

La investigación reportada en esta tesis es parte de los programas de investigación del CICESE (Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, BC.).

La investigación fue financiada por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología).

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de lo 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 o titular de los Derechos Autor.

CICESE@ 2022. Todos los derechos reservados

**Centro de Investigación Científica y de Educación  
Superior de Ensenada, Baja California**



---

**Maestría en Ciencias  
en Nanociencias**

---

**Optimización de la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* para  
la transferencia directa de electrones en biosensores**

Tesis  
para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias

Presenta:

**David Morales Gutiérrez**

Ensenada, Baja California, México  
2022

Tesis defendida por  
**David Morales Gutiérrez**  
y aprobada por el siguiente Comité

---

**Dr. Andrés Zárate Romero**  
Director de tesis

**Dr. Rafael Vázquez Duhalt**

**Dra. Ernestina Castro Longoria**

**Dr. César Salvador Cardona Félix**



---

**Dr. José Manuel Romo Herrera**  
Coordinador del Posgrado en Nanociencias

---

**Dr. Pedro Negrete Regagnon**  
Director de Estudios de Posgrado

Resumen de la tesis que presenta **David Morales Gutiérrez** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias en Nanociencias.

### **Optimización de la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* para la transferencia directa de electrones en biosensores**

Resumen aprobado por:

---

Dr. Andrés Zárate Romero  
**Director de tesis**

En ocasiones las enzimas obtenidas directamente de los organismos que las producen no cuentan con las características óptimas para usos en biodetección, por lo que la optimización de estas ha sido foco de investigación. Una de las enzimas que ha captado especial atención es la L-Lactato oxidasa (LOx), que se utiliza para la detección de L-lactato en diagnóstico clínico, así como para el control de procesos fermentativos. Por otro lado, las primeras generaciones de biosensores usan oxígeno o mediadores redox para la transferencia de electrones, lo cual limita su aplicabilidad en dispositivos implantables, por lo que la transferencia directa de electrones (DET) apunta a ser una mejor alternativa para una biodetección eficiente. En el presente trabajo se optimizó la LOx de *Aerococcus viridans* por apertura del sitio catalítico (para la creación de nanocúmulos de platino) o por inmovilización molecular orientada en superficies de oro para eficientizar la DET en biosensores amperométricos. Se diseñaron 3 mutantes para la apertura del sitio activo en el que se cambió la arginina 181 por residuos hidrofóbicos de cadena más corta (R181A, R181V Y R181I) y una mutante para el anclaje a superficies de oro donde se sustituyó la lisina 188 por cisteína (K188C). Todas las mutantes se expresaron en *E. coli* BL21 (DE3) y purificaron en 2 pasos (cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio iónico). Los ensayos de actividad mostraron una disminución de la actividad de las 4 mutantes con respecto a la enzima de tipo silvestre; sin embargo, la afinidad al sustrato ( $K_m$ ) de las mutantes R181V y K188C no fue afectada. La creación de nanocúmulos de platino se caracterizó por DLS, el ensayo mostró partículas de entre 500 y 1000 nm, mostrando indicios de una DET. Por otra parte, las pruebas de anclaje de la mutante K188C evidenciaron una superficie de oro con enzima inmovilizada y activa; así mismo, los ensayos electroquímicos mostraron un pico redox en presencia de sustrato y una respuesta amperométrica dependiente de la concentración de lactato en ausencia de mediadores lo que demuestra que la mutante K188C es capaz de llevar a cabo la DET.

**Palabras clave:** Lactato oxidasa, biosensor, nanocúmulo de platino, inmovilización molecular orientada, DET.

Abstract of the thesis presented by **David Morales Gutiérrez** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Nanoscience.

### **Optimization of *Aerococcus viridans* lactate oxidase for direct electron transfer in biosensors**

Abstract approved by:

---

Dr. Andrés Zárate Romero  
**Thesis Director**

The enzymes obtained directly from the organisms usually do not have the optimal characteristics for its use in biosensors. Thus, the optimization of these enzymes has been the focus of research. Among these enzymes L-lactate oxidase (LOx) is gained attention. LOx is used for the detection of L-lactate in clinical diagnostics or in the control of fermentation processes. On the other hand, the first generations of biosensors use oxygen or redox mediators for electron transfer, which limits their applicability in implantable devices, so direct electron transfer (DET) appears to be a better alternative for efficient biodetection. Therefore, in the present work, the LOx of *Aerococcus viridans* was optimized in two ways: first by opening the catalytic site (for the creation of platinum nanoclusters) and by producing a molecularly oriented immobilization on gold surfaces for efficient direct electron transfer in amperometric biosensors. Three mutants were designed to opening the active site where arginine 181 was replaced by shorter chain hydrophobic residues (R181A, R181V and R181I). On the other hand, a mutant for anchoring to gold surfaces was produced where lysine 188 was replaced by cysteine (K188C). All mutants were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) and purified in 2 steps (nickel affinity chromatography and ion exchange chromatography). Activity assays showed a decrease in activity of the 4 mutants with respect to the wild-type enzyme, however, the substrate affinity ( $K_m$ ) of the R181V and K188C mutants was not affected. To test the creation of platinum nanoclusters they were characterized by DLS, the assay showed particles between 500 and 1000 nm, and the electrochemical assays suggested a DET. On the other side, anchoring tests of the K188C mutant evidenced a gold surface with immobilized and active enzyme, and electrochemical assays showed a redox peak in the presence of substrate and an amperometric response dependent on lactate concentration in the absence of mediators, these results demonstrate that K188C is capable to perform a DET.

**Keywords:** Lactate oxidase, biosensor, platinum nanocluster, molecularly oriented immobilization, DET.

## Dedicatoria

“Cuando camines, camina junto a los soñadores, a los que confían, a los que tienen coraje, a los alegres, a los que hacen planes, a los que actúan, todos aquellos que tienen la cabeza en las nubes, pero los pies en la tierra. Deja que su espíritu encienda tu fuego interno para que entonces puedas también dejar el mundo mejor de lo que lo encontraste”.

-Anónimo

Dedicada a mi Madre y Hermano que han creído en mí, han luchado junto a mí y me han apoyado incondicionalmente.

A mi Padre, que siempre me acompañará y me enseñó que, aunque las cosas sean difíciles siempre hay que seguir hacia adelante.

A mi familia de sangre y a la que me ha adoptado como uno de ellos, por darme su amor y alentarme a seguir dando el máximo en todas las áreas de mi vida.

A mis amigos que se han vuelto mis hermanos, por enseñarme el valor de la lealtad y cariño.

Esta tesis no solo es la culminación de 2 años de trabajo, es la suma de experiencias, vivencias, personas, objetivos y sueños que han influido a lo largo de mi vida para alentarme a buscar la mejor versión de mí.

## Agradecimientos

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Baja California (CICESE) y al Centro de Nanociencias y Nanotecnología (CNYN-UNAM) por aceptarme en el posgrado y permitirme el uso de instalaciones y recursos para la realización de este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de posgrado otorgada (CVU. 1067617) permitiendo la culminación de esta maestría.

Al proyecto al proyecto UC-MEXUS CN-20-268 titulado *Enhancement of L-lactate oxidase activity in acidic pH by modulating the pKa of the catalytic residue His 265 by site directed mutagenesis*, por el financiamiento de esta investigación.

Al Departamento de Bionanotecnología del CNYN por el uso de su equipo para la realización del proyecto.

Al Dr. Andrés Zárate Romero por aceptarme como tesista, confiar en mí en todo momento, y guiarme de la mano en el desarrollo de esta investigación proporcionándome herramientas, conocimientos y un ambiente óptimo de trabajo.

Al Dr. Raúl García Morales, por brindarme su amistad, apoyo y conocimientos en todo momento.

A mi comité de tesis, el Dr. Rafael Vázquez Duhalt, la Dra. Ernestina Castro Longoria y el Dr. César Salvador Cardona Félix por sus aportaciones y apoyo en la revisión y desarrollo de esta investigación.

Al personal administrativo que me ayudó y asesoró con trámites para el ingreso, estancia y culminación de la maestría.

A la M. en Admon. Itandehui Betanzo Gutiérrez por el apoyo y asistencia técnica brindados durante el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros y amigos del laboratorio que me brindaron apoyo, lealtad y risas para sobrellevar los malos ratos.

A los Doctores del laboratorio que me ayudaron en el uso de equipo y material de este.

A mi familia que siempre estuvo al pendiente de mí, alentándome a no darme por vencido nunca.

A mi equipo y entrenadores por enseñarme a ser resiliente, disciplinado y determinado.

A mis amigos, que sabrán que me refiero a ellos cuando lean estas líneas, por escucharme, darme consejos, estar en las risas y en los llantos, aguantando todas las veces que mencioné o ensayé este proyecto con ellos.

## Tabla de contenido

	Página
Resumen en español.....	ii
Resumen en inglés.....	iii
Dedicatoria .....	iv
Agradecimientos.....	v
Lista de figuras.....	viii
Lista de tablas .....	x
<b>Capítulo 1. Introducción.....</b>	<b>1</b>
1.1 Antecedentes .....	4
1.1.1 Biosensores de L-lactato oxidasa .....	4
1.1.2 Transferencia directa de electrones en diferentes aplicaciones de biosensores .....	5
1.1.3 Nanocúmulos de platino a partir de la oxidación de L-lactato oxidasa y anclaje de enzimas a electrodos de oro .....	9
1.2 Justificación.....	10
1.3 Hipótesis.....	10
1.4 Objetivos .....	11
1.4.1 Objetivo general.....	11
1.4.2 Objetivos específicos.....	11
<b>Capítulo 2. Metodología.....</b>	<b>12</b>
2.1 Análisis de la estructura para diseño de mutantes.....	12
2.2 Obtención de las mutantes .....	12
2.2.1 Plásmidos y cepas.....	12
2.2.2 Mutación en el gen AvLOx por el método de doble PCR .....	13
2.2.3 Clonación de gen mutante en el plásmido pJET.....	16
2.2.4 Clonación de gen mutante en el plásmido pET-28a(+) .....	17
2.3 Expresión y purificación de la enzima .....	18
2.3.1 Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC) .....	19
2.3.2 Cromatografía de Intercambio iónico .....	19
2.4 Caracterización enzimática .....	20
2.5 Crecimiento de nanocúmulos de platino para DET.....	21
2.6 Inmovilización de enzima K188C en superficies de oro .....	21



2.6.1	Pruebas de inmovilización Au-K188C.....	21
2.7	Pruebas electroquímicas para comprobar transferencia directa de electrones .....	22
<b>Capítulo 3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>24</b>
3.1	Obtención de mutantes <i>in silico</i> y minimización de estructuras .....	24
3.2	Obtención de mutantes .....	29
3.2.1	PCR para obtención de megacebadores .....	29
3.2.2	Segunda PCR para obtención de gen AvLOx mutante .....	30
3.2.3	Análisis de la primera secuenciación.....	31
3.2.4	Digestión de gen AvLOx mutante para la clonación en el plásmido pET-28a(+)......	33
3.2.5	Transformación de <i>E.coli</i> XL1-BLUE con AvLOx-pET-28a(+). .....	33
3.2.6	Análisis de la segunda secuenciación.....	35
3.3	Expresión y purificación de la enzima AvLOx.....	36
3.3.1	Purificación por cromatografía de afinidad a níquel.....	36
3.3.2	Purificación por cromatografía de intercambio iónico .....	38
3.3.3	Cuantificación de proteína por método de Bradford.....	41
3.3.4	Caracterización enzimática .....	41
3.4	Nucleación de platino a partir de la oxidación de L-lactato (R181A, R181V, R181I) .....	43
3.5	Inmovilización de enzima (K188C) en superficies de oro y pruebas DET.....	45
3.5.1	Actividad de enzima inmovilizada .....	45
3.5.2	Espectroscopía de Impedancia Electroquímica del electrodo con enzima inmovilizada..	46
3.5.3	Pruebas electroquímicas para comprobar transferencia directa de electrones .....	47
<b>Capítulo 4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>53</b>
<b>Capítulo 5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
	<b>Literatura citada .....</b>	<b>62</b>
	<b>Anexos .....</b>	<b>68</b>

## Lista de figuras

Figura	Página
1. Reacción de la L-lactato oxidasa .....	3
2. Vías de reacción de la L-lactato oxidasa.....	5
3. Caracterización electroquímica de b2LOx.....	8
4. Formación de nanocúmulos de platino en GOx.....	9
5. Canal de entrada al sitio activo de AvLOx.....	24
6. Mutante <i>in silico</i> AvLOx R181A .....	25
7. Mutante <i>in silico</i> AvLOx R181V .....	26
8. Mutante <i>in silico</i> AvLOx R181I.....	27
9. Túnel de acceso al sitio activo de la AvLOx.....	28
10. Distancia entre el FMN, Y40 y C188 en la mutante K188C .....	29
11. Amplificación de megacebadores mutagénicos .....	29
12. Amplificación del gen AvLOx mutante.....	30
13. Colonias positivas a mutantes AvLOx-pJET 1.2 .....	31
14. Alineamiento de las secuencias AvLOx R181A-pJET1.2 y AvLOx-pET-28a(+). ....	32
15. Digestión de construcciones mutantes AvLOx-pJET y pET-28a(+). ....	33
16. Colonias positivas a mutantes AvLOx-pET28a(+). ....	34
17. Alineamiento de las secuencias AvLOx R181A y AvLOx silvestre en pET-28a(+). ....	35
18. Purificación de mutantes AvLOx por cromatografía de afinidad a níquel .....	38
19. Cromatografía de intercambio aniónico de la mutante R181V. ....	39
20. Fracciones de la cromatografía de intercambio iónico de las mutantes AvLOx. ....	40
21. Mutantes de AvLOx purificadas .....	40
22. Caracterización enzimática de mutantes AvLOx.....	42
23. Distribución de tamaños por volumen de las Pt@AvLOx obtenidas para cada mutante.....	44
24. Espectro de impedancia electroquímica.....	46

25. Voltametría cíclica de AvLOx K188C inmovilizada en oro.....	47
26. Evaluación de $J_{max}$ a diferentes potenciales .....	48
27. Caracterización de la respuesta amperométrica de K188C .....	49
28. Respuesta amperométrica de K188C posteriormente al almacenamiento.....	50
29. Determinación de $J_{max}$ de K188C .....	51
30. Diagrama del vector pJET 1.2/blunt.....	68
31. Diagrama del vector pET-28a(+)......	69
32. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva R181V .....	70
33. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva R181I.....	71
34. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva K188C .....	72
35. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva R181V en el plásmido pET-28a(+)......	73
36. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva R181I en el plásmido pET-28a(+)......	74
37. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva K188C en el plásmido pET-28a(+)......	75
38. Cromatogramas obtenidos tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico de cada mutante .....	79

## Lista de tablas

Tabla	Página
1. Parámetros cinéticos de la caracterización de las LOx comercial, mutante y silvestre (Taurino et al., 2013).....	6
2. Cambios en aminoácidos elegidos para la AvLOx después analizar de las mutaciones <i>in silico</i> .....	13
3. Componentes utilizados en la primera PCR para la obtención de megacebadores mutagénicos.....	14
4. Condiciones en el termociclador para la obtención de megacebadores mutagénicos de 700 pb.....	14
5. Componentes utilizados en la segunda PCR para la obtención del gen estructural de la AvLOx con la mutación deseada. ....	15
6. Condiciones en el termociclador para la obtención del gen mutado de la AvLOx. ....	15
7. Reacciones de clonación del gen AvLOx mutado en el plásmido pJET. ....	16
8. Componentes utilizados en la PCR de colonia después de la transformación de <i>E. coli</i> XL1-BLUE. ....	17
9. Condiciones en el termociclador para el PCR de colonia. ....	17
10. Comparación de diámetros obtenidos en el poro de acceso al sitio activo al realizar mutaciones R181A, R181v y R181I.....	28
11. Concentración de megacebadores obtenidos después de la primera PCR. ....	30
12. Concentración de plásmido obtenidos en la extracción y purificación de plásmido (AvLOx-pET-28a(+)). ....	34
13. Cuantificación de la proteína obtenida tras purificación con HisTrap y posteriormente con intercambio iónico.....	41
14. Parámetros cinéticos de AvLOx silvestre y mutantes. ....	42
15. Actividad de la enzima inmovilizada en electrodo de oro. ....	45
16. Actividad de la enzima inmovilizada en electrodo de oro comparada con los controles. ....	46
17. Cinética enzimática aparente de los electrodos Au-K188C.....	52
18. Lista de cebadores utilizados para la obtención de megacebadores mutagénicos y AvLox mutantes. ....	68

## Capítulo 1. Introducción

---

Las enzimas son macromoléculas, en su mayoría de naturaleza proteica (a excepción de un pequeño grupo de moléculas de ARN catalítico, denominado ribozimas) (Nelson et al., 2013), que catalizan la mayoría de las reacciones químicas de los organismos. Tienen un rol de gran importancia, ya que todos los procesos metabólicos requieren de la actividad catalítica de las enzimas (Conix, 2020). Al ser proteínas, su actividad catalítica depende de su conformación nativa (estructura primaria, secundaria o terciaria), por lo que una enzima degradada, disociada o desnaturalizada carece de esta actividad. Algunas enzimas necesitan más grupos químicos que no son parte de cadena polipeptídica para estar activas, estos grupos son llamados coenzimas o cofactores. Las enzimas se clasifican de acuerdo con el tipo de reacción que catalizan, por mencionar algunas: transferasas, hidrolasas, isomerasas, oxidorreductasas; siendo estas últimas las que catalizan reacciones de transferencias de electrones (Nelson et al., 2013). Muchos procesos químicos son poco probables o energéticamente desfavorables dentro de las células, las enzimas resuelven este problema ya que permiten que una reacción determinada ocurra con mayor velocidad al disminuir la barrera de activación.

Es poco común que las enzimas aisladas directamente de los organismos que los producen muestren una combinación ideal de características y funcionamiento requeridos para usos industriales. En los últimos años el diseño y optimización de enzimas han desempeñado un papel importante en la expansión e impacto de la biocatálisis (Fox and Huisman, 2008). Las instrucciones para sintetizar las enzimas se encuentran codificadas en el ADN, los genes son la unidad funcional del material genético que da origen al ARN y posteriormente a las proteínas; por lo que el diseño y optimización de las enzimas se puede lograr desde la modificación de genes, haciendo cambios en aminoácidos específicos. (Lewin et al., 2011). A principios del siglo XX hubo importantes avances en la extracción, caracterización y uso comercial de enzimas, para 1920 la caracterización de las enzimas reveló ciertos mecanismos de su actividad catalítica. De manera industrial las enzimas se utilizan para la producción de edulcorantes, modificación de antibióticos, en productos de limpieza, y además juegan papel importante en biosensores para análisis clínicos, forenses y ambientales (Robinson, 2015).

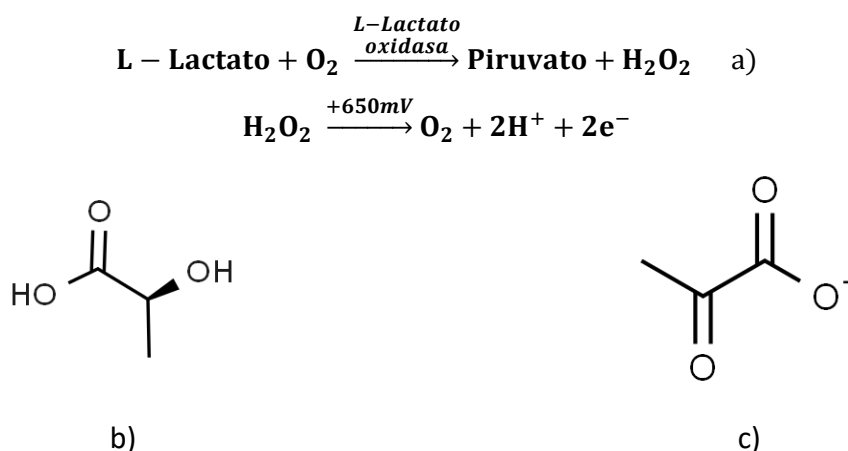
Un biosensor se puede definir como "un dispositivo analítico autónomo que combina un componente biológico con un componente fisicoquímico para la detección de un analito de importancia biológica" (Hasan et al., 2014). En décadas recientes, la biodetección ha ganado terreno en aplicaciones que van desde el medio ambiente hasta biomedicina; tienen la ventaja que pueden llegar a tener un tamaño a

escala nanométrica y se pueden reproducir en masa, además se puede medir analitos de interés en tiempo real lo que brinda la ventaja de monitorear cambios rápidos en el sistema de interés (Rocchitta et al., 2016).

Los biosensores se basan en la presencia de un elemento biológico como: receptores celulares, ácidos nucleicos, anticuerpos o enzimas, que son específicos para el analito de interés (Rocchitta et al., 2016) (Rathee et al., 2016), en otras palabras este elemento biológico se denomina elemento de reconocimiento molecular. Los elementos de reconocimiento del analito se inmovilizan en la superficie de los transductores. Este tipo de biosensores se conocen como de tipo catalítico en el que las enzimas inmovilizadas en la superficie forman la interface de intercambio entre el transductor y el analito (Nguyen et al., 2019).

La enzima en un biosensor cataliza la reacción que implica la generación o consumo de especies electrónicamente activas, posteriormente se sigue el proceso de agotamiento o producción y se relaciona con una medida directa de la concentración del analito. Entre las diferentes enzimas que han atraído la atención en aplicaciones biomédicas se encuentra la lactato oxidasa (LOx, donde su sustrato es el L-lactato) debido a i) la simpleza de reacciones enzimáticas involucradas y ii) el diseño de sensores relativamente sencillos (Rathee et al., 2016). La LOx es una enzima globular de la familia de las flavoenzimas, cataliza la reacción de lactato a piruvato en presencia de oxígeno disuelto produciendo además peróxido de hidrógeno (Figura 1) (Stoisser, Rainer, et al., 2015; Furuichi et al., 2008), este último es electroquímicamente activo con posibilidad de reducirse u oxidarse generando un flujo de electrones equivalente a la concentración del lactato. La actividad de esta enzima depende de su cofactor mononucleótido de flavina (FMN) (Stoisser et al., 2016).

La L-lactato oxidasa puede obtenerse de organismos bacterianos como *Pediococcus sp.*, *Aerococcus viridans* y *Mycobacterium smegmatis* (Rathee et al., 2016). La medición de lactato se ha utilizado en el diagnóstico clínico como parámetro para evaluar la condición de salud en medicina general y deportiva; el lactato es un metabolito clave en la vía metabólica anaeróbica ya que en la ausencia de oxígeno y alta demanda energética se produce un aumento en la concentración del lactato, que puede provocar acidosis láctica (Jia et al., 2013). Además, la estimación de lactato se usa en industria alimentaria para el control de procesos fermentativos; en lácteos, vinos, y carnes, además se usa directamente como un indicador de presencia de fermentación bacteriana (Rathee et al., 2016; Jia et al., 2013).



**Figura 1. Reacción de la L-lactato oxidasa.** a) reacción electroquímica llevada a cabo por L-lactato oxidasa en presencia de oxígeno (Rathee et al., 2016). Estructura de b) L-lactato y c) piruvato.

Es importante esclarecer aquí que los biosensores electroquímicos aprovechan el flujo de electrones producidos por la reacción de oxidación-reducción en un electrodo, por lo tanto, funcionan por la corriente producida al aplicar el potencial entre los electrodos que resulta de la oxidación o reducción de las especies electroactivas. Los biosensores enzimáticos amperométricos se han clasificado comúnmente en tres generaciones, según el método de transferencia de electrones utilizado para medir la reacción bioquímica: los biosensores de primera generación miden la concentración de productos de reacciones enzimáticas que se difunden a la superficie del transductor y generan una respuesta eléctrica; los biosensores de segunda generación utilizan mediadores como agentes portadores de electrones; por último, los biosensores de tercera generación se basan en una transferencia directa de electrones entre la enzima y el electrodo (Fernández et al., 2017; Rocchitta et al., 2016; Nguyen et al., 2019).

En años recientes, el estudio de la electrocatálisis enzimática basada en la transferencia directa de electrones ha recibido especial atención. El avance acelerado en el campo de los nanomateriales ha contribuido para impulsar el estudio de nuevas vías de transferencias de carga directa que se pretende implementar en biosensores (Trifonov et al., 2019). La transferencia directa de electrones tiene una ventaja principal, esta evita usar unidades de relevo de electrones para mediar el transporte de las cargas entre la superficie del electrodo y los cofactores de oxidación-reducción que se encuentran en el interior de las estructuras enzimáticas. Estos relevadores de electrones se emplean en el electrolito y, al viajar libremente en dispositivos implantables limitan su aplicabilidad, ya que pueden filtrarse a superficies adyacentes en el organismo poniendo en peligro la salud. En contraste, la transferencia directa de electrones presenta acoplamiento de los elementos sin mediadores que transfieran las especies

electroactivas entre cofactores enzimáticos y colectores de corriente. Como solución los estudios publicados hasta la fecha han utilizado nanomateriales conductores sobre los cuales se inmovilizan las enzimas de interés. Se ha informado de nanopartículas metálicas, óxidos metálicos, polímeros conductores y materiales nanoestructurados a base de carbono, en los que las enzimas muestran transferencia de electrones por adsorción directa (Trifonov et al., 2019; Nguyen et al., 2019).

Hay estudios cinéticos y estructurales de enzimas que han permitido conocer cuáles residuos son los que intervienen en la especificidad del sitio activo y que son importantes para la catálisis, la modificación de algunos de estos residuos puede afectar la reacción enzimática como respuesta, contribuyendo a una enzima con reactividad y selectividad mejorada permitiendo transferencia directa de electrones (Stoisser et al., 2016; Stoisser, Rainer, et al., 2015).

Debido a lo anteriormente mencionado, las investigaciones que contribuyen a visualizar los efectos de mutaciones específicas en residuos de aminoácidos de la AvLOx para anclaje y promoción de transferencia directa de electrones cobran importancia por lo que se abordarán algunos en la siguiente sección.

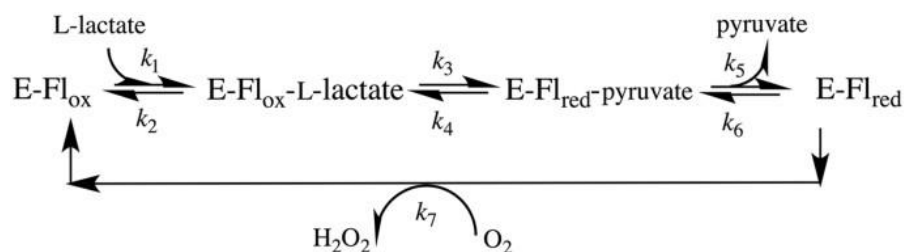
## **1.1 Antecedentes**

### **1.1.1 Biosensores de L-lactato oxidasa**

Las nuevas generaciones de biosensores amperométricos basados en enzimas demandan, además de una fabricación fácil y económica, ciertos criterios como: alta sensibilidad y selectividad, límites de detección bajos, rango amplio de detección del analito, estabilidad y confiabilidad de mediciones conforme transcurre el tiempo. Muchas enzimas en su estado silvestre, extraídas directamente de organismos, presentan estabilidad y funcionalidad baja para aplicaciones en biosensores. Por lo anterior, grandes esfuerzos de investigación se han centrado en la adaptación de estas proteínas para incorporarlas a sensores y, de esta manera, obtener una medición altamente eficiente. Los estudios reportados por Taurino et al. (2013), Hiraka et al. (2020) e Hiraka et al. (2021) buscan una mayor estabilidad y actividad enzimática, mediante la introducción de mutaciones y métodos mejorados de inmovilización, específicamente en la enzima L-lactato oxidasa (LOx). Una posibilidad de controlar la inmovilización de las enzimas es la introducción de aminoácidos específicos en los extremos de la proteína, permitiendo la adsorción por afinidad, o la unión covalente a superficies.



Como se mencionó anteriormente, los biosensores de L-lactato (sustrato de la enzima LOx) tienen múltiples aplicaciones que van desde medicina en monitoreo de la salud, hasta biotecnología en control de calidad de alimentos y cultivos celulares. La LOx cataliza la reacción tal como se describe en la Figura 1 a), sin embargo, de manera más detallada la conversión global de L-lactato se produce en dos semirreacciones como se muestra en la Figura 2, en la primera semirreacción el cofactor mononucleótido de flavina (FMN) es reducido por el lactato (produciendo el complejo E-Fl<sub>red</sub>) y posteriormente reoxidado por O<sub>2</sub> en la segunda semirreacción (formando nuevamente el complejo E-Fl<sub>ox</sub>). En el uso de biosensores de LOx, el peróxido de hidrógeno producido se puede oxidar en la superficie de un electrodo aplicando un potencial de +650 mV que conduce a una señal directamente proporcional a la concentración de L-lactato en la solución circundante.



**Figura 2. Vías de reacción de la L-lactato oxidasa.** E-Fl<sub>ox</sub> y E-Fl<sub>red</sub> son las formas del complejo enzimático (Enzima-Cofactor) que contienen FMN oxidado y reducido, respectivamente (Stoisser et al., 2016).

