
Metanol	5 mL/L
Sulfato de cobre	0.5 mM
L-Alanina	8 g/L

Tabla 5. Medio BMGY para el crecimiento de X33 para la expresión de la lacasa

Reactivo	Concentración
Extracto de levadura	1 %
Peptona	2 %
Buffer de fosfatos	100 mM pH 6.0
YNB	1.34 %
Biotina	4×10^{-5} %
Metanol	0.1 %

5.3 Obtención de la variante F357L/F413A

Al inicio de esta investigación ya se contaba con el plásmido para la expresión de la lacasa de *C. gallica* UAMH8260 y también los plásmidos de las mutantes sencillas F357L y F413A que se expresaron en *Pichia pastoris* (Avelar et al., 2018). Se diseñó una construcción en la que el gen LcCg se introdujo en el vector de expresión pPICZ B para *P. pastoris*, bajo el promotor de la enzima alcohol oxidasa (AOX1) y utilizando como péptido señal al factor α de *S. cerevisiae* modificado genéticamente por evolución dirigida por otro grupo de trabajo (Camarero et al. 2012); la construcción denominada α -fLcCg-pPICZB (Fig. 7) fue sintetizada comercialmente por la compañía GenScript.

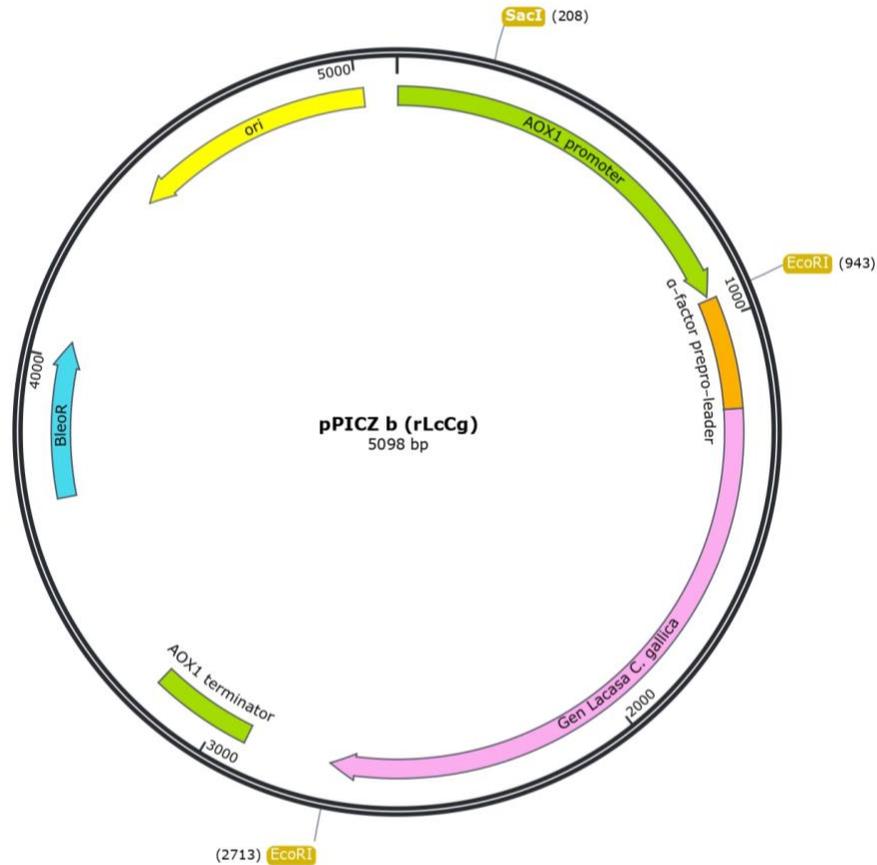


Figura 7. Plásmido rLcCg. Construcción hecha a partir del vector pPICZ b, el factor α modificado y el gen de la lacasa de *C. gallica*

Para facilitar la identificación de los plásmidos que se presentan a lo largo de este documento, estos se abreviaron conforme a lo mostrado en la [Tabla 6](#).

Tabla 6. Descripción de los plásmidos utilizados durante este estudio.

Abreviación	Nombre del plásmido	Descripción
p-rLcCg	pPICZ B-rLcCg	Plásmido pPICZ b con el gen de la lacasa de <i>C. gallica</i> .
p-F413A	pPICZ B-F413A	Plásmido pPICZ b con el gen de la lacasa con la mutación de la fenilalanina 413 por una alanina.
p-F357L	pPICZ B-F357L	Plásmido pPICZ b con el gen de la lacasa con la mutación de la fenilalanina 357 por una leucina.
p-F357L/F413A	pPICZB-F357L/F413A	Plásmido pPICZ b con el gen de la lacasa con la mutación de la fenilalanina 357 por una leucina y la mutación de la fenilalanina 413 por una alanina.

5.3.1 Mutagénesis sitio-dirigida

Para la generación de la doble mutante F357L/F413A se realizó una PCR mutagénica sitio dirigida siguiendo el protocolo QuikChange II de Agilent.

Esta PCR se realizó utilizando el plásmido de la variante F413A como templado y dos oligonucleótidos (Tabla 7) que contenían la segunda mutación requerida, la fenilalanina 357 por una leucina. Una cepa de *E. coli* DH5 α (Jingchao Chin Yi Li, Kun Zhang, 2018) fue transformada por electroporación con el producto de la PCR.

Se secuenció todo el gen de la enzima utilizando los oligonucleótidos 5AOX1, 3AOX1 y Rev_mut413 (Tabla 7).

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados durante el proceso de obtención de la variante F357L/F413A.

Oligonucleótido	Longitud (nt)	Secuencia (5'→3')	Tm (°C)
F-F357L	42	ggt ttc gct ggt gga aag TTG act att aac gga gct tct ttc	73
R-F357L	42	gaa aga agc tcc gtt aat agt CAA ctt tcc acc agc gaa acc	73
5AOX1	21	gac tgg ttc caa ttg aca agc	52
3AOX1	21	gga tgt cag aat gcc att tgc	52
Rev_mut413	39	caa atg gaa agg gtg tgg agc acc agg agc ggc tgc agt	77

En color rojo se resalta el cambio de nucleótido que se realizó.

5.3.2 Transformación del plásmido F357L/F413A en *P. pastoris*

La transformación de la variante F357L/F413A consistió en tres pasos: linealización del plásmido, transformación en la levadura y elección de la colonia productora de la enzima.

Para la incorporación del gen de la lacasa en el genoma de *P. pastoris* es necesario realizar una linealización del plásmido, esta integración ocurre en el locus AOX1 (gen de la enzima alcohol oxidasa). El vector pPICZ b no contiene un origen de

replicación para la levadura por lo que las transformantes serán aquellas donde recombinó el plásmido en el genoma de la levadura.

La linealización se realizó a partir de 10 µg del plásmido con el gen de la variante F357L/F413A y la enzima Sac I (Tabla 8). La reacción se llevó a cabo durante 3 horas a 37°C.

Tabla 8. Composición de la reacción de linealización del plásmido con Sac I

Componente	Concentración	Volumen (µL)
Agua	-	20
Buffer Sac I	10x	12
ADNp	0.12 µg/µL	83
Sac I	10 U/µL	5
<i>Volumen total</i>	-	120

Una vez pasado el tiempo de digestión se inactivó la enzima de restricción a 65°C por 20 min. Se verificó la linealización completa del plásmido mediante un gel de agarosa al 1% (Fig. 7).

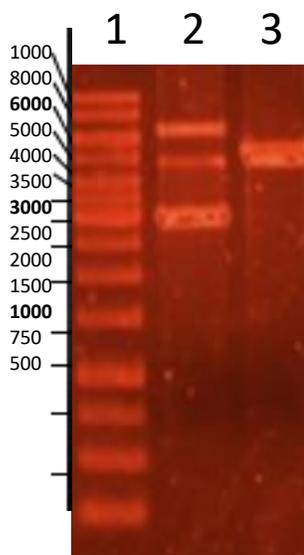


Figura 8. Corroboración de la completa linealización del plásmido F357L/F413A con la enzima Sac I.

Carril 1: Marcador de peso molecular; carril 2: Plásmido superenrollado; carril 3: plásmido linealizado con SacI.

Posteriormente para purificar el DNA linealizado de la mezcla de digestión, este se extrajo adicionando un volumen de fenol, posteriormente se mezcló por 10

segundos en el vortex, y se centrifugó a 13,000 rpm por 2 min, después se tomó la fase acuosa y se adicionó 1 volumen de solución cloroformo: alcohol isoamílico (99:1) y se mezcló nuevamente en el vortex. Se centrifugó para tomar la fase acuosa, posteriormente se agregó un 1/10 volumen de acetato de sodio 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto; se incubó la reacción en hielo seco por 20 min y se centrifugó por 10 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 1 volumen de etanol al 80%, se centrifugó nuevamente y se llevó a la centrifuga concentradora de vacío (Savant) para secar el pellet; finalmente se resuspendió en 10 μ L de agua desionizada estéril.

El plásmido linealizado (10 μ g), se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm con 80 μ L de células X-33 electrocompetentes, la celda se incubó en hielo por 5 minutos y posteriormente se dio un pulso de 2.0 kV con en el Micropulser de Biorad. Inmediatamente se adicionó 1 mL de sorbitol frío 1M y posteriormente se transfirió el contenido de la celda a un tubo estéril de 15 mL y se incubó a 30°C por 2 horas. Se plaqueó todo el contenido del tubo en medio YPDS con 100 μ g/mL de zeocina. Se incubaron las cajas 3 días a 30°C hasta que se visualizaron las colonias.

La elección de la colonia candidata se realizó por medio de un cultivo en placa. A partir de un medio mínimo sólido adicionado con 0.1 mM de CuSO₄ y 0.2 mM ABTS se inocularon las colonias transformadas y se incubaron a 28°C; después de 18 horas de cultivo se observaron halos de color verdoso alrededor de las colonias que expresaron la enzima.

5.4 Expresión de la lacasa de *C. gallica* en *P. pastoris*

La expresión y purificación de esta enzima se realizó conforme a lo reportado por Avelar y colaboradores (Avelar et al., 2017) ([Anexo 3 y 4](#)).

Se tomó una colonia que expresa la lacasa y se cultivó en 300 mL de medio BMGY a 30°C y 250 rpm hasta llegar a una densidad óptica (DO_{600nm}) entre 8-10, el cultivo se centrifugó a 8,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, se realizó un lavado de la pastilla celular con agua estéril, posteriormente se centrifugó nuevamente y la pastilla celular se resuspendió en 500 mL de medio BMM hasta tener una DO inicial de 4-5. El cultivo se incubó a 28°C y 250 rpm, se añadió 1% de metanol cada 24 horas. El crecimiento celular y la actividad de lacasa se midieron diariamente hasta 12 días. El cultivo se detuvo hasta que cesó la producción de la enzima.

5.5 Purificación de la enzima

Una vez determinado el día máximo de producción de la enzima, el cultivo se centrifugó a 8,000 rpm a 4°C durante 15 minutos para obtener el sobrenadante. Este se concentró por ultrafiltración con una membrana de corte de 30 kDa; posteriormente al sobrenadante concentrado se le realizó una cromatografía de intercambio aniónico débil, se cargó en una columna empacada con DEAE-celulosa (10 mL de resina) y se eluyó con amortiguador de fosfatos 60 mM pH 6. Las fracciones con actividad se concentraron por ultrafiltración con una membrana de corte de 30 kDa. Finalmente, se realizó una cromatografía de exclusión molecular usando una columna Sephadex G75 (60 mL) equilibrada con buffer de fosfatos 10 mM pH 6. Las fracciones con actividad específica similar se concentraron mediante ultrafiltración con un corte de 10 kDa. Las muestras de cada paso de purificación se analizaron por SDS-PAGE.

5.6 Ensayos de actividad y determinación de la concentración de proteína

La actividad enzimática se midió a partir de la oxidación de la siringaldazina. La reacción se realizó con 50 μ M del sustrato, 10% v/v de etanol y buffer de succinatos

60 mM pH 4.5 a temperatura ambiente. Las velocidades iniciales de la aparición del producto ($\epsilon = 64,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) se midieron con el cambio de absorbancia de 530 nm a través del tiempo. Una unidad enzimática se define como la cantidad de enzima que cataliza la producción 1 μmol de producto por minuto.

De la misma forma se determinó la actividad enzimática a partir de la oxidación del 2,6 dimetoxifenol (2,6 DMP). La reacción se realizó con 2 mM de 2,6 DMP y amortiguador de citrato-fosfato 0.1 M pH 3 a temperatura ambiente. Se monitoreó la aparición del producto ($\epsilon = 49,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) a 468 nm.

La concentración de proteína total se estimó con el ensayo de Bradford a partir de una curva estándar de BSA (2-20 $\mu\text{g/mL}$).

Las mediciones realizadas se hicieron en un espectrofotómetro marca Agilent 8453 UV-Vis por triplicado.

5.7 Estabilidad en solventes

Se monitoreó la actividad residual de la enzima durante una hora realizando mediciones cada 10 min a temperatura ambiente. Esto se realizó a partir de una reacción con 5 y 20 % del solvente (acetonitrilo, etanol y DMSO), buffer de succinatos 60 mM pH 4.5 y enzima (0.1 U/mL) iniciando la reacción con la adición de 50 μM de siringaldazina. Cada medición se realizó por triplicado.

5.8 Estabilidad térmica

Se monitoreó la actividad enzimática de las variantes a diferentes temperaturas. En una solución enzimática que contenía 3.6 U/mL en buffer de fosfatos 60mM pH 6, la temperatura se mantuvo constante (30, 40, 50 y 60°C) durante 1 hora y se tomaron muestras cada 10 min para determinar la actividad enzimática de la

solución a temperatura ambiente siguiendo el protocolo descrito en la sección 5.6. Cada medición se realizó por triplicado.

5.9 Método de análisis de los bisfenoles por HPLC

Las cinéticas de desaparición de los bisfenoles A, B, E y F fueron monitoreadas por RP-HPLC a 280 nm. Se utilizó una columna Luna 5u C-18 de la marca Phenomenex, con dimensiones de 150 x 3.00 mm con un flujo constante de 0.4 mL/min en un HPLC marca Agilent 1100 series. El gradiente empleado se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Gradiente de concentración de acetonitrilo para el análisis de los bisfenoles A, B y F por HPLC.

Tiempo (min)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
0	60	40
3	60	40
6	20	80
9	20	80
11	60	40
15	60	40

Las reacciones fueron llevadas a cabo en 1 mL de reacción en buffer de succinatos 60 mM pH 4.5 y 20% v/v de ACN a temperatura ambiente. Las concentraciones de los bisfenoles se variaron de 0.2 - 4 mM. La reacción fue iniciada al adicionar 0.10 U de la variante (para las reacciones con la lacasa nativa de *C. gallica* se utilizaron 1.24 U/mL) medidas para siringaldazina. Se monitoreó la disminución del pico correspondiente al sustrato estudiado a lo largo de 40 min de reacción con una conversión máxima de sustrato del 32%; todas las mediciones fueron realizadas por triplicado en reacciones individuales.

5.10 Estabilidad operacional con BPA

La estabilidad operacional de la lacasa recombinante y sus variantes F413A y F357L/F413A durante la oxidación del bisfenol A se determinó mediante una

reacción que contenía 2 mM de BPA y 5% de DMSO en buffer de succinatos 60 mM pH 4.5. La reacción comenzó al añadir 0.26 U/mL (48.66 nM de proteína).

