



biocat

II JORNADA DE BIOCATÁLISIS
22 / 24 DE ENERO DE 2020

Libro de Resúmenes



Reseña Histórica

La biocatálisis enzimática es un área de proyección de la biotecnología hacia la ingeniería de procesos que cobra creciente importancia en campos tan relevantes como la producción de alimentos, fármacos y biocombustibles, la protección ambiental y la elaboración de dispositivos de control y análisis. Los notables avances en ingeniería genética, ingeniería de proteínas, ingeniería de materiales y catálisis en fase heterogénea y en medios de reacción no convencionales, permiten hoy en día diseñar catalizadores enzimáticos robustos y funcionales, aplicables a una amplia gama de reacciones químicas de relevancia comercial, con alta eficiencia y bajo principios de química sustentable.

La trascendencia que la biocatálisis ha cobrado se refleja muy nítidamente en el otorgamiento del Premio Nobel en Química 2018 a la Dra. Frances Arnold, profesora del California Institute of Technology, por su trabajo en evolución dirigida de enzimas. La investigación y desarrollo en biocatálisis se ha expandido considerablemente estando hoy presente en numerosos centros de investigación y formación superior en nuestro país, lo que hace oportuno y necesario un evento como JBiocat 2019 que sirva de foro para el intercambio de conocimientos y experiencias en pos de aunar esfuerzos hacia una investigación colaborativa y asociativa.

II Jornada de Biocatálisis

La Jornada de Biocatálisis (JBiocat 2019) tiene por propósito difundir e intercambiar experiencias entre los diferentes grupos nacionales que trabajan en aspectos básicos y aplicados de biocatálisis enzimática:

- Ingeniería de proteínas
- Enzimología estructural
- Biotransformaciones enzimáticas
- Inmovilización de enzimas
- Modelamiento y simulación de procesos enzimáticos

JBiocat 2019 pretende dar continuidad a la Jornada de Biocatálisis, cuya primera versión tuvo lugar en la Escuela de Ingeniería Bioquímica de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en noviembre de 2017.

En esta ocasión el evento tendrá lugar en la Universidad de Santiago de Chile y será organizado por académicos de la universidad anfitriona, de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, de la Universidad Mayor y de la Universidad de Chile.

Es propósito de esta Jornada es continuar propiciando la investigación colaborativa y la asociatividad de grupos de trabajo, así como la consolidación de una red de colaboración nacional en biocatálisis.



Primera Jornada de Biocatálisis 2017

Comité Organizador



Presidenta: Dra. Andrea Mahn
Universidad de Santiago de Chile



Vice-presidente: Dr. Carlos Vera
Universidad de Santiago de Chile



Tesorera: Dra. Carolina Mascayano
Universidad de Santiago de Chile



Secretario: Dr. Andrés Rivas
Universidad Mayor



Presidente Comité Científico: Dr. Andrés Illanes
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Dr. Felipe Arenas
Universidad de Santiago de Chile



Dr. Víctor Castro
Universidad de Chile



Dra. Oriana Salazar
Universidad de Chile



Dra. Alejandra Herrera
Universidad de Santiago de Chile



Dra. Lorena Wilson
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Dra. Carminna Ottone
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Dra. Cecilia Guerrero
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso



Jbiocat

II JORNADA DE BIOCATÁLISIS

Conferencias Plenarias y Keynotes



Conferencias Plenarias JBiocat 2019

Plenaria 1

Approaching 2020: is the 4th wave of Biocatalysis here?.

Andrés Alcántara. Universidad Complutense de Madrid, España.

Plenaria 2

Dinámica y funcionamiento de la Helicasa US3 del virus del Dengue: Estudio mediante técnicas de moléculas individuales.

Sergio Kaufmann. Universidad de Buenos Aires.

Plenaria 3

Estabilización de enzimas mediante estrategias de inmovilización.

Lorena Wilson, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Plenaria 4

Aplicación de estrategias de ingeniería del medio de reacción y del biocatalizador en la síntesis enzimática de lactulosa.

Andrés Illanes, Cecilia Guerrero. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Plenaria 5

Purificación, caracterización y modelación de mirosinasa de brócoli para el diseño de una estrategia de industrialización en el campo de los alimentos funcionales.

Andrea Mahn, Antonio Castillo, Juan Román. Universidad de Santiago de Chile.

Conferencia Plenaria 1

Approaching 2020: Is the 4th wave of biocatalysis here?

Andrés R. Alcántara

Departamento de Química en Ciencias Farmacéuticas. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, España.

*Author e-mail: andalcan@ucm.es:

In the last years, the advances in bioinformatics, enzyme evolution or process intensification have enlarged the effectiveness of biotransformations, accelerating the rate at which new enzymes are becoming available, even for promiscuous activities not previously known. Thus, after the popularization of the genetic manipulation of biocatalysts by directed evolution (recognized by the Nobel Prize in Chemistry awarded to pioneer Frances Arnold in 2018¹, which led to what was called the 3rd wave of biocatalysis²), the redesign of enzymes to fulfill industrial requirements in terms of specificity, activity and robustness, while keeping or even increasing its exquisite precision, has become very familiar. Thus, with this potent tool in our hands, we are scratching the surface of the 4th wave³, which, for pharma industry, will be fully implemented when the overall process needed to create an improved biocatalyst (rational directed evolution in a design–make–test cycle combining multiple disciplines in a continuous industrialized workflow) could be accelerated at least between 2 and 10 times⁴⁻⁶.

In this communication we will comment some aspects crucial for the development of this 4th wave, presenting several examples aiming to illustrate how to broaden the limits of applied biocatalysis⁷ in the sustainable generation of new compounds. We will stress how biocatalysis aligns perfectly well with green chemistry philosophy⁸, and they go hand-in-hand as good partners seeking to balance the long-term sustainability of business, society and environment^{9,10}. Although it is always risky to predict, maybe next decade would bring us the definitive implementation of applied biocatalysis.