### 1.1.2 Transferencia directa de electrones en diferentes aplicaciones de biosensores

Taurino y colaboradores (2013) clonaron la enzima L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* (AvLOx), para obtener variantes mejoradas. Este grupo de investigación obtuvo mutantes de la enzima con 1) una etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal de la enzima, 2) una etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal y 3) un control con la enzima tipo silvestre, las cuales se compararon con una LOx comercial. Posteriormente se realizó la expresión heteróloga en *E. coli*, la purificación, y se determinaron los parámetros cinéticos de las enzimas. De manera general estudiaron el comportamiento cinético de variantes de las enzimas obtenidas después de su inmovilización en un electrodo.

Uno de los primeros hallazgos fue que la mutante con la etiqueta de histidinas en el extremo carboxilo-terminal de la enzima presentó una actividad muy baja. Esto se debe a que el carboxilo-terminal se encuentra cerca del sitio activo, por lo que la etiqueta de histidinas lo bloquea impidiendo la actividad catalítica. Como primera conclusión, se observó que una mutación cerca del sitio catalítico puede impedir

la actividad de la enzima, incluso si es en un residuo que no participa propiamente en la catálisis (Taurino et al., 2013).

Para comparar las variantes obtenidas se realizó un ensayo de actividad enzimática cuyos resultados se muestran en la Tabla 1: cuantificando la producción de peróxido de hidrógeno de la enzima inmovilizada en un electrodo de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT, por sus siglas en inglés) funcionalizados con grupos carboxilo. En el ensayo de actividad la enzima comercial con la que se compararon las mutantes mostró una  $V_{max}$  3 y 20 veces mayor que la LOx modificada con etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y que la enzima tipo silvestre, respectivamente. Un ensayo electroquímico mostró que la mutante LOx con histidinas en el extremo N-terminal evidenció la mayor corriente de respuesta (datos no mostrados), lo que significa una mayor adsorción a la superficie del electrodo con respecto a las otras enzimas comparadas. Por otro lado, en ambos ensayos la  $K_m$  de la mutante LOx con histidinas N-terminal fue mayor que las otras enzimas, por lo que la saturación de sustrato se alcanza a concentraciones más altas que con la enzima comercial o la enzima silvestre. Como consecuencia, LOx-His-N ofrece un rango lineal más grande cuando se usa con fines de detección. Algo importante es que, a medida que aumentó la concentración de sustrato, la velocidad de reacción comenzó a disminuir del máximo obtenido. Los autores lo atribuyeron a la unión simultánea de múltiples moléculas del sustrato con el sitio activo, lo que aparentemente promovió un cambio conformacional en la enzima y redujo su capacidad de unión.

**Tabla 1.** Parámetros cinéticos de la caracterización de las LOx comercial, mutante y silvestre (Taurino et al., 2013).

Mutante	Ensayo óptico (Michaelis-Menten)
LOx comercial	$V_{max} = 86.27 \pm 2.27 \text{ U / mg}$ $K_m = 0.104 \pm 0.015 \text{ mM}$
LOx-His-N	$V_{max} = 21.81 \pm 1.13 \text{ U / mg}$ $K_m = 0.180 \pm 0.047 \text{ mM}$
LOx silvestre	$V_{max} = 3.72 \pm 0.18 \text{ U / mg}$ $K_m = 0.119 \pm 0.003 \text{ mM}$

Por otro lado, la inmovilización por adsorción física en MWCNT funcionalizados con grupos carboxilo fue eficiente para la enzima con las histidinas en el N-terminal y no así para la enzima comercial ni para la enzima tipo silvestre. Además, este dispositivo mostró el mayor rendimiento de detección para

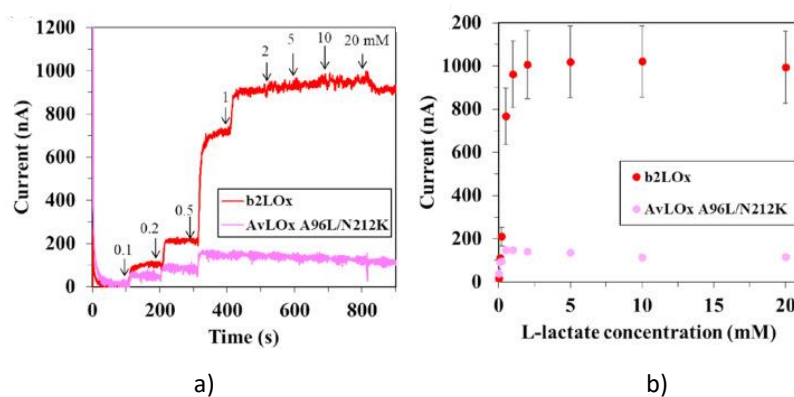
concentraciones bajas de lactato en comparación con las otras 2 enzimas comparadas. Quedó demostrado que esta mutación de la enzima preserva la actividad enzimática y la estabilidad en electrodos modificados con carboxilos, por lo que es una base ideal para la mejora de biosensores de L-lactato de la próxima generación (Taurino et al., 2013).

Las primeras dos generaciones de biosensores muestran algunas desventajas en su funcionamiento; los de primera generación, que emplean oxígeno como aceptor de electrones, tienen el inconveniente que las fluctuaciones en la concentración de oxígeno afectan directamente la señal del sensor. Además, el alto potencial aplicado para oxidar el peróxido de hidrógeno (+650 mV, Fig. 1) puede oxidar también otros elementos electroactivos (como ácido ascórbico, acetaminofén, ácido úrico u otros componentes que se encuentran en fluidos biológicos donde se detecta el L-lactato) que interfieren en la señal. Los de segunda generación, emplean aceptores artificiales de electrones (mediadores redox) que compiten con el oxígeno molecular ambiental en la semirreacción oxidativa, lo cual afecta directamente la señal del sensor.

En 2021, Hiraka et al. publicaron un artículo donde se obtuvo un sensor multiplexado de lactato con transferencia directa de electrones, usando como base una doble mutante AvLOx Ala96Leu/Asn212Lys, que este mismo grupo había creado en 2020. Esta enzima modificada presentaba una baja interferencia de oxígeno y otros compuestos electroactivos, una alta actividad deshidrogenasa y, al hacer reaccionar la lisina modificada (que se encontraba en la superficie de la proteína y a 20 Å del anillo de isoaloxazina de FMN) con arPES (amino-reactivo etosulfato de fenazina) y su posterior inmovilización en electrodos serigrafados de carbono, mostró una respuesta amperométrica hasta 12 veces mayor que la enzima silvestre en la oxidación de L-lactato lo que demostró una cuasi-transferencia directa de electrones (Hiraka et al., 2020).

Esta enzima doble mutante fue fusionada con un citocromo tipo b (que funcionó como un aceptor de electrones, ya que la mutante es insensible al oxígeno) y permitió el anclaje a un electrodo de oro. Para ello el gen de la doble mutante se fusionó con el gen estructural del dominio hemo Fcb2 de *Pichia pastoris* por el método de PCR de superposición. Obtuvieron el complejo proteico y se purificó. El dominio de unión de hemo de tipo b y el dominio catalítico de unión a FMN se conectó mediante un péptido “bisagra”, el cual es flexible y da movilidad a los 2 dominios. La mutante purificada y el complejo con b2 disminuyeron su actividad específica por encima de 20 mM de lactato, debido a la inhibición por sustrato (Hiraka et al., 2021).

Posteriormente, evaluaron la capacidad de transferencia directa de electrones por cronoamperometría, usando electrodos de oro con el complejo inmobilizado en un hidrogel. El sistema electrodo-enzima-hemob2 presentó un aumento en la corriente de manera dependiente de la concentración de lactato (Figura 3, línea roja), sin mediadores redox, por lo que la proteína quimérica creada funciona con transferencia directa de electrones. La enzima probada sin grupo hemo b2 también mostró transferencia directa de electrones. Sin embargo, la dependencia de concentración de lactato era muy por debajo del complejo fusionado completo (Figura 10, línea rosa). Hiraka et al. (2021). Concluye que el complejo mutante-b2 tenía transferencia electrónica de FMN al grupo hemo después de la reducción de FMN, por la oxidación del lactato.



**Figura 3. Caracterización electroquímica de b2LOx.** a) Medición de L- lactato basada en cronoamperometría. AvLOx A96L / N212K mutante (rosa) y complejo electrodo-enzima-hemob2 (rojo). b) corriente generada dependiente de la concentración de L-lactato. (Hiraka et al., 2021).

Ahora bien, Stoisser y colaboradores (2016) evidenciaron que la estructura cristalográfica de la L-lactato oxidasa presenta una triada de residuos (Tyr/Tyr/Arg) en el sitio catalítico. Es esencial dirigir el lactato hasta esa cavidad para llevar a cabo la reacción catalítica. Es probable que la selectividad de la reacción se deba a estos residuos de la enzima. Además, AvLOx tiene una tirosina (Tyr215) prominente en el sitio de unión del sustrato que se encarga, en cierta medida, de asegurar un bucle flexible que secuestra el sitio activo. Para caracterizar el papel de esta tirosina 215, Stoisser y colaboradores analizaron por cinética enzimática, cristalografía y dinámica molecular los efectos de las sustituciones de la tirosina (Tyr215Phe y Tyr215His). Estas variantes de enzimas modificadas mostraron una disminución de 33 veces su actividad de óxido-reducción, también la liberación del sustrato se desaceleró. Se evidenció que unos 15 residuos (200 al 215) funcionan como tapa en la entrada y salida del sustrato al sitio activo, por ello sustituir la Tyr215 puede modular la entrada y salida del sustrato. Entonces introducir mutaciones en la triada de los

residuos del sitio activo, o en los residuos del 200 al 215 podría afectar la reacción enzimática como respuesta, contribuyendo a una enzima con reactividad y selectividad mejorada (Stoisser et al., 2016).

### 1.1.3 Nanocúmulos de platino a partir de la oxidación de L-lactato oxidasa y anclaje de enzimas a electrodos de oro

La modificación de algunos residuos de aminoácidos en las enzimas puede provocar desde un mejor sistema de inmovilización en electrodos para biosensores, hasta la especificidad del sitio catalítico, así como la eficiencia de la actividad enzimática. Es importante recordar que las modificaciones revisadas en este trabajo han promovido la transferencia directa de electrones para evitar el uso de mediadores redox, que en dispositivos implantables pueden llegar a ser nocivos para la salud. Como se mencionó en la sección anterior, Hiraka y colaboradores (2021) utilizaron un grupo hemo para el transporte directo de electrones. En contraparte, Trifonov y colaboradores (2019) propusieron un sistema de auto cableado enzimático para la transferencia directa de electrones. Este grupo de investigación realizó la implantación enzimática de nanocúmulos de platino (PtNC) en una glucosa oxidasa (GOx), la cual se inmovilizó sobre nanopartículas de carbono mesoporosas (MPCNP). Los poros limitan el crecimiento de los PtNC, mientras que estos se conectan eléctricamente a la matriz, demostrando una transferencia directa de electrones. El crecimiento de los PtNC puede llevarse a cabo de adentro hacia afuera y de manera inversa, sin embargo, la deposición química sigue siendo dentro de los poros, y la expansión hacia el centro del cofactor como se muestra en la Figura 4 (Trifonov et al., 2019). Una de las posibles estrategias que se pretende emplear para promover la transferencia directa de electrones en biosensores de L-lactato es el “nanocableado” propuesto por Trifonov et al. (2019). La limitante de dicha metodología es que se necesita hacer que el precursor de platino se acerque lo suficiente al sitio activo para reducirse y llevar a cabo el crecimiento de los nanocúmulos, por lo que incrementar el tamaño del poro a la entrada del sitio activo es una tarea por realizar.



**Figura 4. Formación de nanocúmulos de platino en GOx.** Electrodo PtNC @ GOx / MPCNP sintetizado enzimáticamente de adentro hacia afuera (Trifonov et al., 2019).

Por otro lado otra estrategia que se utilizará está basada en el trabajo de Ditzler et al. (2011b) donde utilizan una cisteína de superficie de la enzima dihidrofolato reductasa y la unen directamente a una superficie de oro mediante un enlace con el átomo de azufre de la cisteína. La capacidad de esta enzima para formar un enlace covalente entre cisteína y el oro permite inmovilizar la enzima en la superficie de Au formando una monocapa autoensamblada sin la mediación de enlazadores o espaciadores.

## 1.2 Justificación

La detección de L-lactato tiene aplicaciones clínicas, en la medicina deportiva y en procesos industriales. Los biosensores electroquímicos que se han desarrollado utilizan la L-lactato oxidasa como elemento de reconocimiento molecular. Sin embargo, la medición de los productos de reacción en los biosensores de primera generación limita la especificidad del biosensor, mientras que los de segunda generación se ven limitados en algunas aplicaciones por la difusión de los mediadores que pueden ser tóxicos. Ambos problemas se pueden resolver mediante la obtención de biosensores de L-lactato capaces de realizar la transferencia directa de electrones. Sin embargo, las L-lactato oxidasas caracterizadas hasta ahora no cuentan con la capacidad para inmovilizarse y transferir electrones de manera directa al electrodo. En este trabajo se propone la obtención de mutantes para explorar la TDE mediante dos estrategias. La primera consiste en la inmovilización en electrodos de oro mediante una cisteína de superficie y la segunda en la formación de núcleos de platino en el sitio activo capaces de funcionar como nanocables en la transferencia de electrones.

## 1.3 Hipótesis

Las mutantes de L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* diseñadas para permitir entrada del precursor hexacloroplatinato al sitio activo o la inmovilización de la enzima molecularmente orientada, serán capaces de realizar transferencia directa de electrones en biosensores amperométricos.

## 1.4 Objetivos

### 1.4.1 Objetivo general

Optimizar la L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* a través de la apertura del sitio activo o por inmovilización molecularmente orientada, mediante mutagénesis dirigida a sitio y evaluar su capacidad en la transferencia directa de electrones a partir de la oxidación de L-lactato para aplicaciones en biosensores.

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Analizar la estructura cristalográfica de la L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans*, realizando mutaciones *in silico* que favorezcan la DET por apertura del sitio activo o por inmovilización molecularmente orientada.
2. Obtener, a partir de PCR mutágena, la construcción AvLOx-pET-28a(+) con la mutación en los residuos seleccionados del gen.
3. Efectuar la expresión heteróloga en *E. coli* de las mutantes obtenidas y purificarlas utilizando métodos cromatográficos.
4. Realizar la caracterización enzimática de las mutantes obtenidas.
5. Evaluar la capacidad de la enzima en solución para la producción de núcleos de platino metálico con hexacloroplatinato como precursor.
6. Evaluar la capacidad de la enzima inmovilizada en electrodos de oro para la transferencia directa de electrones dependiente de la oxidación de L-lactato.

## Capítulo 2. Metodología

---

### 2.1 Análisis de la estructura para diseño de mutantes

Se utilizó el servidor MOLEonline (Berka et al., 2012) para analizar la estructura PDB 2du2 que corresponde a la L-lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* para encontrar los canales de acceso al sitio activo. Estos canales deben tener una distancia aproximada de 7 Å, para la enzima de tipo silvestre se espera que ninguno permita la entrada del precursor de platino para la formación de nanocables ni la DET. A partir de la apertura de la zona de acceso al grupo flavina del sitio activo del cofactor FMN, se favorecerá la entrada del hexacloroplatinato para formación de nanocúmulos de platino y en consecuencia la DET.

Se buscó un residuo que al mutarlo permitiera la apertura del sitio catalítico, el residuo mutado debe aportar hidrofobicidad alrededor del área circundante para permitir la DET. Posteriormente se realizó la mutación *in silico*, con ayuda del software Chimera (Pettersen et al., 2004), cambiando el residuo y se minimizó la estructura para analizar los cambios conformacionales de las cadenas laterales del alrededor del sitio activo y con el mismo servidor, medir la apertura del canal.

De manera simultánea se analizó la superficie de la enzima para buscar los residuos más expuestos y que al mismo tiempo, al mutarse por cisteína, tuvieran una distancia máxima de 20 Å al sitio activo (N5 de la flavina) y se encuentre expuesto en la superficie de la enzima. La mutación de cisteína permitiría la inmovilización directa en superficies de oro, mediante la formación de enlace tiol-oro. Posteriormente se realizó la mutante *in silico*, con el software Chimera (Pettersen et al., 2004), donde se cambió el residuo y se minimizó la estructura para analizar el cambio conformacional y medir la distancia del residuo mutado al N5 de la flavina.

### 2.2 Obtención de las mutantes

#### 2.2.1 Plásmidos y cepas

Se utilizó *E. coli* genotipo XL1-Blue para la clonación de las construcciones AvLOx-pET-28a(+) que se describen en el apartado 2.2.4, esta cepa es deficiente en endonucleasas (*endA*) lo que mejora en gran



medida la estabilidad del inserto, es un excelente huésped para aplicaciones de clonación donde se utilizan vectores plasmídicos (Jooybari et al., 2020). Para la expresión de la enzima se optó por *E. coli* genotipo BL21 (DE3), es un sistema de expresión de enzimas recombinante ampliamente usado. Está basado en la ARN polimerasa de T7 y proporciona niveles altos de expresión de proteínas. Las cepas celulares competentes son específicamente para su uso con vectores regulados bajo los promotores T7, tales como los vectores de expresión de proteínas pET y pCAL. Por otro lado esta cepa es deficiente en las proteasas OmpT y Lon, que pueden interferir con el aislamiento de proteínas recombinantes intactas (Competent Cells for Routine Cloning, XL1-Blue Competent Cells | Agilent, n.d.).

El plásmido utilizado como molde es el pET 28a(+) AvLOx que tiene la secuencia del gen LOx optimizado para expresión en *E. coli* y está insertada en los sitios *NdeI* y *EcoRI* del plásmido.

### 2.2.2 Mutación en el gen AvLOx por el método de doble PCR

Las mutantes seleccionadas para expresión se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Cambios en aminoácidos elegidos para la AvLOx después analizar de las mutaciones *in silico*.

Mutación	Abreviatura
Arginina 181 Alanina	R181A
Arginina 181 Valina	R181V
Arginina 181 Isoleucina	R181I
Lisina 188 Cisteína	K188C

Se utilizó el kit *Q5-site directed mutagenesis* de NEB para la introducción de cada mutación puntual deseada. Con este kit comercial, se tiene una etapa de amplificación del gen de interés con la introducción de la mutante deseada a través del cebador hacia adelante. Posteriormente se realizó un tratamiento con cinasa, ligasa y *DpnI* (reacción KLD), el primero fosforila el 5' del plásmido amplificado, para que la ligasa pueda unir el plásmido de forma circular, el último componente realiza la digestión del DNA silvestre metilado. Sin embargo, las pruebas realizadas no mostraban una correcta amplificación del gen mutado.

Por lo que se procedió a utilizar una modificación del método descrito por Tyagi y colaboradores (2004) en un reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de dos pasos. Se diseñaron los cebadores hacia adelante (el cual contiene la mutación para el gen de la enzima) y como cebador reverso se utilizó el oligo de T7 (Anexo A, Figura 30), ya que esta secuencia se encuentra flanqueando el gen de la AvLOx silvestre en el plásmido pET-28a(+) (Anexo A, Figura A.2). En el primer paso de la (PCR) se obtuvieron megacebadores de aproximadamente 700 pb, los cuales nos servirían como cebadores reversos en el segundo paso de la PCR. Se utilizó una DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion™ de Thermo Scientific, y se siguió el protocolo de acuerdo con el fabricante. Se realizaron reacciones de 50 µl de cada mutante con las condiciones mostradas en la Tabla 3 y 4.

**Tabla 3.** Componentes utilizados en la primera PCR para la obtención de megacebadores mutagénicos.

Componente	Cantidad
CebadorT7 Reverso (10 µM)	1 µL
Cebador mutagénico (R181A, R181V, R181I, K188C) hacia adelante (10 µM)	1 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
5x Buffer Phusion™	10 µL
DNA molde (pET-28a(+))AvLOx silvestre) (10 ng/ml)	1 µL
DNA Polimerasa Phusion™	0.5 µL
Agua desionizada	34.5 µL

**Tabla 4.** Condiciones en el termociclador para la obtención de megacebadores mutagénicos de 700 pb.

	Paso del ciclo	Temperatura (°C)	tiempo
×1	Desnaturalización inicial	98	30 s
×30	Desnaturalización	98	10 s
	Alineamiento	55	30 s
	Extensión	72	20 s
×1	Extensión final	72	8 min
	Hold	4	∞

Los productos de cada reacción de PCR se analizaron con una electroforesis de gel de agarosa 1% en TAE, asegurándose de que hubiera una banda bien definida en aprox. 700 pb, la cual corresponde a la longitud del megaprimer generado. Posteriormente se utilizó el kit de purificación de productos de PCR GeneJET de Thermo Scientific™ en cada producto de reacción para obtener un megacebador puro y se cuantificó utilizando Thermo Scientific™ NanoDrop 2000.

El segundo paso de la PCR fue utilizar el megacebador del primer paso y el oligonucleótido hacia adelante de T7 (que flanquea el gen AvLOx en pET-28a(+)). Se realizaron reacciones de 50 µL utilizando DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion™ de Thermo Scientific, y se siguió el protocolo de acuerdo con el fabricante (Tabla 5 y 6). Para confirmar los productos de la AvLOx mutados se realizó una electroforesis en gel de agarosa 1% en TAE buscando una banda bien definida de aproximadamente 1,200 pb, la cual corresponde a la longitud del gen estructural.

**Tabla 5.** Componentes utilizados en la segunda PCR para la obtención del gen estructural de la AvLOx con la mutación deseada.

Componente	Cantidad
Cebador hacia adelante T7 (10 µM)	2.5 µL
Megacebador con mutación (R181A, R181V, R181I, K188C) reverso (120 ng/ml)	1 µL
dNTPs (10mM)	1 µL
5x Buffer Phusion™	10 µL
DNA molde (pET-28a(+)) AvLOx silvestre (10 ng/ml)	1 µL
DNA Polimerasa Phusion™	0.5 µL
Agua desionizada	34 µL

**Tabla 6.** Condiciones en el termociclador para la obtención del gen mutado de la AvLOx.

	Paso del ciclo	Temperatura (°C)	tiempo
×1	Desnaturalización inicial	98	30 s
×30	Desnaturalización	98	10 s
	Alineamiento	55	30 s
	Extensión	72	30 s
×1	Extensión final	72	8 min

### 2.2.3 Clonación de gen mutante en el plásmido pJET

Los productos confirmados se clonaron en el plásmido pJET (Anexo A, Figura 31) del kit de clonación CloneJET de Thermo Scientific™, se hicieron reacciones de 20  $\mu$ L de cada mutante y se siguió el protocolo de acuerdo con el fabricante, como se muestra a continuación (Tabla 7).

**Tabla 7.** Reacciones de clonación del gen AvLOx mutado en el plásmido pJET.

Componente	Cantidad
2X Buffer de reacción	10 $\mu$ L
Producto de PCR (R181A, R181V, R181I, K188C)	2 $\mu$ L
pJET 1.2/Blunt Vector de clonación	1 $\mu$ L
Agua desionizada	6 $\mu$ L
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ L

Una vez clonado el fragmento AvLOx mutado en el vector pJET se procedió a transformar células *E. coli* quimiocompetentes de la cepa XL1-BLUE. Las células se descongelaron por 10 minutos en hielo para posteriormente agregar 5  $\mu$ L de la reacción de ligación, se incubaron 15 minutos en hielo y se aplicó un choque térmico de 42°C por 1 minuto con una incubación posterior de 5 minutos en hielo. Se agregaron 950  $\mu$ L de medio LB estéril y se incubaron en agitación por 1.5 h. a 37°C. Por último, se centrifugaron las células a 3000 rpm por 3 minutos, resuspendiendo la pastilla celular en 100  $\mu$ L de medio LB. Se inoculó una placa Petri con Agar-LB suplementado con ampicilina a 100  $\mu$ g/mL por mutante, cada una de ellas con los 100  $\mu$ L en los que se resuspendieron las células, incubándose por 24 h a 37°C.

Para confirmar la mutación en los vectores de pJET se procedió a realizar una PCR de colonia. Se seleccionaron colonias de cada caja Petri correspondiente a cada mutante. A continuación, se utilizó el kit MyTaq™ Mix (Bioline) con los cebadores de T7 que flanquean el inicio y el final del gen estructural de la AvLOx y se siguió el protocolo de acuerdo con el fabricante. Para ello se tomó una muestra de la colonia seleccionada y se resuspendió en 20  $\mu$ L de agua desionizada, posteriormente, se llevó a 95°C durante 10 minutos. La mezcla de reacción para la PCR de colonia se llevó a cabo como se muestra en la Tabla 8 y el termociclador se programó según la Tabla 9.

**Tabla 8.** Componentes utilizados en la PCR de colonia después de la transformación de *E. coli* XL1-BLUE.

Componente	Cantidad
2X taq Mix	10 $\mu$ L
Cebador T7 hacia adelante (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Cebador T7 reverso (10 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ L
Agua desionizada	4 $\mu$ L
Colonia lisada	5 $\mu$ L

El producto de PCR se analizó en una electroforesis de gel de agarosa al 1% en TAE 1x. Se buscaron bandas bien definidas de 1.2 kpb para confirmar la presencia de los plásmidos con el gen AvLOx mutado en las colonias transformadas. A partir de estas colonias positivas, se inocularon cultivos de 5 mL de medio LB para extraer los plásmidos mutantes utilizando el kit GeneJet de ThermoScientific, siguiendo el protocolo de acuerdo con el fabricante. El plásmido purificado se envió al servicio de secuenciación del IBT-UNAM para confirmar la secuencia de la mutante de AvLOx.

**Tabla 9.** Condiciones en el termociclador para el PCR de colonia.

	Paso del ciclo	Temperatura (°C)	tiempo
X1	Desnaturalización inicial	95	1 min
X30	Desnaturalización	95	15 s
	Alineamiento	52	15 s
	Extensión	72	10 s
	Hold	4	$\infty$

#### 2.2.4 Clonación de gen mutante en el plásmido pET-28a(+)

Los electroferogramas obtenidos por la secuenciación fueron analizados con el software SnapGene para obtener las secuencias de aminoácidos, posteriormente se compararon con las secuencias de la AvLOx silvestre usando el servidor Clustal Omega. Como siguiente paso, se subclonó el gen mutado de AvLOx en

el plásmido pET-28a(+). Para ello se digirió el plásmido pET-28a(+) con 2 enzimas de restricción en una sola reacción, y por otro lado se digirió cada gen mutante, que se encontraba en pJET, en una reacción con las mismas 2 enzimas de restricción, *NdeI* y *EcoRI*. Cabe mencionar que estos sitios de restricción se encuentran en el sitio de clonación múltiple del vector pET-28a(+) y flaqueando el gen mutado que se encontraba en pJET.

Para la digestión de pET-28a(+) se utilizaron 3.5 µg de este vector, 20 U de *NdeI*, 20 U de *EcoRI*, y 6 µL de Buffer O (10X), estas 3 últimas de Thermo Scientific™, en una reacción de 60 µL totales. Por otro lado, la digestión de cada mutante se llevó a cabo en un vial diferente para cada una de ellas, en el cual se colocaron 3 mg de pJET (20 µL) con el gen mutado de interés, 15 U de *NdeI*, 15 U de *EcoRI*, 3 µL de Buffer O (10X) y 4 µL de agua desionizada. Tanto el plásmido pET-28a(+) digerido, como los genes mutados de AvLOx digeridos, fueron purificados con el kit de purificación de productos de PCR GeneJET de Thermo Scientific™, siguiendo el protocolo del fabricante. Los productos de digestión se corroboraron con una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE.

El siguiente paso fue ligar el gen de AvLOx mutante en el plásmido pET-28a(+); para ello se llevó a cabo una reacción de ligación donde se colocaron 2.5 µL de pET-28a(+) (74.2 ng/ µL), 11.5 µL de la mutante de AvLOx, 2 µL de Buffer de ligación 10X, 2 µL de DNA ligasa T4 y 2 µL de agua desionizada, esta reacción se incubó a 16°C por 20 horas.

Se siguió el protocolo de transformación en XL1-Blue para volver a seleccionar las mutantes positivas en agar LB suplementado con kanamicina a 35 µg/mL (LB + Kan), ya que es el casete de resistencia a antibiótico que tiene el vector pET-28a(+). Nuevamente se seleccionaron colonias positivas con resistencia a Kanamicina de cada mutante, se inocularon cultivos de 5 mL de medio LB para extraer los plásmidos mutantes utilizando el kit GeneJet de ThermoScientific, siguiendo el protocolo de acuerdo con el fabricante, el plásmido purificado se envió al servicio de secuenciación del IBT-UNAM para confirmar la secuencia de la mutante de AvLOx.

### **2.3 Expresión y purificación de la enzima**

Una vez confirmado por secuenciación el gen de AvLOx con la mutación deseada en las colonias positivas, se utilizó el protocolo de transformación, ahora con células quimiocompetentes de *E. coli* genotipo BL21 (DE3) con las construcciones de la enzima silvestre y de las mutantes de AvLOx-pET-28a(+). A partir de las

colonias obtenidas se inocularon cultivos de 500 mL de medio LB + Kan y se crecieron por 12 h a 37°C, estos cultivos se usaron para inocular 4.5 litros de medio LB + Kan y se incubaron a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm. Este cultivo se le añadió una solución de IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) para obtener una concentración de 200 μM incubándose por 20 horas a 20 °C. Las células se cosecharon por centrifugación a 8,000 rpm por 15 minutos y se resuspendieron en solución buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, β-mercaptoetanol 2 mM, 10 mM imidazol, para la lisis celular se añadió PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo) a una concentración de 1 mM y lisozima a 0.1 mg/mL, se incubó a 37°C por 30 minutos, el extracto resultante se sometió a ultrasonificación por 25 minutos efectivos a 40 % de potencia con lapsos de trabajo de 10 segundos activos y 5 segundos de pausa.