Se monitoreó por una hora la oxidación de BPA, por lo que cada 10 minutos se tomaron 50 μ L de la reacción y se diluyeron 1:4 usando DMSO y se añadieron 5 μ L de HCL (5M) para detener la reacción e inmediatamente se resguardó en hielo para su posterior análisis por HPLC, simultáneamente se midió la actividad residual con siringaldazina.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos en este trabajo, describiendo tanto el comportamiento cinético como la estabilidad operacional de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes, tanto en la oxidación de sustratos estándar como de bisfenoles. En todas las gráficas se muestran barras de error que corresponden a los datos obtenidos por triplicado; el error experimental nunca excedió el 10%.

6.1 Caracterización de la variante F357L/F413

6.1.1 Producción de la enzima

Debido a nuestro interés de conocer el comportamiento cinético de una variante de la lacasa de *C. gallica* que tenga las dos mutaciones de las variantes sencillas y cómo éstas influyen en su estabilidad operacional, a continuación, se describe el procedimiento para la obtención de dicha variante.

Se tomó el plásmido con la mutación F413A como templado y para introducir la segunda mutación (F357L) se realizó un cambio del codón TTT por el codón TTG,

que conforme a lo reportado por el Instituto Kazusa tiene la mayor preferencia mayor (31.5%) para codificar a la leucina con respecto a los otros 5 codones que codifican para este mismo aminoácido en la levadura *P. pastoris*.

Dos factores fueron determinantes para la selección de colonias candidatas en este protocolo basado en QuikChange II de Agilent Technologies, el primero fue la correcta digestión del plásmido parental (P-F413A) donde aumentamos la concentración de enzima de restricción (Dpn I) y el segundo fue la correcta selección de las clonas, donde aumentamos la concentración del antibiótico. Para la completa degradación de 50 µg del plásmido parental se utilizaron 5 veces más unidades de Dpn I de las requeridas de acuerdo al proveedor (10 vs 50 U) por 3 horas de reacción, esto se realizó debido a que realizamos un control que consistía en degradar todo el plásmido parental y posteriormente correr un gel de agarosa para visualizar la digestión del plásmido, sin embargo, con 10 U de la enzima aún observábamos el plásmido completo, y ya con 50 U, el plásmido fue degradado en su totalidad.

Respecto al antibiótico de selección, se incrementó la concentración de zeocina de 25 a 50 µg/mL. Esto significó un paso primordial para la obtención de las colonias que incorporan el plásmido generado por PCR, debido a que con la concentración de 25 µg/ml de zeocina recomendaba por el protocolo del vector pPICZ B de Thermo Scientific observábamos colonias satélites, es decir, colonias que no tienen el gen de resistencia al antibiótico; inicialmente, esto dificultó la selección de colonias transformadas.

Finalmente, se obtuvo al plásmido de la doble mutante mediante una PCR mutagénica sitio dirigida, comprobando por secuenciación las dos mutaciones deseadas sin encontrar otra mutación más a lo largo del gen (ver [Anexo 1](#)). En la [Figura 9](#) se muestra una digestión del plásmido con la enzima EcoRI.

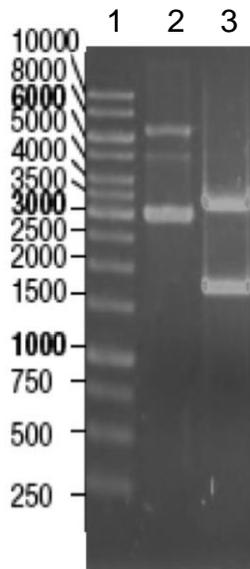


Figura 9. Análisis por la enzima de restricción *EcoRI* de la identidad del F357L/F413A Carril 1. Marcador de peso 1kb. Carril 2 plásmido superenrollado, Carril 3 Digestión con *EcoRI*

Posteriormente, se transformó la nueva construcción en *P. pastoris* siguiendo el protocolo mencionado en la [sección 5.3.2](#). Se eligieron 150 colonias candidatas y estas se resembraron en medio mínimo suplementado con 0.1 mM de CuSO_4 y 0.2 mM de ABTS a 30°C con el fin de determinar cuáles clonas expresaban la enzima. Al cabo de 18 horas visualicé halos de color verde alrededor de las colonias que expresaban la enzima, ya que el producto de la oxidación del ABTS es un compuesto colorido ([Fig. 10](#)).

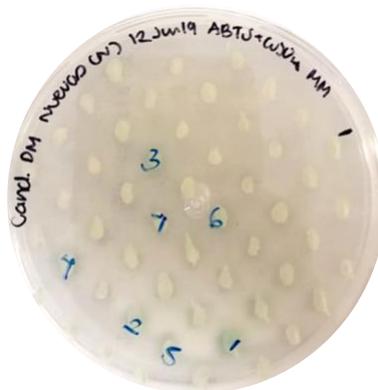


Figura 10. Colonias candidatas cultivadas en medio MM adicionado con CuSO_4 y ABTS, En números se muestra las colonias que oxidaron el ABTS.

Se seleccionaron las cuatro colonias que primero oxidaron el ABTS, para posteriormente determinar cuál de estas era la clona con mayores niveles de expresión de la enzima. Se inocularon cultivos de estas colonias de 50 mL de medio y se indujo por distintos días con MeOH (1%) para monitorear la actividad enzimática siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.6 de este trabajo (Fig. 11). Con respecto a la producción de las cuatro colonias seleccionadas se eligió la colonia nombrada N36 debido a que era una de las más productoras.

La producción de esta variante fue realizada siguiendo la metodología reportada por Avelar y colaboradores en 2017 y descrita de igual forma en este documento en la

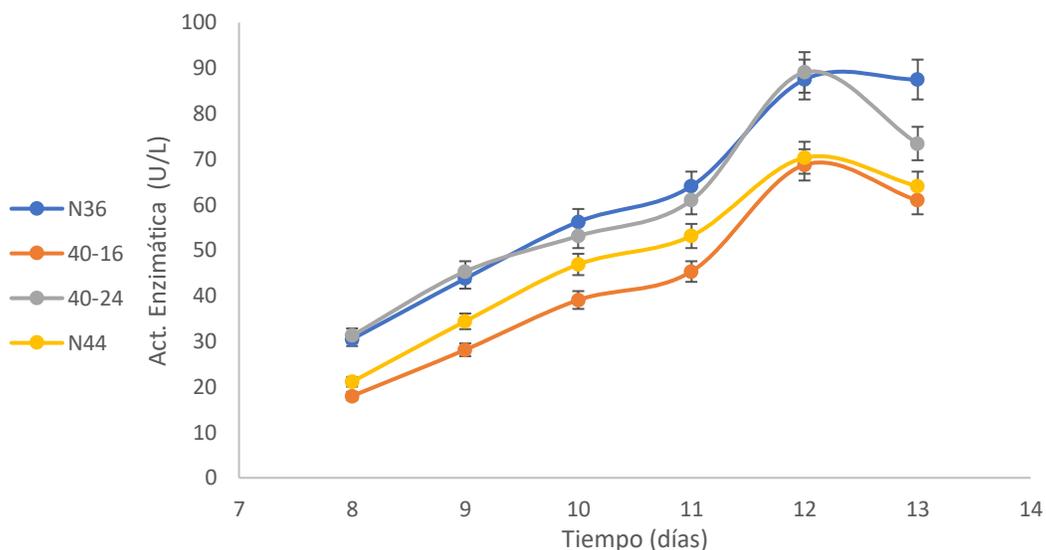


Figura 11. Actividad enzimática de las colonias seleccionadas en medio BMM. Se seleccionó la cepa N36 por ser la que produjo mayor actividad volumétrica de la lacasa.

sección 5.5. Como se puede observar en la Figura 12, se logró incrementar la cantidad de enzima en el cultivo al seguir adicionando metanol aún después de que la levadura había dejado de crecer. Cabe recordar que en este cultivo el metanol actúa tanto como inductor y como fuente de carbono. Alrededor del día 5 del cultivo se alcanza el estado estacionario, lo que sugiere que algún otro nutriente se ha

agotado; sin embargo, al seguir adicionando metanol la enzima continuó acumulándose en el sobrenadante.

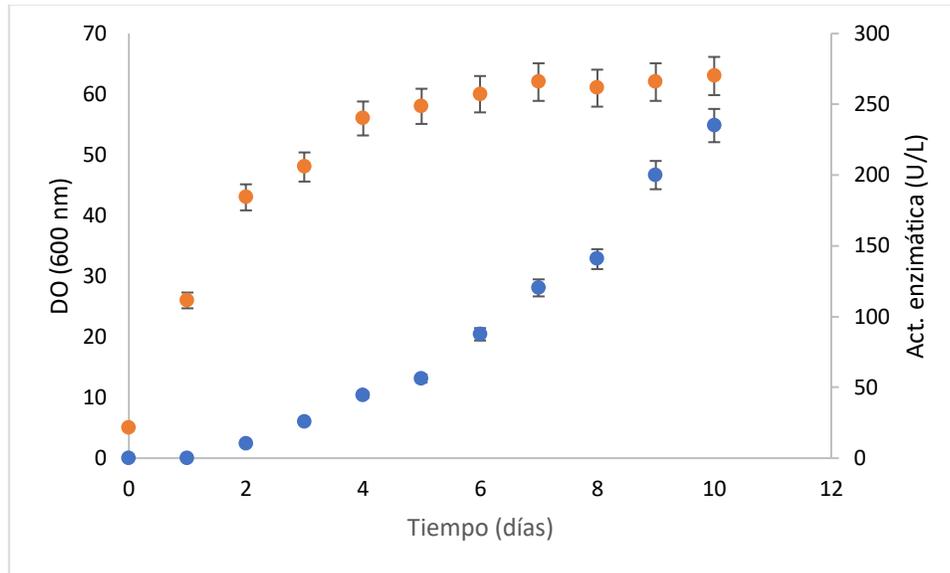


Figura 12. Crecimiento de la cepa productora de la variante F357L/F413A (naranja) y actividad enzimática (azul).

Se lograron obtener 235 U por litro de cultivo de esta variante; comparando esta producción con las otras variantes, el rendimiento fue similar al cultivo que produce la variante F413A (240 U/L) y es 1.8 veces mayor que el cultivo que produce a la enzima parental recombinante (rLcCg) (130 U/L). Esta variación de la producción de las variantes puede ser debida a la inserción de copias múltiples del plásmido en el genoma de la levadura, dando como consiguiente mayor producción de las colonias seleccionadas para producir las variantes F413A y F357L/F43A (Serrano-rivero & Fando-calzada, 2016).

6.1.2 Caracterización cinética de la lacasa en la oxidación de siringaldazina

La variante F357L/F413A se purificó siguiendo el protocolo descrito en la sección experimental. Se obtuvo una preparación con actividad específica de 86 U/mg y una pureza electroforética de 95% (Fig. 13).

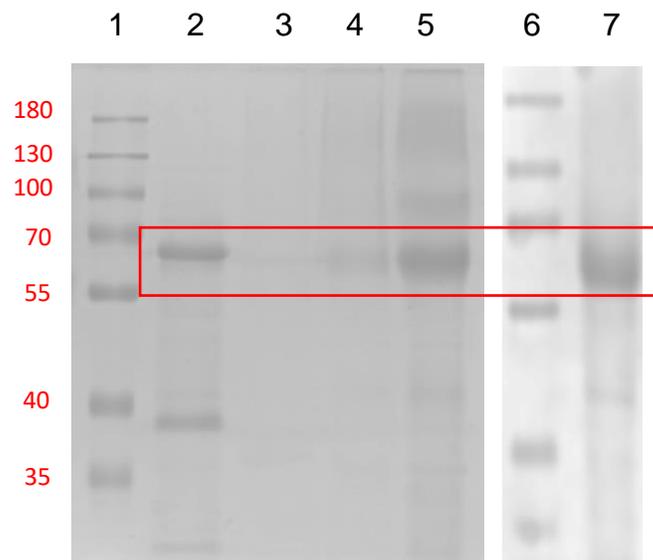


Figura 13. Tren de purificación de la variante F357L/F413A. Gel de electroforesis SDS. Carril 1, Marcador de peso (MP) 2. Lacasa de *Corioloopsis gallica*, 3. Sobrenadante del cultivo de la lacasa en *Pichia pastoris*, 4. Ultrafiltración de 30kDa, 5. Cromatografía de intercambio aniónico (DEAE), 6. MP y 7. Cromatografía de exclusión molecular Sephadex G75.

Se determinaron las constantes cinéticas de actividad de esta variante (Fig. 14 y Tabla 10) para la oxidación de siringaldazina, el sustrato estándar para caracterizar este tipo de enzimas. El modelo de Michaelis-Menten fue adecuado para representar los datos experimentales con una R^2 de 0.96.

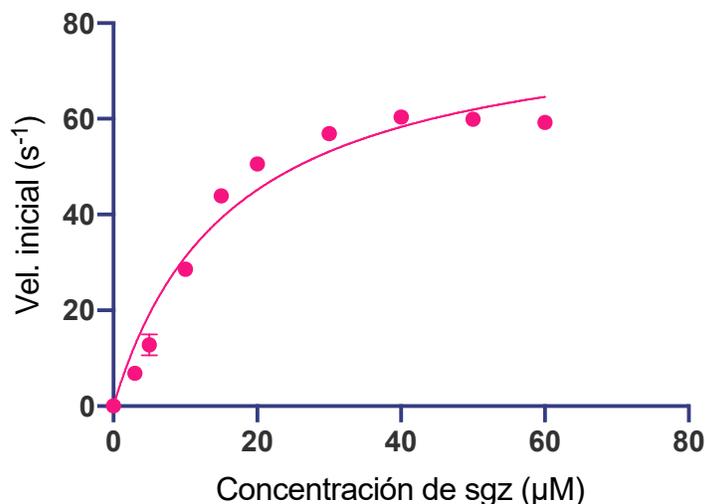


Figura 14. Cinética de actividad de la variante F357L/F413A en la oxidación de siringaldazina.

Tabla 10. Constantes cinéticas de actividad de las variantes en la oxidación de siringaldazina.

Enzima	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (μM)	k_{cat}/K_m (M ⁻¹ s ⁻¹)
rLcCg*	106 ± 5.8	9.6 ± 1.3	11.3 × 10 ⁶
F357L*	74.4 ± 5.0	12.2 ± 2.1	6.1 × 10 ⁶
F413A*	181 ± 12.7	10.8 ± 1.8	16.3 × 10 ⁶
F357L/F413A	82.3 ± 7.1	16.45 ± 3.6	5.00 × 10 ⁶

*(Avelar et al., 2018)

Se ha reportado que el residuo F337 de la lacasa de *Trametes versicolor* (equivalente a la posición F357 en la lacasa de *C. gallica*) forma parte del sitio de interacción del sustrato con la enzima, y por consiguiente juega un papel importante en la afinidad por el sustrato. Se ha sugerido que el reemplazo de este residuo, al encontrarse en la segunda esfera de coordinación, podría desestabilizar el sitio (Yanagisawa et. al. 2008). Por otro lado, el residuo F413 también forma parte del sitio de interacción con el sustrato, y se encuentra expuesto al solvente. Pardo y colaboradores reportan que su reemplazo por residuos más pequeños conlleva a un menor impedimento estérico y por lo tanto se favorece la interacción de sustratos más voluminosos en el sitio T1 (Pardo et. Al. 2016).