References:

1. Illanes, A., Dr. Frances Arnold is awarded with the Nobel Prize in Chemistry 2018: Good news for biocatalysis. *Electronic Journal of Biotechnology* **2018**, 36, A1-A1.
2. Bornscheuer, U.T.; Huisman, G.W.; Kazlauskas, R.J.; Lutz, S.; Moore, J.C.; Robins, K., Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **2012**, 485 (7397), 185-194.
3. Bornscheuer, U.T., The fourth wave of biocatalysis is approaching. *Philosophical Transactions of the Royal Society. A-Mathematics, Physics, Engineering Sciences* **2018**, 376 (2110), 7.
4. Truppo, M.D., Biocatalysis in the pharmaceutical industry: The need for speed. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2017**, 8 (5), 476-480.
5. Alcántara, A.R., Biotransformations in drug synthesis: a green and powerful tool for medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry and Drug Design* **2018**, 1 (1), 1-7.
6. Woodley, J.M., Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2019**, 103 (12), 4733-4739.
7. Sheldon, R.A.; Brady, D., The limits to biocatalysis: Pushing the envelope. *Chemical Communications*. **2018**, 54 (48), 6088-6104.
8. Sheldon, R. A.; Brady, D., Broadening the scope of biocatalysis in sustainable organic synthesis. *ChemSusChem* **2019**, 12 (13), 2859-2881.
9. Roschangar, F.; Colberg, J.; Dunn, P.J.; Gallou, F.; Hayler, J.D.; Koenig, S.G.; Kopach, M.E.; Leahy, D.K.; Mergelsberg, I.; Tucker, J.L.; Sheldon, R.A.; Senanayake, C.H., A deeper shade of green: inspiring sustainable drug manufacturing. *Green Chemistry* **2017**, 19 (1), 281-285.
10. Lalor, F.; Fitzpatrick, J.; Sage, C.; Byrne, E., Sustainability in the biopharmaceutical industry: Seeking a holistic perspective. *Biotechnology Advances* **2019**, 37, 698-703.

Conferencia Plenaria 2

Dynamics of function of helicase NS3 of dengue virus: study through individual molecules techniques

Fernando Amrein¹, Leopoldo G Gebhard², Ariel Kaplan³, Andrea V Gamarnik², Carlos Bustamante⁴, Sergio B Kaufman^{1*}

¹ IQUIFIB Departamento de Química Biológica Fac de Farmacia y Bioquímica, UBA, CABA, Argentina

² Fundación Instituto Leloir-CONICET, CABA, C1405BWE, Argentina

³ Faculty of Biology, Technion—Israel Institute of Technology, Haifa, Israel

⁴ Department of Physics, Departments of Chemistry, and Molecular and Cell Biology and Howard Hughes Medical Institute, University of California, Berkeley, California 9472, USA

*sbkauf@qb.ffyb.uba.ar

Dengue virus (DENV) NS3h protein is an RNA-helicase that catalyzes the hydrolysis of ATP and couples the free energy of this reaction to the translocation on single strands and to unwind double stranded RNA. Binding and hydrolysis of ATP are essential for helicase function because they are the energy source of the mechanical work. These processes are stochastic in nature although showing patterns with a certain periodicity which is manifested both in step-size and dwell times.

The former comprises discrete movements of the protein along the RNA strand, and the latter corresponds to periods during which the motor carries chemical transformations (ATP binding, ADP release, ATP hydrolysis) and no mechanical movement. We performed single molecule experiments at different [ATP] using optical tweezers to measure length variation between extremes of a dsRNA as a result of the unwinding activity of NS3h.

A step detecting algorithm was used to extract information from experimental data to characterize step-sizes and dwell times. From the analysis of these results we obtained the following conclusions 1) the mechanical step-size value strongly correlates with the NS3h site-size value for the RNA (10 to 11 nt), 2) the unwinding dwell times values followed an inverse relation with the ATP concentration, indicating that binding of ATP takes place during the dwell, and 3) the behavior of the protein can be explained by the inchworm model of translocation and unwinding.

With grants from: SECyT, UBA and ANPCyT



Conferencia Plenaria 3

Estabilización de enzimas mediante estrategias de inmovilización

Lorena Wilson

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

email: lorena.wilson@pucv.cl

Las enzimas son catalizadores lábiles, propiedad que limita su aplicación en condición de operación. Sin embargo, a la fecha se han realizado numerosos esfuerzos para abordar este problema; entre estos destaca la inmovilización de enzimas.

A comienzos de la década de 1970, se reportan los primeros estudios de inmovilización de enzimas a un soporte, permitiendo con ello proyectar su uso en reactores continuos y, por tanto, considerar a estos nobles catalizadores en procesos industriales.

Actualmente se cuenta con un abanico de posibilidades para la inmovilización de enzimas. Todas estas estrategias han sido favorecidas por un trabajo multidisciplinario que, junto con el desarrollo de equipamiento sofisticado, permite hacer un riguroso diseño y caracterización del soporte, los grupos funcionales para inmovilizar la enzima, y las características superficiales y estructurales de la proteína enzimática que se verán involucrados en la inmovilización. La selección de la estrategia de inmovilización más adecuada dependerá, tanto de las características propias de la enzima, como de la aplicación en la cual será utilizado el catalizador.

A la fecha existen numerosos estudios de inmovilización de enzimas que incluyen, además, la inmovilización sin soporte, y más recientemente la inmovilización de más de una enzima en un mismo soporte o biocatalizador con el fin de realizar una reacción en serie o cascada, favoreciendo la eficiencia del proceso.