### 2.3.1 Cromatografía de afinidad a níquel (IMAC)

El extracto se sometió a centrifugación a 13,000 x g durante 45 minutos y el sobrenadante se pasó a través de una columna His Trap (Cytiva), previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna de solución buffer de unión, utilizando una bomba peristáltica a 2 mL/min, posteriormente se hizo un lavado de la columna con 50 mL de solución buffer de unión. Por último, la enzima se eluyó en 3 pasos de 10 mililitros cada uno con el mismo buffer suplementado con imidazol a 100, 300 y 500 mM, respectivamente.

Las fracciones con actividad de lactato oxidasa de cada paso de purificación se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12 %, las fracciones con mayor pureza se mezclaron, concentraron y dializaron en buffer Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10% glicerol y 2 mM de mercaptoetanol para eliminar los residuos de imidazol, por último, se añadió a las muestras 30% de glicerol y se almacenaron a -80 °C.

### 2.3.2 Cromatografía de Intercambio iónico

Como segundo paso de purificación las muestras dializadas provenientes la cromatografía de afinidad a níquel se sometieron a cromatografía de intercambio iónico. Se utilizó el sistema de cromatografía líquida GE Healthcare ÄKTAprime plus de Cytiva con una columna Macro-Prep® High Q de Biorad. Se equilibró la

columna con 2 volúmenes de columna de buffer A ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7, 100 mM NaCl, 10% glicerol y 2 mM mercaptoetanol) a 2 mL/min. Las muestras se inyectaron en 3 aplicaciones en el bucle de 5 ml. La enzima se eluyó en un gradiente de 120 mL de 0 a 100% de buffer B ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM pH 7, 1 M NaCl, 10% glicerol y 2 mM mercaptoetanol) y se recolectaron las fracciones correspondientes a los picos observados en el cromatograma. Las fracciones con actividad de LOx se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, las de mayor pureza se mezclaron y concentraron.

## 2.4 Caracterización enzimática

La actividad de LOx purificada se midió usando un ensayo espectrofotométrico acoplado a peroxidasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producido en la reacción de LOx se hace reaccionar con peroxidasa en presencia de 4-aminoantipirina y N,N-dimetilanilina para dar un cromóforo de quinonediimina detectable por espectrofotometría a 565 nm. Se agregaron de 20  $\mu\text{L}$  de enzima 2  $\mu\text{M}$  en buffer de fosfato de fosfato 100 mM, pH 7.0, a una solución con ácido 3,3-dimetilglutárico a 40 mM, 2.5 unidades de peroxidasa, 4 aminoantipirina 1.5 mM, y 0.04% (v / v) de N, N-dimetilanilina, L-lactato (0.1, 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100 mM) en un volumen total de 0.5 mL. Cada concentración de lactato se evaluó por separado midiendo todo el curso temporal en un espectrofotómetro (Unterweger et al., 2012).

Las constantes cinéticas ( $K_m$ ,  $V_{max}$ ) se obtuvieron mediante el ajuste con el modelo de Michaelis-Menten, utilizando el software OriginPro 2016 versión 93E. Por otro lado, la constante catalítica ( $k_{cat}$ ) se calculó a partir de la relación:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{E}$$

donde E es la concentración de enzima molar,  $k_{cat}$  es la constante catalítica y  $V_{max}$  es la velocidad máxima de reacción (Unterweger et al., 2012).

La AvLOx tipo silvestre fue purificada y caracterizada con el mismo protocolo, y los datos de cinética enzimática fueron proporcionados por el Dr. Raúl García Morales, quien está trabajando con esta misma enzima.



## 2.5 Crecimiento de nanocúmulos de platino para DET

Se utilizó 3 mL de una solución de buffer HEPES (ácido 4- (2-hidroxietil) -1-piperazinetanosulfónico) 100 mM, glicerol 10%, NaCl 100 mM purgada con N<sub>2</sub> (100 mM, pH 7.0) que además contenía 0.5 mg/mL de AvLOx (R181A, R181V, R181I, cada una por separado), K<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub> a 5 mM y L-lactato a 20 mM, posteriormente se agitó suavemente bajo atmósfera de N<sub>2</sub> por 48 horas para llevar a cabo la nucleación de los nanocúmulos de platino (Trifonov et al., 2019). Se utilizaron como controles las soluciones exactamente igual en cada mutante con excepción de la adición de lactato.

Para la caracterización de los nanocúmulos de platino se optó por utilizar la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS por sus siglas en inglés), la cual es una técnica de bajo costo, no invasiva ni destructiva y de operación relativamente simple y rápida. Las suspensiones se midieron por DLS y se analizaron los tamaños de partícula obtenidas (Tomaszewska et al., 2013; Starikova et al., 2016).

## 2.6 Inmovilización de enzima K188C en superficies de oro

Un electrodo de disco de oro (3 mm de diámetro) se pulió en 3 pasos con polvo de alúmina de 1, 0.3 y 0.05 μm, respectivamente. Luego se lavó con agua desionizada y se activó en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5 M escaneando el potencial entre 0.1 y 1.5 V durante 25 ciclos a una velocidad de barrido de 100 mV/s para eliminar los grupos no polares adheridos a la superficie del electrodo (Kangkamano et al., 2017). La AvLOx K188C se autoensambló en el electrodo de oro al sumergirlo en 50 μL de una solución 10 μM de AvLOx en buffer MTEN (NaCl 100 mM, MES 50 mM, Tris 25 mM y etanolamina 25 mM; pH 7.5 a 25 °C), glicerol 10%, durante 2 horas y luego se enjuagó tres veces con buffer MTEN para eliminar la enzima no fisisorbida (Ditzler et al., 2011a). El procedimiento anterior se realizó también con la enzima silvestre para utilizar el electrodo como control negativo y con la mutante K188C inactivada por temperatura la cual se sometió a incubación por 30 minutos a 70°C (Milton and Minteer, 2017).

### 2.6.1 Pruebas de inmovilización Au-K188C

Primeramente, para comprobar la inmovilización de la enzima K188C en el electrodo de oro se realizó un ensayo de actividad. En 0.5 mL de una solución de buffer de fosfato de 100 mM, pH 7.0, 4 aminoantipirina

1.5 mM, y 0.04% (v/v) de N, N-dimetilanilina, L-lactato 20 mM se incubó el electrodo Au-K188C a 37°C por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se añadió 2.5 unidades de peroxidasa de rábano picante y se dejó reaccionar por 10 minutos más. Se midió la absorbancia de la reacción a 565 nm y se cuantificó la actividad del electrodo. Se comparó la actividad de la solución de incubación (actividad inicial), la solución después de incubación (actividad residual), la actividad del electrodo y por último se calculó el porcentaje de inmovilización.

Para evaluar el rendimiento del proceso de inmovilización, la recuperación de la actividad se definió como la actividad experimental de la AvLOx K188C inmovilizada dividida por la actividad de la AvLOx K188C teóricamente inmovilizada en el soporte. La actividad teóricamente inmovilizada se calculó como la diferencia entre la actividad inicial de la AvLOx K188C, antes del proceso de inmovilización, y la actividad residual después del proceso.

Por otro lado, se midió la impedancia del electrodo de oro antes y después de inmovilización de la mutante K188C para comprobar que se haya anclado la enzima al electrodo. Los detalles experimentales se encuentran en el apartado 2.7.

## **2.7 Pruebas electroquímicas para comprobar transferencia directa de electrones**

La detección amperométrica se realizó utilizando un potenciostato  $\mu$ stat 400 (Metrohm DROPSENS) con un sistema convencional de 3 electrodos. Se usó un electrodo de oro como electrodo de trabajo, un electrodo Ag/AgCl como electrodo de referencia y un alambre de platino contraelectrodo. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente en un vaso de precipitados con 5 mL de buffer de fosfatos 100 mM pH 7.4.

***Voltametría Cíclica.*** Los experimentos de voltametría cíclica se realizaron mediante un barrido de potencial de 0.7 a -0.01 V y a una velocidad de barrido de 50 mV/s en presencia o ausencia de L-lactato 50 mM.

***Amperometría.*** La respuesta amperométrica en estado estacionario de los electrodos de trabajo a diferentes concentraciones de L-lactato se determinó mediante adiciones sucesivas de una solución de 1

M de lactato en buffer fosfatos. En primer lugar, los electrodos de trabajo se equilibraron en buffer fosfatos 100 mM a un potencial constante de -0.1 V hasta obtener una corriente constante, denominada corriente de fondo (I1). A continuación, se añadieron alícuotas de la solución lactato a la celda electroquímica (1, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 50 mM) y se registró la respuesta de corriente en estado estacionario obtenida (I2). La diferencia de corriente obtenida ( $\Delta I = I2 - I1$ ) se utilizó para trazar una curva de calibración de  $\Delta I$  frente a la concentración de L-lactato. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

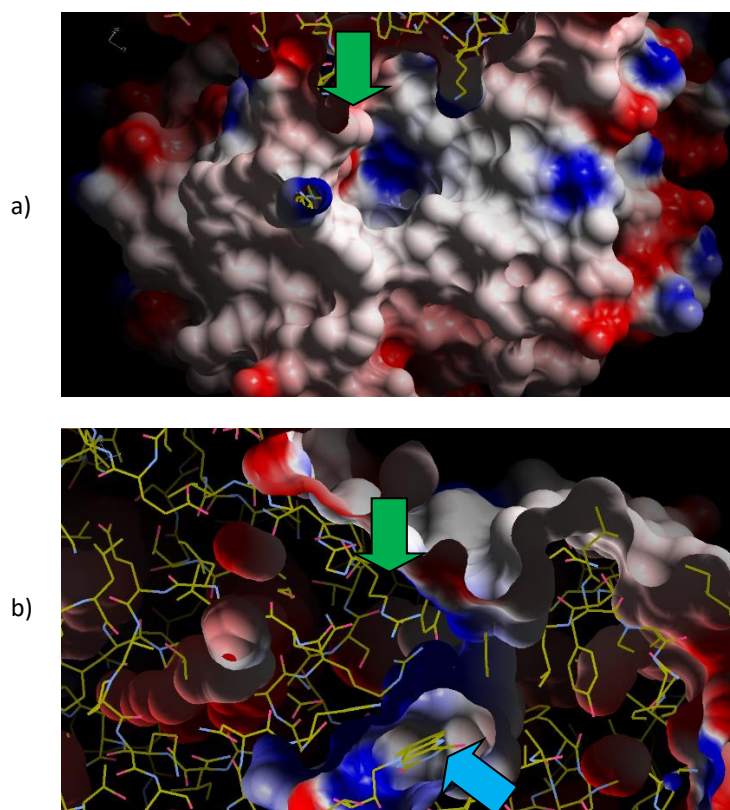
***Espectroscopia de Impedancia Electroquímica.*** La medición de la impedancia ( $R_{CT}$ ) se realizó en una solución buffer de fosfato 100 mM pH 7 que contiene  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$  5 mM. Se hicieron mediciones a potencial de circuito abierto usando un voltaje sinusoidal de 10 mV de amplitud en el rango de frecuencia  $10^5 \text{ Hz} - 10^{-1} \text{ Hz}$  (Milton and Minter, 2017). Se obtuvieron los espectros de impedancia electroquímica.

## Capítulo 3. Resultados

---

### 3.1 Obtención de mutantes *in silico* y minimización de estructuras

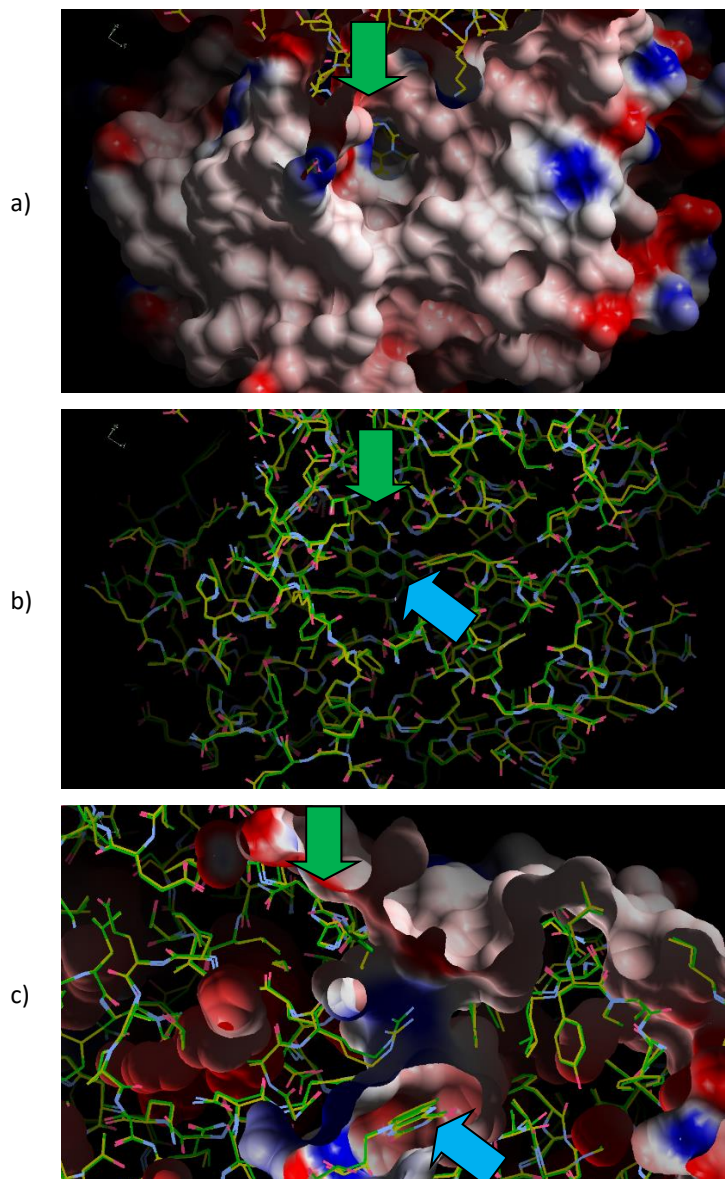
Una vez obtenidas las minimizaciones de energía de las estructuras tras la mutación *in silico* se analizaron las superficies y abertura del acceso al sitio activo. En la Figura 5 se puede observar imágenes de la AvLOx tipo silvestre vista desde la superficie y desde una vista lateral. La flecha verde muestra el residuo R181 que posteriormente fue mutado, se observa un poro de acceso prácticamente cerrado.



**Figura 5. Canal de entrada al sitio activo de AvLOx.** La estructura cristalográfica de la AvLOx silvestre muestra el sitio de acceso al FMN desde a) la superficie y b) una vista lateral. Flecha verde: residuo 181; flecha azul: cofactor FMN.

La primer mutante se presenta en la Figura 6, la flecha verde muestra el residuo cambiado de arginina en la posición 181 por alanina por lo que se aprecia un poro de acceso al sitio activo (FMN flecha color azul) mucho más grande que en la enzima tipo silvestre. Además, se muestra la estructura en forma solo de enlaces y se puede ver la diferencia de tamaños en los residuos 181 una arginina que es mucho más grande

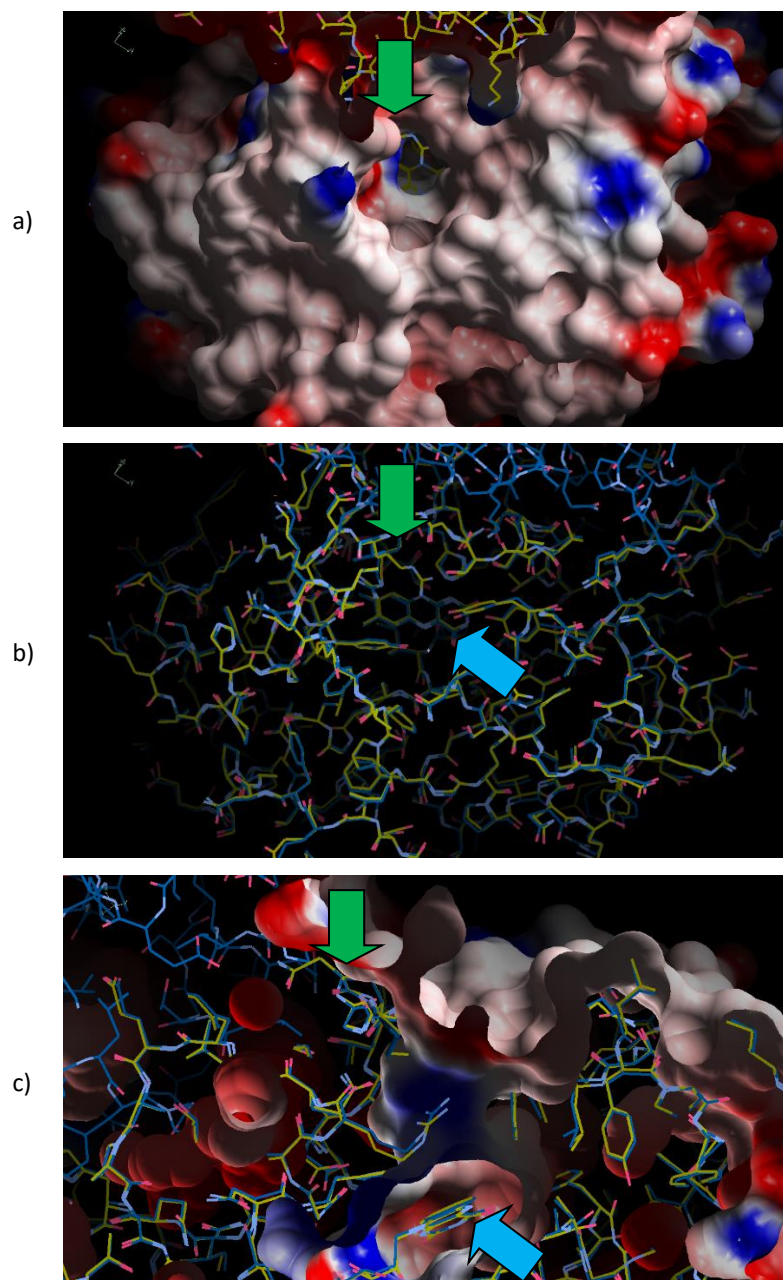
que el residuo alanina (Figura 6 b). Por último, en la Figura 6 c se aprecia un corte lateral del poro de acceso al FMN donde este canal de acceso se aprecia libre desde la superficie hasta sitio activo.



**Figura 6. Mutante *in silico* AvLOx R181A.** Minimización energética de la estructura de la mutante R181A desde: a) la superficie, b) la superficie con enlaces y c) vista lateral. Los átomos de carbono en el modelo de la enzima silvestre se muestran en amarillo y en la mutante en color verde, Los átomos de nitrógeno se presentan en azul y los de oxígeno en rojo. Flecha verde: residuo 181; flecha azul: cofactor FMN.

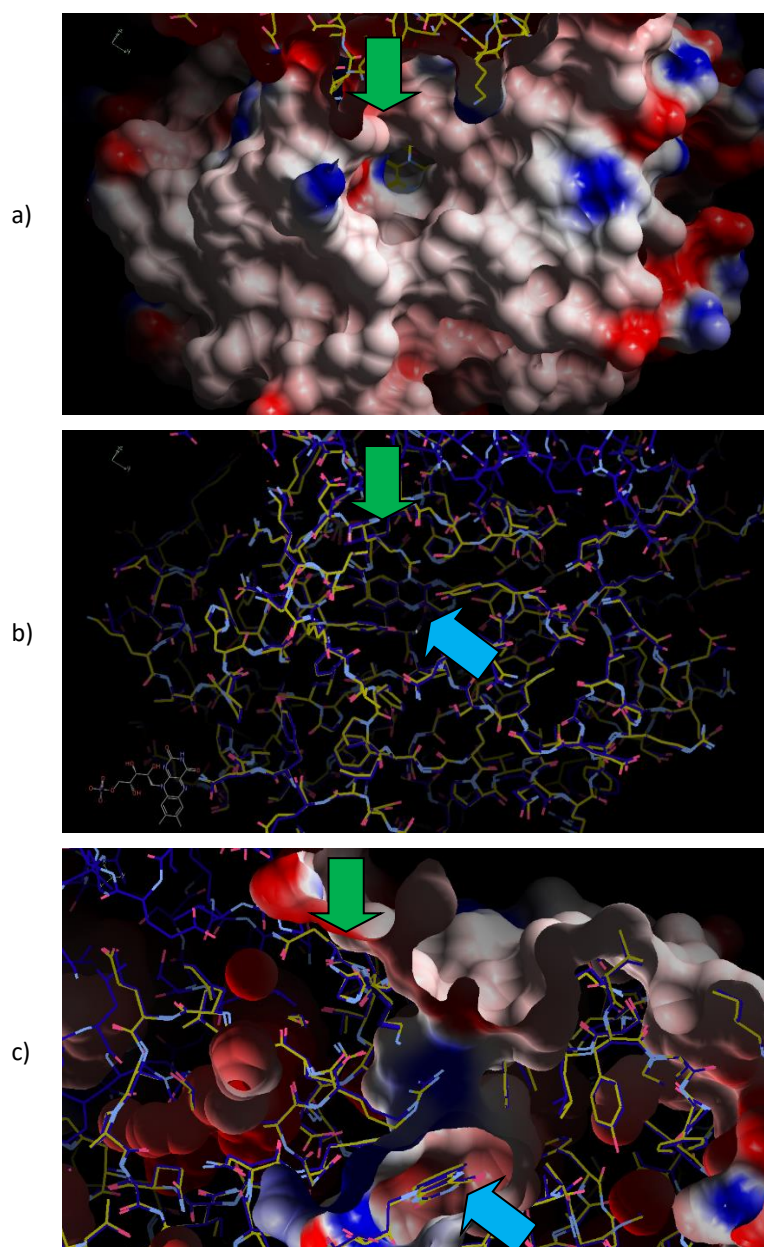
De manera similar en las mutantes R181V y R181I (Figura 7 y 8, respectivamente) se logra ver un poro de acceso al sitio activo mucho mayor tanto en la vista de superficie (Fig. 7 y 8 a) como en la vista lateral, en

la vista de enlaces (Fig. 7 y 8 b) se aprecia un cambio significativo en el tamaño de residuo, siendo A, V, I mucho más pequeños en longitud que la R.



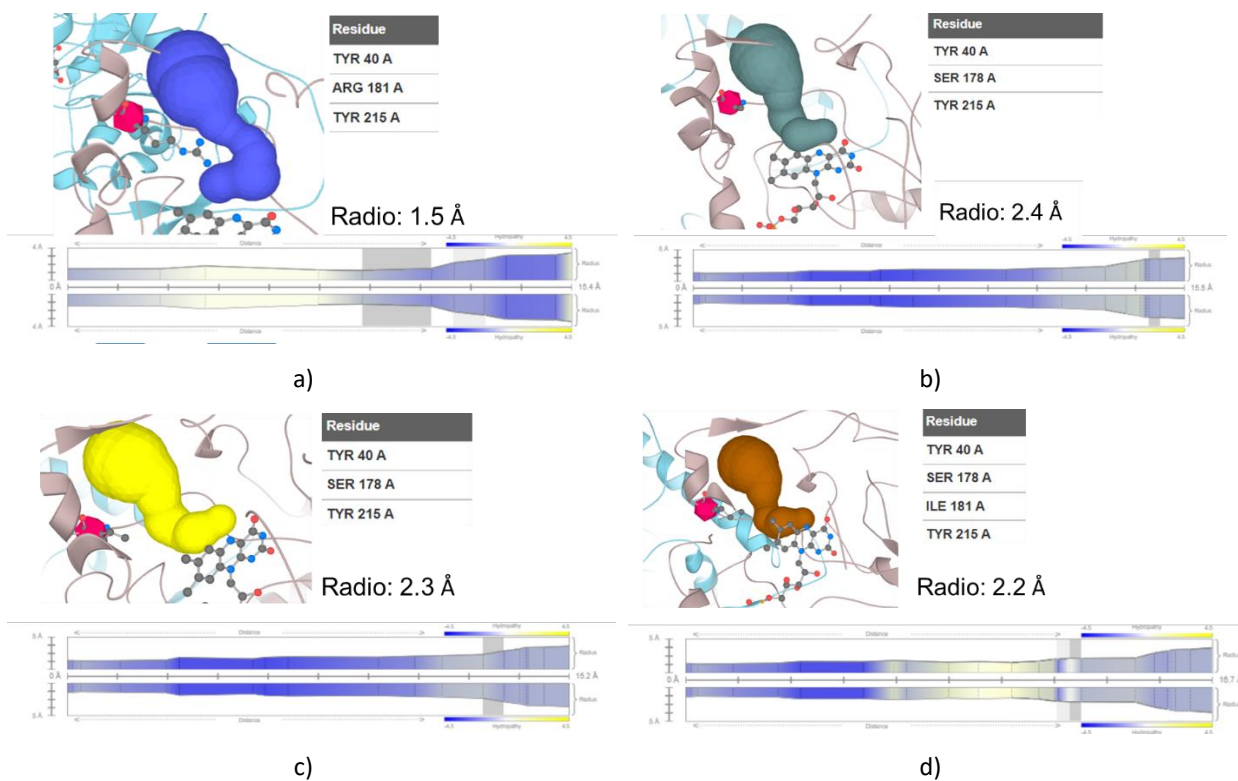
**Figura 7. Mutante *in silico* AvLOx R181V.** Minimización energética de la estructura de la mutante R181V desde: a) la superficie, b) la superficie con enlaces y c) vista lateral. Los átomos de carbono en el modelo de la enzima silvestre se muestran en amarillo y en la mutante en color azul intenso, Los átomos de nitrógeno se presentan en azul y los de oxígeno en rojo. Flecha verde: residuo 181; flecha azul: cofactor FMN.

Adicionalmente al analizar el canal del sitio activo en el servidor MOLE online (Pravda et al., 2018) se observó un incremento en el diámetro del canal de acceso, los resultados se resumen en la Figura 9 y la Tabla 10.



**Figura 8. Mutante *in silico* AvLOx R181I.** Minimización energética de la estructura de la mutante R181I desde: a) la superficie, b) la superficie con enlaces y c) vista lateral. Los átomos de carbono en el modelo de la enzima silvestre se muestran en amarillo y en la mutante en color azul marino, Los átomos de nitrógeno se presentan en azul y los de oxígeno en rojo. Flecha verde: residuo 181; flecha azul: cofactor FMN.

Con estos resultados, se decidió iniciar la mutagénesis para la obtención de estas mutantes esperando que la naturaleza hidrofóbica de estos residuos además de su efecto en el diámetro del sitio activo favoreciera que, el hexacloroplatinato pueda acercarse lo suficiente al sitio catalítico y en consecuencia la transferencia directa de electrones (Trifonov et al., 2015).



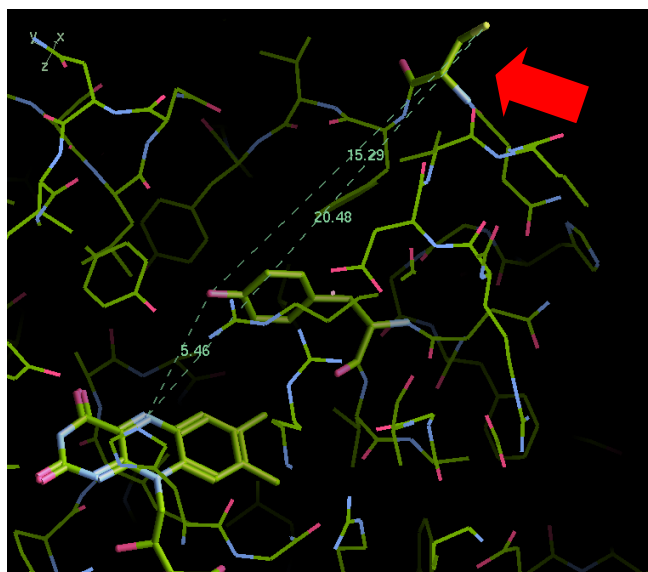
**Figura 9. Túnel de acceso al sitio activo de la AvLOx.** Medición de la apertura e hidrofobicidad del túnel de acceso al sitio activo después de las mutación *in silico* de a)AvLOx tipo silvestre, b)R181A, c)R181V y d)R181I. Las barras en cada figura muestran la hidrofobicidad del túnel tras el cambio de residuo.

Respecto a la otra estrategia, en la Figura 10 se muestra la estructura de la mutante K188C obtenida *in silico* y minimizada. La flecha roja muestra la cisteína que sustituyó a la K188. La distancia desde el N5 de la FMN al grupo tiol de la cisteína fue de 20.48 Å, sin embargo, el tiol se encuentra a 15.29 Å del grupo hidroxilo de Y40, por lo que se espera que una vez inmovilizada la enzima en superficies de oro, como se realiza en Ditzler et al. (2011b), promueva una transferencia directa de electrones al electrodo.