En relación con las constantes cinéticas, resalta una disminución del 50% en la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de F357L/F413A comparando con rLcCg (Avelar et al.,

2018). Aunque hay una clara disminución en los valores están en el mismo orden de magnitud que las otras variantes lo que significaría un comportamiento cinético similar de la doble mutante en relación con las variantes sencillas.

6.1.3 pH óptimo de actividad en la oxidación de siringaldazina, 2,6 dimetoxifenol y BPA

La geometría del sitio T1 de las lacasas es muy importante para la catálisis de estas enzimas. Este sitio tiene una geometría planar triangular compuesta por tres ligandos altamente conservados, dos histidinas y una cisteína, y un ligando axial distante que por lo general en las lacasas fúngicas es una fenilalanina (Piontek et al., 2002). Se ha resaltado la importancia de dos residuos por su interacción con un sustrato llamado xilidina (Fig. 14). El primero es la histidina 458 (numeración con respecto a la lacasa de *T. versicolor*) que coordina al cobre del sitio T1 y actúa como aceptor primario del electrón del sustrato y el segundo es el aspartato 206, que forma un puente de hidrógeno con la xilidina (Madzak et al., 2006). Como se puede observar en la Figura 15, el residuo Asp 206 se encuentra inmerso en una cavidad compuesta por residuos hidrófobos, y el sitio activo (T1) presenta un parche hidrófobo constituido principalmente por fenilalaninas que ayudan a estabilizar la interacción de sitio activo con el sustrato (Mehra et al., 2018).

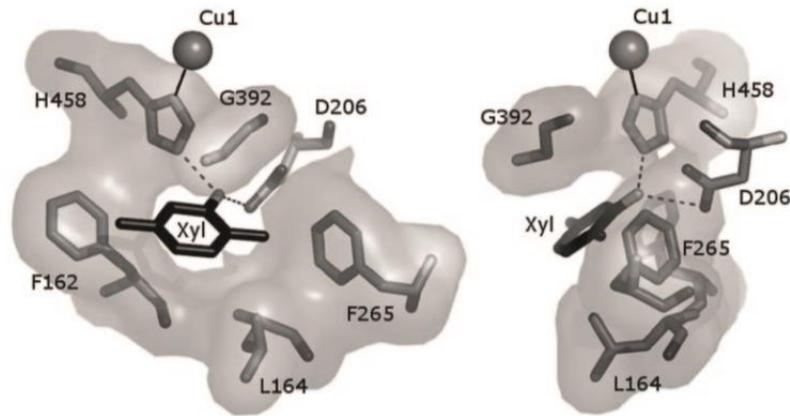


Figura 15. Vista ortogonal del sitio de unión de la xilidina con la lacasa de *Trametes versicolor*.

Izquierda: vista desde la entrada de la cavidad. Derecha: Vista ortogonal obtenida por una rotación de 90° sobre el eje vertical. Los residuos y el sustrato son mostrados en barras desde el cobre del sitio T1 (Cu1) ilustrado como esfera. Los átomos de carbono mostrados en gris, átomos de nitrógeno en gris claro y los átomos de oxígeno en gris oscuro. El sustrato 2,5- xilidina (Xyl) en negro. Se muestra la superficie de los residuos que contribuyen a las interacciones hidrofóbicas con el sustrato. Los puentes de hidrógeno con el nitrógeno de la xilidina son mostrados en líneas discontinuas y la coordinación del Cu1 con la His458 es mostrada en líneas negras. La figura fue representada con PyMOL. Figura tomada de (Madzak et al., 2006).

El estudio realizado por Madzak exploró la fuerte interacción del Asp206 con la xilidina. Se construyeron las variantes Asp206/Glu, Ala o Asn con el fin de determinar cómo estas mutaciones impactaban en la actividad enzimática y su dependencia del pH. Con el sustrato 2,6-DMP mostró que la mutación por Asn condujo a un cambio significativo ($\Delta\text{pH} = 1.4$) del pH óptimo hacia un pH más alto (pH=5). Este estudio resalta la importancia del residuo en la posición 206 debido a que un cambio de este conduce a un corrimiento del perfil de pH de la enzima, igualmente también nos revela un elemento adicional sobre los factores que modulan la unión del sustrato al sitio activo (T1) (Madzak et al., 2006).

En la [Figura 16](#) se observa el sitio T1 de la lacasa de *Corioloopsis gallica*, donde los residuos cercanos a este aspartato son principalmente fenilalaninas. Al realizar las mutaciones (F357L y F413A) generadas en este estudio, la hidrofobicidad se reduce y esto podría influir en el pKa y por tanto en el estado de ionización de residuos como el Asp226 (equivalente a Asp 206 de la lacasa de *T. versicolor*), reflejándose quizás en un cambio en el pH óptimo de actividad de las variantes con respecto a la enzima parental (rLcCg).

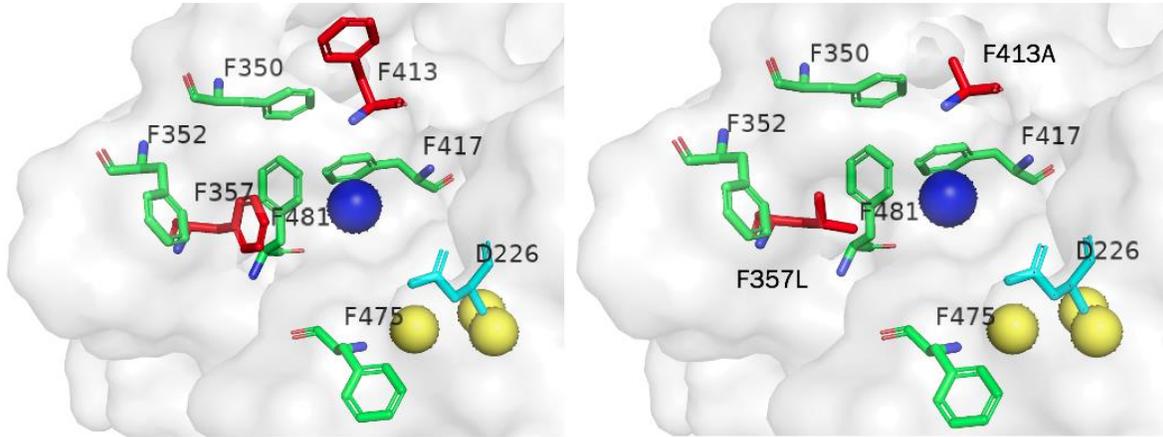


Figura 16. Composición del sitio activo de la lacasa parental rLcCg (izquierda) y la variante F357L/F413A (derecha).

Se determinó el pH óptimo de actividad de rLcCg y F357L/F413A durante la oxidación de dos sustratos estándar, 2,6 DMP y siringaldazina. El perfil de pH para cada sustrato se muestra en la Figuras 17. Para ambas variantes observamos un perfil de pH en forma de campana. Xu en 1997 propuso que esta forma de campana en los perfiles de pH de las lacasas era consecuencia de dos efectos opuestos: la parte ascendente de la curva en pH ácidos es generada por la diferencia de potencial redox entre el sustrato y el Cu T1 y la parte descendente es generada por la unión del anión hidróxido con los cobres en los sitios T2/T3, que inhibe la actividad a pH altos, combinado con la disminución del potencial de reducción del oxígeno cuando el pH se incrementa (Xu, 1997).

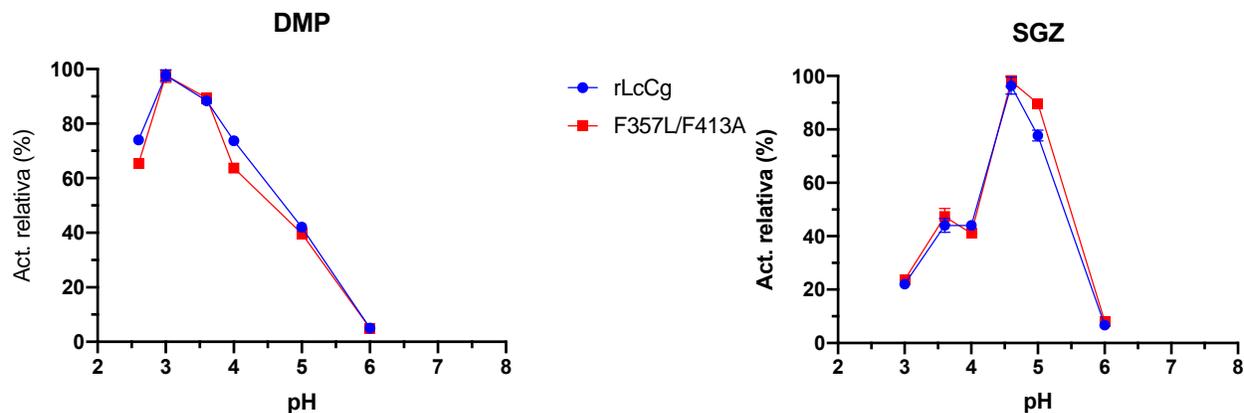


Figura 17. Perfiles de pH óptimo de actividad de la lacasa parental rLcCg (azul) y la variante F357L/F413A (rojo) en la oxidación de 2,6 DMP (izquierda) y siringaldazina (derecha).

Con estos experimentos podemos resaltar que los pH óptimos de actividad de la enzima parental y la variante F357L/F413A es idéntico para dos sustratos diferentes: 2,6 DMP (pH 3) y siringaldazina (pH 4.6).

Debido a la similitud del pH óptimo de rLcCg y F357L/F413A, el siguiente paso fue obtener el perfil de pH para la variante F413A en la oxidación del bisfenol A, (Fig. 18) con el objetivo de conocer el pH óptimo que utilizaremos en las reacciones con este sustrato.

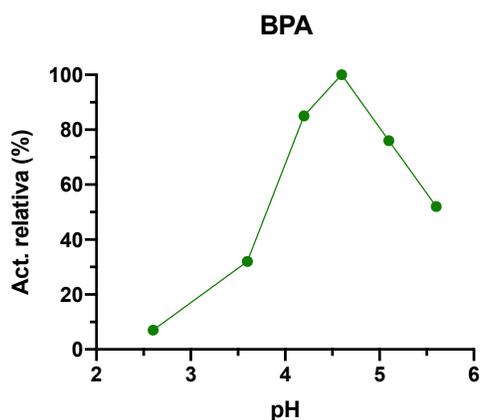


Figura 18. Perfil de pH óptimo de actividad de la variante F413A en la oxidación BPA.

Al observar este perfil vemos nuevamente el comportamiento de campana como anteriormente lo observamos con 2,6 DMP y siringaldazina. Estableciendo que el pH óptimo de actividad es de 4.5 para la oxidación de BPA.

6.1.4 Estabilidad térmica

La termoestabilidad es una propiedad intrínseca, que es determinada por la estructura primaria de las proteínas (Ward & Moo-Young, 1976). Por lo tanto, al depender de la secuencia de la enzima, en este apartado reportamos la termoestabilidad de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes que tienen mutaciones en la vecindad del sitio activo.

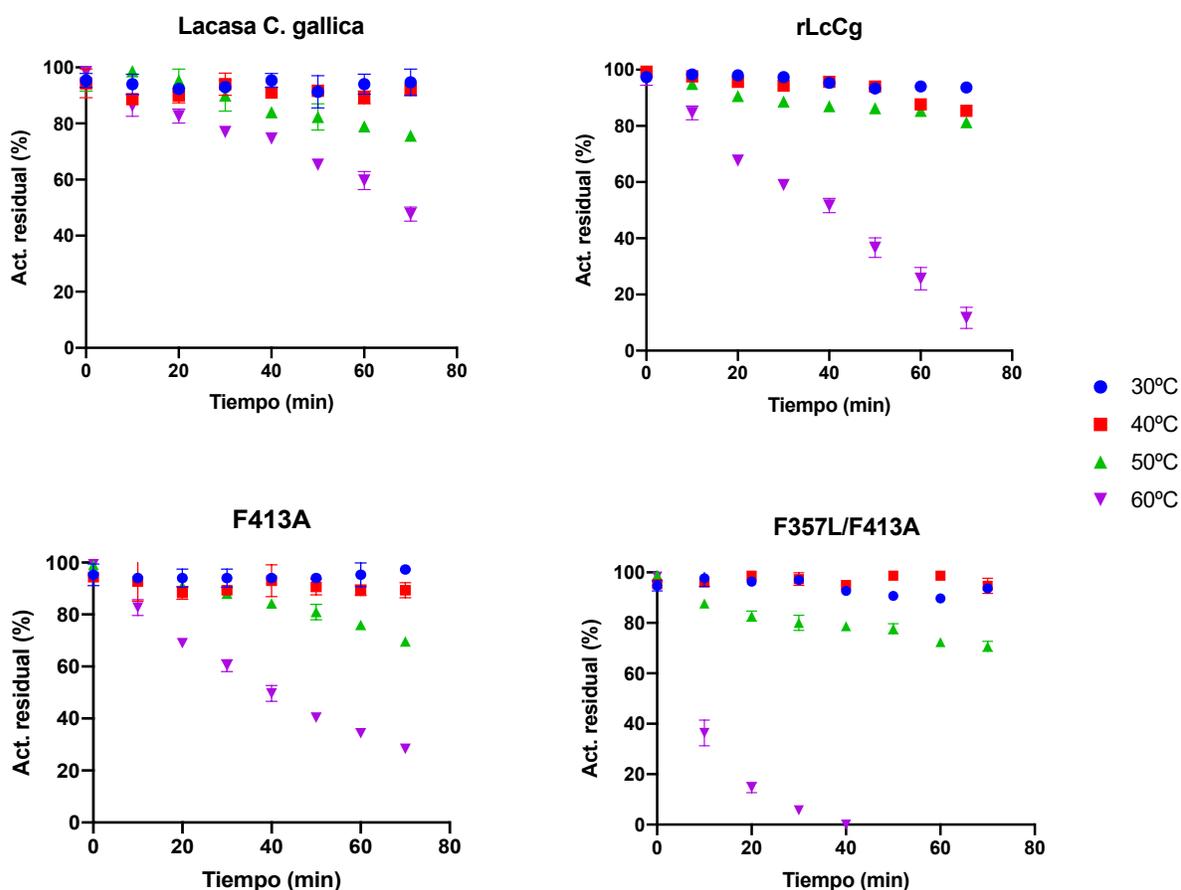


Figura 19. Estabilidad térmica de la lacasa de *C. gallica* y las lacasa recombinante y sus variantes F413A y F357L/F413A. Monitoreo de actividad durante 70 min de incubación.

Los gráficos representados en la [Figura 19](#), muestran la actividad residual de la lacasa de *C. gallica*, la lacasa recombinante y sus variantes a diferentes temperaturas a lo largo de 70 min de incubación a diferentes temperaturas. Se puede apreciar que a 30 y 40°C no hay inactivación durante los 70 min de incubación. No obstante, a temperaturas mayores de 50°C se observa la inactivación de las variantes. Esta inactivación térmica a 50 y 60°C se ajusta a un modelo de primer orden, esto implica un solo paso de transición de un estado activo (E_a) a uno inactivo de la enzima (E_{in}) como se muestra en las ecuaciones de abajo.

Para poder comparar la inestabilidad a la temperatura de la lacasa de *C. gallica*, la recombinante y sus variantes, se calculó el tiempo de vida media (t_{50}) de éstas a 50 y 60°C, estos parámetros de inactivación están representados en la [Tabla 11](#). Al observar los tiempos de vida media, resalta que el grado de inactivación de las variantes es diferente entre ellas. Podemos ver una disminución de 40% y 75% en el valor reportado para F357L/F413A en comparación con la parental a 50°C y 60°C, respectivamente. Por consiguiente, F357L/F413A es la variante más inestable a temperaturas mayores a 50°C.