Dado que no existe una estrategia de inmovilización estándar para lograr la estabilización de una enzima, existe el desafío de contar con nuevas y más eficientes estrategias de inmovilización, que permitan la construcción de catalizadores robustos y recuperables, lo suficientemente estabilizados para resistir las condiciones, generalmente rigurosas, de un proceso industrial.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1190709



Conferencia Plenaria 4

Aplicación de estrategias de ingeniería del sistema de reacción y del biocatalizador en la síntesis enzimática de lactulosa

Andrés Illanes*, Cecilia Guerrero

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

*Autor correspondiente: andres.illanes@pucv.cl

La lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructosa), es un disacárido usado como medicamento contra el estreñimiento y la encefalopatía hepática, y como ingrediente funcional en alimentos debido a su condición de prebiótico. La lactulosa es producida industrialmente mediante la isomerización alcalina de lactosa, no obstante, las desventajas, de formación de subproductos cuya remoción es costosa, y los bajos rendimientos. Por ello la producción de lactulosa con catalizadores enzimáticos provenientes de diversos microorganismos y en diversas modalidades de reacción, surge como una alternativa atractiva y sustentable. La síntesis enzimática de lactulosa puede ocurrir por la transgalactosilación de una molécula de fructosa con galactosa proveniente de lactosa, catalizada por β -galactosidasa¹, o por el reordenamiento de la estructura molecular de la lactosa catalizado por celobiosa-2-epimerasa (CE)². La síntesis bajo control cinético de lactulosa con β -galactosidasa es un sistema complejo en que compiten las reacciones de hidrólisis con las de transgalactosilación. La especificidad de la β -galactosidasa por el sustrato aceptor afecta la selectividad de la síntesis de lactulosa, ya que determina la relación entre las actividades de hidrólisis y de síntesis de lactulosa y oligosacáridos transgalactosilados (TOS). Por ello, para hacer tecnológicamente viable este proceso, es necesario incrementar la selectividad, el rendimiento y la productividad de lactulosa. Se ha evaluado el efecto de las principales variables de operación en la síntesis de lactulosa con β -galactosidasas de distintos orígenes, determinándose, que la razón entre los sustratos es la única variable que afecta significativamente la selectividad y el rendimiento de síntesis, lográndose incrementar la razón lactulosa-TOS producida al incrementar la razón fructosa/lactosa alimentada, la que puede controlarse mediante una adecuada selección de la modalidad de operación, habiéndose evaluado la síntesis en sistemas discontinuos, semi-continuos y continuos.

En principio, una mejor estrategia para la síntesis de lactulosa es mediante la isomerización directa de lactosa a lactulosa, la que ofrece una mayor eficiencia atómica. La isomerización de lactosa en lactulosa debiere ser más económica porque solo requiere lactosa como sustrato. Tal funcionalidad fue recién reportada en 2012 al lograrse la síntesis de lactulosa mediante CE, una enzima promiscua termoestable de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*, expresada en *Escherichia coli*. Sin embargo, su aplicación industrial está limitada por la baja actividad de la enzima, no disponible aun comercialmente, y por la formación de epilactosa como subproducto. Se encuentra actualmente en estudio la síntesis de una CE recombinante y su aplicación a la producción de lactulosa a partir de lactosa

Referencias

- [1]. Guerrero, C., Valdivia, F., Ubilla, C., Ramírez, N., Gómez M., Aburto, C., Vera, C., Illanes, A., Continuous enzymatic synthesis of lactulose in packed-bed reactor with immobilized *Aspergillus oryzae* β -galactosidase. *Bioresource Technology* **2019**, 278, 296-302.
- [2]. Wang, H., Yang, R., Hua, X., Zhao, W., Zhang, W., Enzymatic production of lactulose and 1-lactulose: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2013**, 97, 6167-6180.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1190104.



Conferencia Plenaria 5

Purificación, caracterización y modelación de mirosinasa de brócoli para el diseño de una estrategia de industrialización en el campo de los alimentos funcionales

Andrea Mahn^{1*}, Antonio Castillo², Juan Román¹

¹ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad de Santiago de Chile

² Departamento de Biología, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

*andrea.mahn@usach.cl

La mirosinasa (β -tioglucosidasa glucohidrolasa, E.C. 3.2.3.1) es una glicoproteína responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos, los que constituyen un grupo de metabolitos secundarios azufrados presentes en las *Brassicaceae*. Entre los productos de su hidrólisis se encuentran tiocianatos, isotiocianatos y nitrilos, dependiendo de las condiciones de reacción. El sulforafano, isotiocianato derivado de la glucorafanina, ha mostrado diversos efectos beneficiosos para la salud de quienes lo consumen, tales como prevención de algunos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, úlcera, entre otros. Por otra parte, los nitrilos pueden producir toxicidad, y su formación se ve favorecida en condiciones diferentes a las de formación de sulforafano. La glucorafanina es el glucosinolato más abundante en brócoli, y está presente en concentraciones considerablemente inferiores en otras crucíferas. Se ha investigado distintas alternativas de procesamiento para maximizar el contenido de sulforafano en alimentos derivados de brócoli. Se desarrollaron distintos procesos post cosecha para maximizar el contenido de sulforafano en harina de brócoli, los que incluyen etapas de escaldado, incubación y deshidratación [1]. Por otra parte, se ha propuesto la obtención de sulforafano partir de extractos de brócoli, adicionando mirosinasa exógena y controlando las condiciones de reacción. Como tercera opción, se ha estudiado la hidrólisis “*in-situ*” de los glucosinolatos presentes en el brócoli mediante la ingesta de mirosinasa junto con el vegetal cocido. Para investigar los procesos de hidrólisis fuera del vegetal fue necesario contar con la mirosinasa purificada y conocer sus propiedades estructurales, fisicoquímicas y cinéticas. En este trabajo se presenta el proceso de purificación de mirosinasa a partir de inflorescencias de brócoli [2], la caracterización fisicoquímica y cinética de la mirosinasa de brócoli purificada, la secuencia amino acídica de esta enzima y un modelo de su estructura tridimensional [3]. A partir de esta información fue posible elucidar el mecanismo cinético de la mirosinasa de brócoli, simular la interacción entre la estructura tridimensional de la enzima y distintos sustratos e inhibidores [4,5], producir la enzima de manera heteróloga en bacteria y levadura, y diseñar un proceso de purificación escalable a nivel productivo. Con estos resultados se espera contribuir a la industrialización de la mirosinasa y al desarrollo de nuevos alimentos funcionales como fuente de sulforafano biodisponible.