**Tabla 10.** Comparación de diámetros obtenidos en el poro de acceso al sitio activo al realizar mutaciones R181A, R181v y R181I.

	AvLOx WT	R181A	R181V	R181I
<b>Tamaño de poro en el residuo R181 (Å)</b>	1.5	2.4	2.3	2.2



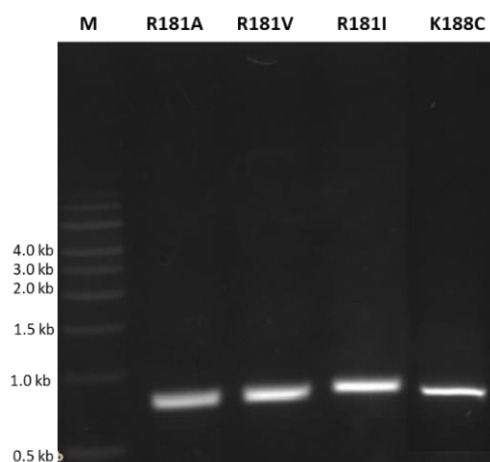


**Figura 10.** Distancia entre el FMN, Y40 y C188 en la mutante K188C. Los átomos de carbono se muestran en color verde, los de nitrógeno en azul, los de oxígeno en rojo y los de azufre en amarillo. Residuo 188 señalado con flecha roja.

## 3.2 Obtención de mutantes

### 3.2.1 PCR para obtención de megacebadores

La Figura 11 muestra el gel de agarosa al 1% en TAE con los resultados de la primera PCR para la obtención de megacebadores con la modificación en el aminoácido correspondiente. Se logra apreciar una banda bien definida en las 4 muestras en aproximadamente 700 pb, el cual muestra un resultado positivo a la amplificación deseada con la mutación introducida.



**Figura 11.** Amplificación de megacebadores mutagénicos. Gel de agarosa al 1% después de la electroforesis de los productos del primer PCR correspondientes a la amplificación del megacebador. Carril M: Marcador de peso molecular.

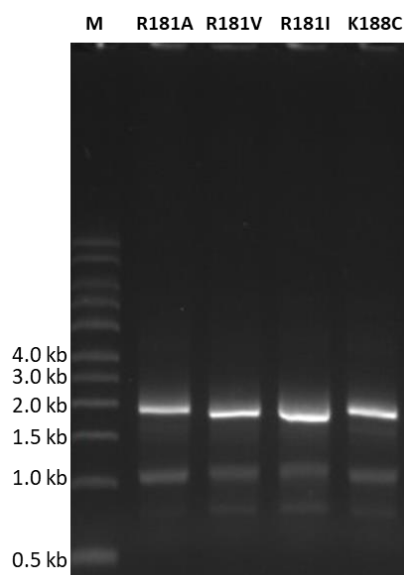
Después de la obtención del megacebador mutagénico se cuantificó el producto purificado con el Nanodrop sense 2000 y se obtuvieron 50  $\mu\text{L}$  de DNA a las concentraciones mostradas en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Concentración de megacebadores obtenidos después de la primera PCR.

Mutante	Concentración de DNA (ng/ $\mu\text{L}$ )
R181A	54
R181V	26
R181I	29.2
K188C	14.3

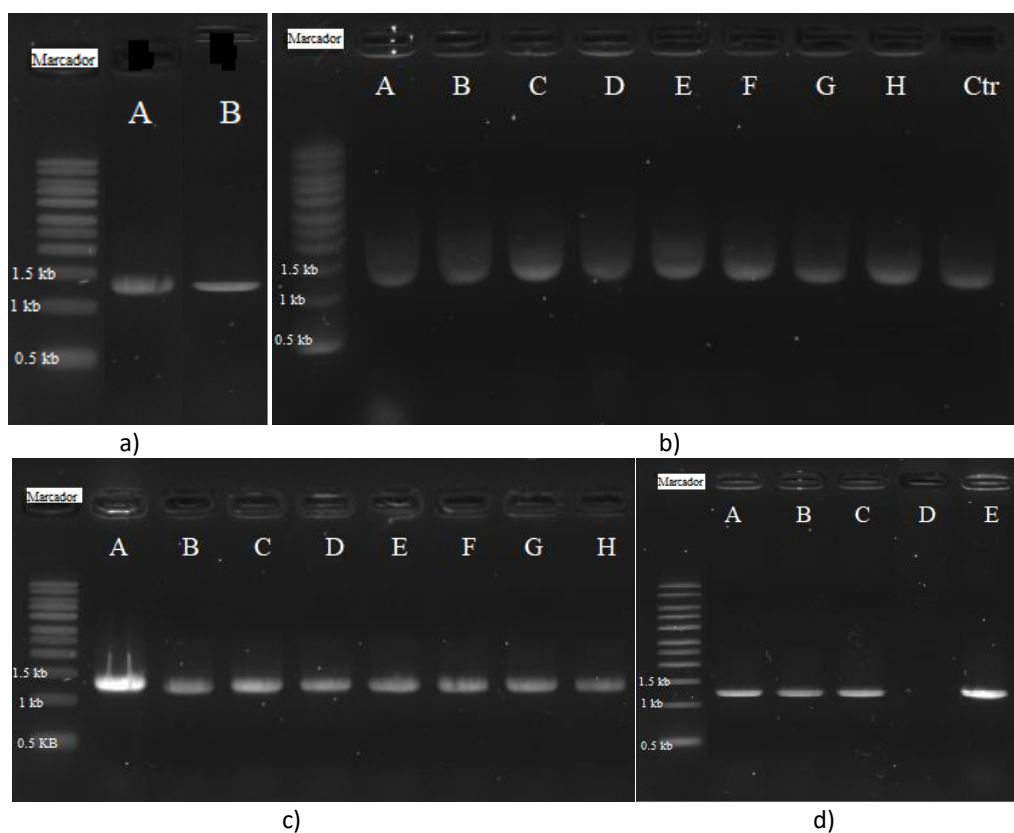
### 3.2.2 Segunda PCR para obtención de gen AvLOx mutante

Los resultados de la segunda PCR, donde se utilizó el megacebador para introducir la mutación en el gen estructural de AvLOx, se pueden observar en la Figura 12. Se aprecia una banda bien definida por debajo de 2 kb que corresponden al gen mutado, además se logran ver unas bandas cerca de 1 kb que corresponden a los megacebadores residuales en cada reacción; por otro lado, las bandas más pequeñas en la parte inferior del gel corresponden a amplificaciones inespecíficas.



**Figura 12. Amplificación del gen AvLOx mutante.** Gel de agarosa al 1% después de la electroforesis de los productos del segundo PCR correspondientes a la amplificación del gen AvLOx mutante. Carril M: Marcador de peso molecular.

Después de la clonación del gen mutado en el plásmido pJET 1.2 y de la transformación en *E. coli* XL1-BLUE, la PCR de colonia se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se seleccionaron 2 colonias de la mutante R181A, 8 colonias de la R181V, 8 colonias de la R181I y 5 colonias de la K188C, que se muestran en la Figura 13. Se observa una banda bien definida entre 1 y 1.5 kb que corresponde a nuestro constructo (pJET + AvLOx) de aproximadamente 1.2 kb. Solo la colonia D de la mutante R181I fue un falso positivo ya que no se observa amplificación del gen de la AvLOx, pudiendo tener solo vectores vacíos.



**Figura 13. Colonias positivas a mutantes AvLOx-pJET 1.2.** Gel de agarosa al 1% después de la electroforesis de los productos de la PCR de colonia para confirmar la construcción (pJET+AvLOx). a) R181A, b) R181V, c) R181I, d) K188C.

### 3.2.3 Análisis de la primera secuenciación

Los electroferogramas obtenidos de la secuenciación se analizaron en SnapGene para la traducción de la secuencia de aminoácidos de la enzima y posteriormente se compararon con la AvLOx silvestre con ayuda de Clustal Omega (Figura 14). Los análisis de las mutantes R181V, R181I y K188C se encuentran en el Anexo B, Figura 32, 33, 34, respectivamente). Para la secuenciación se eligió una colonia mutante positiva, se extrajo plásmido y se enviaron 2 muestras del constructo pJET+AvLOx de cada mutante. Se puede observar

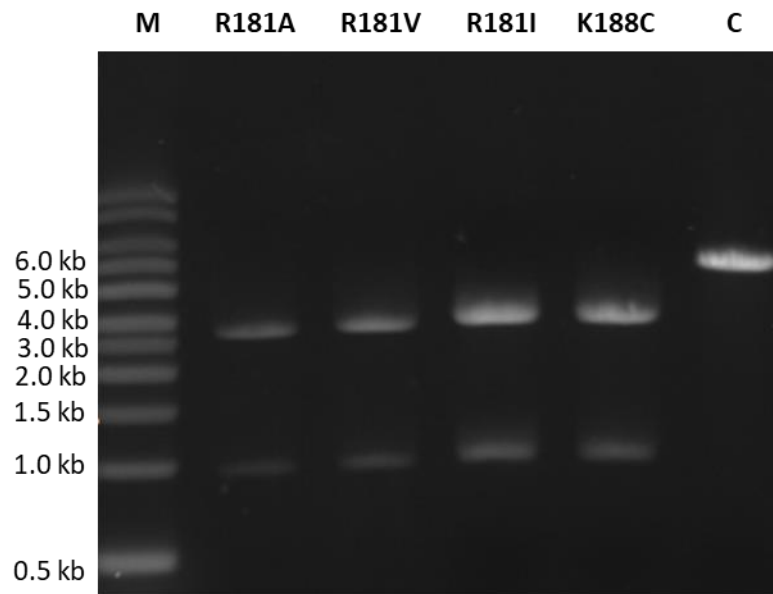
que tanto la muestra secuenciada con cebador hacia adelante como el reverso cuentan con la mutación correspondiente R181A, R181V, R181I y K188C (Anexo B). Los asteriscos en las comparaciones de gen mutante y silvestre muestran los residuos de aminoácidos iguales, mientras que la ausencia de esta muestra un aminoácido cambiado.

	AvLOx	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
	R181AAF6896	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
		*****	
	AvLOx	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
	R181AAF6896	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
		*****	
	AvLOx	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
	R181AAF6896	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
		*****	
a)	AvLOx	RDRDVKNKFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV	240
	R181AAF6896	ADRDKVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYG-----	216
		*****	
	AvLOx	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDMSGVR	300
	R181AAF6896	-----	216
	AvLOx	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	360
	R181AAF6896	-----	216
	AvLOx	KGLDLFDPYGYEY 374	
	R181AAF6896	----- 216	
	AvLOx	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
	R181AAR6897	-----	0
	AvLOx	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
	R181AAR6897	-----	0
	AvLOx	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
	R181AAR6897	-----SDGATAIILTADSTVSGN	18
		*****	
b)	AvLOx	RDRDVKNKFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV	240
	R181AAR6897	ADRDKVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV	78
		*****	
	AvLOx	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDMSGVR	300
	R181AAR6897	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDMSGVR	138
		*****	
	AvLOx	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	360
	R181AAR6897	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	198
		*****	
	AvLOx	KGLDLFDPYGYEY 374	
	R181AAR6897	KGLDLFDPYGYEY 212	
		*****	

**Figura 14. Alineamiento de las secuencias AvLOx R181A-pJET1.2 y AvLOx-pET-28a(+).** Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva R181A. a) Muestra secuenciada con a) oligo T7 hacia adelante y b) reverso.

### 3.2.4 Digestión de gen AvLOx mutante para la clonación en el plásmido pET-28a(+)

Se eligieron las colonias “A” de cada mutante (Figura 13) y los productos del plásmido digerido se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 15). Se observa en cada una una banda bien definida cerca de los 3 kb que corresponde al vector pJET y una banda definida cerca de 1 kb que corresponde al gen de AvLOx. En el carril control (C) se observa una banda entre 5 y 6 kb que corresponde al plásmido pET-28a(+) digerido con una longitud de 5600 pb. Por lo que las digestiones enzimáticas fueron exitosas y se procedió a ligar el fragmento AvLOx en el vector pET-28a(+).

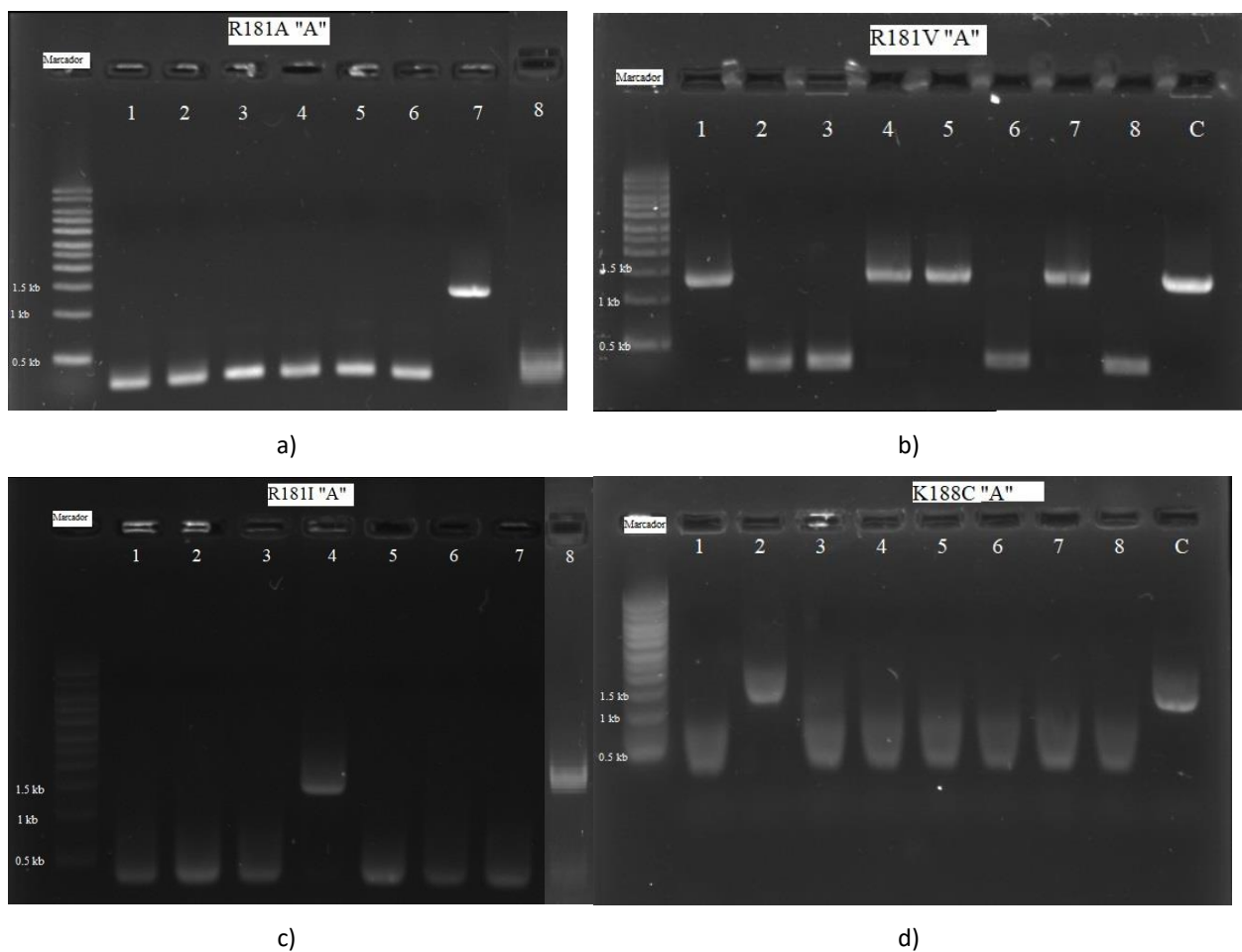


**Figura 15. Digestión de construcciones mutantes AvLOx-pJET y pET-28a(+).** Gel de agarosa al 1% después de la electroforesis de los productos de la digestión de cada mutante en el plásmido pJET. Carril M: Marcador de peso molecular, Carril C: control que corresponde a la digestión del plásmido pET-28a(+).

### 3.2.5 Transformación de *E. coli* XL1-BLUE con AvLOx-pET-28a(+)

La PCR de colonia después de transformar *E. coli* XL1-BLUE con la construcción AvLOx-pET-28a(+) mutante se aprecia en la Figura 16. Se eligieron 8 colonias de cada mutante, de las cuales se obtuvo una colonia con mutante positiva de R181 A “A” etiquetada con el número 7 (Fig. 16 a), cuatro colonias mutante positivas de R181V “A” correspondientes a la 1, 4, 5 y 7 (Fig. 16 b), dos colonias mutantes positivas de R181I “A” que corresponden a la 4 y 8 (Fig. 16 c) y una colonia mutante positiva de K188C “A” con la etiqueta 2 (Fig. 16 d). En las muestras antes mencionadas presentan una banda bien definida entre 1 y 1.5 kb dando positivo a la amplificación del gen mutado con 1.2 kb.

De las colonias anteriores se eligieron las que se muestran en la Tabla 12, posteriormente se purificó el plásmido de cada mutante y se cuantificó con Nanodrop 2000.



**Figura 16.** Colonias positivas a mutantes AvLOx-pET28a(+). Gel de agarosa al 1% después de la electroforesis de los productos de la PCR de colonia para confirmar la construcción de las mutantes (AvLOx-pET-28a(+)). a) R181A, b) R181V, c) R181I, d) K188C.

**Tabla 12.** Concentración de plásmido obtenidos en la extracción y purificación de plásmido (AvLOx-pET-28a(+)).

Mutante	Concentración de plásmido (ng/ $\mu$ L)
R181A "A" 7	45.7
R181V "A" 4	52.7
R181I "A" 8	76.9
K188C "A" 2	65.1

### 3.2.6 Análisis de la segunda secuenciación

La segunda secuenciación, que corresponde a las mutantes dentro del vector pET-28a(+), aparece en la Figura 17 (Los análisis de las mutantes R181V, R181I y K188C se encuentran en el Anexo C, Figura 35, 36 y 37, respectivamente). Se puede observar que tanto en la muestra con el cebador T7 hacia adelante como en el reverso el único residuo de aminoácido que no empata con su correspondiente en la AvLOx silvestre es en la posición 181 para las mutantes R181 que están cambiadas por A, V, I respectivamente, y en el residuo 188 para la mutante K188 que está sustituida por C. De esta manera queda demostrado que las construcciones AvLOx-pET-28a(+) contienen la mutación deseada, y se puede iniciar la expresión de la enzima mutante.

	LoxAvPet28	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
	R181AF	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
		*****	
	LoxAvPet28	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
	R181AF	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
		*****	
	LoxAvPet28	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
	R181AF	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
		*****	
a)	LoxAvPet28	RDRDVKNKFVYVPGMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPV FV	240
	R181AF	ADRDVKNKFVYVPGMPVQRYLRGTAEGMSLNN-----	213
		*****	
	LoxAvPet28	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR	300
	R181AF	-----	213
	LoxAvPet28	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	360
	R181AF	-----	213
	LoxAvPet28	KGLDLFDNPPYGYEY	374
	R181AF	-----	213
	LoxAvPet28	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH	60
	R181AR	-----	0
	LoxAvPet28	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS	120
	R181AR	-----	0
	LoxAvPet28	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	180
	R181AR	-----EGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN	47
		*****	
b)	LoxAvPet28	RDRDVKNKFVYVPGMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPV FV	240
	R181AR	ADRDVKNKFVYVPGMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPV FV	107
		*****	
	LoxAvPet28	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR	300
	R181AR	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR	167
		*****	
	LoxAvPet28	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	360
	R181AR	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL	227
		*****	
	LoxAvPet28	KGLDLFDNPPYGYEY	374
	R181AR	KGLDLFDNP-----	236
		*****	

**Figura 17. Alineamiento de las secuencias AvLOx R181A y AvLOx silvestre en pET-28a(+).** Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva R181A en el plásmido pET-28a(+). a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso.

### 3.3 Expresión y purificación de la enzima AvLOx

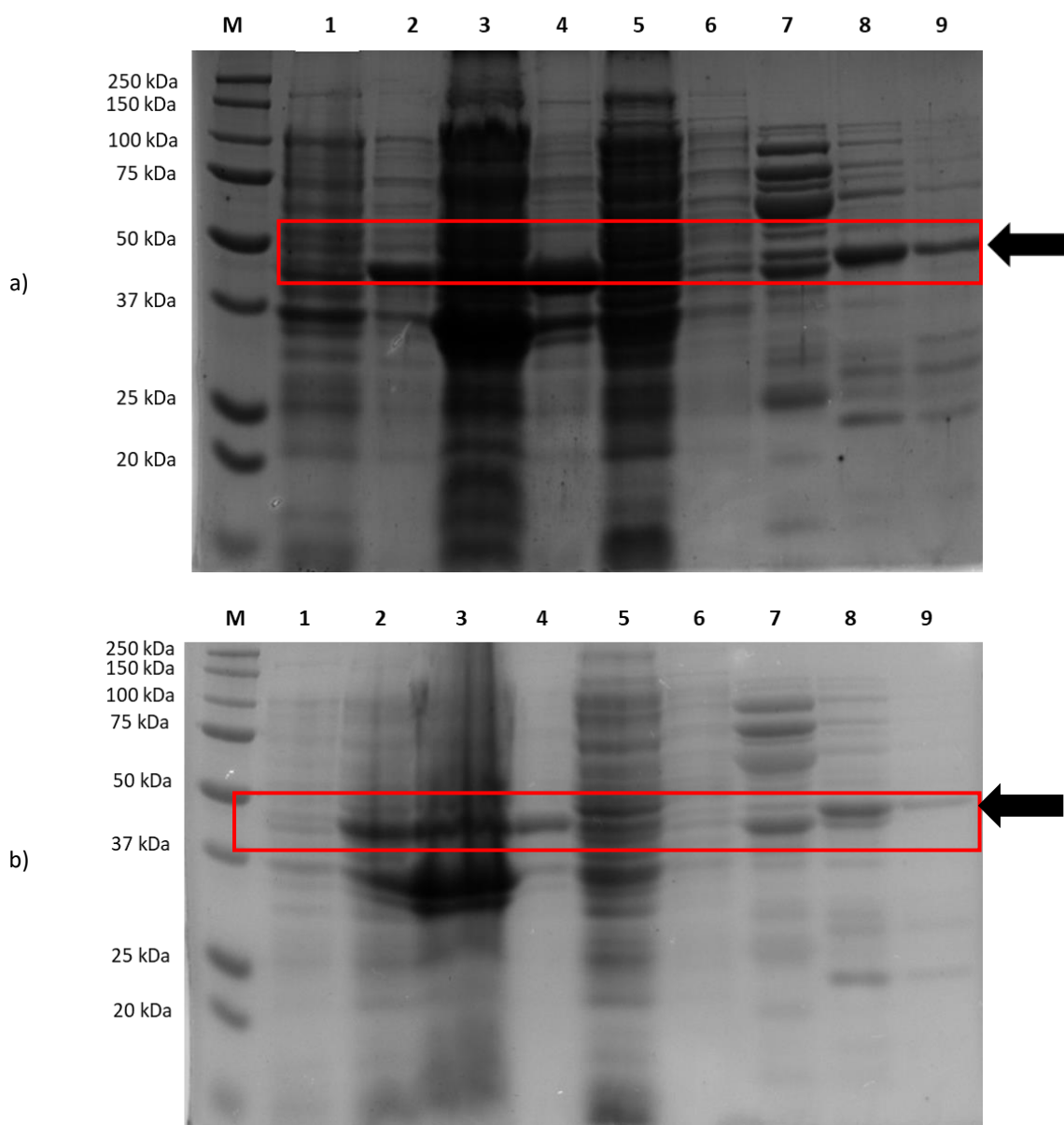
#### 3.3.1 Purificación por cromatografía de afinidad a níquel

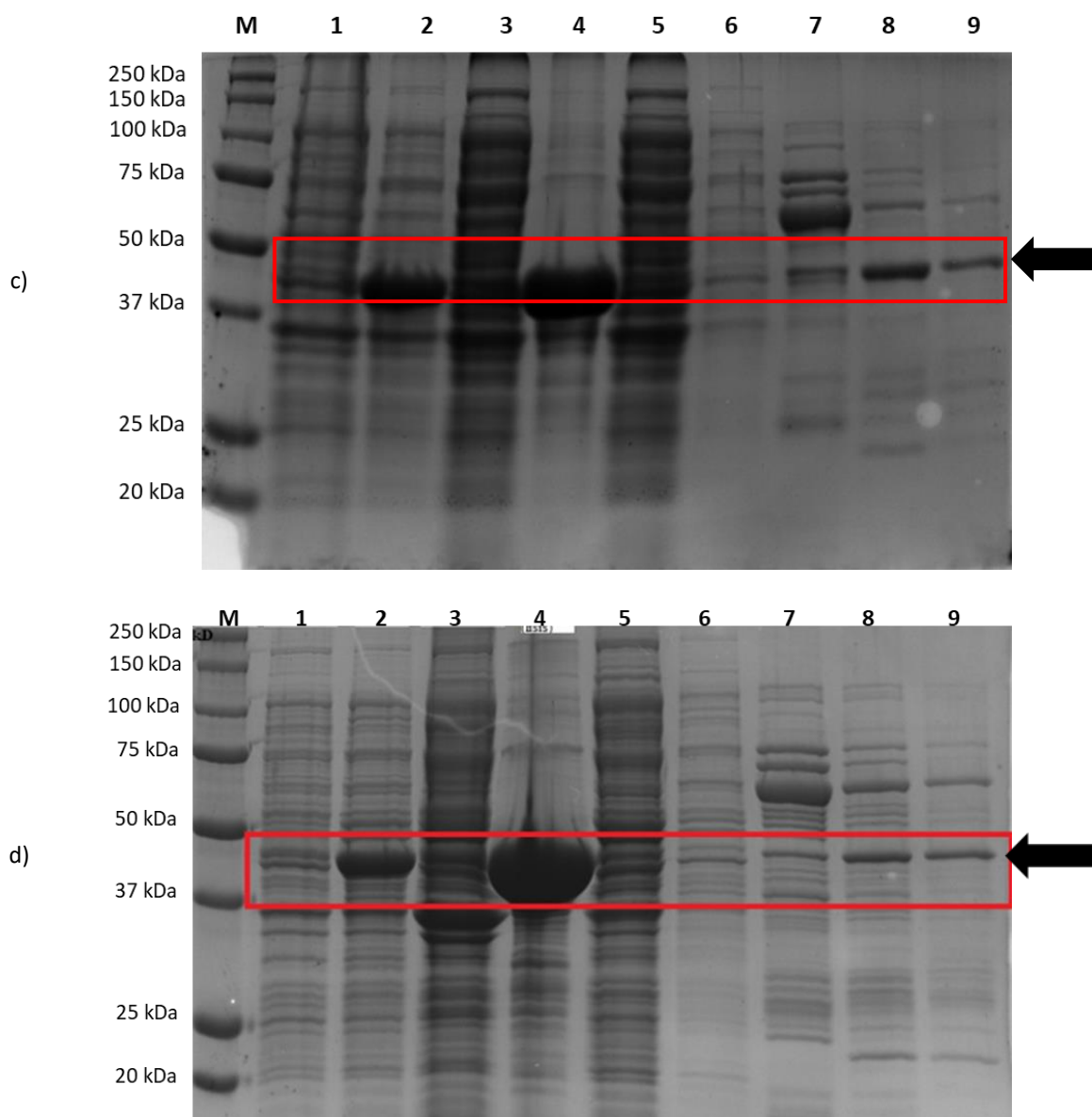
Tras la inducción del cultivo de cada mutante con IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) las fracciones con actividad de lactato oxidasa de cada paso de purificación se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. En la Figura 18 se presentan las fracciones de cada paso de purificación de cada mutante; en el primer carril de cada gel se observa el marcador de peso molecular Precision plus protein standards de Bio-Rad, con su valor de peso molecular en cada banda. El tetrámero AvLOx tiene un peso molecular de 164 kDa, por lo que cada subunidad tiene un peso molecular de 41 kDa (Umena et al., 2006); al ser un gel desnaturante se busca una banda definida con el valor de cada subunidad, una banda entre 37 y 50 kDa que correspondería a la AvLOx mutante. Las purificaciones de las 4 mutantes muestran fracciones muy parecidas, el segundo carril en cada gel contiene la muestra del cultivo de *E. coli* BL21-DE3 antes de inducir con IPTG, el tercer carril contiene la muestra una vez inducida después del periodo de incubación. Una vez cosechadas las células, posteriormente lisadas y recuperada la parte soluble por centrifugación se colocaron en el carril 4, identificado como "sobrenadante", la pastilla obtenida después de esta centrifugación también se analizó ahora en el carril 5 mostrando las proteínas que se mantienen en la parte insoluble. El carril 6 tiene el primer paso del sobrenadante pasado por la columna HisTrap, mientras que el siguiente contiene el lavado con buffer de unión. Por último, los últimos 3 carriles contienen la elución de la enzima en buffer suplementado con imidazol a 100, 300 y 500 mM respectivamente.