Tabla 11. Parámetros observados de inactivación térmica de la lacasa recombinante rLcCg y sus variantes F413A y F357L/F413A.

Variante	50°C			60°C		
	k (h ⁻¹)	t ₅₀ (h)	R ²	k (h ⁻¹)	t ₅₀ (h)	R ²
LcCg	0.234	3	0.95	0.546	1.3	0.95
rLcCg	0.15	5	0.95	1.61	0.4	0.93
F413A	0.282	2	0.98	1.056	0.7	0.99
F357L/F413A	0.252	3	0.91	6.624	0.1	0.98

Por otra parte, se ha reportado que la estabilidad térmica de las proteínas varía considerablemente dependiendo del organismo de origen. El tiempo de vida media de las lacasas fúngicas está por debajo de 1 h a 70°C y por debajo de 10 min a 80°C

(Coll et al., 1993). Por ejemplo, la lacasa de *T. harzianum* retiene el 70% de su actividad inicial después de 1 hora de incubación a 55°C y tiene un tiempo de vida media de 1 h a 65°C (Sadhasivam et al., 2008), mientras que la lacasa de *Daedalea quercina* es más estable a temperaturas por debajo de los 45°C (Baldrian, 2004). Comparando los valores obtenidos de las variantes con respecto a lo citado anteriormente, resalta una similitud en la termoestabilidad. Sin embargo, es evidente el incremento de la inestabilidad de la doble mutante, y esto puede estar relacionado con las mutaciones insertadas. En el sitio T1, donde se encuentran las mutaciones que gobiernan las interacciones pi-pi. Las interacciones pi-pi son fuerzas no covalentes entre dos anillos aromáticos donde los centros de los anillos tienen que estar en una distancia menor a 7 Å (Shao, 2016). Sólo en el sitio T1 existen 11 contactos por apilamiento o “stacking” (Mehra et al., 2018) y se ha estudiado que este tipo de interacciones juegan un papel importante en la estabilización estructural de macromoléculas como las proteínas (Burley & Petsko, 1985) ya que favorece el empaquetamiento; incluso se ha visto que la adición de este tipo de interacciones en proteínas como la endopoligalacturonasa PG63 aumenta la termoestabilidad (Tu et al., 2016).

6.2 Caracterización cinética de las variantes durante la oxidación de los bisfenoles

Los bisfenoles AF y S no fueron sustrato de ninguna variante. Cabe mencionar que a la fecha ninguna lacasa ha sido capaz de catalizar la oxidación de estos dos compuestos. El BPAF tiene dos grupos CF₃-, este grupo se utiliza en la industria para incrementar la estabilidad y biodisponibilidad de ciertos fármacos debido a que su incorporación conduce a un aumento significativo en la lipofilia del fármaco. La energía del enlace carbono-fluor (~ 116 kcal/mol) es bastante alta, lo que lleva a que el compuesto tenga una alta estabilidad térmica y oxidativa (Khetan & Collins, 2007). Se ha estudiado que el bisfenol AF es uno de los bisfenoles más persistentes en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Quian Sun y colaboradores reportaron también que el BPAF es resistente a la biodegradación por los microorganismos

presentes en una planta de tratamiento de aguas residuales (Sun et al., 2017). Aunque no se ha reportado el potencial de ionización de este compuesto, es posible que sea alto debido a la gran cantidad de átomos de F presentes en los anillos aromáticos, y por tal motivo no es sustrato de este tipo de enzimas.

De igual manera el BPS, no puede ser oxidado con lacasas de manera aislada (Beck et al., 2018); pero si ha sido posible oxidarlo mediante un sistema lacasa-mediador (Sei et al., 2008). De acuerdo con lo reportado por Ike y colaboradores, la presencia del grupo O=S=O en la estructura del BPS conlleva a que en solución acuosa este compuesto podría estar estabilizado por la transferencia de electrones entre los anillos aromáticos y el grupo SO₂, haciendo que sea resistente a la biodegradación por este tipo de enzimas (Zdarta et al., 2018). De igual forma, la persistencia de este bisfenol puede deberse a que el potencial redox del BPS (0.95 V) es mayor al de la lacasa de *C. gallica* (≈ 0.8 V) (Zheng et al., 2016), provocando que la enzima no pueda remover los electrones del compuesto.

En cuanto a los bisfenoles A, B y F se encontró que sí fueron sustratos de la enzima y se montaron los métodos analíticos para estudiar el comportamiento cinético de la reacción. Debido a la baja solubilidad de los sustratos, en la mezcla de reacción se añadió ACN, en el que se disolvió hasta 10 mM de cada bisfenol. Sin embargo, a pesar del uso de acetonitrilo no fue posible alcanzar concentraciones del sustrato donde la enzima estuviera saturada y solo se determinó la eficiencia catalítica, medida como la relación entre la constante catalítica y la constante de Michaelis-Menten (k_{cat}/K_m) (Fig. 20). En la Tabla 12 se muestran las eficiencias catalíticas en la transformación de BPA, BPB y BPF. Observamos que la eficiencia catalítica entre las variantes de la lacasa de *C. gallica* es similar, no obstante, la variante F357L/F413A muestra una ligera disminución en su eficiencia catalítica, pudiéndose deber esto a la influencia del ACN.

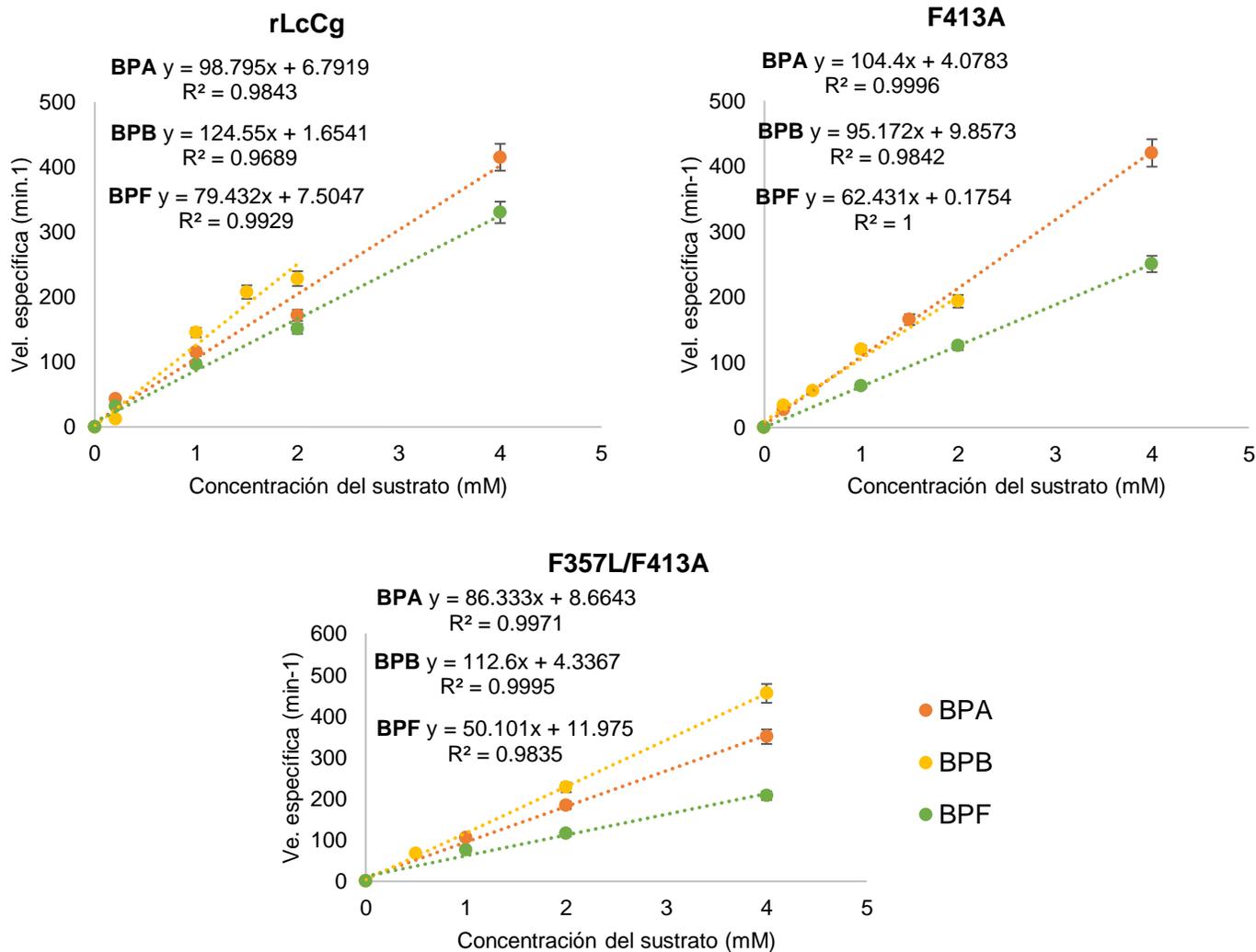


Figura 20. Eficiencia catalítica de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes en la oxidación de bisfenoles, en 20% de acetonitrilo.

Tabla 12. Eficiencia catalítica de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes en la oxidación de bisfenoles, en presencia de 20% de acetonitrilo

Variante	BPA	BPB	BPF
	kcat/Km (mM ⁻¹ min ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ min ⁻¹)	kcat/Km (mM ⁻¹ min ⁻¹)
<i>rLcCg</i>	99 ± 7.2	124.5 ± 12	79.4 ± 3.9
<i>F413A</i>	104.3 ± 2.5	95.1 ± 6.8	62.3 ± 0.4
<i>F357L/F413A</i>	86.3 ± 3.4	112 ± 5.3	50 ± 4.6

Se realizó un análisis de Anova (Gooch, 2011) donde la hipótesis nula fue que la capacidad oxidativa de las enzimas estudiadas en este proyecto (rLcCg, F413A y F357L/F413A) es igual en la oxidación de bisfenoles. Obtuvimos una $p\text{-value}=0.72169$, por lo tanto, la hipótesis nula no se rechaza debido a que este valor es mayor al nivel de confianza 0.05, concluyendo que la capacidad oxidativa de las variantes es estadísticamente igual en la oxidación de BPA, BPB y BPF (Anexo 5, análisis 1).

Se realizó un segundo análisis de Anova (Gooch, 2011) para determinar si había diferencias en la oxidación de cada bisfenol (BPA, BPB y BPF). Se obtuvo una $p\text{-value}=0.000002$, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula a un nivel de confianza 0.05, por lo que al menos para un bisfenol es diferente su oxidación.

Para conocer que bisfenol era diferente su oxidación, se realizó un diagrama de cajas, donde se comprobó que la oxidación del BPF es menor a la del BPA y BPB (Anexo 5, análisis 1 Fig. 30).

Las eficiencias catalíticas de las variantes en la oxidación de los BPs obtenidas en este estudio son menores a las reportadas en otros trabajos. Por ejemplo, en el 2011 Nicolucci y colaboradores, quienes estudiaron la biodegradación de bisfenoles con la lacasa de *Trametes versicolor*, determinaron la eficiencia catalítica con los diferentes bisfenoles: BPA $764\text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$, BPB $640\text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$, BPF $2613\text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ y $278\text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ TCBPA. De igual forma se ha estudiado a la lacasa del basidiomiceto *Coriolopsis gallica* en la oxidación de BPA y otros perturbadores. Torres Duarte y colaboradores en el 2012 reportaron una eficiencia catalítica de $1,242\text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ en la oxidación de BPA, en un medio de reacción con 5% de ACN (Torres-Duarte et al., 2012).

Para estudiar si la reducción de la eficiencia catalítica de la enzima nativa, de la recombinante y de sus variantes observada en la oxidación de los bisfenoles era consecuencia de la alta concentración de ACN, se realizaron una serie de

experimentos. El primero fue obtener la cinética de actividad de la lacasa de *C. gallica* (LcCg) con BPA con 20% de ACN dando como resultado una eficiencia catalítica de $30 \text{ mM}^{-1}\text{min}^{-1}$. Al igual que en los experimentos realizados con las otras variantes no pudimos llegar a la saturación de la enzima debido al límite de solubilidad del sustrato (Fig. 21). Comparando este valor con el obtenido con las variantes en las mismas condiciones, determinamos que se encuentra en el mismo orden de magnitud, sin embargo, existe una disminución en la eficiencia catalítica de la enzima nativa de 3 veces con respecto a la recombinante silvestre, y esto puede ser debido a la pureza de la enzima (60% LcCg y 75% rLcCg). Como se resalta en los resultados el ACN sí influye en la eficiencia de la enzima. Por lo que planteamos explorar otros solventes y su influencia en la actividad enzimática.

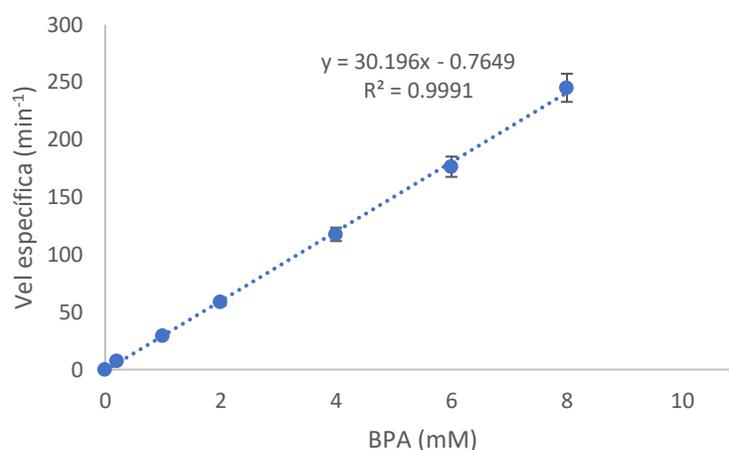


Figura 21. Velocidad específica de la lacasa de *Corioloopsis gallica* en la oxidación de BPA en 20% de ACN.

6.2.1 Estabilidad en solventes

Los solventes orgánicos son usualmente requeridos para incrementar la solubilidad de sustratos hidrófobos, no obstante las velocidades de transformación de las enzimas en estos solventes son generalmente órdenes de magnitud menores comparadas con sistemas acuosos (Carrea & Riva, 2000).

La baja solubilidad de los bisfenoles en agua (por ejemplo, BPA: 300 mg/L a 25°C (Aschberger et al., 2010) es una de las limitantes durante el estudio de su degradación por medio de enzimas. Para contrarrestar esta limitante se han empleado solventes polares como el acetonitrilo (5%) y etanol (30%) donde se lograron disolver hasta 1 mM y 3 mM de BPA, respectivamente (Nicolucci et al., 2011; Torres-Duarte et al., 2012).

Al inicio de este proyecto se empleó el ACN en la reacción, por consiguiente, se analizó la estabilidad de las variantes en este solvente. En la [Figura 22](#) se muestra el porcentaje de actividad residual de las variantes y de la parental con respecto al tiempo, al incubarlas durante una hora en 5% y 20% de acetonitrilo. Al observar el comportamiento de rLcCg y F413A, destaca que no disminuye significativamente su actividad inicial; por otro lado, para F357L/F413A vemos un comportamiento diferente, ya que esta variante se inactiva gradualmente en ambas concentraciones del solvente. El tiempo de vida media para esta variante es de 0.97 h y 0.63 h en 5% y 20% de ACN, respectivamente (ver [Tabla 13](#)).