Referencias

- [1] Mahn A, Martín C, Reyes A, Saavedra A (2016). Evolution of sulforaphane content in sulforaphane-rich broccoli during tray drying. *Journal of Food Engineering* 186:27 – 33.
- [2] Mahn A, Angulo A, Cabañas F (2014). Purification and Characterization of Broccoli (*Brassica oleracea* var *italica*) Myrosinase (β -tioglucosidase glucohydrolase). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62 (48): 1666-1671.
- [3] Román J, Cottet L, Castillo A, Mahn A (2018). Kinetic and structural study of broccoli myrosinase and its interaction with glucoraphanin and sinigrin. *Food Chemistry* 254: 87 – 94.
- [4] Román J, Castillo A, Cottet L, Mahn A (2018). Molecular modeling of broccoli myrosinase and its interaction with different ligands. *Chemical Engineering Transactions* 64: 373 - 378.
- [5] Román J, Castillo A, Mahn A. (2018). Molecular Docking of Potential Inhibitors of Broccoli Myrosinase. *Molecules* 23, 1313.

Keynote JBiocat 2019

Keynote 1:

Machine learning techniques applied for mutation selection in semi-rational protein engineering: how to learn from what has been learned.

Álvaro Olivera. Universidad de Chile.

Keynote 2

Interfering with the folding of adhesive bacterial proteins.

Andrés Rivas. Universidad Mayor.

Keynote 3

High throughput selective immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A.

Karen Rodríguez, **Ronny Martínez**, Claudia Bernal. Universidad de La Serena.

Keynote 4

Modificación de la especificidad de sustrato de una endoxilanasas fúngica de origen antártico.

Renato Chávez, Carlos Gil-Durán, Cristina Ravanal, Maximiliano Rojas, Romina Sepúlveda, Danilo González-Nilo, Víctor Castro, Victoria Guixé, Inmaculada Vaca. Universidad de Santiago de Chile.

Keynote 5

Optimización de la operación de reactores enzimáticos.

Raúl Conejeros. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Keynote 6:

Bioquímica computacional: Modelando reacciones enzimáticas al nivel multiescala.

Rodrigo Recabarren, Rubén Fritz Fritz, Jefferson Romero, **Jans Alzate-Morales.** Universidad de Talca.

Keynote 1

Machine learning techniques applied for mutation selection in semi-rational protein engineering: how to learn from what has been learned

Álvaro Olivera-Nappa*, David Medina, Sebastián Contreras

Centro de Biotecnología y Bioingeniería – CeBiB, Departamento de Ingeniería Química, Biotecnología y Materiales, Universidad de Chile, Santiago, Chile

* Corresponding author: aolivera@ing.uchile.cl

Protein engineering usually encompasses a set of methodologies and techniques, both experimental and theoretical, used to develop useful or valuable proteins through the understanding of protein folding, chemistry and interactions, as protein design principles for technological applications. The current level of these applied technologies allows to create new protein functions from known protein sequences, introducing mutations in the protein amino acid sequence. Two main approaches are generally used to obtain such amino acid modifications: rational design, based on molecular structure, physicochemical knowledge and mechanistic insights to design novel protein variants, and directed evolution, based on randomly introduced mutations, screening and selection of suitable mutants. The success of the first approach requires good structural and mechanistic knowledge to design effective mutations, while the second approach requires the existence of high-throughput screening methods to discard deleterious mutations. However, there is a large number of proteins and protein activities for which no structure-function knowledge is available and no suitable screening method can be used. These proteins constitute what has been called protein engineering “dark matter”, a vast set of proteins that cannot be engineered using current techniques. This talk will focus on showing our groups’ latest advances on applying machine learning techniques for the semi-rational design of proteins, especially for properties that cannot be easily screened or rationally designed. This talk will also show how few laboratory results and bioinformatics algorithms can be combined to design recursive improvement mutagenesis rounds that can help to optimize selected protein features. Finally, it will be shown how information gathered from directed evolution experiments could be used by our algorithms to select multiple mutations that could optimize a desired property, which constitutes our current research and development focus.

Keynote 2

Interfering with the folding of adhesive bacterial proteins

J. Andrés Rivas Pardo

*Mechanobiology Laboratory, Center for Genomics and Bioinformatics,
Facultad de Ciencias, Universidad Mayor, Santiago, Chile
e-mail: jaime.rivas@umayor.cl*

Streptococcus pyogenes use their adhesive pili to attach to host cells during the early stages of infection. These extracellular hair-like appendages experience mechanical stresses of hundreds of picoNewtons, force enough to unfold and detach any protein from its substrates. Nevertheless, *S. pyogenes* have implemented a novel strategy to prevent the unfolding of the pilus protein: an internal isopeptide between the side chain of a Lys and Asn prevents the protein unfolding. Through protein engineering and specific protein gene induction, a “proof of concept” has been implemented for a peptide-based strategy able to intervene in the formation of the isopeptide bond on the pilin Spy0128 from *Streptococcus pyogenes*. The peptide prevents the folding of the pilus proteins and renders the Spy0128 susceptible to protease digestion. Single-molecule force spectroscopy was used to determine how the presence of the isopeptide-blocker peptide interferes with the formation of the isopeptide bond, therefore, with the mechanics of the pilus. While the intact Spy0128 is inextensible under mechanical forces, the intervened Spy0128 is completely extensible and lacks mechanical stability. It is proposed that this isopeptide-blocker affords a novel strategy for mechanically-targeted antibiotics which, by blocking the folding structure of bacterial pili, could prevent the colonization of infectious microorganisms.

Acknowledgment: This project is funded by CONICYT, through research grant FONDECYT Inicio 11180705



Keynote 3

High throughput selective immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A

Karen Rodríguez Núñez, Ronny Martínez, Claudia Bernal *

Laboratorio de Tecnología de Enzimas para Bioprocesos, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán 1305, 1720010 La Serena, Chile

*Corresponding author: cbernal@userena.cl

A novel high throughput (HT) immobilization methodology in 96-well microtiter plates is presented. In order to evaluate the feasibility and efficiency of this methodology, HT immobilization was compared with traditional immobilization, using *Bacillus subtilis* lipase A (BSLA) and glyoxyl silica support as a model (Fig. 1). Immobilization kinetics, activity expression and thermal stability, resistance to isopropyl alcohol and substrate preference of the resulting biocatalyst were evaluated. More than 95% immobilization was obtained in both methodologies, and the yield in terms of enzyme activity was greater than 40%. The offered protein amount was $0.131 \pm 0.004 \mu\text{g g}^{-1}$ and the loaded protein was 0.066 ± 0.001 and $0.059 \pm 0.004 \mu\text{g g}^{-1}$ for the traditional and HT immobilization, respectively. To verify the selective immobilization of the BSLA in the support, polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analysis was performed (Fig. 2). The immobilized biocatalysts displayed higher stability in isopropyl alcohol at 50°C than the soluble enzyme. Both immobilization approaches were similar in performance and stability of the generated biocatalysts. This novel HT immobilization allows screening enzyme libraries for improved immobilized biocatalysts, evaluating different supports or different enzymes at the same time, providing a more time and resource efficient process and increased storage of biocatalysts [1].