Se observa, en comparación con la muestra sin inducir, un cambio importante cuando se induce el cultivo, por el incremento en la intensidad de la banda en  $\approx 41$  kDa, que sugiere que corresponde a la AvLOx, mientras que las demás bandas son más tenues. En el sobrenadante se aprecia un carril con una cantidad importante de proteínas que incluso no permiten la diferenciación de algunas bandas. Sin embargo, cerca de 37 y 41 kDa donde se aprecia un ensanchamiento de la banda, de igual manera en la pastilla después de la lisis celular se siguen presentando estas mismas bandas con menor intensidad por lo que parte de estas se encuentran en fase insoluble. El primer paso por columna tiene una reducción de intensidad de las bandas con respecto al sobrenadante, por lo que se puede inferir que una cantidad de proteínas se quedan atrapadas en la columna. El lavado con buffer de unión tiene bandas muy tenues con respecto al primer paso por la HisTrap, incluso la banda que corresponde a la AvLOx se muestra con una intensidad muy baja. La elución a 100 mM de imidazol comienza a arrastrar gran cantidad de la enzima de interés, sin



embargo, tiene bandas con gran intensidad de muchas otras proteínas de mayor y menor peso molecular. La elución a 300 mM de imidazol contiene la banda a  $\approx 41$  kDa de la AvLOx muy bien definida con una cantidad importante y se observa que hay pocas otras proteínas, incluso desapareciendo bandas de menor peso molecular. Por último, la elución con 500 mM de imidazol sigue mostrando la banda correspondiente a la enzima de interés y con muy poca cantidad de otras enzimas, por lo que las eluciones a 300 y 500 mM de imidazol son las que se recuperaron para un próximo paso de purificación con cromatografía de intercambio iónico.



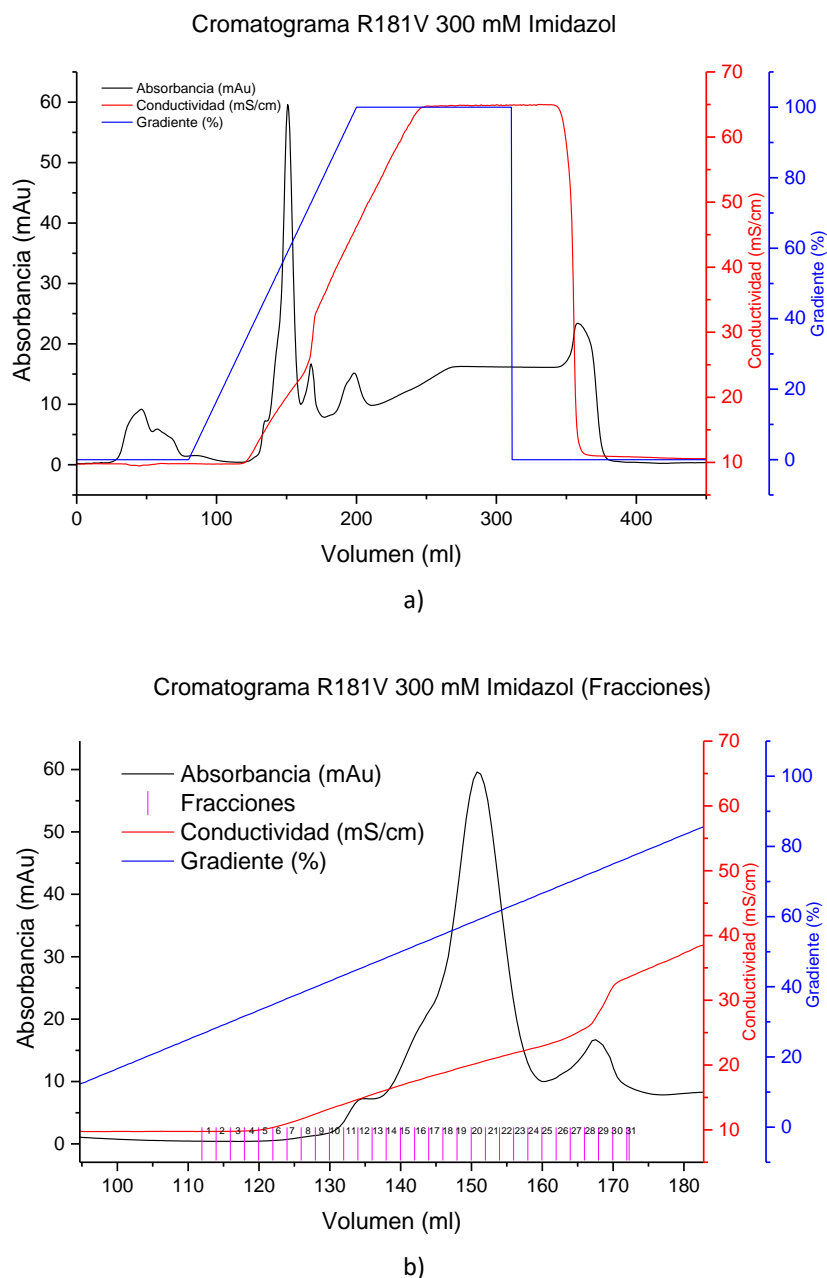


**Figura 18. Purificación de mutantes AvLOx por cromatografía de afinidad a níquel.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de cada fracción de purificación de las mutantes a) R181A, b) R181V, c) R181I y d) K188C. Carril M: Marcador de peso molecular, carril 1: Cultivo no inducido, carril 2: cultivo tras 24 hrs de inducción, carril 3: Sobrenadante después de centrifugación, carril 4: pastilla después de lisis celular y centrifugación, carril 5: 1er paso por columna His Trap™, Carril 6: Lavado de columna con buffer de unión. Carril 7, 8 y 9: elución de enzima con imidazol 100, 300 y 500 mM respectivamente.

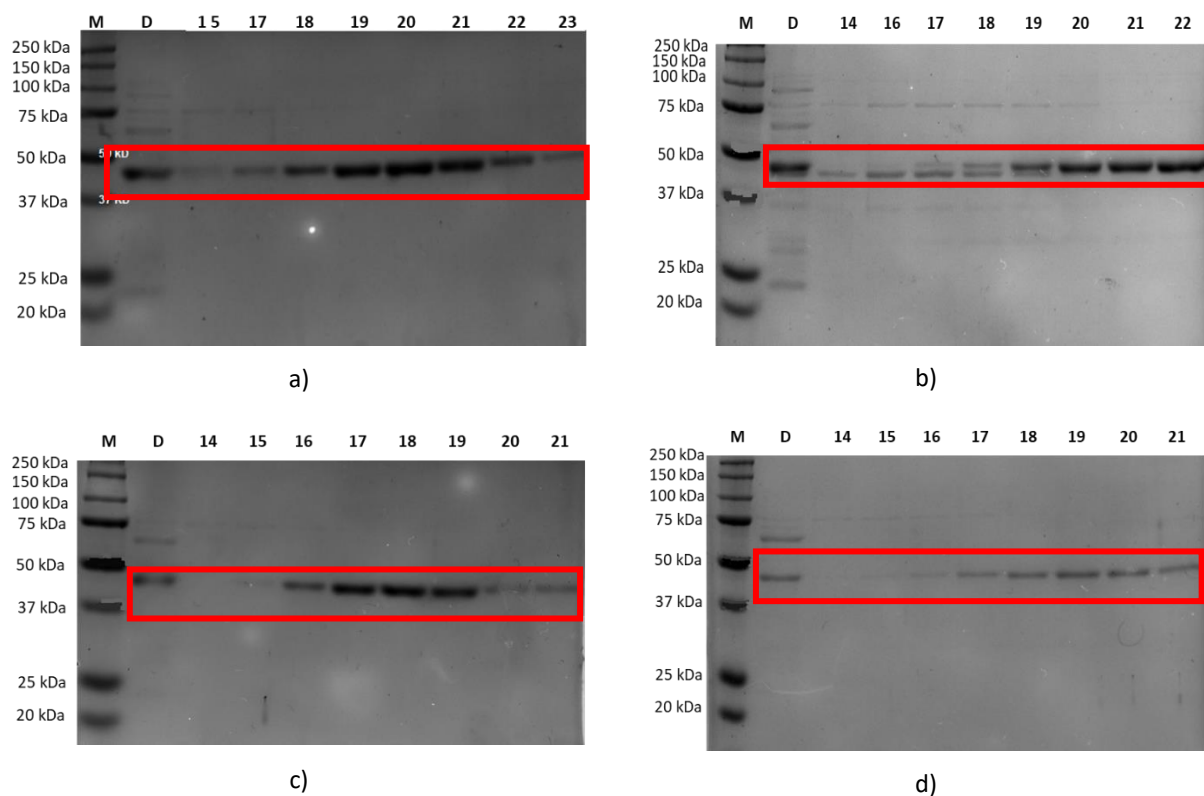
### 3.3.2 Purificación por cromatografía de intercambio iónico

Las fracciones de 300 y 500 mM de imidazol de cada mutante se dializaron por separado y se filtraron con filtro amicon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Posteriormente se purificaron por cromatografía de intercambio iónico y se recolectaron las fracciones de elución. Dichas fracciones correspondían al pico más alto en absorbancia

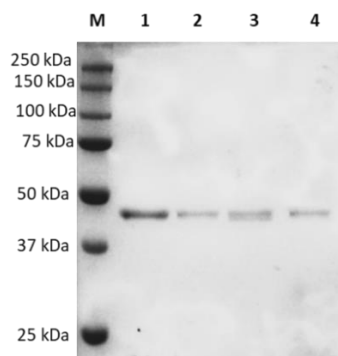
mostrado en los cromatogramas (Figura 19) y que comenzaba a aparecer alrededor del 30% del gradiente. Para corroborar que se trataba de la AvLOx se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%, eligiendo las fracciones de mayor pureza para conservarlas. En la Figura 20 se observan los geles de las fracciones recolectadas tras el paso por la columna de intercambio iónico, se puede observar que el cromatograma de la Figura 19 b) corresponde al gel de la Figura 20 c), y son las fracciones 18 a 21 las que se encuentran con mayor pureza.



**Figura 19. Cromatografía de intercambio aniónico de la mutante R181V.** a) cromatograma completo y b) acercamiento al pico de absorbancia máxima.



**Figura 20. Fracciones de la cromatografía de intercambio iónico de las mutantes AvLOx.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de cada fracción de purificación de las mutantes tras la cromatografía de intercambio iónico de a) R181A, b) R181V, c) R181I y d) K188C. En la parte superior del carril se especifica el número de la fracción a la que corresponde, así como M para el marcador de peso molecular y D para la muestra dializada



**Figura 21. Mutantes de AvLOx purificadas.** Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% de cada mutante tras los 2 pasos de purificación. Carril M: marcador de peso molecular, carril 1: R181A, carril 2: R181V, carril 3: R181I, carril 4: K188C.

Los cromatogramas de las otras mutantes tenían un comportamiento muy similar (Anexo D, Figura 38), por lo que también se recolectaron las fracciones de mayor pureza de acuerdo con el cromatograma obtenido y al gel de poliacrilamida después de la electroforesis. Una vez purificadas las fracciones de 300 y 500 mM de imidazol de cada mutante se juntaron las fracciones recolectadas con mayor pureza y se

corrió una electroforesis para ver el resultado. Se obtuvo el gel de la Figura 21 donde se puede apreciar bandas bien definidas en  $\approx 41\text{kDa}$  en cada mutante y sin ninguna otra proteína definida.

### 3.3.3 Cuantificación de proteína por método de Bradford

Tras los dos pasos de purificación de cada mutante se cuantificó la proteína obtenida con el ensayo de proteínas de Bio-Rad, basado en el método de Bradford. Se utilizó una curva de calibración con concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) conocidas y se cuantificaron las muestras obtenidas. En la Tabla 13 se muestran las cantidades de enzima obtenida de lote de purificación donde se partió de 4.5 L de cultivo inicial.

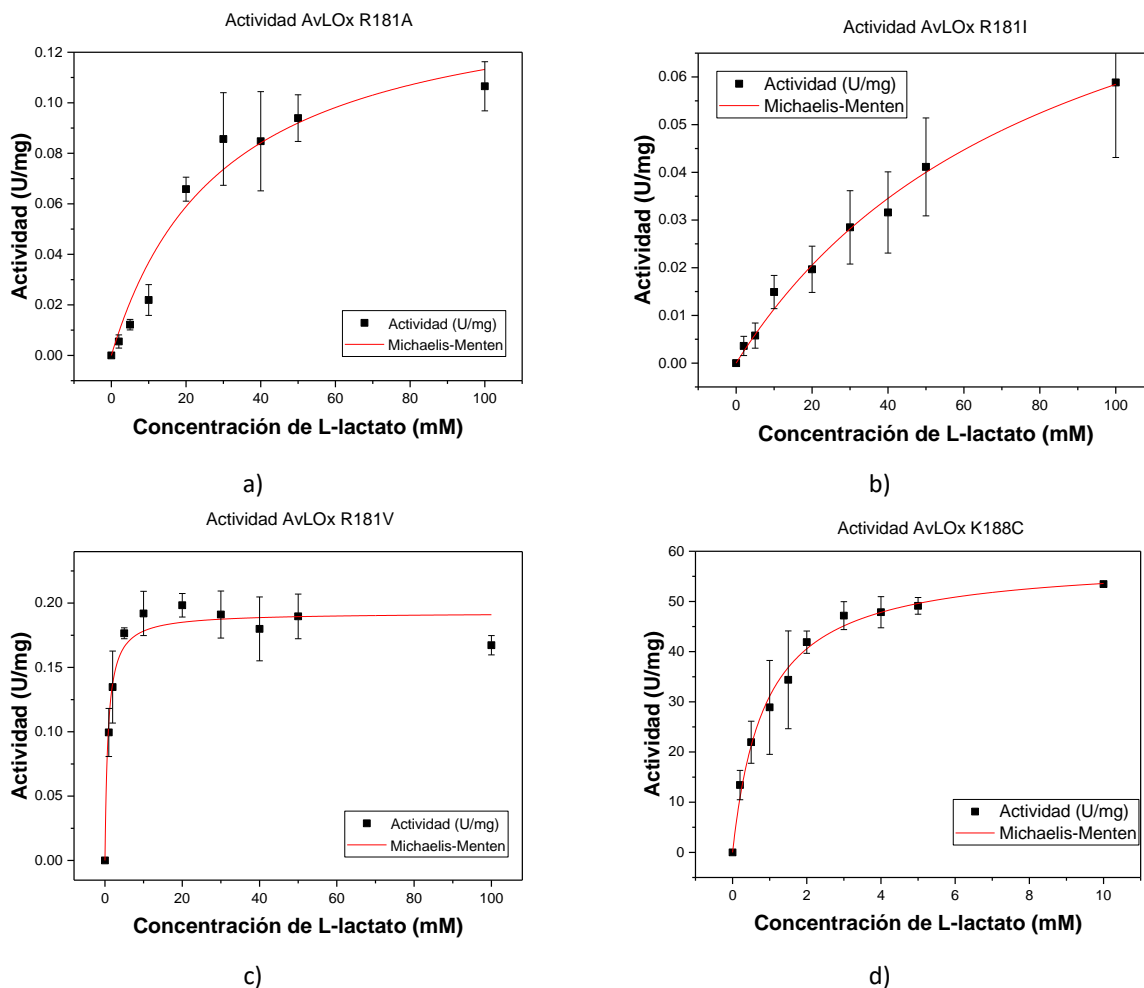
**Tabla 13.** Cuantificación de la proteína obtenida tras purificación con HisTrap y posteriormente con intercambio iónico.

Mutante	mg/mL	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	mg totales
R181A	2.44	59.48	4.88
R181I	1.71	41.68	3.42
R181V	1.48	36.12	2.96
K188C	0.42	10.18	0.83

### 3.3.4 Caracterización enzimática

Se hicieron ensayos de actividad curso temporales acoplados a peroxidasa con medición de la absorbancia a  $565\text{ cm}^{-1}$ . Se realizaron ensayos por triplicado a 0.2, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10 mM de lactato con mediciones cada 3 segundos. En la Figura 22 y Tabla 14 se muestra la caracterización enzimática de cada mutante de AvLOx y los parámetros cinéticos obtenidos a partir de un ajuste de Michaelis-Menten, respectivamente. Se puede observar que en el caso de las mutantes R181A y R181I no se llegó a saturación usando una concentración de 100 mM de lactato, lo que muestra una disminución en la afinidad del sustrato; en el mismo sentido, la  $K_m$  de ambas mutantes aumentó considerablemente en comparación con la AvLOx tipo silvestre, mientras que sus  $V_{\text{max}}$  disminuyeron hasta 250 veces. Fue la mutante R181V la que mostró la mejor actividad de las 3 mutante diseñadas para la apertura del sitio activo, aunque su  $V_{\text{max}}$  disminuyó en

comparación con la de tipo silvestre, su  $K_m$  está en el mismo orden de magnitud que esta, por lo que la afinidad al sustrato no ha sido afectada en gran medida, además la mutante llega a saturación en 10 mM de lactato un valor cercano a lo reportado para la enzima silvestre.



**Figura 22. Caracterización enzimática de mutantes AvLOx.** Actividad en U/mg de AvLOx mutante: a) R181A, b) R181I, c) R181V y d) K188C con ajuste de Michaelis-Menten.

**Tabla 14. Parámetros cinéticos de AvLOx silvestre y mutantes.**

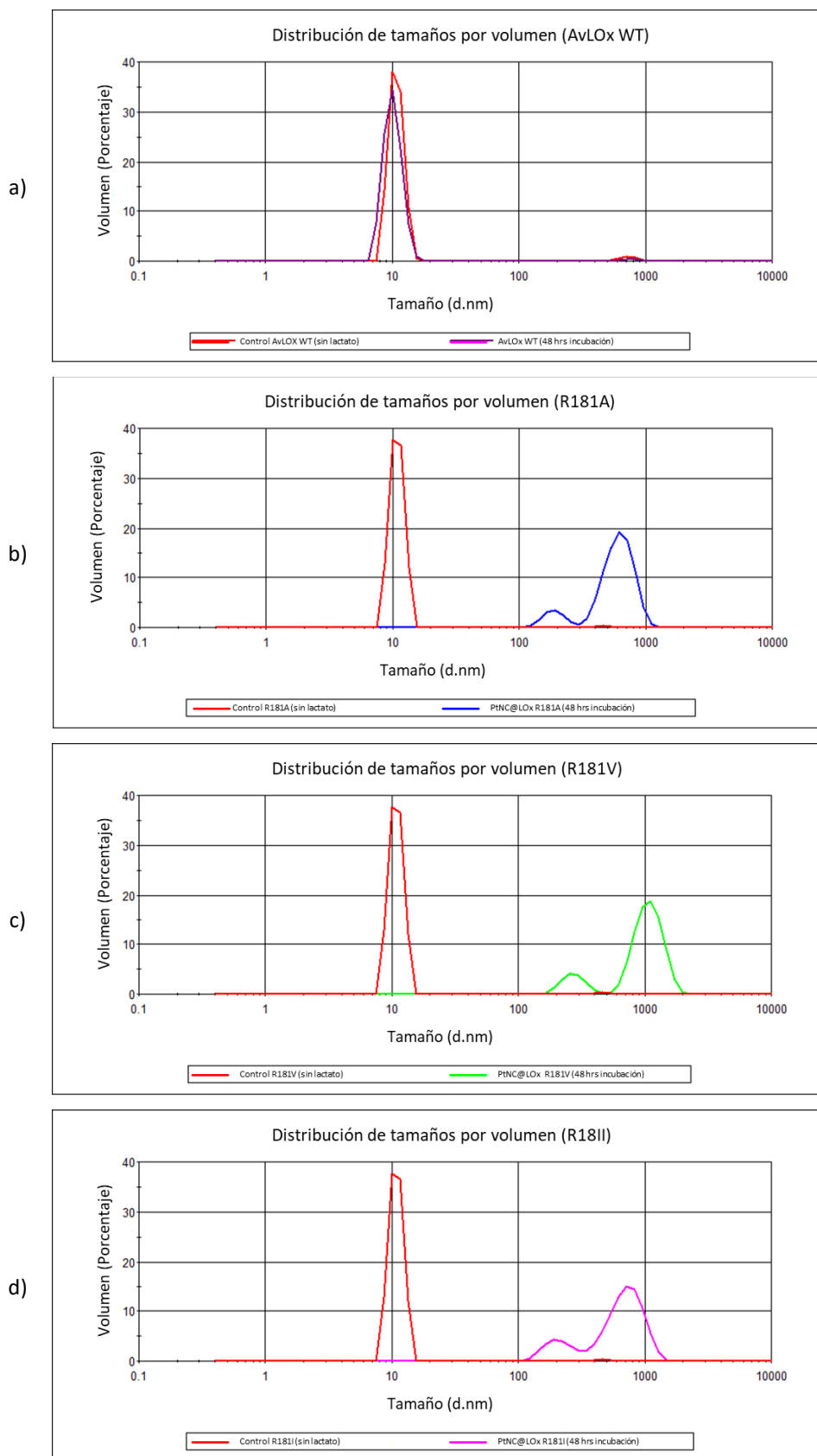
AvLOx	$V_{max}$ (U/mg)	$K_m$ (mM)	$k_{cat}(s^{-1})$
Silvestre	$27.966 \pm 1.089$	$0.155 \pm 0.018$	$19.11 \pm 0.740$
R181A	$0.15 \pm 0.018$	$29.97 \pm 9.143$	$0.10 \pm 0.012$
R181I	$0.11 \pm 0.011$	$85.71 \pm 14.488$	$0.07 \pm 0.007$
R181V	$0.19 \pm 0.005$	$0.80 \pm 0.176$	$0.13 \pm 0.003$
K188C	$47.88 \pm 0.637$	$0.59 \pm 0.033$	$32.72 \pm 0.435$

Por otro lado, la mutante K188C muestra una actividad comparable con la de tipo silvestre, se comienza a saturar a 6 mM de lactato, y su  $K_m$  y  $k_{cat}$  se encuentran en el mismo orden de magnitud que la enzima silvestre reportada en este trabajo; este comportamiento es inferible debido a que la modificación en esta mutante no es en el sitio activo.

### **3.4 Nucleación de platino a partir de la oxidación de L-lactato (R181A, R181V, R181I)**

Como primer acercamiento para la comprobación de formación de nanocúmulos de platino a partir de la oxidación de lactato, se utilizó la técnica de Dispersión de Luz Dinámica (DLS), con ella se pudo observar el tamaño de nanocúmulos formado, esto comparando cada solución que contenía híbridos Pt@LOx con su control donde había ausencia de sustrato. De manera visual (no se muestra) las mezclas de reacción al iniciar el experimento eran completamente traslúcidas, al transcurrir 48 horas de incubación, las soluciones que contenían la enzima mutante, el sustrato y el precursor de platino se tornaron turbias, mientras que las soluciones de la AvLOx tipo silvestre y los controles de las mutantes con ausencia de sustrato se mantuvieron transparentes. En la Figura 23 se muestran las distribuciones de tamaño en volumen de los híbridos Pt@AvLOx, El control con la enzima de tipo silvestre muestra, un pico en 10.21 nm que corresponde al tamaño de la enzima, tras 48 h de incubación no se aprecia formación de ningún tipo de nanopartícula, ya que el pico en el mismo tamaño (Figura 23 a).

En la mutante R181A se observa el pico de la enzima cerca del mismo tamaño  $\approx 10$  nm, pero al añadir lactato y dejar incubar por 48 h, aparecen partículas de 625 nm, dando indicios de una formación de nanocúmulos metálicos. (Figura 23 b). Por su parte, la mutante R181V tuvo un pico de tamaño de 1087 nm, mientras que la R181I de 728 nm (Figura 23 c y d respectivamente). Estos resultados junto con la observación de la turbidez de la solución sugieren que durante la reacción hubo formación de nanocúmulos de platino.



**Figura 23. Distribución de tamaños por volumen de las Pt@AvLOx obtenidas para cada mutante. a) Control con la AvLOx tipo silvestre, b) R181A, c) R181V y c) R181I.**



### 3.5 Inmovilización de enzima (K188C) en superficies de oro y pruebas DET

#### 3.5.1 Actividad de enzima inmovilizada

En la Tabla 15 se muestra el rendimiento de inmovilización de la mutante K188C en el electrodo de oro. La actividad inicial, antes de incubar el electrodo, era de 4.12 U/mL. Tras una hora de incubación con el electrodo, la actividad en la solución bajó a 2.78 U/mL obteniendo una diferencia de 1.34 U/mL que corresponde a la actividad inmovilizada teórica. Sin embargo, de manera experimental la actividad de la enzima inmovilizada por ensayo espectrofotométrico acoplado a peroxidasa fue de 0.16 U/mL, por lo que solo 11.94% de las enzimas que están teóricamente enlazadas están activas. La enzima se almacenó en buffer de fosfatos con 30% glicerol por 2 meses a  $-80^{\circ}\text{C}$ , posterior a ello se descongeló y se hicieron 2 lavados consecutivos para bajar la concentración de glicerol al 10%, al repetir el experimento con enzima almacenada la actividad inicial bajó a 2.98 U/mL, conservando un 72% de actividad con respecto a la enzima del primer ensayo. La actividad residual registró 1.85 U/mL, mientras que la actividad inmovilizada teórica tuvo 1.13 U/mL. La actividad de la enzima anclada al electrodo de oro fue de 0.08 U/mL que representa un 50% de la actividad tratada con la enzima fresca. Al comparar la actividad experimental del electrodo con la teórica se obtuvo que el 7.08% de estas se encuentran activas. Con estos resultados comprobamos que la enzima está directamente inmovilizada en el electrodo de oro y es activa. La disminución de la actividad de la enzima fresca comparada con la que estuvo almacenada 2 meses pudo haberse reducido debido a algunos factores como la precipitación de la enzima, cambios conformacionales por temperatura, proteólisis o los cambios de buffer en los lavados.

**Tabla 15.** Actividad de la enzima inmovilizada en electrodo de oro.

	Primeros ensayos de inmovilización	Ensayos de inmovilización tras almacenamiento
<b>Actividad Inicial (U/mL)</b>	4.12 $\pm$ 0.51	2.98 $\pm$ 0.31
<b>Actividad residual (U/mL)</b>	2.78 $\pm$ 0.21	1.85 $\pm$ 0.35
<b>Actividad inmovilizada teórica (U/mL)</b>	1.34 $\pm$ 0.72	1.13 $\pm$ 0.66
<b>Actividad inmovilizada en electrodo (U/mL)</b>	0.16 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.01
<b>Porcentaje de inmovilización (%)</b>	11.94 $\pm$ 0.85	7.08 $\pm$ 0.71

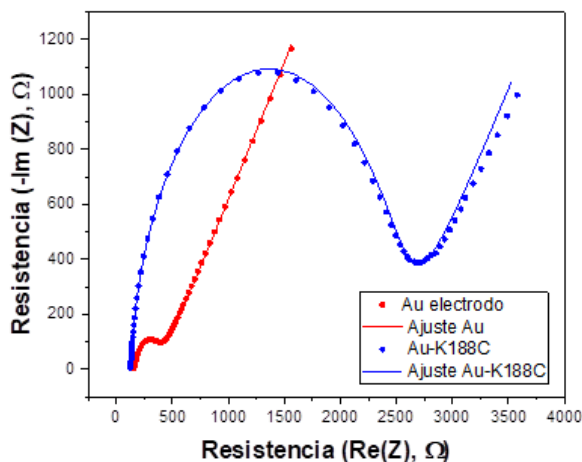
En la Tabla 16 se observa la actividad de la enzima inmovilizada y su comparación con los controles, se observa que solo el bioelectrodo Au-K188C tiene actividad, mientras que en los controles no se detectó actividad mediante el ensayo espectrofotométrico.

**Tabla 16.** Actividad de la enzima inmovilizada en electrodo de oro comparada con los controles.

	Au-K188C	Electrodo oro desnudo	Au-K188C inactivada	Au—AvLOX silvestre
<b>Actividad inmovilizada en oro (U/mL)</b>	0.16	N/D	N/D	N/D

### 3.5.2 Espectroscopía de Impedancia Electroquímica del electrodo con enzima inmovilizada

Para confirmar el anclaje de la enzima K188C al electrodo de oro se midió la impedancia del electrodo antes y después del proceso de inmovilización enzimática, los resultados se muestran en la Figura 24. En un diagrama de Nyquist o el espectro de impedancia electroquímica. El valor  $R_{CT}$  (Resistencia a la transferencia de cargas por sus siglas en inglés) para el electrodo de oro desnudo fue de 270  $\Omega$ , mientras al inmovilizar la enzima se obtuvo un valor de 2.57 k $\Omega$ . El  $R_{CT}$  del electrodo Au-K188C aumentó debido a la unión de moléculas de enzimas, que son malos conductores eléctricos a bajas frecuencias y dificultan la transferencia de electrones. Aunado a los resultados de los ensayos de actividad enzimática en los electrodos, estos resultados también confirmaron la inmovilización de AvLOx mutante en el electrodo.