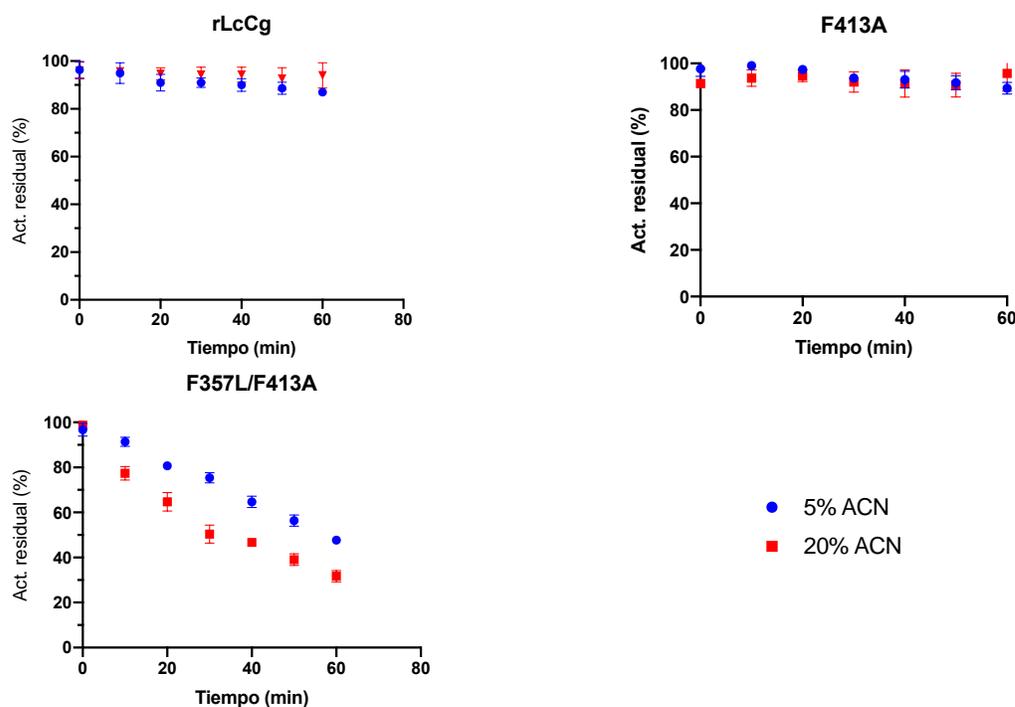


Figura 22. Estabilidad de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes en diferentes concentraciones de acetonitrilo. Monitoreo de actividad enzimática máxima durante 1 hora de incubación.

Tabla 13. Parámetros de inactivación de la variante de la lacasa de *C. gallica* F357L/F413A al incubarla en presencia de acetonitrilo.

ACN	k (h ⁻¹)	t ₅₀ (h)	R ²
5%	0.708	0.97	0.98
20%	1.092	0.63	0.98

La baja estabilidad que presenta la doble mutante F357L/F413A en el solvente puede estar relacionada a la pérdida de estructura terciaria debido a la capacidad que tienen los solventes polares de penetrar la enzima, perturbar y perder la estructura terciaria del sitio activo provocando su inactivación, como lo exponen Yoon y colaboradores, donde afirman estudiaron los efectos de ciertos solventes orgánicos en la actividad enzimática de tres β-galactosidasas (Yoon & Mckenzie, 2005). Esta mayor susceptibilidad a la inactivación podría estar relacionada con los residuos mutados en la variante, y con un empaquetamiento menos eficiente comparado con la enzima parental, como se mencionó en la sección 6.1.4.

Se propuso explorar la estabilidad de la doble mutante en otros solventes, con el propósito de elegir un solvente en el cual no fuera inestable y mejorará la determinación de la eficiencia catalítica. Los solventes que se estudiaron fueron etanol (EtOH) y dimetilsulfóxido (DMSO). En la [Figura 23](#) se muestra la actividad enzimática de la doble mutante durante una hora en 5 y 20% de cada solvente.

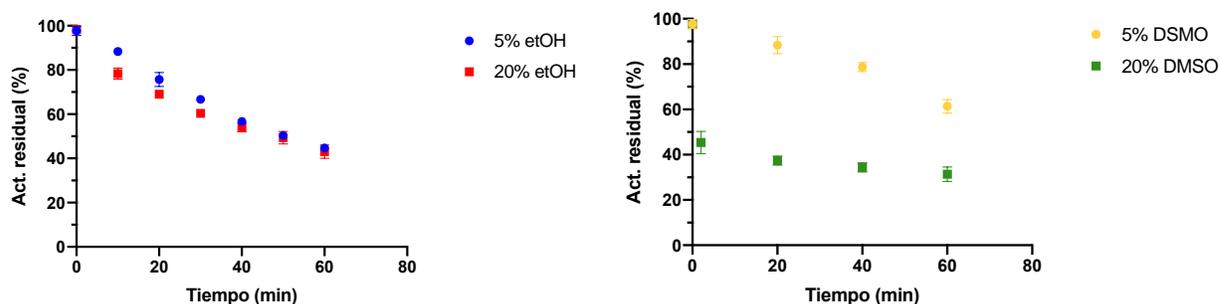


Figura 23. Estabilidad en solventes de la variante F357L/F413A de la lacasa de *C. gallica*. Monitoreo de actividad durante una hora.

Tabla 14. Parámetros de inactivación de la variante F357L/F413A de la lacasa de *C. gallica* al incubarla en diferentes concentraciones de solventes orgánicos.

Solvente		k (h⁻¹)	t₅₀ (h)	R²
ACN	5%	0.71	0.97	0.98
	20%	1.09	0.63	0.98
EtOH	5%	0.804	0.86	0.99
	20%	0.846	0.82	0.96
DMSO	5%	0.45	1.53	0.95
	20%	1.044	0.66	0.72

Como se puede ver en la [Tabla 14](#), observamos que la enzima se inactiva en todas las condiciones ensayadas; sin embargo, el mayor tiempo de vida media se obtiene en presencia de 5% de DMSO. Se ha estudiado ampliamente el efecto de los grupos funcionales en los solventes orgánicos y cómo éstos pueden afectar a la enzima. El ACN puede penetrar en el sitio activo de las enzimas, lo que lleva a una variación de la estructura del sitio activo y, por lo tanto, a la disminución de la actividad enzimática (Zhu et al., 2012). En el caso de etanol, se ha visto que tiene la capacidad de eliminar las moléculas de agua de la capa de hidratación que rodea a las proteínas, esto se considera un factor esencial que afecta la actividad, ya que puede provocar que las enzimas sean menos rígidas y más propensa a desplegarse, lo que aumenta la inestabilidad de estas (Park et al., 2013). Roy y colaboradores, mediante simulación de dinámica molecular, informaron que la flexibilidad de una lisozima se ve afectado con aproximadamente 5% (v/v) de DMSO debido a la solvatación preferencial de los residuos hidrófobos expuestos por los grupos metilo del DMSO (Roy et al., 2012). En conclusión, se eligió DMSO al 5% en las reacciones con BPA debido a que es el solvente con menor efecto en la inactivación.

Con respecto a la inestabilidad en solventes de la doble mutante, podría estar relacionada con la pérdida de interacciones pi-pi como se expuso en el apartado de termoestabilidad. Los cambios de las fenilalaninas podrían estar influyendo en la compactación del sitio T1, lo que podría verse más flexible y por consiguiente reflejarse en su estabilidad (Tu et al., 2016).

Posteriormente, se obtuvieron las cinéticas de actividad de las variantes con BPA en 5% de DMSO, donde se logró solubilizar hasta 2.5 mM del sustrato (Fig. 24).

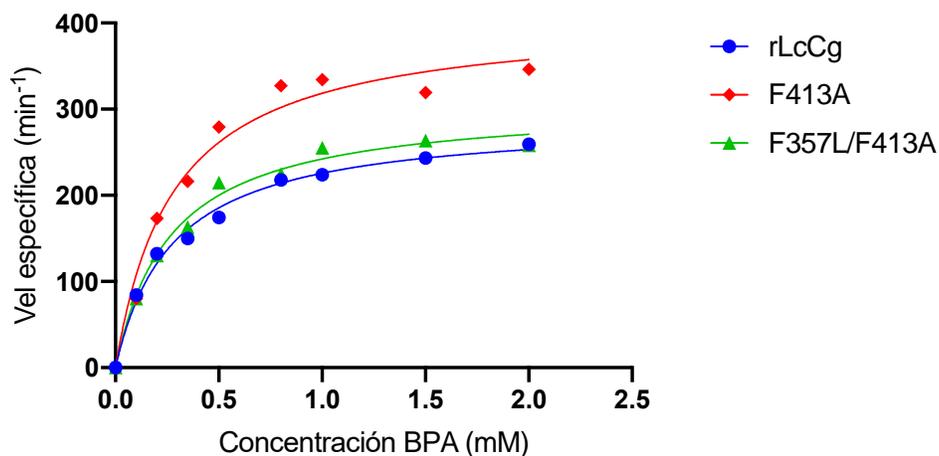


Figura 24. Cinética de actividad de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes en la oxidación de BPA en 5% de DMSO.

Utilizando el programa Prism, fue posible ajustar los datos de actividad a un modelo Michaelis-Menten. Los parámetros cinéticos de actividad calculados se muestran en la [Tabla 15](#). Para determinar la k_{cat} fue necesario considerar una preparación enzimática de 95% de cada variante con un peso de 63.7 kDa.

Tabla 15. Parámetros cinéticos de actividad de la lacasa de *C. gallica* y las variantes en la oxidación de BPA en 5% de DMSO.

Variante	k_{cat} (min^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($\text{min}^{-1}\text{mM}^{-1}$)	R^2
WT*	834	0.67	1,245	0.97
rLcCg	288	0.28	1,029	0.99
F413A	407.4	0.28	1455	0.97
F357L/F413A	307	0.27	1,137	0.99

Se realizó un análisis de Anova para determinar si hay diferencias significativas entre la eficiencia catalítica de las variantes durante la oxidación de BPA, se obtuvo una p -vale=0.64 a un nivel de confianza de 0.05, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula, concluyendo que el comportamiento cinético de las variantes es estadísticamente similar durante la oxidación de BPA, y podemos resaltar que la afinidad de la doble mutante no se vio afectada ([Anexo 5, análisis 2](#)). Los datos obtenidos de las variantes y parental son similares a lo esperado, ya que Torres Duarte reporta una eficiencia catalítica similar ($1,245 \text{ min}^{-1}\text{mM}^{-1}$) en la degradación de BPA.

Con los resultados obtenidos en los dos experimentos podemos concluir que la concentración de acetonitrilo en las reacciones influye en la eficiencia catalítica de la enzima. Como ya se ha descrito, las velocidades de transformación de las enzimas en solventes son bajas comparadas en sistemas acuosos (Carrea & Riva, 2000) ya que la afinidad del sustrato hacia el sitio activo puede estar controlada por interacciones hidrofóbicas y el coeficiente de partición del sustrato puede estar favorecido hacia el solvente en lugar del sitio activo reduciendo la eficiencia catalítica de la enzima (Ryu & Dordick, 1992). Y, por último, se debe resaltar que el comportamiento cinético de actividad de las variantes con BPA es similar entre ellas.

6.3 Estabilidad operacional durante la oxidación de BPA

Finalmente, la hipótesis de este proyecto inicia resaltando que las variantes que presentan alta estabilidad operacional durante la oxidación de fenoles simples podrían conservar su mayor estabilidad operacional con fenoles más complejos como los bisfenoles.

Para determinar la estabilidad operacional de las variantes con BPA, se cuantificó el consumo de BPA y la actividad residual durante 60 min ([Fig. 25](#)). Durante estos ensayos se utilizó la misma concentración de proteína (79 nM) y las mismas

unidades de actividad enzimática (250 U/L, medidas con siringaldazina) debido a las diferencias en la actividad específica de las variantes.

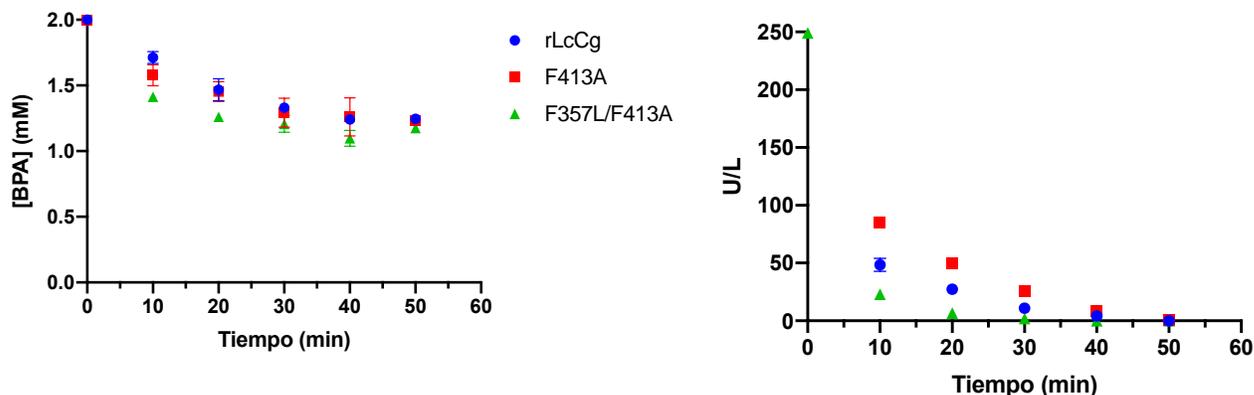


Figura 25. Estabilidad operacional de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes. Consumo de BPA (izquierda) y actividad residual (derecha) de las variantes durante la oxidación de BPA.

Tabla 16. Rendimiento de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes durante la oxidación de BPA.

Variante	Conversión de BPA (%)	Actividad residual (%)	Rendimiento ($\mu\text{mol}/\text{U}$)
rLcCg	38	0	2.98 ± 0.04 (1)
F413A	38	0	3.06 ± 0.01 (1.06)
F357L/F413A	41	0	3.31 ± 0.1 (1.14)

De acuerdo con los resultados obtenidos todas las variantes perdieron su actividad a los 60 minutos de reacción, al alcanzar una conversión del BPA alrededor del 40% (Fig. 25). Para determinar si la estabilidad operacional de las variantes es mejor con respecto a la parental, se realizó una comparación con base en el rendimiento de la enzima durante la reacción. Este rendimiento es calculado a partir de la concentración de sustrato consumido entre las unidades de enzima inactiva, expresado en $\mu\text{moles}/\text{U}$. Este rendimiento también se expresa como el número total

de recambio (TTN, *Total Turnover Number* por sus siglas en inglés) que se define como la relación entre los moles de producto por moles de catalizador.

Un aspecto que resaltamos es la comparativa entre los rendimientos obtenidos con las variantes con 4-metoxifenol (Tabla 17) y BPA (Tabla 16), como se observa los valores reportados son aproximadamente 10 veces mayores al de BPA.

Tabla 17. Rendimientos de la lacasa nativa de *C. gallica*, la lacasa recombinante y sus variantes durante la oxidación de 4-metoxifenol (Avelar et al., 2018).