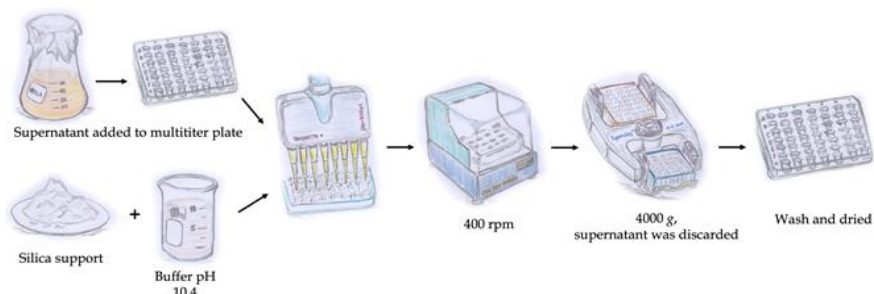


Fig. 1. High throughput immobilization of BSLA

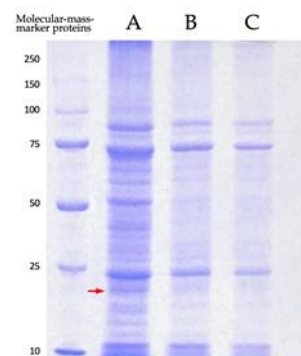


Fig. 2. SDS-PAGE of supernatants before and after enzymatic immobilization. BSLA supernatant before immobilization (A), supernatant after traditional immobilization (B), supernatant after HT immobilization (C). The arrow indicates the protein band of interest.

Acknowledgment: The authors wish to acknowledge CONICYT Fondecyt research grant N° 1170219 to R. Martínez and CONICYT doctoral scholarship N° 21170748 to K. Rodríguez for financial support.

References:

[1] Bernal, C., Rodríguez, K., Martínez, R. *Biotechnology Advances* **2018**, 36, 1470-1480.

Keynote 4

Modificación de la especificidad de sustrato de una endoxilanasas fúngica de origen antártico

Renato Chávez^{1*}, Carlos Gil-Durán¹, Cristina Ravanal², Maximiliano Rojas³, Romina Sepúlveda³, Danilo González-Nilo³, Víctor Castro⁴, Victoria Guixé⁴, Inmaculada Vaca⁵

¹ Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile

³ Center for Bioinformatics and Integrative Biology, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile

⁴ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

⁵ Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

*Autor correspondiente: renato.chavez@usach.cl

El xilano es un polímero compuesto por un esqueleto central de moléculas de β -D-xilosa unidas por enlaces glicosídicos β -(1,4), el cual puede estar sustituido por diversos grupos químicos. Estas sustituciones hacen que el xilano sea un sustrato heterogéneo, cuya degradación requiere de la acción de un conjunto de enzimas hidrolíticas. Entre ellas, destacan las endo-1,4- β -xilanasas (EC 3.2.1.8), conocidas comúnmente como endoxilanasas. Las endoxilanasas hidrolizan los enlaces glicosídicos β -(1,4) del esqueleto central del xilano originando xilooligosacáridos. Estas enzimas han sido clasificadas en varias familias. Una de ellas, denominada familia GH10, contiene múltiples endoxilanasas de origen fúngico.

En nuestro laboratorio, recientemente se ha caracterizado una endoxilanasas de un hongo antártico, denominada XynA. XynA es una endoxilanasas de la familia GH10 clásica, que libera xilooligosacáridos como producto. Esta proteína posee un extremo N-terminal no estructurado. La eliminación de este extremo N-terminal originó una enzima mutada (XynA Δ 29N) que mostró mayor actividad específica en comparación con XynA en todos los sustratos usados. Sorprendentemente, además de producir xilooligosacáridos, XynA Δ 29N también generó xilosa como producto, una característica inédita en endoxilanasas de la familia GH10. De hecho, XynA Δ 29N tuvo actividad sobre *p*-nitrofenil- β -D-xilopiranosido (pNPxyl), un sustrato sintético sobre el cual las endoxilanasas clásicas no tienen ninguna actividad, y que se usa para caracterizar β -xilosidasas (E.C.3.2.1.37), enzimas distintas y que catalizan la hidrólisis de la xilobiosa para originar xilosa. Estos resultados sugieren que XynA Δ 29N presenta una especificidad de sustrato modificada, pues a diferencia de XynA, tendría dos actividades (endoxilanasas/xilohidrolasa). Para entender mejor el origen de esta característica, se realizaron simulaciones de dinámica molecular y “docking”. Las simulaciones indican que la eliminación del extremo N-terminal hace a la enzima más flexible, lo que le otorga al pNPxyl una mayor accesibilidad al sitio activo. Esto posibilita la incorporación de pNPxyl al sitio activo y su hidrólisis por parte de los residuos catalíticos de la enzima.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado por el proyecto INACH RG_03-14, y proyecto POSTDOC DICYT, Código 021943CHR_POSTDOC.

Keynote 5

Optimización de la operación de reactores enzimáticos

Raúl Conejeros

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso

e-mail: raul.conejeros@pucv.cl

La operación de reactores enzimáticos involucra la toma de decisiones respecto de algunos aspectos que definen cómo se llevará a cabo y que afectan tanto la productividad como la economía del proceso. Decisiones tales como modalidad en la que se lleva a cabo la reacción, flujo de operación, temperatura, frecuencia de recambio del catalizador, entre otros, pueden ser determinantes y su elección no es obvia.