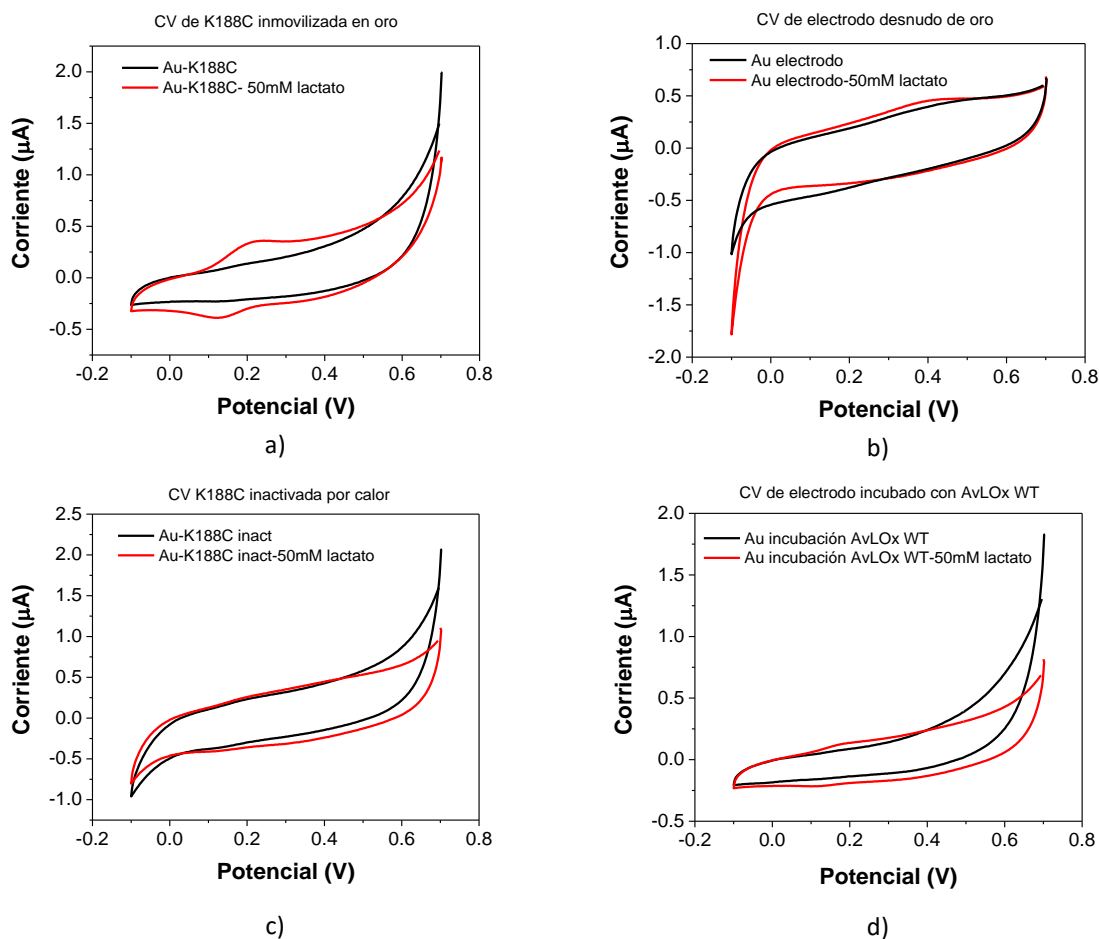


**Figura 24. Espectro de impedancia electroquímica.** Se muestra el espectro del electrodo de oro sin modificar (rojo) y del electrodo de oro tras la inmovilización de la mutante K188C (azul).

### 3.5.3 Pruebas electroquímicas para comprobar transferencia directa de electrones

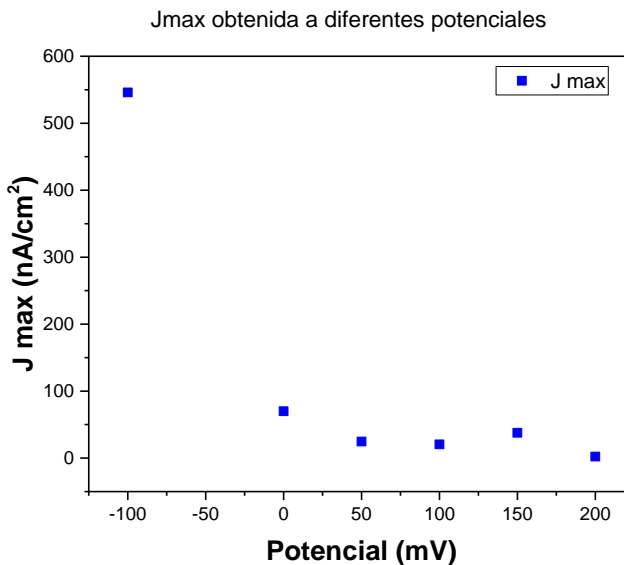
Los electrodos de oro con enzima directamente inmovilizada K188C (Au-K188C) se evaluaron por voltametría cíclica. En ausencia de lactato, como se esperaba, no se observa una respuesta redox en ninguno de los electrodos probados. En el Au-K188C de la Figura 25 a), tras la adición de lactato, el voltamograma cíclico muestra un aumento de la corriente máxima anódica (0.21 V) y una disminución de la corriente máxima catódica (0.12 V), este comportamiento es consistente y atribuido a un efecto electrocatalítico del par redox.

En contraste el electrodo de oro desnudo, el electrodo Au-K188C inactivado y el electrodo de oro incubado con AvLOx silvestre (Figura 25 b, c y de respectivamente) no muestran cambios significativos en las corrientes anódicas y catódicas correspondientes al par redox observado en el electrodo Au-K188C.



**Figura 25. Voltametría cíclica de AvLOx K188C inmovilizada en oro.** Se muestra la voltametría cíclica de a) Au-K188C, b) electrodo de oro desnudo, c) Au-K188C inactivada por calor y d) Au incubado con AvLOx silvestre. La línea negra en cada gráfico es en ausencia de lactato y la línea roja tras añadir 50mM de lactato en buffer fosfatos 100mM y E vs Ag/AgCl.

Para evaluar la respuesta del bioelectrodo Au-K188C se utilizó la técnica de amperometría, se midió la corriente producida a diferentes potenciales: -100, 0, 50, 100, 150, 200 mV vs Ag/AgCl; se eligió el potencial con la mayor densidad de corriente producida ( $J_{\max}$ ) el cual fue el de 545 nA/cm<sup>2</sup> a -100 mV. Los resultados se muestran en la Figura 26.

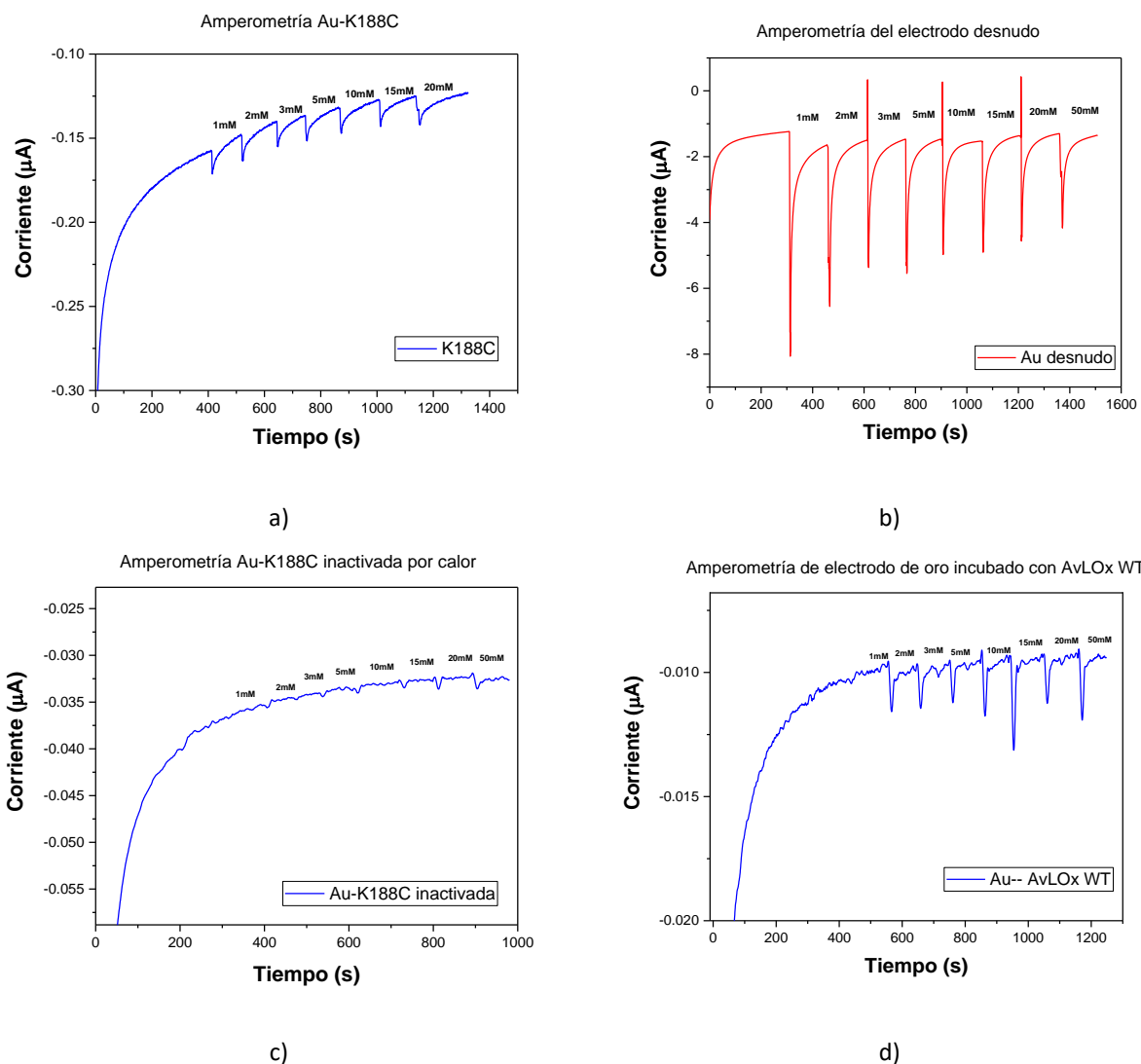


**Figura 26. Evaluación de  $J_{\max}$  a diferentes potenciales.** Densidad de corriente máxima ( $J_{\max}$  (nA/cm<sup>2</sup>)) obtenida por cronoamperometrías a diferentes potenciales. Buffer fosfatos 100mM, 50 mM de lactato y E vs Ag/AgCl.

El bioelectrodo Au-K188C mostró un aumento de corriente después de la adición de L-lactato dependiente de la concentración de este, se hicieron inyecciones de 1, 2, 3, 5, 10, 15 y 20 mM, y se registraron los aumentos de corriente (Figura 27 a). La corriente cambió de -0.157  $\mu$ A a -0.123  $\mu$ A tras la adición de 20 mM de lactato, dando una diferencia significativa de 0.034  $\mu$ A. Por otro lado, el electrodo de oro desnudo mostró una disminución de las corrientes al inyectar L-lactato al sistema, y tras cada inyección la corriente llegaba a un valor similar al de la inyección anterior, por lo que no se observa aumento de corriente dependiente de lactato (Figura 27 b).

A usar la enzima K188C e inactivarla tras el anclaje a la superficie de oro se observó una diferencia máxima de corriente de 0 a 50 mM de lactato de 0.003  $\mu$ A, esto es una diferencia de corriente muy pequeña que se puede deber a que algunos sitios catalíticos de la enzima siguen activos (Figura 27 c). En el electrodo incubado con AvLOx silvestre la diferencia de corriente obtenida de 0 a 50 mM fue de 0.0007  $\mu$ A, por lo que es prácticamente nula la respuesta dependiente de la concentración de lactato (Figura 27 d). Estos

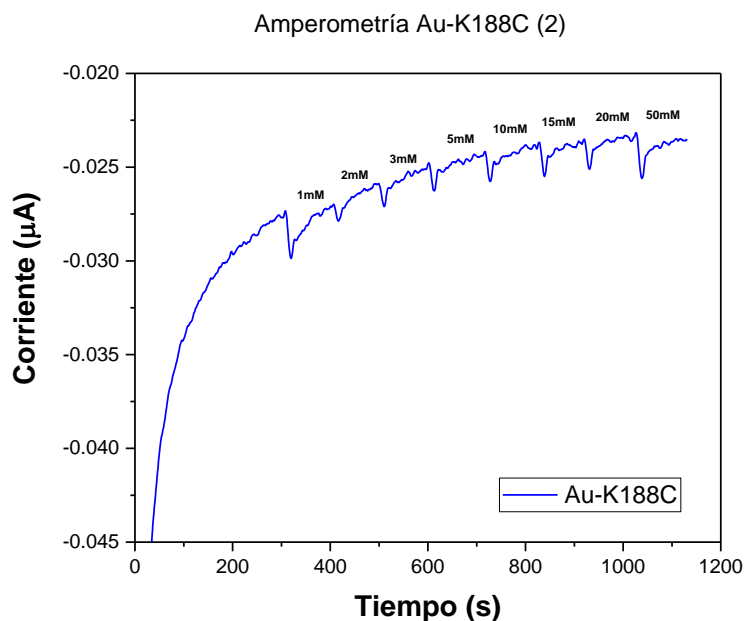
resultados indican que el diseño de esta mutante promueve la DET al anclarse directamente en electrodos de oro y obtener una respuesta amperométrica dependiente de la concentración de lactato en la celda.



**Figura 27. Caracterización de la respuesta amperométrica de K188C.** Amperometría de a) electrodo Au-K188C, b) electrodo de oro desnudo, c) Au-K188C inactivada por calor y d) electrodo incubado con AvLOx silvestre. Buffer fosfatos 100mM, E vs Ag/AgCl.

Tras 2 meses de almacenaje de la enzima K188C, se repitieron por triplicados los experimentos amperométricos. Se puede apreciar en la Figura 28 que hay un aumento en la corriente dependiente de la concentración de lactato inyectada, sin embargo, es menor en magnitud a la reportada en la Figura 27a. mientras que el electrodo tratado con enzima fresca tuvo un aumento de corriente de 0.034 µA, el electrodo tratado con enzima almacenada solo obtuvo 0.0053 µA. Esto puede atribuirse al almacenaje de

la enzima, ya que habíamos observado una pérdida en la actividad, como se mencionó en la sección anterior de las pruebas de actividad de los electrodos.



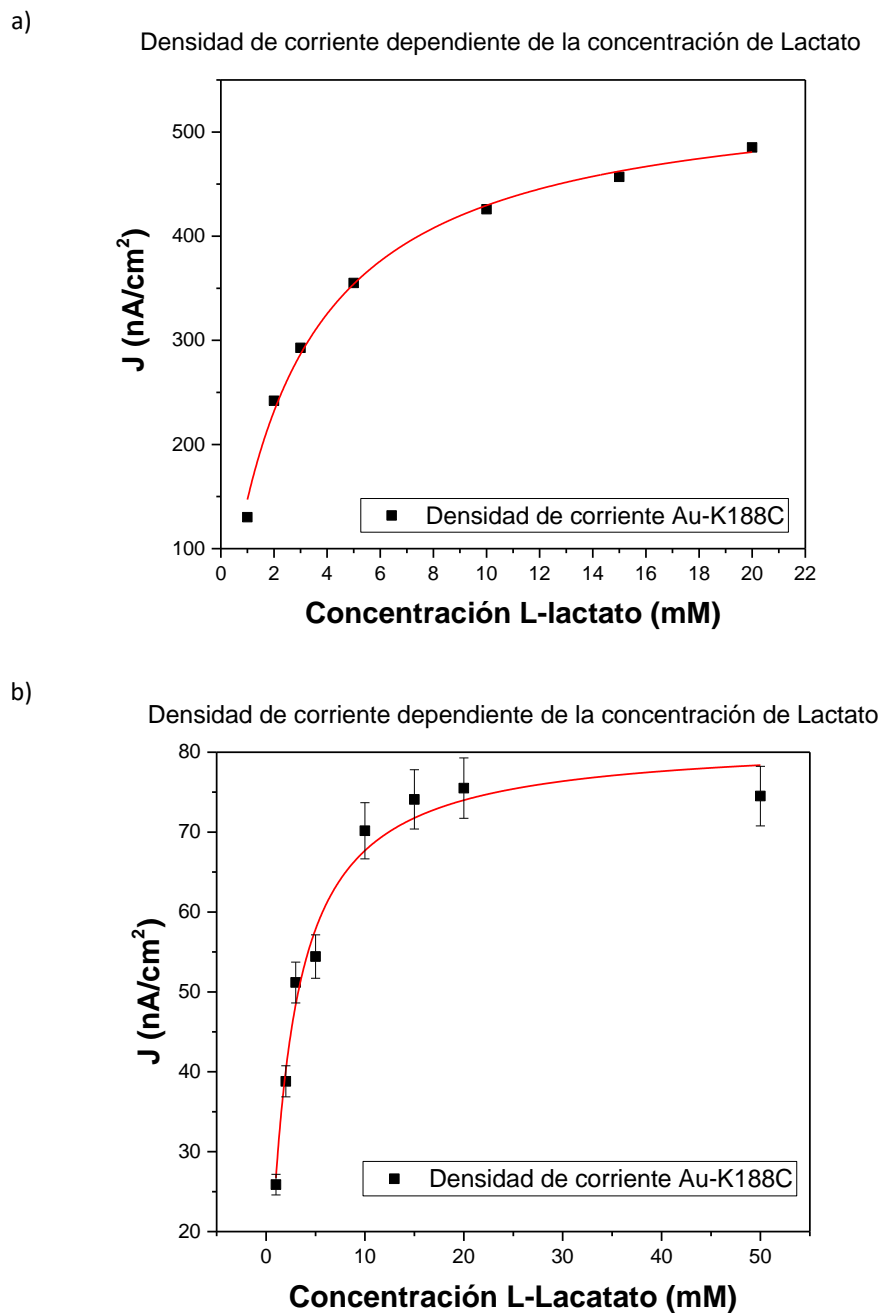
**Figura 28. Respuesta amperométrica de K188C posteriormente al almacenamiento.** Amperometría de electrodo de oro con enzima inmovilizada K188C después de 2 meses de almacenaje de enzima. Buffer fosfatos 100mM, E vs Ag/AgCl.

En la Figura 29 se muestra la correlación que hay entre el aumento de corriente dependiente de la concentración de L-lactato inyectado al sistema. Se utilizó la regresión no lineal del modelo Michaelis-Menten para evaluar la cinética enzimática aparente de los electrodos Au-K188C por el sustrato (Reshetilov et al., 2013; Janata, 2009). Se utilizó la ecuación:

$$J = \frac{J_{max}[S]}{([S] + k_m^{app})}$$

Donde  $J$  es la densidad de corriente,  $k_M^{app}$  es la constante de Michaelis-Menten aparente que cuantifica la afinidad enzimática por el sustrato y  $J_{max}$  es la densidad de corriente máxima.

Dado que el sistema de reconocimiento del bioelectrodo enzimático propuesto depende de la cinética enzimática, la detección del L-lactato se evaluó en condiciones de estado estacionario para comparar la afinidad aparente  $k_M^{app}$  y  $J_{max}$  del lactato en los bioelectrodos (Mross et al., 2015; Milton et al., 2015).



**Figura 29. Determinación de  $J_{\max}$  de K188C.** Correlación entre el aumento de corriente y la concentración de L-lactato del cronoamperograma de a) Au-K188C y b) Au-K188C con enzima almacenada por 2 meses.

Los resultados se muestran en la Tabla 17, se puede observar que la  $J_{\max}$  del primer ensayo fue de 545  $\text{nA}/\text{cm}^2$  es 6.7 veces mayor que el experimento donde se utilizó enzima almacenada por 2 meses que se obtuvo una  $J_{\max}$  de 81.61  $\text{nA}/\text{cm}^2$ . Por otro lado, la  $K_m$  se mantiene en valores muy parecidos lo que nos da indicios que hemos perdido enzima activa. Al comparar los valores de la  $K_m$  con los obtenidos en la sección 3.3.4 se aprecian en el mismo orden de magnitud por lo que la enzima no perdió afinidad por el sustrato.

**Tabla 17.** Cinética enzimática aparente de los electrodos Au-K188C.

<b>Enzima</b>	<b><math>J_{\max}</math> (nA/cm<sup>2</sup>)</b>	<b><math>K_m</math> (mM)</b>
K188C	545.87 ±10.72	2.71 ±0.17
K188C (2 meses)	81.61 ±2.15	2.06 ±0.23



## Capítulo 4. Discusión

---

El L-lactato es un analito importante en la industria alimentaria, en ingeniería de bioprocesos, en medicina deportiva y clínica, por ello la detección y cuantificación de este compuesto ha ganado mucha importancia en los últimos tiempos. Para la detección y cuantificación del lactato se han reportado diferentes métodos entre los que se incluyen métodos colorimétricos, espectrofotométricos y fluorométricos, cromatográficos, biosensores electroquímicos, entre otros (Rattu et al., 2020). Centrándonos en los últimos, los biosensores electroquímicos, utilizan un elemento de reconocimiento molecular que cataliza una reacción, generando o consumiendo especies electroquímicamente activas. Para la detección de lactato, la lactato oxidasa ha causado especial atención, debido a su reacción sencilla y al diseño relativamente sencillo de biosensores. Sin embargo, los biosensores de primera y segunda generación tienen complicaciones y algunas limitaciones en cuanto a la obtención de señales y la aplicabilidad en dispositivos implantables. Por ello, en este trabajo se optimizó la lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* para realizar transferencia directa de electrones en aplicaciones de biosensores. Aunque existen diferentes reportes donde modifican la LOx para diferentes aplicaciones como insensibilidad al oxígeno, anclaje a superficies, modificaciones químicas, entre otros; son pocos los trabajos donde se ha explorado en la transferencia directa de electrones con esta enzima, siendo esta estrategia una mejor plataforma para la detección y en aplicaciones implantables.

Se usaron dos estrategias diferentes para promover la DET, la primera consistió en abrir el poro de acceso al sitio activo de la AvLOx para acercar lo suficiente un precursor de platino y sintetizar nanocúmulos de platino dependientes de la oxidación de lactato (Trifonov et al., 2019). La segunda estrategia fue cambiar un residuo de superficie que estuviera lo suficientemente cerca del N5 del FMN (no más de 20 Å) por una cisteína promoviendo el anclaje directo a superficies de oro por un enlace tiol-oro y permitir la DET (Vazquez-Duhalt et al., 2014; Häkkinen, 2012).

Las minimizaciones de energía de las estructuras AvLOx tras las mutaciones *in silico* mostraron una evidente apertura del poro de acceso al FMN para la primera estrategia DET. Un análisis en el servidor MOLE online (Pravda et al., 2018) mostró una apertura de poro en la parte más angosta de 1.5 Å en la enzima tipo silvestre a 2.4, 2.3, 2.2 Å al cambiar la arginina (R) 181 por alanina (A), valina (V) e isoleucina (I) respectivamente. Estos residuos mantienen la hidrofobicidad del poro de acceso al FMN y al ser más pequeños que la arginina permitieron el ensanchamiento del túnel de acceso.

En la mutante elegida para la segunda estrategia se cambió la lisina (K) en la posición 188 por cisteína (C). Al medir la distancia desde el N5 del FMN a la superficie se obtuvo 20.5 Å. Vazquez-Duhalt et al., (2014) menciona que un valor igual o inferior a 14 Å favorece la DET por el efecto de túnel de los electrones. Surgiría el problema que tenemos 5.48 Å de distancia extra que no favorecen la DET, sin embargo, esta mutación K188C queda a 15 Å de la tirosina 40 (Y40). Cuando ocurre la oxidación del lactato el N5 del FMN toma el electrón del lactato y la tirosina 40 es el residuo que puede participar como puente para el acarreo de ese electrón (Umena et al., 2006). Debido a ello este residuo es importante en el proceso de oxidación y al estar cerca de la cisteína de superficie puede promover la DET. Para confirmar el rol de este residuo en la DET se podría generar una mutante por fenilalanina para evaluar su desempeño en el análisis amperométrico, aunque ese experimento está fuera del alcance de este trabajo. Adicionalmente, la Y40 es fundamental en la interacción con piruvato, formando un enlace de hidrógeno con su grupo carboxilo (Stoisser, Klimacek, et al., 2015) , por lo que una mutante en este residuo podría tener un efecto negativo en la actividad de la enzima, impidiendo determinar su papel en la DET.

En la obtención de las mutantes la variante del método de doble PCR (Tyagi et al., 2004) fue exitoso. En la primera PCR se usaron megacebadores de 700 pb lo que sirvió como molde para una segunda PCR en la cual la amplificación del gen introducía la mutación deseada. Los productos de estas amplificaciones fueron clonados en el kit comercial CloneJET de Thermo Scientific™ y se transformaron células *E. coli* quimiocompetentes de la cepa XL1-BLUE. Tras la selección de las colonias y la confirmación por secuenciación de las mutantes deseadas se procedió a la clonación del gen mutante en el vector pET-28a(+). Una nueva transformación, selección y secuenciación nos confirmó las colonias positivas al gen mutante.

Por último, se purificó el plásmido y se transformó en *E. coli* de la cepa BL21 (DE3) para expresar las enzimas mutantes y purificarlas. Fueron 2 pasos de purificación los que permitieron obtener enzimas puras. La cromatografía de afinidad a níquel funcionó debido a las etiquetas de histidinas presentes en el gen AvLOx que se clonaron en los vectores. Esta cromatografía se basa en la unión de alta afinidad de seis residuos de histidina consecutivos (la etiqueta 6xHis) a los iones de níquel inmovilizados, lo que genera una interacción altamente selectiva que permite la purificación de proteínas etiquetadas o complejos de proteínas con una homogeneidad. La estrecha asociación entre la etiqueta y la resina permite que los contaminantes se eliminen fácilmente en condiciones estrictas, aunque las proteínas unidas se pueden eluir fácilmente compitiendo con imidazol o con una ligera reducción del pH (Crowe et al., 1994).

El primer paso de purificación no fue suficiente ya que la electroforesis mostró otras bandas que no eran de interés por lo que se procedió a un segundo paso de purificación por cromatografía de intercambio iónico. A pH 7.4 la AvLOx tiene carga negativa por lo que la resina Macroprep High Q fue la elegida para esta técnica, esta resina tiene grupos funcionales amina cuaternaria con cargas mayormente positivas, por lo que la proteína con carga negativa interacciona con esta. En los geles de electroforesis se mostraron enzimas de alta pureza que correspondían con los picos más altos de absorbancia observados en los cromatogramas; sin embargo, hubo 2 mutantes: R181V y R181I que tenían una banda bien definida (40 kDa) por debajo de la banda de interés (41 kDa). Esta banda tiene mucha menor concentración de proteína que la banda de interés por lo que no interfirió en la aplicación. Es posible que la banda extra (40 kDa) sea una isoforma de la AvLOx. Las isoformas de proteínas se definen como variantes de un solo polipéptido que generalmente alteran su función; más del 90 % de las isoformas naturales surgen de modificaciones postraduccionales y menos del 10 % de variaciones de empalme de ARNm. Se han reportado trabajos donde se encuentra este fenómeno, expresan isoformas de una enzima recombinante (Brizio et al., 2006), o de proteínas nativas (Bologna et al., 2007; Raikos et al., 2006) y son encontradas por electroforesis en bandas muy cercanas a las bandas de interés.

Para la estrategia de síntesis de nanocúmulos de platino la mutante con mejor actividad fue la R181V, la  $V_{max}$  disminuyó hasta 150 veces su actividad respecto a la enzima silvestre mientras que la  $K_m$  se mantuvo en el mismo orden de magnitud, por lo que la afinidad al sustrato no se vio modificada de manera significativa. Además, la enzima comienza a llegar a saturación por encima de 10 mM de lactato. Las mutantes R181A y R181I, no solo disminuyeron su  $V_{max}$ , sino que su  $K_m$  creció 550 y 200 veces con respecto a la de tipo silvestre por lo que su afinidad al sustrato fue modificada. Usando una concentración de 100 mM de lactato se evidenció que no se llega a saturación de la enzima y se confirma que su afinidad al sustrato ha disminuido de manera importante. Al comparar el número recambio o constante catalítica ( $k_{cat}$ ) de estas 3 mutantes, se observó que son 2 órdenes de magnitud menor que la  $k_{cat}$  de la enzima de tipo silvestre, esto significa que el número máximo de moléculas de sustrato convertidas en producto por sitio activo por unidad de tiempo es al menos 100 veces menor (Unterweger et al., 2012; Roskoski, 2015). Esto es coherente debido a que estamos afectando una zona muy cercana al sitio activo. El uso de sensores de lactato que utilizan LOx tienen la desventaja de tener una  $K_m$  relativamente baja, y considerando la concentración de lactato en el sudor (hasta 43.7 mM en estado basal y 115.8 mM bajo ejercicio exhaustivo), este fenómeno afecta la señal del sensor limitando el rango de detección del sistema, por lo que una LOx con la  $K_m$  modificada podría tener mejor desempeño en la obtención de señales en el biosensor (Hiraka et al., 2021). El cambio en la cinética en estas 3 mutantes se debe a que el residuo 181 forma parte del bucle flexible de entrada al sitio catalítico de la enzima, además interacciona con el lactato

de forma remota. Este es uno de los residuos conservados en toda la familia de las oxidasas  $\alpha$ -hidroxiácidos (Umena et al., 2006). Además, la R181 participa tanto en la unión del sustrato como en la influencia de las propiedades y la reactividad del sitio activo. Años atrás se había cambiado este residuo por una metionina para ver los efectos de quitar la carga positiva en esa posición, los resultados fueron una disminución de la actividad (Yorita et al., 2000), por ello la mutación elegida fue con aminoácidos hidrófobos y de cadena corta, manteniendo la hidrofobicidad del túnel de acceso al sitio activo y reduciendo el tamaño de uno de los residuos, permitiendo el ensanchamiento del canal. Es importante resaltar que, aunque la actividad en estas mutantes se ve disminuida en nuestro ensayo acoplado a peroxidasa, en este ensayo se mide la concentración de  $H_2O_2$  formado en el segundo paso de la reacción, sin embargo, para fines de un biosensor electroquímico la formación de  $H_2O_2$  no es necesaria. De esta manera, la disminución en la actividad no siempre correlaciona con la señal electroquímica, ya que en esta solo se llevarían a cabo los pasos de reducción del L-lactato y la liberación del piruvato.