Variante	% Conversión	% Actividad residual	Rendimiento ($\mu\text{mol/U}$) (incremento)
WT	88	53	14 \pm 3 (1.0)
F357L	90	73	25 \pm 4 (1.8)
F413A	92	78	34 \pm 6 (2.4)
F475I	92	53	13 \pm 1 (0.9)

A pesar de que el potencial redox del 4 metoxifenol (0.72 V) es más alto que el del BPA (0.63 V) y, por consiguiente, su radical sería más inactivante que el del bisfenol, los valores de rendimiento nos indican lo contrario. Relacionando esto al comportamiento cinético de las variantes con respecto a estos dos sustratos, Vandertol y colaboradores reportan las constantes cinéticas de la lacasa de *C. gallica* con 4 metoxifenol, $k_{\text{cat}} = 1.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, $K_M = 2.64 \mu\text{M}$ y $k_{\text{cat}}/K_M = 4.9 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ (Vandertol-Vanier et al., 2002). Comparando los valores de estas constantes con respecto a las obtenidas con BPA (Apartado 6.2), resalta una baja eficiencia catalítica (286 veces menor) en la oxidación de BPA, dando como consecuencia que al no ser tan eficiente la enzima, esta pueda catalizar la oxidación de un menor número de moléculas de BPA y por consiguiente los radicales sigan formando aductos hasta inactivarla por lo que esto podría corresponder a los bajos rendimientos con el bisfenol.

Con relación a los rendimientos reportados en la [Tabla 16](#), se realizaron pruebas de hipótesis no paramétricas (Friedman y Quade (Maris & Oostenveld, 2007)) donde la hipótesis nula es que las variantes tienen el mismo rendimiento durante la oxidación de BPA, no se rechaza para un nivel de confianza de 0.05 debido a que el valor de la P-value (0.0658) es menor al nivel de confianza ([Anexo 5, análisis 3](#)). Por lo que podemos concluir que la eficiencia operacional de las variantes es estadísticamente similar con respecto a la enzima parental con al menos este fenol más complejo (BPA).

7. CONCLUSIONES

En este trabajo, se logró expresar la doble mutante de la lacasa de *Corioloopsis gallica* variante F357L/F413A en la levadura *Pichia pastoris* con un rendimiento de 235 U por litro, una actividad específica de 86 U/mg y una pureza del 95%. El comportamiento cinético de esta variante es similar a las variantes sencillas en la oxidación de siringaldazina presentando una K_m de 16.5 μM y una k_{cat} de 82.3 s^{-1} . El pH óptimo de actividad de esta variante es igual al de la enzima parental en la oxidación de la siringaldazina (pH=4.6) y del 2,6 DMP (pH=3). La doble mutante F357L/F413A es inestable a temperaturas mayores a 50°C y de igual forma es inestable en presencia de solventes no acuosos, a diferencia de las variantes sencillas.

Los bisfenoles AF y S no fueron sustrato de ninguna de las variantes, posiblemente la alta hidrofobicidad y estabilidad oxidativa que presenta el BPAF y al alto potencial redox del BPS ($E = 0.95 \text{ V}$) en comparación con la lacasa de *C. gallica* ($E \approx 0.8 \text{ V}$).

Las variantes de la lacasa de *C. gallica* son capaces de transformar los bisfenoles A, B y F con eficiencias catalíticas similares, sin embargo, F357L/F413A tiene las eficiencias más bajas en comparación con las variantes sencillas, atribuyendo esta disminución a su inestabilidad en el solvente.

La presencia de acetonitrilo durante la reacción de oxidación de los bisfenoles influye negativamente en la eficiencia catalítica de las variantes; observamos una disminución de este parámetro cinético cuando se aumenta la concentración del solvente de 5% a 20% en la reacción.

El comportamiento cinético de actividad de las variantes es similar en la oxidación de BPA.

Finalmente, la alta estabilidad de las variantes con fenoles simples no se conserva durante la oxidación de fenoles más complejos (2.4 vs 1.1 veces).

8. PERSPECTIVAS

- Si se pretende estudiar más a fondo las variantes de la lacasa de *C. gallica*, se propone mejorar el sistema de expresión en *P. pastoris* debido a estudios previos que reportan una producción de esta enzima en el mismo sistema de expresión 10 veces mayor a lo que se obtuvo con la metodología planteada (Bronikowski et al., 2017). Una de las metodologías planteadas podría ser aplicar evolución dirigida al péptido señal para aumentar la expresión enzimática como se ha demostrado con peroxigenasas (Molina-Espeja et al., 2014).
- Entender mejor la estabilidad de la doble mutante (F357L/F413A) analizando el desplegamiento/plegamiento de las variantes mediante dicroísmo circular y fluorescencia de triptófanos.
- Analizar la interacción del BPA con la lacasa recombinante por dinámica molecular para conocer qué residuos están implicados en esta interacción y poder mejorar su eficiencia catalítica.

9. REFERENCIAS

- Arregui, L., Ayala, M., Gómez-Gil, X., Gutiérrez-Soto, G., Hernández-Luna, C. E., Herrera De Los Santos, M., Levin, L., Rojo-Domínguez, A., Romero-Martínez, D., Saparrat, M. C. N., Trujillo-Roldán, M. A., & Valdez-Cruz, N. A. (2019). Laccases: structure, function, and potential application in water bioremediation. *Microbial Cell Factories*, *18*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1248-0>
- Aschberger, K., Munn, S., Olsson, H., Pakalín, S., Pellegrini, G., Vegro, S., & Paya Perez, A. B. (2010). European Union Risk Assessment Report - BPA (4,4' – Isopropylidenediphenol (Bisphenol – A)). In *Assessment: Vol. April 2008* (Issue April 2008). <https://doi.org/10.2788/40195>
- Avelar, M., Olvera, C., Aceves-Zamudio, D., Folch, J. L., & Ayala, M. (2017). Recombinant expression of a laccase from *Corioliopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preproleader. *Protein Expression and Purification*, *136*, 14–19. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.001>
- Avelar, M., Pastor, N., Ramirez-Ramirez, J., & Ayala, M. (2018). Replacement of oxidizable residues predicted by QM-MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability. *Journal of Inorganic Biochemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.10.007>
- Baldrian, P. (2004). Purification and characterization of laccase from the white-rot fungus *Daedalea quercina* and decolorization of synthetic dyes by the enzyme. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *63*(5), 560–563. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1434-0>
- Baldrian, Petr. (2006). Fungal laccases – occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews*, *30*(2), 215–242. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x>
- Beck, S., Berry, E., Duke, S., Milliken, A., Patterson, H., Prewett, D. L., Rae, T. C., Sridhar, V., Wendland, N., Gregory, B. W., & Johnson, C. M. (2018). Characterization of *Trametes versicolor* laccase-catalyzed degradation of estrogenic pollutants: Substrate limitation and product identification. *International Biodeterioration and Biodegradation*, *127*(December), 146–159. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.11.020>
- Belfroid, A., Van Velzen, M., Van der Horst, B., & Vethaak, D. (2002). Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: Evaluation of field measurements. *Chemosphere*, *49*(1), 97–103. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(02\)00157-1](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(02)00157-1)
- Biles, J. E., McNeal, T. P., & Begley, T. H. (1997). Determination of Bisphenol a Migrating from Epoxy Can Coatings to Infant Formula Liquid Concentrates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*(12), 4697–4700. <https://doi.org/10.1021/jf970518v>
- Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., & Matsuura, T. (2009). A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination*, *239*(1–3), 229–246. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2008.03.020>
- Bronikowski, A., Hagedoorn, P. L., Koschorreck, K., & Urlacher, V. B. (2017). Expression of a new laccase from *Moniliophthora roreri* at high levels in *Pichia pastoris* and its potential application in micropollutant degradation. *AMB Express*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0368-3>
- Burley, A. S. K., & Petsko, G. a. (1985). Aromatic-Aromatic Interaction: A Mechanism of Protein Structure Stabilization Author(s): S. K. Burley and G. A. Petsko Source: *Science*, *229*(4708), 23–28.
- Cabana, H., Jones, J. P., & Agathos, S. N. (2007). Elimination of endocrine disrupting chemicals using white rot fungi and their lignin modifying enzymes: A review. *Engineering in Life Sciences*, *7*(5), 429–456.

<https://doi.org/10.1002/elsc.200700017>

- Calvo, A. M., Copa-Patiño, J. L., Alonso, O., & González, A. E. (1998). Studies of the production and characterization of laccase activity in the basidiomycete *Corioloropsis gallica*, an efficient decolorizer of alkaline effluents. *Archives of Microbiology*, *171*(1), 31–36. <https://doi.org/10.1007/s002030050674>
- Camarero, S., Pardo, I., Cañas, A. I., Molina, P., Record, E., Martínez, A. T., Martínez, M. J., & Alcalde, M. (2012). Engineering platforms for directed evolution of laccase from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(5), 1370–1384. <https://doi.org/10.1128/AEM.07530-11>
- Cañas, A. I., & Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. In *Biotechnology Advances*. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>
- Carrea, G., & Riva, S. (2000). Properties and Synthetic Applications of Enzymes in Organic Solvents. *Angewandte Chemie International Edition*, *39*(13), 2226–2254. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20000703\)39:13<2226::aid-anie2226>3.3.co;2-c](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20000703)39:13<2226::aid-anie2226>3.3.co;2-c)
- Česen, M., Lenarčič, K., Mislej, V., Levstek, M., Kovačič, A., Cimrmančič, B., Uranjek, N., Kosjek, T., Heath, D., Dolenc, M. S., & Heath, E. (2018). The occurrence and source identification of bisphenol compounds in wastewaters. *Science of the Total Environment*, *616–617*, 744–752. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.252>
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity - A Review. *Environmental Science and Technology*, *50*(11), 5438–5453. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>
- Chen, M. Y., Ike, M., & Fujita, M. (2002). Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols. *Environmental Toxicology*, *17*(1), 80–86. <https://doi.org/10.1002/tox.10035>
- Coll, P. M., Fernandez-Abalos, J. M., Villanueva, J. R., Santamaria, R., & Perez, P. (1993). Purification and characterization of a phenoloxidase (laccase) from the lignin-degrading basidiomycete PM1 (CECT 2971). *Applied and Environmental Microbiology*, *59*(8), 2607–2613. <https://doi.org/10.1128/aem.59.8.2607-2613.1993>
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., & Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, *16*(1), 23–52. <https://doi.org/10.1385/MB:16:1:23>
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, *30*(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
- Díaz-Torres, E., Gibson, R., González-Farías, F., Zarco-Arista, A. E., & Mazari-Hiriart, M. (2013). Endocrine disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water, Air, and Soil Pollution*, *224*(6), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11270-013-1586-1>
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., & Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, *104*, 19–34. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.03.021>
- García-Guevara, F., Avelar, M., Ayala, M., & Segovia, L. (2016). Computational Tools Applied to Enzyme Design – a review. *Biocatalysis*, *1*(1), 109–117. <https://doi.org/10.1515/boca-2015-0009>
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., & Sannia, G. (2010). Laccases: A never-ending story. In *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Gonzales, M. F., Brooks, T., Pukatzki, S. U., & Provenzano, D. (2013). Rapid protocol for preparation of

- electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *Journal of Visualized Experiments*, 80, 6–11. <https://doi.org/10.3791/50684>
- Gooch, J. W. (2011). Kruskal-Wallis Test. *Encyclopedic Dictionary of Polymers*, 1, 984–985. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6247-8_15268
- Guimarães, L. R. C., Woiciechowski, A. L., Karp, S. G., Coral, J. D., Zandoná Filho, A., & Soccol, C. R. (2017). 9 – Laccases. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00009-9>
- Husain, Q., & Qayyum, S. (2013). Biological and enzymatic treatment of bisphenol A and other endocrine disrupting compounds: A review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 33(3), 260–292. <https://doi.org/10.3109/07388551.2012.694409>
- Jacobs, M., Laufer, H., Stuart, J., Chen, M., & Pan, X. (2012). Endocrine-disrupting alkylphenols are widespread in the blood of lobsters from southern New England and adjacent offshore areas. *Journal of Shellfish Research*, 31(2), 563–571. <https://doi.org/10.2983/035.031.0216>
- Jingchao Chin Yi Li, Kun Zhang, H. W. (2018). Sequence Whole-genome *Escherichia* Phage-resistant Strain. *American Society for Microbiology*, 5–6.
- Jones, S. M., & Solomon, E. I. (2015). Electron transfer and reaction mechanism of laccases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72(5), 869–883. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1826-6>
- Jurgen Svava, Norbert Weferling, T. H. (2012). Organic Phosphorous Compounds. *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 27, 19–49. <https://doi.org/10.1002/14356007.a19>
- Kaczmarek, M., Kwiatos, N., Szczesna-Antczak, M., & Bielecki, S. (2017). Laccases – enzymes with an unlimited potential. In *Biotechnology and Food Science*.
- Khetan, S. K., & Collins, T. J. (2007). Human pharmaceuticals in the aquatic environment: A challenge to green chemistry. *Chemical Reviews*, 107(6), 2319–2364. <https://doi.org/10.1021/cr020441w>
- Kunamneni, A., Camarero, S., García-Burgos, C., Plou, F. J., Ballesteros, A., & Alcalde, M. (2008). Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis. *Microbial Cell Factories*, 7(January 2014). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-7-32>
- Madzak, C., Mimmi, M. C., Caminade, E., Brault, A., Baumberger, S., Briozzo, P., Mougin, C., & Jolival, C. (2006). Shifting the optimal pH of activity for a laccase from the fungus *Trametes versicolor* by structure-based mutagenesis. *Protein Engineering, Design and Selection*, 19(2), 77–84. <https://doi.org/10.1093/protein/gzj004>
- Marbach, I., Harel, E., & Mayer, A. M. (1984). Molecular properties of extracellular *Botrytis cinerea* laccase. *Phytochemistry*, 23(12), 2713–2717. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(84\)83001-0](https://doi.org/10.1016/0031-9422(84)83001-0)
- Maris, E., & Oostenveld, R. (2007). Nonparametric statistical testing of EEG- and MEG-data. *Journal of Neuroscience Methods*, 164(1), 177–190. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.03.024>
- Mehra, R., Muschiol, J., Meyer, A. S., & Kepp, K. P. (2018). A structural-chemical explanation of fungal laccase activity. *Scientific Reports*, 8(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35633-8>
- 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>
- Morozova, O. V., Shumakovich, G. P., Gorbacheva, M. A., Shleev, S. V., & Yaropolov, A. I. (2007). “Blue” Laccases. 72(10), 1136–1150.
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Godjevargova, T., Ivanov, Y., Bianco, M., Mita, L., Bencivenga, U., Mita, D.