La modelación tanto de los mecanismos de reacción enzimática como de la operación de los reactores, resulta una herramienta muy útil en la simulación y predicción del resultado productivo a obtener; sin embargo, alcanzar la mejor condición productiva del sistema de reacción hace necesario el uso de técnicas de optimización, las que se apoyan fuertemente en las matemáticas y en los métodos numéricos, y que pueden ser implementados computacionalmente.

Aun así, la implementación de estas técnicas y del software existente no es fácil ni directa y son altamente dependientes de la complejidad del problema que se defina. Esto resulta en la necesidad de explorar en formulaciones matemáticas que resulten apropiadas para el problema tratado y que permitan el uso de técnicas que garanticen las soluciones obtenidas.

En esta presentación esto se ilustrará utilizando como modelo de estudio la enzima β -galactosidasa, por la simplicidad del sistema y la amplia experiencia en el uso de esta enzima.



Keynote 6

Bioquímica computacional: Modelando reacciones enzimáticas al nivel multiescala

Rodrigo Recabarren¹, Rubén Fritz Fritz², Jefferson Romero³, Jans Alzate-Morales^{1*}

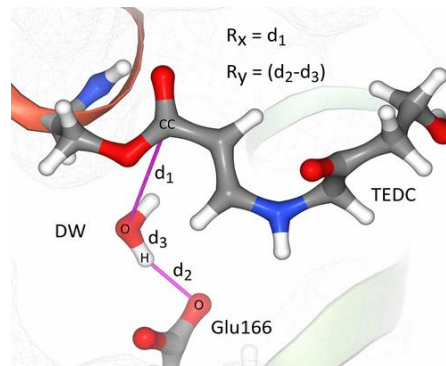
¹ Centro de Bioinformática, Simulación y Modelado, Facultad de Ingeniería, Universidad de Talca.

² Molecular Quantum Technology Group, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

³ Instituto de Química de Recursos Naturales, Universidad de Talca, Talca, Chile

*Autor correspondiente: jalzate@utalca.cl

El modelado multi-escala comprende una serie de herramientas computacionales que van desde las más simples, como acoplamiento molecular, hasta las sofisticadas y más complejas, como los métodos híbridos QM/MM (Quantum Mechanics/Molecular Mechanics). Este tipo de modelos ha permitido entender el funcionamiento de sistemas con pocos átomos ($H+H_2$) hasta el funcionamiento de biomoléculas¹. Se presentan varios modelos computacionales multi-escala que han sido implementados en nuestro grupo para entender procesos de importancia médica y biotecnológica, como por ejemplo: los procesos de transferencia de fosfato en dos quinasas (CDK2 y PFK-2)^{2, 3}, el rompimiento de inhibidores realizado por β -lactamasas TEM-1 y KPC-2⁴ y el reconocimiento y oxidación de sustratos por la lignina peroxidasa (LiP) del hongo *P. chrysosporium*⁵.



Coordenadas de reacción usadas para evaluar la superficie de energía potencial a través de dinámicas moleculares en el sistema clavulanato- β -lactamasas TEM-1 y KPC-2.

Agradecimientos: FONDECYT Proyectos 1140618 y 1181253. Becas CONICYT de estudios doctorales PFCHA/Folios 21130949 y 21160905.

Referencias:

1. Karplus, M., *Angewandte Chemie International Edition*, **2014**, **53** (38), 9992–10005.
2. Recabarren, R., *et al.*, *Plos One*, **2019**, aceptado.
3. Murillo-López, J., *et al.*, *Chemical Science*, **2019**, **10**, 2882-2892.
4. Fritz, R., *et al.*, *Biochemistry*, **2018**, **57**, 3560-3563.
5. Romero, J., *et al.*, *Computational and Structural Biotechnology Journal*, **2019**, **17**, 1066-1074.



biocat

II JORNADA DE BIOCATÁLISIS

Presentaciones Orales



Presentaciones Orales JBiocat 2019

Oral 1

Evidence of enzyme promiscuity from evolutionary genomics and large-scale metabolic analyses.
Ilvanna Salas, Evandro Ferrada. Universidad Mayor.

Oral 2

Deletion and mutational randomization of variable loops in *B. subtilis* Lipase A (BSLA) alter stability and substrate specificity for longer fatty acid esters.
Ronny Martínez, Claudia Bernal, Rodrigo Álvarez, Christopher Concha, Fernando Araya, Ricardo Cabrera. Universidad de La Serena.

Oral 3

Recombinant production of xylanolytic enzymes of the *Gloeophyllum trabeum* fungus for degradation of residual lignocellulosic biomass.
Sebastián Bernal, Pamela Quiñones, Oriana Salazar. Universidad de Chile.

Oral 4

Evolutionary-based approaches to engineer the cofactor specificity in the 6-phosphogluconate dehydrogenase family.
Pablo Maturana, Eduardo Tobar, Pablo Cea, Richard Garratt, Ricardo Cabrera. Universidad de Chile.

Oral 5

Caracterización cinética, estructural y evolutiva de 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina-fosfato quinasas involucradas en la biosíntesis de vitamina B1.
Pablo Cea, Pablo Maturana, Gissela Araya, Gabriel Vallejos, Rodrigo Recabarren, Jans Alzate-Morales, Victoria Guixé y Víctor Castro-Fernández. Universidad de Chile.

Oral 6

Where is the catalytic region in agmatinase like protein (ALP)?
Elena-Amparo Uribe, Ma Belén Reyes, Ignacio Martínez, Kelly Mella, José Martínez-Oyanedel. Universidad de Concepción.

Oral 7

Regulación alostérica en enzimas de archaea: mecanismo de activación por AMP en la enzima bifuncional PFK/GK dependiente de ADP de *Methanococcus maripaludis*.
Vallejos Gabriel, Herrera Sixto, Kaufman Sergio, González-Lebrero Rodolfo, Castro-Fernández Víctor, Guixé Victoria. Universidad de Chile.

Oral 8

Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* sobre soportes. heterofuncionales con distintos largos de cadenas de alquilo.
Yerko Fredes, María Elvira Zúñiga, Zaida Cabrera. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Oral 9

Estimación del factor de efectividad de catalizadores de enzima inmovilizada mediante ensayos de conversión.
Pedro Valencia, Francisco Ibáñez. Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso.