La reacción de cada mutante para la formación de nanocúmulos de platino fue analizada por DLS. Con esta técnica se mide la luz dispersada por un láser de luz que pasa por la solución. Seguido de ello, la modulación de la intensidad de luz dispersada es analizada en función del tiempo, y el tamaño hidrodinámico de las partículas se determina (Tomaszewska, et al., 2013). La primera observación al transcurrir 48 horas de reacción fue el cambio en la turbidez de la solución, fue evidente que solo en las reacciones con mutante optimizada (R181A, R181V Y R181I) se observó este fenómeno. En contraparte los controles que carecían de sustrato, y en el control con enzima de tipo silvestre, no se aprecia cambios en la solución de reacción. Según esta técnica de caracterización se obtuvieron partículas de aproximadamente 625, 1087, 728 nm (R181A, R181V, R181I, respectivamente) que crecieron dependiendo de la oxidación de lactato, siendo la mutante R181V a que formó nanocúmulos más grandes: el tamaño de formación de nanocúmulos depende del tiempo de reacción, de la disponibilidad del sustrato y del precursor del platino. Estos resultados indican que las mutantes optimizadas por ensanchamiento del poro de acceso al sitio activo podrían promover la DET, en otras palabras, se inicia una reacción enzimática controlada por el tiempo en la que el lactato es oxidado por la AvLOx mutante, simultáneamente ocurre la reducción de los iones de platino a grupos metálicos y se regenera el centro activo redox de la enzima, pasando de  $FMN_{red}$ , a su estado  $FMN_{ox}$ . La primera semirreacción (oxidación del lactato) produce el cofactor  $FMN_{red}$ , que actúa como fuerte agente reductor, este impulsa la reducción química de los iones de platino, para formar un grupo metálico nanométrico que se extiende del centro activo hacia la superficie de la enzima. Como la etapa de crecimiento se realiza en condiciones casi anaeróbicas en las que el  $O_2$ , el aceptor natural de LOx, se elimina del sistema a través de una extensa purga de  $N_2$ ; la segunda semireacción de la AvLOx (Figura 1) se vuelve desfavorable respecto a la reducción de iones  $PtCl_6^{-2}$  utilizándolos como el único aceptor de los

electrones (Trifonov et al., 2019). La técnica utilizada es el primer acercamiento y nos muestra los primeros indicios de formación de nanocúmulos de platino, sin embargo, para caracterizarlas de manera más precisa es conveniente auxiliarse de otra técnica como la microscopía electrónica de transmisión (TEM) (Starikova et al., 2016).

En el caso de la cinética de la mutante K188C la  $V_{\max}$  aumentó 1.7 veces con respecto a la enzima de tipo silvestre. En contraparte su  $K_m$  se encuentra en el mismo orden de magnitud por lo que la afinidad al sustrato no ha sido modificada de manera importante, además por arriba de 5 mM de lactato comienza a saturarse. En el caso de  $k_{\text{cat}}$  de esta mutante y comparándola con la enzima de tipo silvestre, la de la mutante es solo unas 1.5 veces mayor, encontrándose en el mismo orden de magnitud. Se confirmó en este experimento que se conserva la actividad de la enzima sin cambios importantes en la afinidad por el sustrato de la mutante K188C.

Para la estrategia de anclaje directo a superficie de oro se observó que entre el 8-11% de la enzima que teóricamente está anclada se mantuvo activa. Cabe mencionar que estos ensayos para confirmar inmovilización son basados solo en actividad enzimática. Para caracterizar la naturaleza de la superficie del electrodo, Parra et al. (2006) y Pagán et al. (2015) utilizan microscopía de fuerza atómica (AFM) ya que aportarían información morfológica del acomodo espacial de las enzimas en superficie. En contraparte, en esta investigación, como parte de la caracterización del electrodo se obtuvieron los espectros de impedancia electroquímica y se midió la diferencia de resistencia en la superficie del electrodo antes y después de inmovilizar la enzima. La  $R_{\text{CT}}$  aumentó 10 veces tras la inmovilización de la enzima en el electrodo, lo que nos confirma la unión de la proteína mutante en la superficie. Esta resistencia aumenta debido a que las moléculas de las enzimas son malos conductores eléctricos a bajas frecuencias, lo que impide la difusión de los electrones sobre la superficie metálica, confirmando la presencia de una capa no conductora sobre el oro (Sainz et al., 2022; Dagar y Pundir, 2017).

En primera instancia al obtener actividad en el electrodo Au-K188C y no detectar actividad en los controles de electrodo de oro desnudo, Au-K188C inactivada por calor y el Au--AvLOx silvestre. Podemos ver evidencia de anclaje directo de la mutante K188C al oro. La primera prueba de DET fue el resultado obtenido de los experimentos por voltametría cíclica. La adición de lactato mostró un claro aumento en la corriente anódica (0.21 V) y una disminución de corriente catódica (0.12 V) que se le atribuye al par redox en la reacción. En ausencia de lactato no aparecen estos picos correspondientes al par redox. Para confirmar el papel de la enzima en la respuesta catalítica del biosensor se registraron las respuestas voltamperométricas cíclicas del electrodo de oro desnudo con la solución de buffer fosfatos 100 mM en

ausencia y presencia de lactato, como era de esperar, los resultados no mostraron cambios importantes en la respuesta asociada a la reacción de la AvLOx (Parra et al., 2006) (Dagar and Pundir, 2017). Como controles adicionales, los electrodos con K188C térmicamente inactivada y AvLOx silvestre, no mostraron cambios en las corrientes anódicas y catódicas, esto debido a que la enzima inactivada no debería conservar capacidad de bioconversión, y en el caso del tipo silvestre el anclaje a la superficie de oro no se llevó a cabo ya que no tenía cisteínas en superficie que favorecieran su inmovilización. Estos resultados son consistentes con los mostrados en la actividad de los electrodos, ya que solo el electrodo Au-K188C mostraba actividad de 0.16 U/mL.

A continuación, se evaluó la capacidad DET de Au-K188C usando amperometría. Se realizó la amperometría a diferentes potenciales y a partir de ello se calculó la densidad de corriente máxima producida. Entre los potenciales explorados fue el de -100 mV vs Ag/AgCl el que produjo la mayor densidad de corriente ( $545 \text{ nA/cm}^2$ ), por lo que los experimentos posteriores se llevaron a cabo a ese potencial. El bioelectrodo Au-K188C presentó un aumento de corriente dependiente de la concentración de lactato sin aceptores de electrones externos, evidenciando la capacidad DET de la enzima (Hiraka et al., 2021). Por su parte el electrodo desnudo no presentó aumento de la corriente en presencia de lactato, y aunque el electrodo con enzima inactivada mostró un ligero aumento en la corriente, la dependencia de la concentración fue limitada debido a cierta actividad residual en las enzimas ancladas al oro. En el caso del electrodo que fue incubado con enzima silvestre, se esperaba que no se hubiera anclado ninguna enzima, sin embargo, puede haber fisorción inespecífica de algunas proteínas que reaccionan al añadir lactato y esto explica el ligero aumento en la corriente.

A pesar de haber protegido con glicerol al 30% para almacenar la enzima a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ , tras 2 meses de almacenaje de la enzima y contrastando con los experimentos de actividad en el electrodo, la actividad de la enzima disminuyó considerablemente. La respuesta amperométrica del electrodo Au-K188C tratada con enzima almacenada por 2 meses mostró aumento en corriente dependiente a la adición de lactato evidenciando su capacidad DET. Sin embargo, la densidad de corriente ( $J_{\text{max}}$ ) disminuyó 6.7 veces con respecto al electrodo con enzima inmovilizada fresca. Además, tanto en la actividad residual de la solución de incubación de la enzima fresca como en la solución con enzima que fue almacenada se conserva solo de un 60 a 70% de la actividad inicial, esto puede deberse no solo a que una parte se inmoviliza en el electrodo, sino que al cambiar de buffer fosfatos a MTEN (MES, TRIS, Etanolamina) puede precipitarse la enzima o tener cambios conformacionales. Aunque el almacenamiento de la enzima se hace en el mismo buffer de purificación de la proteína solo que suplementado con 30% de glicerol se observó que, al pasar 2 meses y descongelar la enzima, la actividad también se reduce, quedándonos solo con 70% de la

actividad. Además, al descongelar la enzima se hacen lavados para cambiar el buffer y reducir el porcentaje de glicerol a 10%. Estos resultados indican que la enzima pudo haberse precipitado, haber perdido su estabilidad debido a cambios de temperatura en el manejo de la enzima o pérdida de enzima en los lavados para cambiar el buffer. Es conveniente buscar un mejor buffer de almacenamiento para evitar pérdida de actividad enzimática.

De manera conjunta los resultados de la actividad en el electrodo, la impedancia y la actividad electroquímica confirman la inmovilización directa de la mutante K188C a la superficie de oro. Por otro lado, la señal redox de la voltamperometría cíclica, y la respuesta en corriente dependiente de la concentración de lactato con la ausencia de mediadores redox evidencian una transferencia directa de electrones de la enzima al electrodo.

## Capítulo 5. Conclusiones

---

En el presente trabajo se modificó la enzima AvLOx para promover la DET por 2 estrategias en biosensores amperométricos. Se utilizaron herramientas de bioinformática con el objetivo de diseñar mutantes *in silico* que permitieran la DET en diferentes aplicaciones. Posterior a ello se utilizó mutagénesis dirigida a sitio para la obtención de 4 mutantes: 3 de ellas para la creación de nanocúmulos de platino dependientes de la oxidación de lactato (R181A, R181V y R181I), y 1 de ellas para la inmovilización directa molecularmente orientada en electrodos de oro (K188C). La expresión y purificación de las 4 variantes de la enzima AvLOx fueron exitosas, obteniendo enzimas puras en 2 pasos de purificación (cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio iónico).

Se logró estandarizar los ensayos de actividad enzimática obteniendo los parámetros cinéticos de las 4 mutantes, aunque la actividad catalítica de ellas fue disminuida con respecto a la enzima de tipo silvestre (A excepción de la mutante R181V), la afinidad por el sustrato se mantuvo en la mutante R181V y K188C. Esto permitió probar cada una de ellas para su aplicación específica.

Una primer técnica de caracterización (DLS) permitió explorar la formación de nanocúmulos de platino dependientes de la oxidación de lactato. Se formaron partículas de entre 500 y 1000 nm de tamaño después de 48 hrs. de reacción. Las mutantes R181A, R181V, Y R181I, permitieron el acercamiento necesario del precursor de platino al sitio activo por apertura del túnel de acceso para la reducción de iones de platino a grupos metálicos y la regenerando el FMN de reducido a oxidado. En este sentido, los iones metálicos funcionaron como aceptores de electrones por ausencia del aceptor principal de la LOx, el oxígeno, permitiendo una DET. Cabe recalcar que es conveniente utilizar TEM para una mejor caracterización del sistema.

El anclaje de la mutante K188C a los electodos de oro por enlace tiol-oro fue evidente, además de que mantuvo actividad. Los experimentos de actividad sobre el electrodo y los espectros de impedancia electroquímica permitieron comprobar una superficie del electrodo modificada con la variante de la enzima. En este mismo sentido, las pruebas electroquímicas de voltametría cíclica permitieron evidenciar una DET ya que solo en el electrodo Au-K188C aparece una señal de par redox en presencia de lactato; además la señal amperométrica registrada dependiente de lactato y en ausencia de mediadores redox confirma la DET en esta mutante mostrando una transferencia intraelectrónica entre el FMN y la superficie del electrodo de oro. Este sistema ofrece una plataforma idónea para la creación de biosensores amperométricos de lactato basados en DET, se tiene el beneficio que se permite un potencial de acción



relativamente bajo que no interfiere con la oxidación de otras sustancias que pueden afectar la señal del sensor. Es conveniente mejorar la estabilidad de la enzima, tanto en el almacenaje como en el anclaje sobre el electrodo para ampliar el uso potencial del sistema.

De acuerdo con lo anterior, la hipótesis planteada es aceptada, ya que las mutantes de AvLOx que fueron diseñadas para la apertura del sitio activo pudieron formar cúmulos de platino. Por otro lado, la variante diseñada para el anclaje directo al electrodo de oro, en una inmovilización molecularmente orientada, fue capaz de realizar la transferencia directa de electrones. Esta última variante de la lactato oxidasa presenta un gran potencial para el diseño de biosensores amperométricos más eficientes.

## Literatura citada

---

- Berka, K., Hanák, O., Sehnal, D., Banáš, P., Navrátilová, V., Jaiswal, D., Ionescu, C.-M., Svobodová Vařeková, R., Koča, J., and Otyepka, M. 2012. MOLEonline 2.0: interactive web-based analysis of biomacromolecular channels. *Nucleic Acids Research*. Oxford Academic, 40(W1), pp. W222–W227. doi: 10.1093/NAR/GKS363
- Bologna, F. P., Andreo, C. S., and Drincovich, M. F. 2007. Escherichia coli Malic Enzymes: Two Isoforms with Substantial Differences in Kinetic Properties, Metabolic Regulation, and Structure. *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 189(16), pp. 5937. doi: 10.1128/JB.00428-07
- Brizio, C., Galluccio, M., Wait, R., Torchetti, E. M., Bafunno, V., Accardi, R., Gianazza, E., Indiveri, C., and Barile, M. 2006. Over-expression in Escherichia coli and characterization of two recombinant isoforms of human FAD synthetase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), pp. 1008–1016. doi: 10.1016/J.BBRC.2006.04.003
- Competent cells for routine cloning, XL1-Blue Competent Cells | Agilent. n.d. Retrieved June 18, 2022, from: <https://www.agilent.com/en/product/mutagenesis-cloning/competent-cells-competent-cell-supplies/competent-cells-for-routine-cloning/xl1-blue-competent-cells-233099>
- Conix, S. 2020. Enzyme classification and the entanglement of values and epistemic standards. *Studies in History and Philosophy of Science*. Elsevier Ltd, *April*. doi: 10.1016/j.shpsa.2020.05.005
- Crowe, J., Döbeli, H., Gentz, R., Hochuli, E., Stüber, D., and Henco, K. 1994. 6xHis-Ni-NTA chromatography as a superior technique in recombinant protein expression/purification. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). Humana Press, 31, pp. 371–387. doi: 10.1385/0-89603-258-2:371/FIGURES/4
- Dagar, K. and Pundir, C. S. 2017. An improved amperometric L-lactate biosensor based on covalent immobilization of microbial lactate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/copper nanoparticles/polyaniline modified pencil graphite electrode. *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, 96, pp. 177–186. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2016.10.014
- Ditzler, L. R., Sen, A., Gannon, M. J., Kohen, A., and Tivanski, A. V. 2011a. Self-assembled enzymatic monolayer directly bound to a gold surface: Activity and molecular recognition force spectroscopy studies. *Journal of the American Chemical Society*, 133(34), pp. 13284–13287. doi: 10.1021/ja205409v
- Ditzler, L. R., Sen, A., Gannon, M. J., Kohen, A., and Tivanski, A. V. 2011b. Self-assembled enzymatic monolayer directly bound to a gold surface: Activity and molecular recognition force spectroscopy studies. *Journal of the American Chemical Society*. NIH Public Access, 133(34), pp. 13284. doi: 10.1021/JA205409V
- Fernández, H., Arévalo, F. J., Granero, A. M., Robledo, S. N., Nieto, C. H. D., Riberi, W. I., and Zon, M. A. 2017. Electrochemical biosensors for the determination of toxic substances related to food safety

developed in south America: Mycotoxins and herbicides. In *Chemosensors* (Vol. 5, Issue 3). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. doi: 10.3390/chemosensors5030023

- Fox, R. J. and Huisman, G. W. 2008. Enzyme optimization: moving from blind evolution to statistical exploration of sequence-function space. *Trends in Biotechnology*, 26(3), pp. 132–138. doi: 10.1016/j.tibtech.2007.12.001
- Furuichi, M., Suzuki, N., Dhakshnamoorthy, B., Minagawa, H., Yamagishi, R., Watanabe, Y., Goto, Y., Kaneko, H., Yoshida, Y., Yagi, H., Waga, I., Kumar, P. K. R., and Mizuno, H. 2008. X-ray Structures of *Aerococcus viridans* Lactate Oxidase and Its Complex with d-Lactate at pH 4.5 Show an  $\alpha$ -Hydroxyacid Oxidation Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 378(2), pp. 436–446. doi: 10.1016/j.jmb.2008.02.062
- Häkkinen, H. 2012. The gold–sulfur interface at the nanoscale. *Nature Chemistry* 2012 4:6. Nature Publishing Group, 4(6), pp. 443–455. doi: 10.1038/nchem.1352
- Hasan, A., Nurunnabi, M., Morshed, M., Paul, A., Polini, A., Kula, T., Al Hariri, M., Lee, Y. K., and Jaffa, A. A. 2014. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2014. doi: 10.1155/2014/307519
- Hiraka, K., Kojima, K., Tsugawa, W., Asano, R., Ikebukuro, K., and Sode, K. 2020. Rational engineering of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd, 151, pp. 111974. doi: 10.1016/j.bios.2019.111974
- Hiraka, K., Tsugawa, W., Asano, R., Yokus, M. A., Ikebukuro, K., Daniele, M. A., and Sode, K. 2021. Rational design of direct electron transfer type L-lactate dehydrogenase for the development of multiplexed biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier Ltd, 176, pp. 112933. doi: 10.1016/j.bios.2020.112933
- Janata, J. 2009. *Potentiometric Sensors. Principles of Chemical Sensors*. Springer, Boston, MA, pp. 119–199. doi: 10.1007/B136378\_6
- Jia, W., Bandodkar, A. J., Valdés-Ramírez, G., Windmiller, J. R., Yang, Z., Ramírez, J., Chan, G., and Wang, J. 2013. Electrochemical tattoo biosensors for real-time noninvasive lactate monitoring in human perspiration. *Analytical Chemistry*, 85(14), pp. 6553–6560. doi: 10.1021/ac401573r
- Jooybari, N. M., Amini, K., and Falsafi, S. 2020. Determining the L-arabinose isomerase in bacilli isolates from Gandom Beryan area of Kerman (Iran) by Molecular method and its cloning in *Escherichia coli* xl1 blue. *Gene Reports*. Elsevier, 21, pp. 100817. doi: 10.1016/J.GENREP.2020.100817
- Kangkamano, T., Numnuam, A., Limbut, W., Kanatharana, P., and Thavarungkul, P. 2017. Chitosan cryogel with embedded gold nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes modified electrode for highly sensitive flow based non-enzymatic glucose sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*. Elsevier, 246, pp. 854–863. doi: 10.1016/J.SNB.2017.02.105

- Lewin, B., Krebs, J., Goldstein, E., Kilpatrick, S. T., and Goldstein, E. S. 2011. *Lewin's GENES X*. Jones & Bartlett Learning. <https://books.google.com.mx/books?id=OpM4KbFIEb0C>
- Milton, R. D. and Minteer, S. D. 2017. Direct enzymatic bioelectrocatalysis: differentiating between myth and reality. *Journal of The Royal Society Interface*. The Royal Society, 14(131). doi: 10.1098/RSIF.2017.0253
- Milton, R. D., Wu, F., Lim, K., Abdellaoui, S., Hickey, D. P., and Minteer, S. D. 2015. Promiscuous Glucose Oxidase: Electrical Energy Conversion of Multiple Polysaccharides Spanning Starch and Dairy Milk. *ACS Catalysis*. American Chemical Society, 5(12), pp. 7218–7225. doi: 10.1021/ACSCATAL.5B01777/SUPPL\_FILE/CS5B01777\_SI\_001.PDF
- Mross, S., Pierrat, S., Zimmermann, T., and Kraft, M. 2015. Microfluidic enzymatic biosensing systems: A review. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 70, pp. 376–391. doi: 10.1016/J.BIOS.2015.03.049
- Nelson, D. L., Lehninger, A. L., Cox, M. M., Foix, C. M. C., León, S., and Roca, J. V. 2013. *Lehninger principios de bioquímica*. Omega. <https://books.google.com.mx/books?id=QFaxoQEACAAJ>
- Nguyen, H. H., Lee, S. H., Lee, U. J., Fermin, C. D., and Kim, M. 2019. Immobilized enzymes in biosensor applications. In *Materials* (Vol. 12, Issue 1). MDPI AG. doi: 10.3390/ma12010121
- Pagán, M., Suazo, D., del Toro, N., and Griebenow, K. 2015. A comparative study of different protein immobilization methods for the construction of an efficient nano-structured lactate oxidase-SWCNT-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. Elsevier, 64, pp. 138–146. doi: 10.1016/J.BIOS.2014.08.072
- Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Jin, J., Pariente, F., and Lorenzo, E. 2006. Microscopic and voltammetric characterization of bioanalytical platforms based on lactate oxidase. *Langmuir*. American Chemical Society, 22(12), pp.5443–5450. doi: 10.1021/LA060184G/ASSET/IMAGES/LARGE/LA060184GF00009.JPEG
- Parra, A., Casero, E., Vázquez, L., Pariente, F., and Lorenzo, E. 2006. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 555(2), pp. 308–315. doi: 10.1016/J.ACA.2005.09.025
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., and Ferrin, T. E. 2004. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd, 25(13), pp. 1605–1612. doi: 10.1002/JCC.20084
- Pravda, L., Sehnal, D., Toušek, D., Navrátilová, V., Bazgier, V., Berka, K., Vařeková, R. S., Koča, J., and Otyepka, M. 2018. MOLEonline: A web-based tool for analyzing channels, tunnels and pores (2018 update). *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 46(W1), pp. W368–W373. doi: 10.1093/NAR/GKY309

- Raikos, V., Hansen, R., Campbell, L., and Euston, S. R. 2006. Separation and identification of hen egg protein isoforms using SDS–PAGE and 2D gel electrophoresis with MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry*. Elsevier, 99(4), pp. 702–710. doi: 10.1016/J.FOODCHEM.2005.08.047
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., and Singh, S. 2016. Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochemistry and Biophysics Reports*. Elsevier, 5, pp. 35–54. doi: 10.1016/j.bbrep.2015.11.010
- Rattu, G., Khansili, N., Maurya, V. K., and Krishna, P. M. 2020. Lactate detection sensors for food, clinical and biological applications: a review. *Environmental Chemistry Letters* 2020 19:2. Springer, 19(2), pp. 1135–1152. doi: 10.1007/S10311-020-01106-6
- Reshetilov, A., Zyrina, N., and Zheleznyaya, L. 2013. *Enzymatic Biosensors*. CRC Press, pp. 148–185. doi: 10.1201/B15589-10
- Robinson, P. K. 2015. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*. Portland Press Ltd, 59, pp. 1–41. doi: 10.1042/BSE0590001
- Rocchitta, G., Spanu, A., Babudieri, S., Latte, G., Madeddu, G., Galleri, G., Nuvoli, S., Bagella, P., Demartis, M. I., Fiore, V., Manetti, R., and Serra, P. A. 2016. Enzyme biosensors for biomedical applications: Strategies for safeguarding analytical performances in biological fluids. In *Sensors (Switzerland)* (Vol. 16, Issue 6). MDPI AG. doi: 10.3390/s16060780
- Roskoski, R. 2015. Michaelis-Menten Kinetics. *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.05143-6
- Sainz, R., Pozo, M. del, Vázquez, L., Vilas-Varela, M., Castro-Esteban, J., Blanco, E., Petit-Domínguez, M. D., Quintana, C., and Casero, E. 2022. Lactate biosensing based on covalent immobilization of lactate oxidase onto chevron-like graphene nanoribbons via diazotization-coupling reaction. *Analytica Chimica Acta*. Elsevier, 1208, pp. 339851. doi: 10.1016/J.ACA.2022.339851
- Starikova, S., Jones, C., Forman, W. R., -, al, James Jee, M., Anthony Tyson, J., Schneider, M. D., F Souza, T. G., T Ciminelli, V. S., and S Mohallem, N. D. 2016. A comparison of TEM and DLS methods to characterize size distribution of ceramic nanoparticles. *Journal of Physics: Conference Series*. IOP Publishing, 733(1), pp. 012039. doi: 10.1088/1742-6596/733/1/012039
- Stoisser, T., Brunsteiner, M., Wilson, D. K., and Nidetzky, B. 2016. Conformational flexibility related to enzyme activity: Evidence for a dynamic active-site gatekeeper function of Tyr215 in *Aerococcus viridans* lactate oxidase. *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(March), pp. 1–13. doi: 10.1038/srep27892
- Stoisser, T., Klimacek, M., Wilson, D. K., and Nidetzky, B. 2015. Speeding up the product release: A second-sphere contribution from Tyr191 to the reactivity of l-lactate oxidase revealed in crystallographic and kinetic studies of site-directed variants. *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd, 282(21), pp. 4130–4140. doi: 10.1111/FEBS.13409

- Stoisser, T., Rainer, D., Leitgeb, S., Wilson, D. K., and Nidetzky, B. 2015. The Ala95-to-Gly substitution in *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase revisited - Structural consequences at the catalytic site and effect on reactivity with O<sub>2</sub> and other electron acceptors. *FEBS Journal*, 282(3), pp. 562–578. doi: 10.1111/febs.13162
- Taurino, I., Reiss, R., Richter, M., Fairhead, M., Thöny-Meyer, L., De Micheli, G., and Carrara, S. 2013. Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications. *Electrochimica Acta*. Pergamon, 93, pp. 72–79. doi: 10.1016/j.electacta.2013.01.080
- Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W., and Grobelny, J. 2013. Detection limits of DLS and UV-Vis spectroscopy in characterization of polydisperse nanoparticles colloids. *Journal of Nanomaterials*. Hindawi Limited PUB1800 London, UK, United Kingdom, 2013. doi: 10.1155/2013/313081
- Tomaszewska, E., Soliwoda, K., Kadziola, K., Tkacz-Szczesna, B., Celichowski, G., Cichomski, M., Szmaja, W., Grobelny, J., and Yu, W. W. 2013. Detection Limits of DLS and UV-Vis Spectroscopy in Characterization of Polydisperse Nanoparticles Colloids. *Journal of Nanomaterials*. Hindawi Publishing Corporation, 2013. doi: 10.1155/2013/313081
- Trifonov, A., Stemmer, A., and Tel-Vered, R. 2019. Enzymatic self-wiring in nanopores and its application in direct electron transfer biofuel cells. *Nanoscale Advances*. Royal Society of Chemistry, 1(1), pp. 347–356. doi: 10.1039/c8na00177d
- Trifonov, A., Tel-Vered, R., Fadeev, M., Ceconello, A., and Willner, I. 2015. Metal Nanoparticle-Loaded Mesoporous Carbon Nanoparticles: Electrical Contacting of Redox Proteins and Electrochemical Sensing Applications. *Electroanalysis*. Wiley-VCH Verlag, 27(9), pp. 2150–2157. doi: 10.1002/elan.201500183
- Tyagi, R., Lai, R., and Duggleby, R. G. 2004. A new approach to “megaprimer” polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *BMC Biotechnology*. BioMed Central, 4, pp. 2. doi: 10.1186/1472-6750-4-2
- Umena, Y., Yorita, K., Matsuoka, T., Kita, A., Fukui, K., and Morimoto, Y. 2006. The crystal structure of l-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Academic Press, 350(2), pp. 249–256. doi: 10.1016/J.BBRC.2006.09.025
- Unterweger, B., Stoisser, T., Leitgeb, S., Birner-Grünberger, R., and Nidetzky, B. 2012. Engineering of *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase for site-specific PEGylation: Characterization and selective bioorthogonal modification of a S218C mutant. *Bioconjugate Chemistry*, 23(7), pp. 1406–1414. doi: 10.1021/bc2006847
- Vazquez-Duhalt, R., Aguila, S. A., Arrocha, A. A., and Ayala, M. 2014. QM/MM Molecular Modeling and Marcus Theory in the Molecular Design of Electrodes for Enzymatic Fuel Cells. *ChemElectroChem*. John Wiley & Sons, Ltd, 1(3), pp. 496–513. doi: 10.1002/CELC.201300096