- G., & Diano, N. (2011). Biodegradation of bisphenols with immobilized laccase or tyrosinase on polyacrylonitrile beads. *Biodegradation*, 22(3), 673–683. <https://doi.org/10.1007/s10532-010-9440-2>
- Owczarek, K., Kudłak, B., Simeonov, V., Mazerska, Z., & Namieśnik, J. (2018). Binary mixtures of selected bisphenols in the environment: Their toxicity in relationship to individual constituents. *Molecules*, 23(12), 1–15. <https://doi.org/10.3390/molecules23123226>
- Pardo, I., Santiago, G., Gentili, P., Lucas, F., Monza, E., Medrano, F. J., Galli, C., Martínez, A. T., Guallar, V., & Camarero, S. (2016). Re-designing the substrate binding pocket of laccase for enhanced oxidation of sinapic acid. *Catalysis Science and Technology*, 6(11), 3900–3910. <https://doi.org/10.1039/c5cy01725d>
- Park, H. J., Park, K., & Yoo, Y. J. (2013). Understanding the effect of tert-butanol on *Candida antarctica* lipase B using molecular dynamics simulations. *Molecular Simulation*, 39(8), 653–659. <https://doi.org/10.1080/08927022.2012.758850>
- Piontek, K., Antorini, M., & Choinowski, T. (2002). Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*, 277(40), 37663–37669. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204571200>
- Ramírez-Cavazos, L. I., Junghanns, C., Ornelas-Soto, N., Cárdenas-Chávez, D. L., Hernández-Luna, C., Demarche, P., Enaud, E., García-Morales, R., Agathos, S. N., & Parra, R. (2014). Purification and characterization of two thermostable laccases from *Pycnoporus sanguineus* and potential role in degradation of endocrine disrupting chemicals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 108, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.06.006>
- Ramirez-Ramirez, J. (2014). *ESTUDIO DE LA INACTIVACIÓN DE LA LACASA DE Corioloopsis gallica DURANTE LA OXIDACIÓN DE FENOLES*.
- Reddy, C. A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, 6(3), 320–328. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(95\)80054-9](https://doi.org/10.1016/0958-1669(95)80054-9)
- Rochester, J. R., & Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environmental Health Perspectives*, 123(7), 643–650. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408989>
- Roy, S., Jana, B., & Bagchi, B. (2012). Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme. *Journal of Chemical Physics*, 136(11). <https://doi.org/10.1063/1.3694268>
- Ruiz-Dueñas, F. J., & Martínez, Á. T. (2009). Microbial degradation of lignin: How a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*, 2(2 SPEC. ISS.), 164–177. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2008.00078.x>
- Ryu, K., & Dordick, J. S. (1992). How Do Organic Solvents Affect Peroxidase Structure and Function? *Biochemistry*, 31(9), 2588–2598. <https://doi.org/10.1021/bi00124a020>
- Ryvarden, L. (1972). *A critical checklist of the Polyporaceae in tropical East Africa*. *Norwegian Journal of Botany*, 19(3-4): 229-238.
- Sadhasivam, S., Savitha, S., Swaminathan, K., & Lin, F. H. (2008). Production, purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process Biochemistry*, 43(7), 736–742. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2008.02.017>
- Sei, K., Takeda, T., Soda, S. O., Fujita, M., & Ike, M. (2008). Removal characteristics of endocrine-disrupting chemicals by laccase from white-rot fungi. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 43(1), 53–60.

- <https://doi.org/10.1080/10934520701750397>
- Serrano-rivero, Y., & Fando-calzada, K. M. R. (2016). *Redalyc. Pichia pastoris: una plataforma para la producción de proteínas heterólogas*.
- Shao, J. (2016). *Evaluation of π - π interactions in proteins using Trp analogs : from protein labeling to quantitating the energies involved*. https://www.rug.nl/research/portal/files/36479791/Complete_thesis.pdf
- Society, C., & Yoshida, B. H. (1883). *LXII1.-Chemistry*. 47.
- Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J. G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E. H., & Muñoz-De-Toro, M. (2003). Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology*, 133(3), 287–296. [https://doi.org/10.1016/S0016-6480\(03\)00199-0](https://doi.org/10.1016/S0016-6480(03)00199-0)
- Stossi, F., Bolt, M. J., Ashcroft, F. J., Lamerdin, J. E., Melnick, J. S., Powell, R. T., Dandekar, R. D., Mancini, M. G., Walker, C. L., Westwick, J. K., & Mancini, M. A. (2014). Defining estrogenic mechanisms of bisphenol A analogs through high throughput microscopy-based contextual assays. *Chemistry and Biology*, 21(6), 743–753. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.03.013>
- Sun, Q., Wang, Y., Li, Y., Ashfaq, M., Dai, L., Xie, X., & Yu, C. P. (2017). Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Environmental Pollution*, 225, 542–549. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.018>
- Thurston, C. F. (1994). The structure and function of fungal laccases. *Commercial Law*, 1(1 994), 901–905. <https://doi.org/10.5771/9783845276564-901>
- Torres-Duarte, C., Viana, M. T., & Vazquez-Duhalt, R. (2012). Laccase-mediated transformations of endocrine disrupting chemicals abolish binding affinities to estrogen receptors and their estrogenic activity in zebrafish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(4), 864–876. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9825-2>
- Tu, T., Li, Y., Su, X., Meng, K., Ma, R., Wang, Y., Yao, B., Lin, Z., & Luo, H. (2016). Probing the role of cation- π interaction in the thermotolerance and catalytic performance of endo-polygalacturonases. *Scientific Reports*, 6(12), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep38413>
- Vandertol-Vanier, H. A., Vazquez-Duhalt, R., Tinoco, R., & Pickard, M. A. (2002). Enhanced activity by poly(ethylene glycol) modification of Coriopsis gallica laccase. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 29(5), 214–220. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000308>
- Ward, O. P., & Moo-Young, M. (1976). *Thermostable enzymes*. 145(1958), 141–145.
- Wood, D. A. (1980). Production, purification and properties of extracellular laccase of Agaricus bisporus. *Journal of General Microbiology*, 117(2), 327–338. <https://doi.org/10.1099/00221287-117-2-327>
- Xu, F. (1997). Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. *Journal of Biological Chemistry*, 272(2), 924–928. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.2.924>
- Xu, F., Palmer, A. E., Yaver, D. S., Berka, R. M., Gambetta, G. A., Brown, S. H., & Solomon, E. I. (1999). Targeted mutations in a Trametes villosa laccase: Axial perturbations of the T1 copper. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18), 12372–12375. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12372>
- Y.Yamada et al. (1956). *Pfaff leeuwenhoek*. 115.
- Yang, O., Kim, H. L., Weon, J.-I., & Seo, Y. R. (2015). Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *Journal of Cancer Prevention*, 20(1), 12–24. <https://doi.org/10.15430/jcp.2015.20.1.12>
- Yoon, J. H., & Mckenzie, D. (2005). A comparison of the activities of three β -galactosidases in aqueous-organic

- solvent mixtures. *Enzyme and Microbial Technology*, 36(4), 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.09.014>
- Yoshitake, A., Katayama, Y., Nakamura, M., Iimura, Y., Kawai, S., & Morohoshi, N. (1993). N-linked carbohydrate chains protect laccase III from proteolysis in *Coriolus versicolor*. *Journal of General Microbiology*, 139(1), 179–185. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-1-179>
- Zdarta, J., Anteck, K., Frankowski, R., Zgoła-Grzeškowiak, A., Ehrlich, H., & Jesionowski, T. (2018). The effect of operational parameters on the biodegradation of bisphenols by *Trametes versicolor* laccase immobilized on *Hippospongia communis* spongin scaffolds. *Science of the Total Environment*, 615, 784–795. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.213>
- Zhang, H., Zhang, Y., Li, J., & Yang, M. (2019). Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China. *Science of the Total Environment*, 655, 607–613. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.053>
- Zheng, Z., Liu, J., Wang, M., Cao, J., Li, L., Wang, C., & Feng, N. (2016). Selective sensing of bisphenol A and bisphenol S on platinum/poly(diallyl dimethyl ammonium chloride)-diamond powder hybrid modified glassy carbon electrode. *Journal of the Electrochemical Society*, 163(6), B192–B199. <https://doi.org/10.1149/2.0281606jes>
- Zhu, L., Yang, W., Meng, Y. Y., Xiao, X., Guo, Y., Pu, X., & Li, M. (2012). Effects of organic solvent and crystal water on γ -chymotrypsin in acetonitrile media: Observations from molecular dynamics simulation and DFT calculation. *Journal of Physical Chemistry B*, 116(10), 3292–3304. <https://doi.org/10.1021/jp3002405>

10. ANEXOS

ANEXO 1. Secuenciación del gen de la variante F357L/F413A de la lacasa de *C. gallica*.

Alineamiento de la secuencia del gen de la variante F357L/F413A (seq_1) con el gen de rLcG (Seq_2) (en recuadros rojos se muestran los nucleótidos diferentes en ambas secuencias).

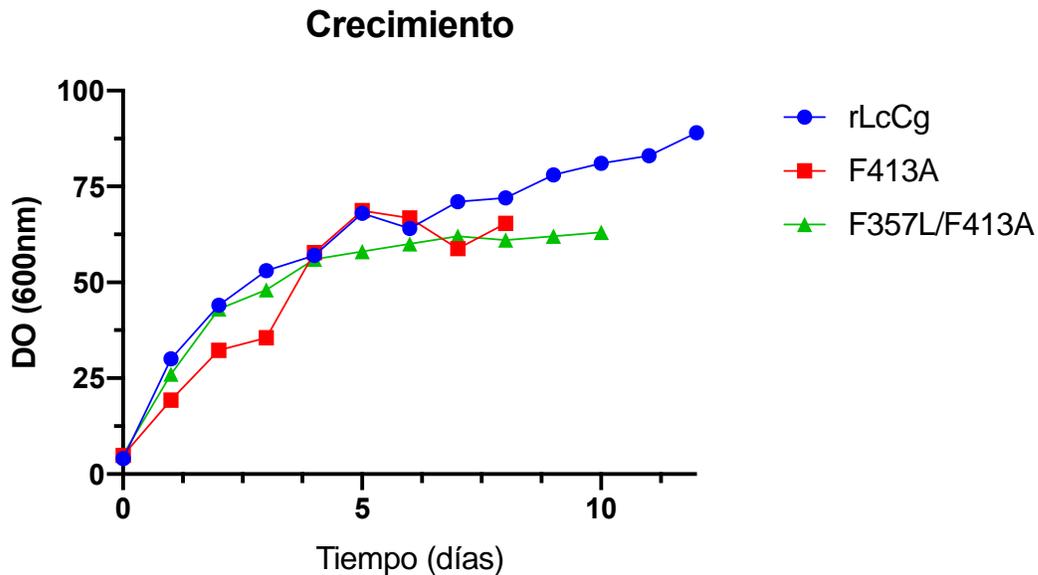
Seq_1	1	-----AACGAGGAATTCATGAGATTCCCT	24
Seq_2	901	caacttgagaagatcaaaaaacaactaattattcgaaacgaggaattcatgagattccct	960
Seq_1	25	TCCATTTTCACCGATGCTCTTATTTGCTGCTTCTTCCGCTTTGGCTGCTCCAGTCAACACC	84
Seq_2	961	tccat t t t c a c c g a t g t c t t a t t t g c t g c t t c t t c c g c t t t g g c t g c t c c a g t c a a c a c c	1020
Seq_1	85	ACAACAGAGGATGAGACCGCTCAAATTCAGCTGAAGCAGTTATCGGTTATAGTGATTTG	144
Seq_2	1021	acaacagaggatgagaccgctcaaattcagctgaagcagttatcggttatagtgatttg	1080
Seq_1	145	GAGGGAGACTCTGATGTTGCTGTCTTGCCTTTTTC TAACGGTACAAACAACAGATTGTTA	204
Seq_2	1081	gagggagactctgatgttgctgtcttgcctttttc taacggtacaaacaacagattgtta	1140
Seq_1	205	TTCATTAACACTACAATCGCTAGTATCGCTGCAAAAGAAGAGGGTGTTTCTTTGGAAAAG	264
Seq_2	1141	ttcat taacactacaatcgctagtatcgctgcaaaagagagggtgtttctttggaaaag	1200
Seq_1	265	AGAGGAGCCGAGGCTCATATGGCAATTGGTCCAGTTGCCGACTTAACTATCTCAATGGT	324
Seq_2	1201	agaggagccgaggctcataatggcaattgggtccagttgccgacttaactatctccaatggt	1260
Seq_1	325	GCAGTCAGTCCTGATGGATTTTCTAGAC AAGCCATTTGGTTAACGACGCTTCCCATCT	384
Seq_2	1261	gcagtcagtcctgatggat t t t c t a g a c a a g c c a t t t t g g t t a a c g a c g t c t t c c c a t c t	1320
Seq_1	385	CCTTTAATCACAGGTAATAAGGGAGATAGATTCCAGTTGAACGTTATCGAC AACATGACC	444
Seq_2	1321	cctttaatcacaggtaataagggagatagattccagttgaacgtatcgacaacatgacc	1380
Seq_1	445	AACCACACTATGTTAAAGTCCACAAGTATCCATTGGCACGGTTTCTTTCAACATGGAACC	504
Seq_2	1381	aaccacactatg t t a a a g t c c a c a a g t a t c c a t t g g c a c g g t t t c t t t c a a c a t g g a a c c	1440
Seq_1	505	AATTGGGCCGATGGTCCAGCTTTTGTTAAC CAGTGCCTATTTC AACTGGACATGCTTTC	564
Seq_2	1441	aattgggccgatggtccagcttttgttaaccagtgctctatttcaactggacatgctttc	1500
Seq_1	565	TTGTATGATTTCCAAGTTCCAGACCAGGCAGGTACATCTGGTATCATTCCC ACTTGAGT	624
Seq_2	1501	ttgtatgat t t t c c a a g t t c c a g a c c a g g t a c a t c t g g t a t c a t t c c c a c t t g a g t	1560

ANEXO 2. Lacasa recombinante de *Coriopsis gallica* en *Pichia pastoris*.

Esta enzima posee una masa molecular de 63.7 kDa, un poco más alta que la enzima nativa (60.4 kDa). La lacasa nativa tiene dos sitios de glicosilación que corresponden a las posiciones Asn 51 y 433 (Avelar et al., 2017). Mientras que se conoce que la levadura *P. pastoris* puede tener N y O glicosilación y los carbohidratos más comunes son manosas (Glc3Man9GlcNAc2 (Glc = glucosa; GlcNAc = N- acetilglucosamina) en residuos de asparagina en los sitios de reconocimiento Asn-X-Ser/Thr (Cregg et al., 2000).

ANEXO 3. Producción de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes F413A y F357L/F413A.

La producción de estas variantes se realizó a partir de un medio de crecimiento (BMGY) y un medio de expresión (BMM), en las cuales se lograron alcanzar densidades celulares alrededor de las 90 unidades y con respecto a la expresión de la enzima un valor máximo de 240 U por litro de cultivo.



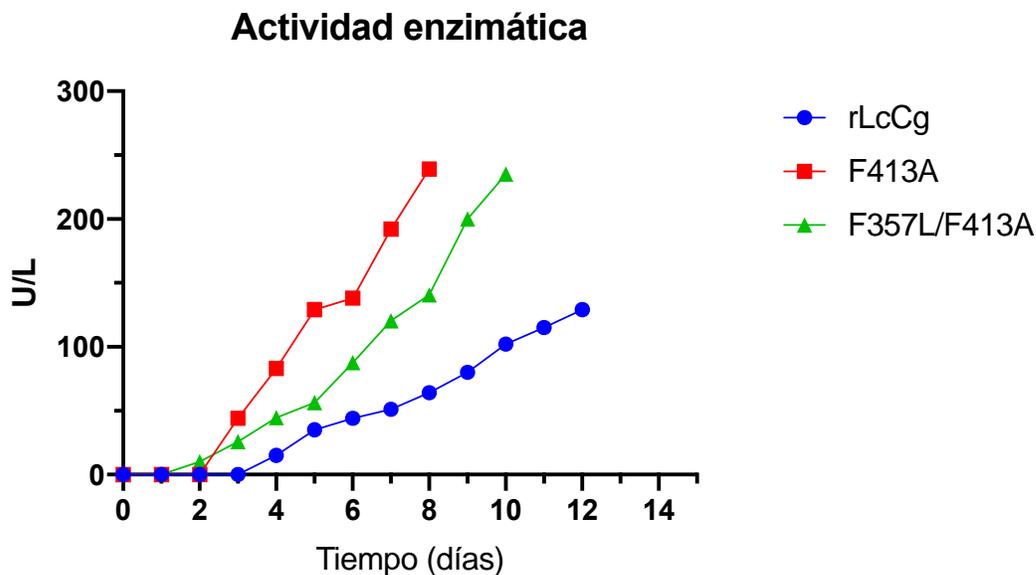


Figura 27. Crecimiento y actividad enzimática de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes en medio BMM.