Oral 10

A novel strategy for the immobilization of β -galactosidase as carrier-free bio-inorganic nanoflowers.
Luigi Tavernini, Lorena Wilson, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Oral 11

Immobilized enzyme, eco-friendly solvents and continuous flow reactor: a triple synergy for sustainable esterifications.
Nadia Guajardo, Katherine Ahumada, Pablo Domínguez de María. Universidad Técnica Metropolitana.

Oral 12

Biochemical characterization of a novel thermostable amine-transaminase from Antarctica.
Sebastián L. Márquez-Miranda, Jenny M. Blamey, Universidad de Santiago de Chile. Fundación Científica y Cultural Biociencia.

Oral 13

Mejoramiento del rendimiento y la selectividad de la reacción de síntesis de lactulosa con β -galactosidasa de *Bacillus circulans*.
Carla Aburto, Claudia Ubilla, Nicolás Ramírez, Carlos Vera, Andrés Illanes, Cecilia Guerrero. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

Oral 14

Discovery and production of carbohydrate esterases (CE) from fungal genomes and their potential industrial applications.
Felipe Venegas, Justin Powlowski. Concordia University, Montreal, Canadá.

Oral 15

Síntesis de butil- β -D-galactósido en el medio de reacción ternario: 1-butanol/acetona/agua.
Diego Ahumada, Cecilia Guerrero, Carlos Vera. Universidad de Santiago de Chile.

Oral 16

Diseño de nuevos derivados de feniletilamina como potenciales inhibidores del transportador de dopamina.
Dinamarca Luis, Robles Agustín, Pérez Edwin, Campusano Jorge, Fierro Angélica. Pontificia Universidad Católica de Chile.

Oral 17

Unveiling the sequence and structure features enabling enzymatic degradation of PET at low temperatures.
Paula Blázquez, Pablo Galaz-Davison, Felipe Engelberger, Victoria Guixé, Wolfgang Zimmermann, Marcos Sotomayor, César A. Ramírez-Sarmiento. Universidad Católica de Chile.

Oral 18

Engineering anchor peptides for polymer and plant surfaces.
Felix Jacob. Ulrich Schwaneberg. DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien, Alemania.

Presentación Oral 1

Evidence of enzyme promiscuity from evolutionary genomics and large-scale metabolic analyses

Ilvanna Salas¹ and Evandro Ferrada^{1,*}

¹ Center for Genomics and Bioinformatics, Facultad de Ciencias, Universidad Mayor. Camino la Pirámide 5750, Huechuraba 8580745, Santiago, Chile.

*Corresponding author: evandro.ferrada@umayor.cl

Large-scale functional and genomics studies have the potential to inform about the genomic and metabolic constraints faced by catalytic promiscuity. Here results are report on simulations of single and double enzyme knockouts using analyses of flux balance on a metabolic network of *Saccharomyces cerevisiae*. Results were contrasted to previous functional studies of these knockouts, a set of candidates of promiscuous enzymes was identified. In order to provide additional support to these findings, a genome-wide evolutionary analysis of the genus *Saccharomycetaceae* was carried out. A well-documented whole genome duplication event in this genus lends itself as a natural evolutionary experiment for the emergence of gene duplicates with new enzyme functions. We identified groups of enzymes that share a common ancestor in several *Saccharomyces* species, and studied sequence patterns suggestive of natural selection. These analyses allowed identifying enzymes that likely arose from ancestral genes capable of promiscuous catalytic activity, and/or have orthologs that are still promiscuous. These sources of evidence are summarized and lessons are proposed that inform genomic and metabolic constraints on enzyme promiscuity, as well as their consequences for molecular evolution and enzyme engineering.

Presentación Oral 2

Deletion and mutational randomization of variable loops in *B. subtilis* Lipase A (BSLA) alter stability and substrate specificity for longer fatty acid esters

Ronny Martínez^{1*}, Claudia Bernal¹, Rodrigo Álvarez¹, Christopher Concha¹, Fernando Araya², Ricardo Cabrera²

¹Laboratorio de Tecnología de Enzimas para Bioprocesos, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán 1305, 1720010 La Serena, Chile

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Corresponding author: remartinez@userena.cl

A semi-rational mutational strategy focused in variable “loop” sequences in enzymes is proposed and applied. The selected sequence was subjected to a progressive deletion of two amino acids and the joining residues were subjected to saturation mutagenesis using NNK degenerate codons. This strategy offers a novel library diversity approach while simultaneously decreasing enzyme size in the variable regions. In this way, the purpose was to identify and reduce variable regions found in enzymes, probably resulting from neutral drift evolution, and simultaneously studying the functional effect of said regions.

This strategy was applied to *B. subtilis* lipase A (BSLA), by selecting and progressively deleting six variable enzyme regions (named libraries 1 to 6). For the first round, (2 amino acid deletions and NNK-NNK randomization) no active variants were found in libraries 1 and 4, 15% active variants were found in libraries 2 and 3 and 25% in libraries 5 and 6 (n = 3000 per library, activity detected using tributyrin agar plates). Active variants were assessed for activity in microtiter plate assay (pNP-butyrate), thermal stability and substrate preference (pNP-butyrate, -octanoate, dodecanoate and -palmitate), and compared to wild type BSLA. From these analyses, variant P5F3 (F41L-ΔW42-ΔD43-R44P), from library 3 was identified, showing increased activity towards longer chain fatty acid p-nitrophenyl esters, when compared to wild type BSLA. This study allows to propose loop 3 (positions 40-46) as a potential modulator for substrate specificity (fatty acid chain length) in BSLA, which can be further studied to increase its substrate spectrum and selectivity. Additionally, this variant showed lower thermal resistance but, interestingly, higher solvent resistance.

This strategy may help to expand and explore sequence diversity, even in already well studied and characterized enzyme backbones, such as BSLA. In addition, this strategy can contribute to investigate and identify important non-conserved regions in classic and novel enzymes, as well as generating novel biocatalyst with increased performance in specific processes, such as enzyme immobilization [1].

Acknowledgments: Fondecyt Research Grant N° 1170219.

Reference:

[1] Bernal, C., Rodríguez, K., Martínez, R., *Biotechnology Advances* **2018**, 36, 1470-1480.