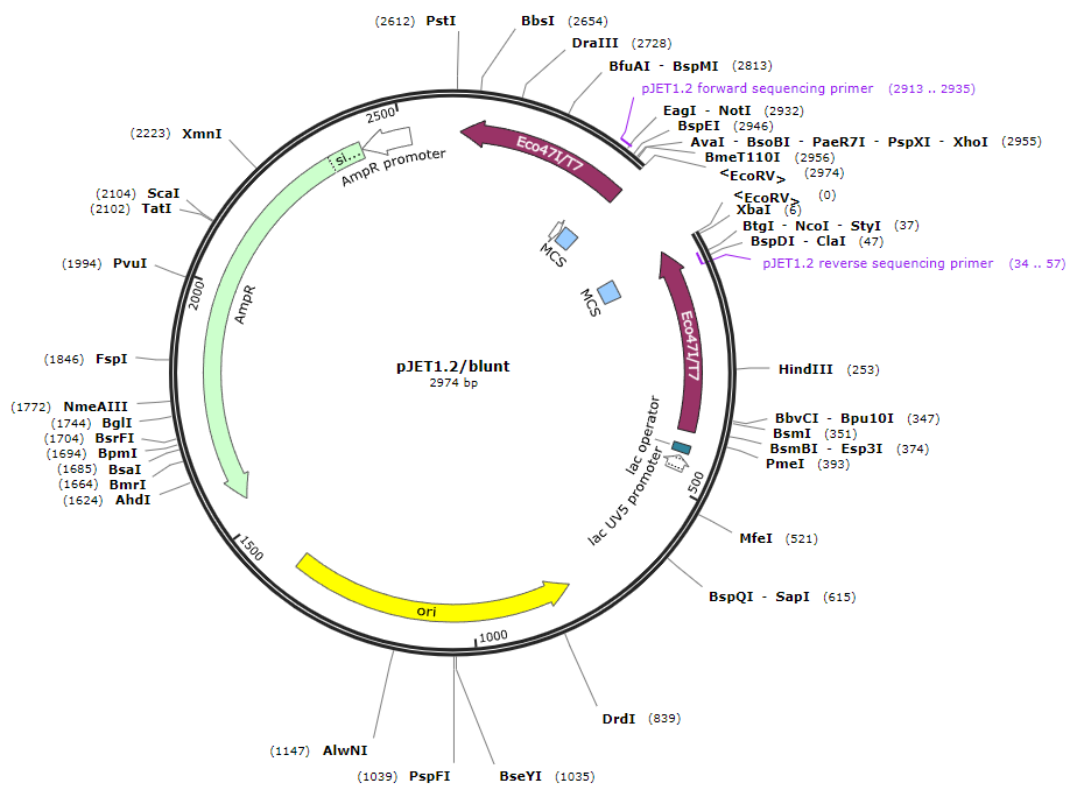
Yorita, K., Matsuoka, T., Misaki, H., and Massey, V. 2000. Interaction of two arginine residues in lactate oxidase with the enzyme flavin: Conversion of FMN to 8-formyl-FMN. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(24), pp. 13039–13044. doi: 10.1073/PNAS.250472297/ASSET/4CCCA9DF-064C-461C-AA77-AD0BAC2A0B57/ASSETS/GRAPHIC/PQ2504722005.JPEG

## Anexos

### Anexo A.

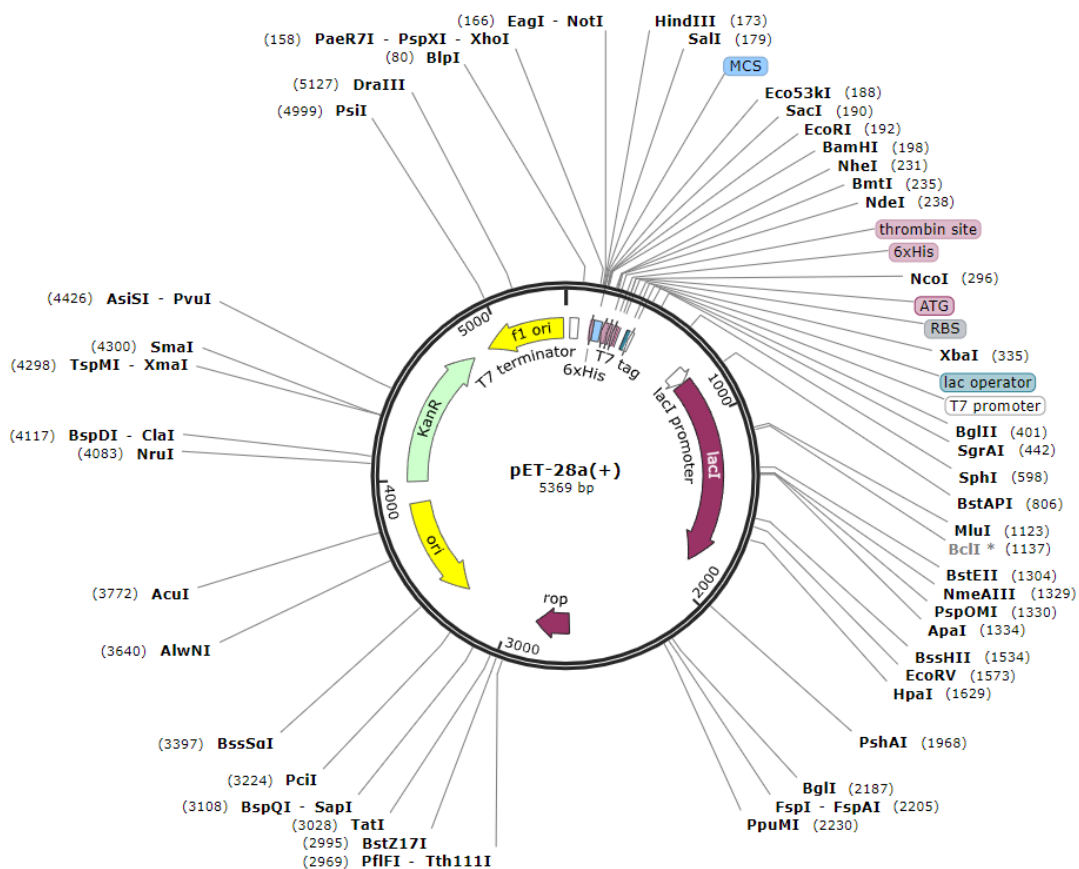
**Tabla 18.** Lista de cebadores utilizados para la obtención de megacebadores mutagénicos y AvLox mutantes.

Nombre	Secuencia	Tm
R181A hacia adelante	TCT GGA AAC GCC GAC AGA GAC GTT AAG	72°C
R181V hacia adelante	TCT GGA AAC GTC GAC AGA GAC GTT AAG	70°C
R181I hacia adelante	TCT GGA AAC ATC GAC AGA GAC GTT AAG AAT	60°C
K188C hacia adelante	AGA GAC GTT AAG AAT TGC TTT GTC TAT CCT TTT GGG	71°C
T7 hacia adelante	TAATACGACTCACTATAGGG	57°C
T7 Reverso	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	63°C



**Figura 30.** Diagrama del vector pJET 1.2/blunt (Thermo Scientific™). Vector utilizado para la expresión de AvLOx mutante. Mapa del vector generada con SnapGene® software.





**Figura 31. Diagrama del vector pET-28a(+)** (MilliporeSigma™). Vector usado para la expresión de AvLOx mutante. Mapa del vector generada con SnapGene® software.

## Anexo B.

AvLOx R181VAF6900	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
AvLOx R181VAF6900	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
AvLOx R181VAF6900	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
AvLOx R181VAF6900	RDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAGHSGLPVFV VDRDVKNKFVYPFGMPIVQ----- *****	240 199	a)
AvLOx R181VAF6900	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR -----	300 199	
AvLOx R181VAF6900	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 199	
AvLOx R181VAF6900	KGLDLFDNPGYGEY 374 ----- 199		
AvLOx R181VAR6901	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
AvLOx R181VAR6901	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
AvLOx R181VAR6901	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN -----LTADSTVSGN *****	180 10	
AvLOx R181VAR6901	RDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAGHSGLPVFV VDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAGHSGLPVFV *****	240 70	b)
AvLOx R181VAR6901	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR *****	300 130	
AvLOx R181VAR6901	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 190	
AvLOx R181VAR6901	KGLDLFDNPGYGEY 374 KGLDLFDNPGYGEY 204 *****		

Figura 32. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva R181V. a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso.

AvLOx R181IAF6904	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
AvLOx R181IAF6904	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
AvLOx R181IAF6904	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
AvLOx R181IAF6904	RDRDVKNK FVYYPFGMPIVQR YLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV IDRDVKNK FVYYPFGMPIVQR YLRGTAEGMSLNNIYGASKQ----- *****	240 220	a)
AvLOx R181IAF6904	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFD SGVR -----	300 220	
AvLOx R181IAF6904	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 220	
AvLOx R181IAF6904	KGLDLFDNPGY EY 374 ----- 220		
AvLOx R181IAR6905	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
AvLOx R181IAR6905	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
AvLOx R181IAR6905	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ----- ILTADSTVSGN *****	180 11	
AvLOx R181IAR6905	RDRDVKNK FVYYPFGMPIVQR YLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV IDRDVKNK FVYYPFGMPIVQR YLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV *****	240 71	b)
AvLOx R181IAR6905	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFD SGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFD SGVR *****	300 131	
AvLOx R181IAR6905	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 191	
AvLOx R181IAR6905	KGLDLFDNPGY EY 374 KGLDLFDNPGY EY 205 *****		

**Figura 33. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva R181I.** a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso.

AvLOx R188CAF6908	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
AvLOx R188CAF6908	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
AvLOx R188CAF6908	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
AvLOx R188CAF6908	RDRDVKNKFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV RDRDVKNCFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIY----- *****	240 215	a)
AvLOx R188CAF6908	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR -----	300 215	
AvLOx R188CAF6908	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 215	
AvLOx R188CAF6908	KGLDLFDNPGYGYEY 374 ----- 215		
AvLOx R188CAR6909	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
AvLOx R188CAR6909	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
AvLOx R188CAR6909	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN -----GATAIILTADSTVSGN *****	180 16	
AvLOx R188CAR6909	RDRDVKNKFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV RDRDVKNCFVYYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV *****	240 76	b)
AvLOx R188CAR6909	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIFDSGVR *****	300 136	
AvLOx R188CAR6909	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 196	
AvLOx R188CAR6909	KGLDLFDNPGYGYEY 374 KGLDLFDNPGYGYEY 210 *****		

**Figura 34. Análisis en Clustal Omega correspondiente a la mutante positiva K188C.** a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso.

## Anexo C.

LoxAvPet28 R181VF	MNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
LoxAvPet28 R181VF	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
LoxAvPet28 R181VF	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
LoxAvPet28 R181VF	RDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV VDRDVKNKFVYPFGMPIVQ----- *****	240 199	a)
LoxAvPet28 R181VF	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR -----	300 199	
LoxAvPet28 R181VF	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 199	
LoxAvPet28 R181VF	KGLDLFDNPGYHEY 374 ----- 199		
LoxAvPet28 R181VR	MNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
LoxAvPet28 R181VR	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
LoxAvPet28 R181VR	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN -----GLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 46	
LoxAvPet28 R181VR	RDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV VDRDVKNKFVYPFGMPIVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIIAGHSGLPVFV *****	240 106	b)
LoxAvPet28 R181VR	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR *****	300 166	
LoxAvPet28 R181VR	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGLALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 226	
LoxAvPet28 R181VR	KGLDLFDNPGYHEY 374 KGLDLFDNPGYHEY 240 *****		

Figura 35. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva R181V en el plásmido pET-28a(+). a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso

LoxAvPet28 R181IF	MNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
LoxAvPet28 R181IF	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
LoxAvPet28 R181IF	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
LoxAvPet28 R181IF	RDRDVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV IDRDVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV *****	240 240	a)
LoxAvPet28 R181IF	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR -----	300 240	
LoxAvPet28 R181IF	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 240	
LoxAvPet28 R181IF	KGLDLFDNPYGYEY 374 ----- 240		
LoxAvPet28 R181IR	MNNDIEYNAPSEIKYIDVNTYDLEEEASKVVPHGFFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
LoxAvPet28 R181IR	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
LoxAvPet28 R181IR	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN -----QIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 37	
LoxAvPet28 R181IR	RDRDVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV IDRDVKNKRVYYPFGMPIVQRYLRTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEE IAGHSGLPVFV *****	240 97	b)
LoxAvPet28 R181IR	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDTLPAIAERVNKRVPVIVFDSGVR *****	300 157	
LoxAvPet28 R181IR	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVLDFYQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 217	
LoxAvPet28 R181IR	KGLDLFDNPYGYEY 374 KGLDLFDNPYGYEY 231 *****		

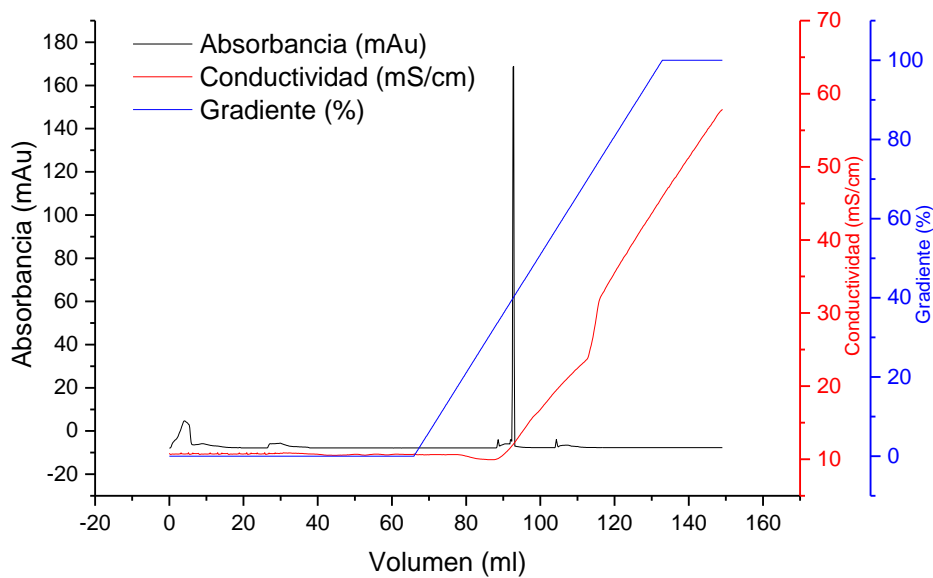
Figura 36. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva R181I en el plásmido pET-28a(+). a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso

LoxAvPet28 K188CF	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH *****	60 60	
LoxAvPet28 K188CF	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS *****	120 120	
LoxAvPet28 K188CF	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 180	
LoxAvPet28 K188CF	RDRDVKNKCFVYPFMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAHGSLPVFV RDRDVKNCVYPFMPVQRYLRGTAEGMSLNN----- *****	240 213	a)
LoxAvPet28 K188CF	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVFDGVR -----	300 213	
LoxAvPet28 K188CF	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL -----	360 213	
LoxAvPet28 K188CF	KGLDLFDNPGYHEY 374 ----- 213		
LoxAvPet28 K188CR	MNNNDIEYNAPSEIKYIDVVNTYDLEEEASKVVPHGGFNYIAGASGDEWTKRANDRAWKH -----	60 0	
LoxAvPet28 K188CR	KLLYPRLAQDVEAPDTSTEILGHKIKAPFIMAPIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTIMS -----	120 0	
LoxAvPet28 K188CR	ISAYSGATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN --AYSATFEEISEGLNGGPRWFQIYMAKDDQQNRDILDEAKSDGATAIILTADSTVSGN *****	180 58	
LoxAvPet28 K188CR	RDRDVKNKCFVYPFMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAHGSLPVFV RDRDVKNCVYPFMPVQRYLRGTAEGMSLNNIYGASKQKISPRDIEEIAHGSLPVFV *****	240 118	b)
LoxAvPet28 K188CR	KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVFDGVR KGIQHPEDADMAIKRGASGIWVSNHGARQLYEAPGSFDLPAIAERVNKRVPVFDGVR *****	300 178	
LoxAvPet28 K188CR	RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL RGEHVAKALASGADVVALGRPVLFGALGGWQGAYSVDYFQKDLTRVMQLTGSQNVEDL *****	360 238	
LoxAvPet28 K188CR	KGLDLFDNPGYHEY 374 KGLDLFDNPGYHEY 252 *****		

Figura 37. Análisis en Clustal Omega de la secuenciación correspondiente a la mutante positiva K188C en el plásmido pET-28a(+). a) Muestra secuenciada con oligo T7 hacia adelante y b) reverso

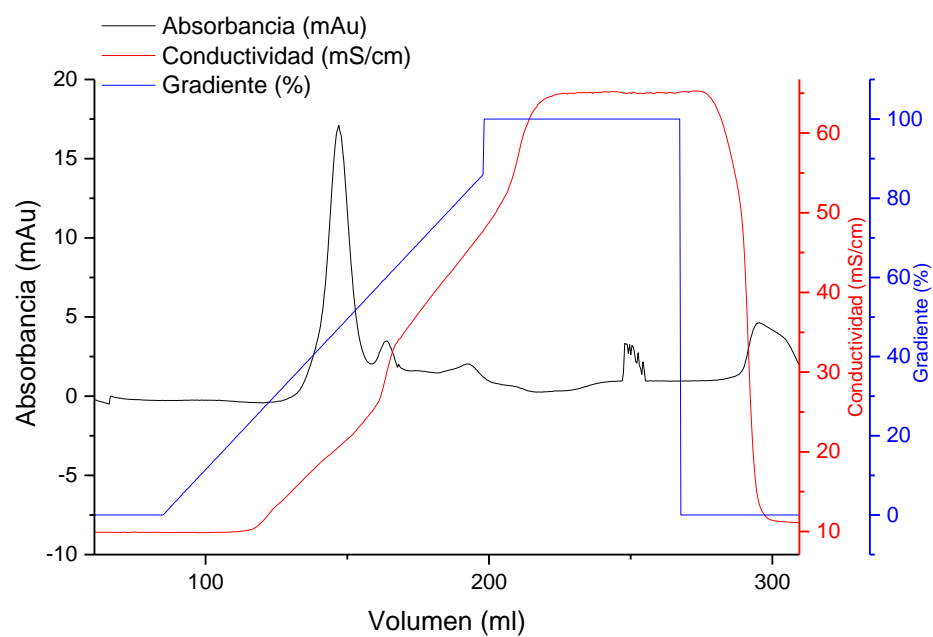
## Anexo D.

Cromatograma R181A 300mM Imidazol



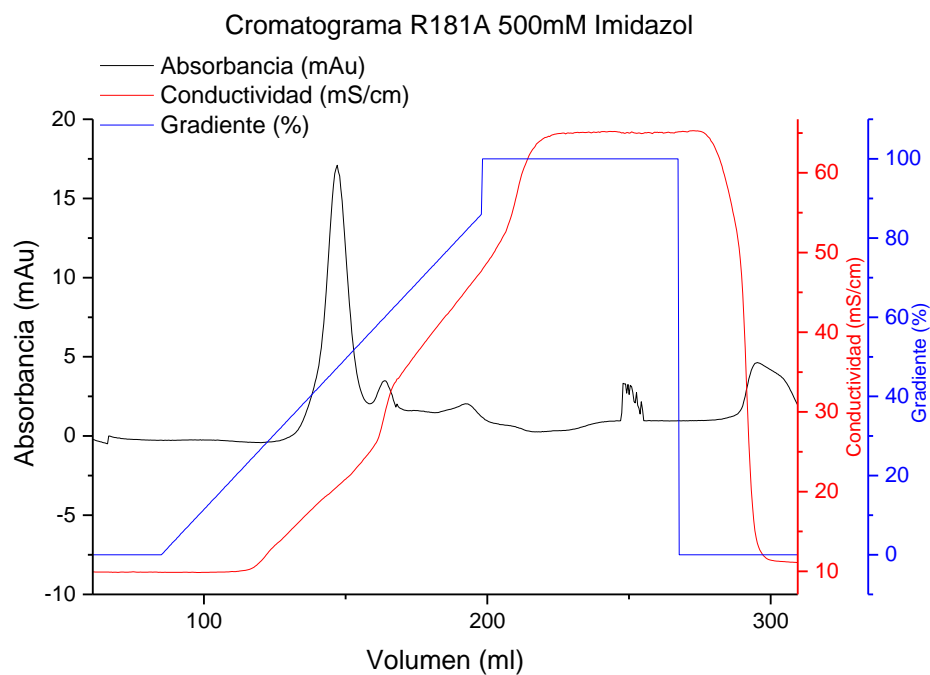
a)

Cromatograma R181A 500mM Imidazol

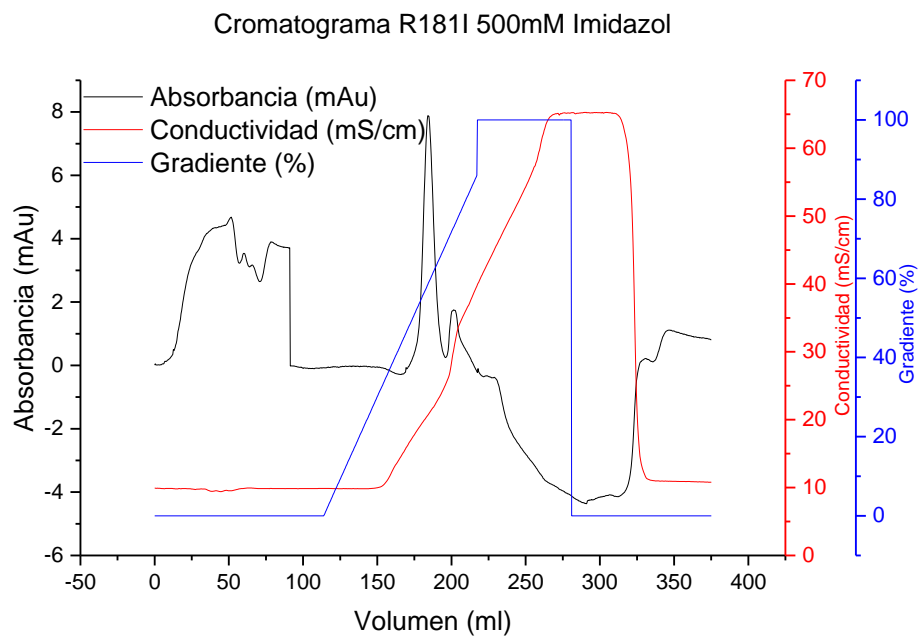


b)



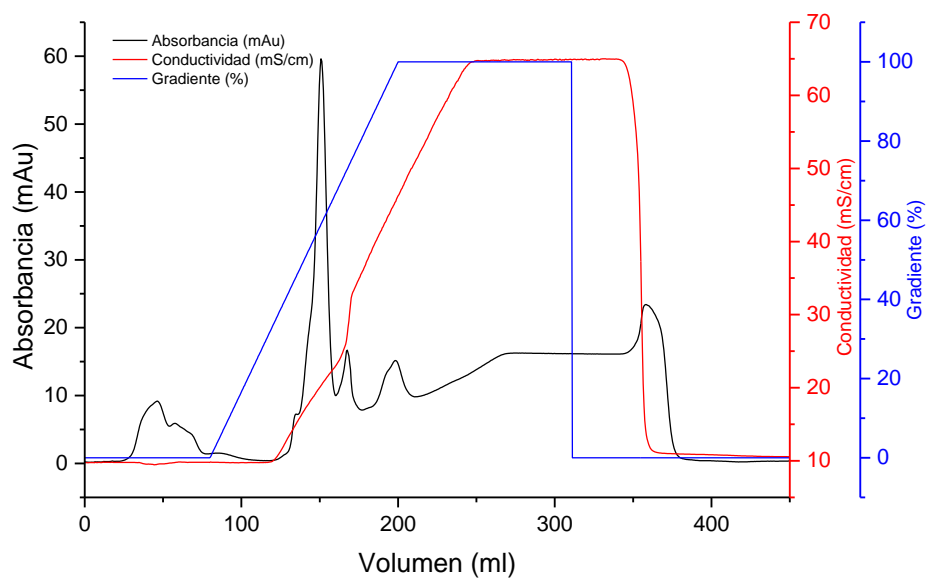


c)



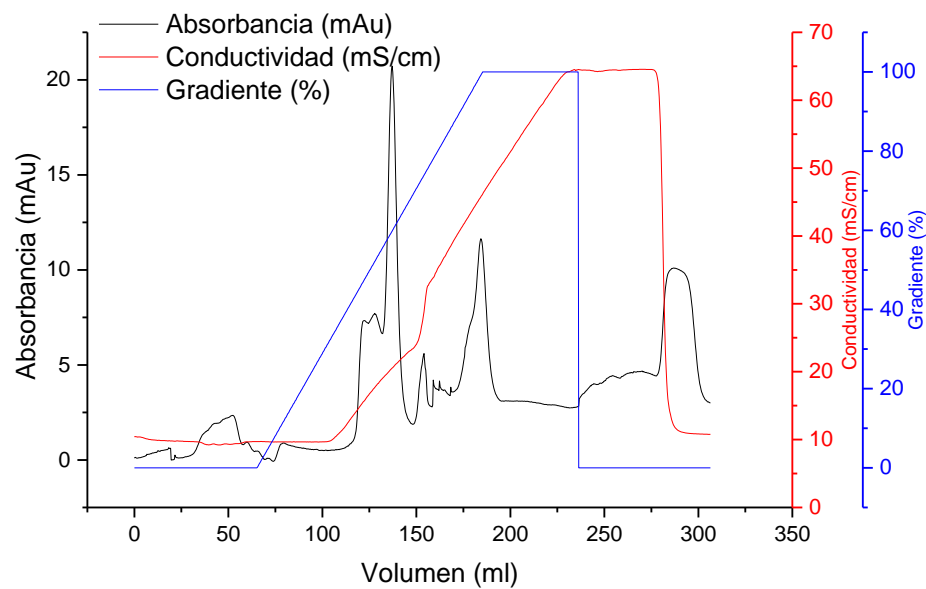
d)

Cromatograma R181V 300 mM Imidazol



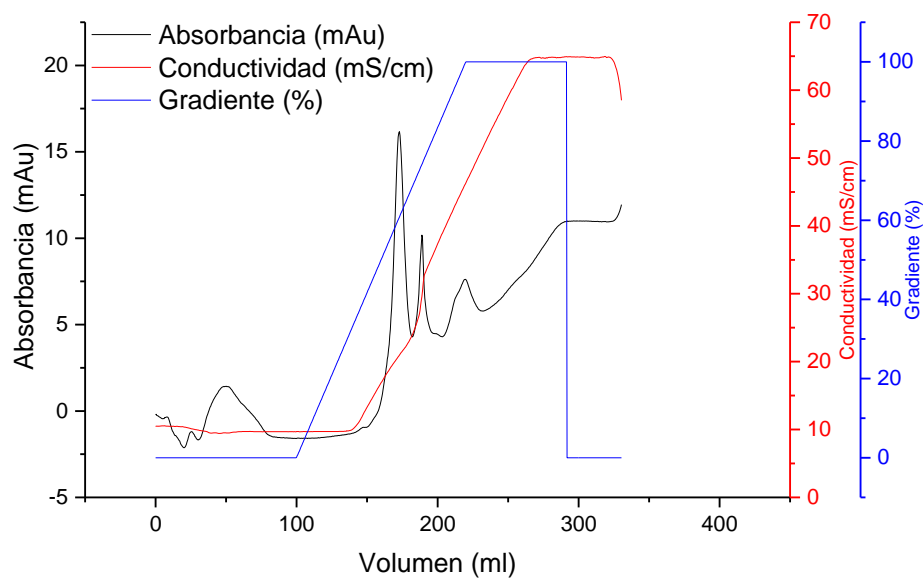
e)

Cromatograma R181V 500mM Imidazol



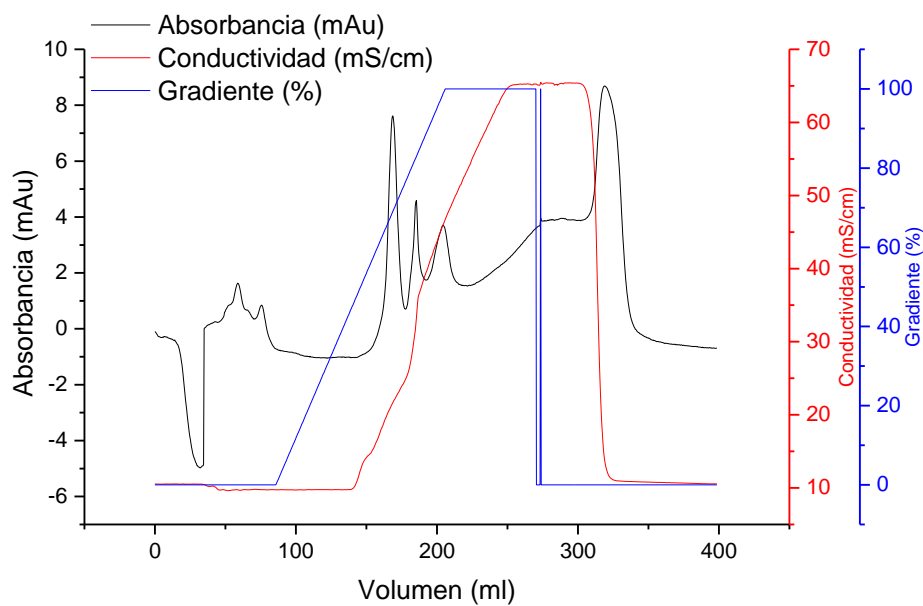
f)

Cromatograma K188C 300mM Imidazol



g)

Cromatograma K188C 500mM Imidazol



h)

**Figura 38. Cromatogramas obtenidos tras la purificación por cromatografía de intercambio iónico de cada mutante.**  
 a) y b) R181A, c) y d) R181I, e) y f) R181V, g) y h) K188C.