ANEXO 4. Purificación en *Pichia pastoris* de la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes F357L/F413A.

La purificación de las variantes se inició a partir de la centrifugación del medio de cultivo (BMM) a 8,000 rpm a 4°C durante 20 min. Posteriormente se concentró el sobrenadante por ultrafiltración con una membrana con corte de 30 kDa.

El concentrado fue cargado en una columna de intercambio aniónico débil DEAE, siguiendo el protocolo descrito a continuación.

1. Equilibrar la columna con 2 V de buffer de fosfatos 60 mM a pH 6 y un flujo de 2 mL/min.
2. Cargar la muestra a un flujo de 1 mL/min.
3. Colectar fracciones de 5 mL.
4. Lavar la columna con buffer de fosfatos 60 mM con 1 M de NaCl.
5. Se mide la actividad volumétrica y concentración de proteína de cada fracción que presente actividad.
6. Concentrar las fracciones con actividad específica similar por ultrafiltración con una membrana con corte de 10 kDa.

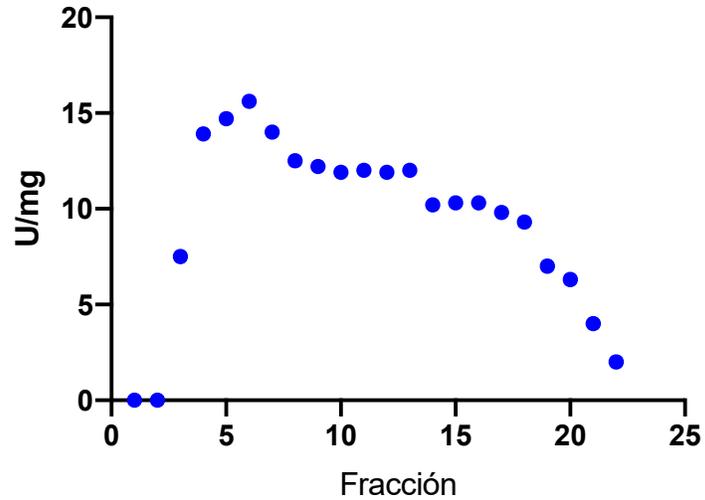


Figura 28. Actividad específica de las fracciones obtenidas durante la purificación de la lacasa recombinante utilizando por cromatografía de intercambio aniónico débil utilizando una columna DEAE marca Biorad.

El concentrado se cargará en una columna de exclusión molecular Sephadex G75 (60mL) siguiendo el protocolo que se describe a continuación.

1. Equilibrar la columna con 2 V de buffer de fosfatos 10 mM a pH 6 y un flujo de 1 mL/min.
2. Cargar la muestra a un flujo de 0.5 mL/min.
3. Colectar inmediatamente fracciones de 2 mL.
4. Lavar la columna con 2 V de buffer de fosfatos 10 mM.
5. Se mide la actividad volumétrica y concentración de proteína de cada fracción que presente actividad.
6. Concentrar las fracciones con actividad específica similar por ultrafiltración con una membrana con corte de 10 kDa.

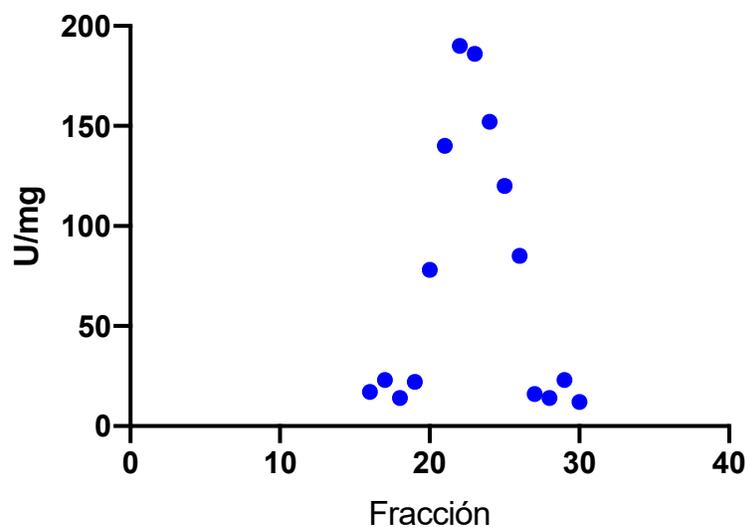


Figura 29. Actividad específica de las fracciones obtenidas durante la purificación de la lacasa recombinante por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna Sephadex G75 marca Biorad.

Tabla 18. Tren de purificación de la variante F413A.

Paso de purificación	Actividad total (U)	Proteína total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Rendimiento (%)	Factor de purificación
Sobrenadante	250	51	5	100	1
Ultrafiltración (30 kDa)	272	20	14	109	3
DEAE	133	3	41	53	8
Sephadex G75	61	0	166	24	34

ANEXO 5. Análisis estadísticos

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa NCSS.

- **Análisis 1.** Eficiencias catalíticas de la lacasa recombinante y sus variantes en la oxidación de BPA, BPB y BPF.
 1. Hipótesis nula: La capacidad oxidativa de las enzimas (rLcCg, F413A y F357L/F413A) estudiadas es similar para la oxidación de los bisfenoles.

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	2	13.88927	6.944637	0.34	0.721639	0.084007
S(A)	6	120.9065	20.15109			
Total (Adjusted)	8	134.7958				
Total	9					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Como p-value=0.721639>0.05, no se rechaza H0 de que la capacidad oxidativa de las enzimas es similar estadísticamente.

2. Hipótesis nula: La oxidación de los bisfenoles (BPA, BPB y BPF) es similar para las enzimas estudiadas.

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares (Alpha=0.05)	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	2	11008.8	5504.401	24.65	0.000002*	0.999989
S(A)	24	5360.231	223.343			
Total (Adjusted)	26	16369.03				
Total	27					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: Se rechaza H0, dado que p-value= 0.000002; al menos la oxidación de un bisfenol es diferente.

Para visualizar que tratamiento es diferente se realizó un diagrama de cajas.

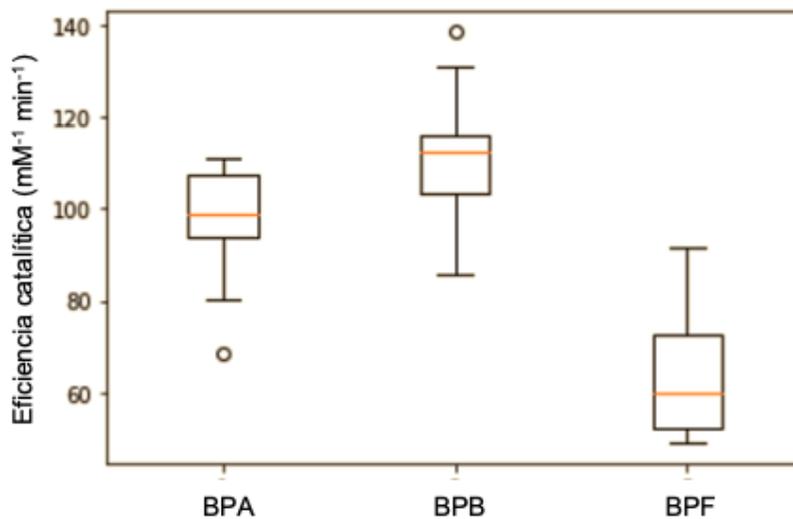


Figura 30. Diagrama de cajas de la oxidación de los bisfenoles catalizada por las enzimas estudiadas (rLcCg, F413A y F357L/F413A).

Conclusión: La oxidación del BPF es diferente a la oxidación de los bisfenoles A y B.

- **Análisis 2.** Cinéticas de actividad de la lacasa de *C. gallica*, la lacasa recombinante de *C. gallica* y sus variantes F413A y F357L/F413A en la oxidación de BPA.

Hypotheses

H0: All medians are equal.

Ha: At least two medians are different.

Analysis of Variance Table

Source Term	DF	Sum of Squares	Mean Square	F-Ratio	Prob Level	Power
A (...)	2	39268.17	19634.08	0.47	0.644033	0.097379
S(A)	6	248580.3	41430.04			
Total (Adjusted)	8	287848.4				
Total	9					

* Term significant at alpha = 0.05

Conclusión: No se rechaza H0, dado que p-value= 0.644033, por lo tanto, la eficiencia catalítica de las variantes es estadísticamente similar durante la oxidación de BPA.

- **Análisis 3.** Estabilidad operacional de la lacasa recombinante y sus variantes F413A y F357L/F413A durante la oxidación de BPA.

Se realizaron pruebas de hipótesis no paramétricas (Friedman y Quade)

Hipótesis nula: Las enzimas rLcCg, F413A y F357L/F413A tienen el mismo rendimiento durante la oxidación de BPA.

Quade test

Enzimas	A	B	C
1	99.74333	126.05333	79.95000
2	103.93667	94.93333	59.81167
3	85.92067	113.82333	50.04967

```
> (Pquade<- quade.test(p))
```

Quade test

data: p

Quade F = 5.6364, num df = 2, denom df = 4, p-value = 0.06859

Conclusión: El p-value es mayor a $\alpha = 0.05$ (5%) de confianza, por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula H_0 , es decir, el rendimiento de las enzimas rLcCg, F413A y F357L/F413A es estadísticamente igual durante la oxidación de BP



OXIDATION OF ENDOCRINE DISRUPTORS CATALYZED BY VARIANTS OF A FUNGAL LACCASE WITH HIGH OPERATIONAL STABILITY



*Alina Elizabeth Torres Aguirre, Marcela Ayala Aceves. Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, 62210, Cuernavaca, Mexico. *aeta@mail.ibt.unam.mx

Key words: Bisphenols, endocrine disruptors, laccases, operational stability.

Introduction

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are emergent pollutants that are found mainly in wastewater from industrial and communal sources. Laccases is one of most promising enzymes for the transformation EDCs because it only uses oxygen as an oxidant producing free radicals and water¹. The main disadvantage of laccases is that the radicals produced during the reaction gradually inactivate the enzyme. In this work we studied the oxidation of selected EDCs using variants of a laccase from the basidiomycete *Coriolopsis gallica* (LcCg) that display higher operational stability than the parental enzyme for the oxidation of phenols².

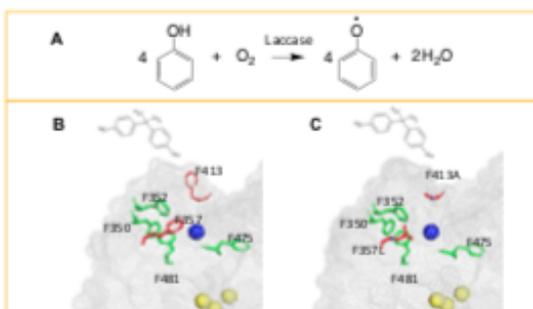


Figure 1 A) Laccase-catalyzed phenol oxidation B) Active site in LcCg C) Active site in variants of LcCg in which Phe residues have been replaced

Results

Avelar et al. reported an operational stability 2.6 and 1.9-fold higher for the laccase variants F413A and F357L, respectively, during 4-methoxyphenol oxidation². In this work we explored if the higher operational stability of the variants is also maintained for the oxidation of more complex and hydrophobic phenols like bisphenols. Also, we generated a double mutant F413A/F357L, to explore its kinetic and stability properties. The bisphenols are emergent pollutants in wastewater causing problems related to their endocrine disruptor character. The bisphenols used in this work were selected for its endocrine activity, presence and persistence in the environment. Bisphenol S and AF were not substrates for the variants. As shown in Table 1, the oxidation of bisphenols is catalyzed by LcCg variants. The individual values of *k*_{cat} and *K*_m was not determined for all bisphenols because the solubility limit appears to be lower than substrate saturation concentration. Substrate concentration as high as 10 mM were still below enzyme saturation.

Table 1. Catalytic efficiency of the variants in the oxidation of bisphenols

Variant	BPA <i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m (M ⁻¹ min ⁻¹)	BPB <i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m (M ⁻¹ min ⁻¹)	BPF <i>k</i> _{cat} / <i>K</i> _m (M ⁻¹ min ⁻¹)
<i>l.cCg</i>	99	124.5	79.4
F413A	304.3	95.1	62.3
F413A/F357L	86.3	112	50

Methodology

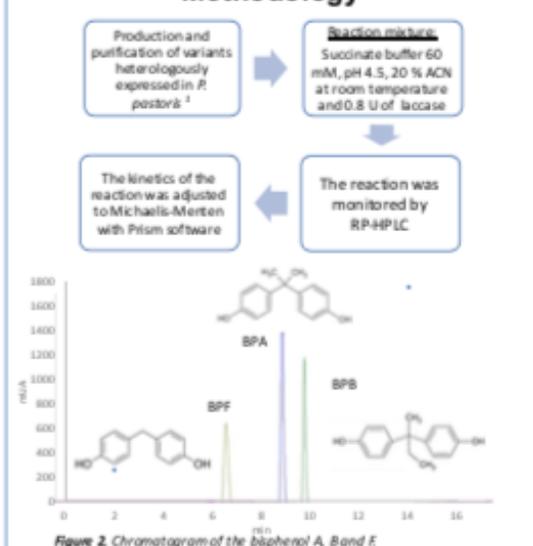


Figure 2. Chromatogram of the bisphenol A. Band F.

Conclusions

Catalytic efficiency of the variants is apparently similar in the oxidation of BPA, BPB and BPF compared to parental (*l.cCg*). BPF oxidation is less efficient compared to the other bisphenols.

Perspectives

Determine the operational stability for the single and double variant for the oxidation of bisphenols. Study the variants in the presence of mediators, for the oxidation of BPS and BPAF.

References

- Avelar, M., Olvera, C., Acero-Zamudio, D., Faldut, J. L., & Ayala, M. (2017). Recombinant expression of a laccase from *Coriolopsis gallica* in *Pichia pastoris* using a modified α -factor preprotease. *Protein Expression and Purification*, 136, 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.06.001>
- Avelar, M., Pastor, N., Ramírez-Ramírez, J., & Ayala, M. (2018b). Replacement of oxidizable residues predicted by QM/MM simulation of a fungal laccase generates variants with higher operational stability. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 179, 105-118. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.08.002>
- Torres-Duarte, C., Viana, M. T., & Jacques-Dubois, S. (2015). Laccase-Mediated Transformations of Endocrine Disrupting Chemicals Affecting Affinities to Estrogen Receptors and Their Estrogenic Activity in Zebrafish. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 168(8), 864-876. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-0615-1>
- Jones SA, Solomon B (2015) Electron transfer and reaction mechanisms of laccase. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71(5):887-893. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1824-6>

Acknowledgements. Authors thank Dra. Clarita Olvera and technical support of Biol. Rosa Román. We also thank financial support from CONACYT, scholarship 924843, and the Latin American Protein Society Meeting for the opportunity to present this work.