Presentación Oral 3

Recombinant production of xylanolytic enzymes of the *Gloeophyllum trabeum* fungus for degradation of residual lignocellulosic biomass

Sebastián Bernal*, Pamela Quiñones, Oriana Salazar

Centre for Biotechnology and Bioengineering (CeBiB), Faculty of Physical Sciences and Mathematics
University of Chile, Santiago, Chile

*Corresponding author: sebastian.bernals@utem.cl

Obtaining biomaterials and bioproducts is essential to move towards the establishment of a society based on a sustainable economy. It is estimated that 5 billion tons of residual biomass from the agricultural sector are produced worldwide. Hemicellulose is the second most abundant group of heteropolymers in plants, constituting 25% - 30% of the dry weight of the wood. The components of hemicellulose can be classified into xylan, xyloglucan, mannan, glucomannan and glucan. Xylan represents approximately 70% of the weight of hemicellulose¹.

Complete xylan hydrolysis requires the synergistic action of several enzymes, known as the xylanolytic system². Endo β (1-4) xylanases (E.C.3.2.1.8) hydrolyze internal β (1-4) glycosidic bonds in the main chain, producing xylooligosaccharides of different length. Xylosidases, on the other hand, are responsible for hydrolyzing β (1-4) glycosidic bonds at the ends of the chain, generating xylose as the main product. These enzymes are not only important for hemicellulose conversion, but they are also key for removing xylan derived compounds from the hydrolytic mixtures, since they are strong inhibitors of cellulases used for glucan hydrolysis.

In consequence, our main goal in this work was to produce recombinant GtXyl10A xylanase and GtXyn43A xylosidase from the *Gloeophyllum trabeum* xylanolytic system. Our interest was to provide sufficient amount of enzyme to assess the effects on the hydrolysis of wheat straw. The respective genes were isolated from the fungal cDNA and cloned into pET22b and pPIC9k expression vectors. Recombinant vectors were introduced into *Escherichia coli* BL21 (DE3) and *Pichia pastoris* KM71, respectively. The enzymes were produced after chemical induction in both host systems and purified using either ion metal affinity or classical chromatographic methods.

Results indicate that GtXyl10A and GtXyn43A are actively produced in both systems, although the expression in *P. pastoris* is higher than in *E. coli*. Individually the purified enzymes from both hosts showed similar specific hydrolytic activity on commercial beechwood xylan and also on more complex substrates, such as wheat straw. Preliminary experiments with GtXyl10A and GtXyn43A in different combinations have shown that mixing xylanase and xylosidase improves xylose and xylooligosaccharides yields from wheat straw xylan, while glucan hydrolysis increases in about 45% by including xylanase in the cellulolytic mixture. In conclusion, recombinant GtXyl10A and GtXyn43A produced either in *E. coli* or *P. pastoris* are completely functional enzymes for xylan conversion, allowing to move towards further optimization of hemicellulose hydrolysis.

References:

1. Biely *et al.*, *Biotechnology Advances* **2016**, 34, 1260-1274.
2. Naidu *et al.*, *Carbohydrate Polymers* **2018**, 179, 28-41.



Presentación Oral 4

Evolutionary-based approaches to engineer the cofactor specificity in the 6-phosphogluconate dehydrogenase family

Pablo Maturana¹, Eduardo Tobar¹, Pablo Cea¹, Richard Garratt², Ricardo Cabrera^{1*}

¹Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

²Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, São Carlos, Brasil.

*Corresponding author: ricabrer@uchile.cl

The use of evolutionary and structural information in the context of rational design and directed evolution, has been a powerful approach to modulate the cofactor specificity in different dehydrogenases families. In this work different evolutionary-based strategies were used to modulate the cofactor specificity in tetrameric and dimeric members of the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) family. To this end, structural and phylogenetic analyses, X-ray crystallography studies, molecular-dynamics simulations and site-directed mutagenesis on the dimeric 6PGDH from *Escherichia coli* (*Ec6PGDH*) and the tetrameric enzyme from *Gluconobacter oxydans* (*Go6PGDH*) were performed. The 6PGDH family has evolved through architectural changes that shaped the substrate binding site, involving a α -helix swapping before the duplication of the entire C-terminal domain that lead to a change in the oligomeric state from tetramer to dimer. In the $\beta 2$ - $\alpha 2$ loop of the N-terminal domain, dimeric 6PGDHs display the NR motif while tetrameric 6PGDHs present $D\Phi$ (Φ = non polar residue), a difference associated with preference for $NADP^+$ and NAD^+ , respectively. According to the presence of these motifs, monophyletic clusters in both dimeric and tetrameric 6PGDHs were identified that may have changed cofactor preference. Then, these motifs were tested as determinants of cofactor specificity. In the case of the *Go6PGDH*, dual cofactor-specificity is associated to the presence of a mixed motif DR, which was changed to the canonical NR and $D\Phi$, resulting in a dramatic increase of $NADP^+$ - and NAD^+ -selectivity, respectively. A similar approach over the $NADP^+$ -specific *Ec6PGDH* resulted in reversion of cofactor specificity but showing low affinity for NAD^+ . In order to increase the efficiency for this cofactor, directed evolution by site-saturation mutagenesis was performed in the loop $\beta 1$ - $\alpha 1$ loop, another locus containing determinants for cofactor specificity. A screening platform to select NAD^+ -dependent mutants from our library was obtained by generating an *E. coli* strain derived from the deletion of the *pgi* gene. This strain displayed a remarkable decrease in growth rate as a consequence of $NADPH$ overproduction. The site-saturation mutant library was expressed in this strain, thus replacing the endogenous 6PGDH, allowing to select a $NADH$ -producing 6PGDH that helped to restore the growth rate when glucose is used as carbon source. This mutant showed a striking reversal of $7 \cdot 10^7$ fold regarding the wild type enzyme with high affinity for NAD^+ . X-ray crystallography and molecular dynamics analysis on wild type and mutant 6PGDHs showed alterations in the network of hydrogen bonds that interact with the cofactor, giving support to the results presented on the reversion of the cofactor specificity.

Acknowledgements: P.M. thanks CONICYT Fellowship and Center for the Structural Biology from Mercosur Fellowship.

Presentación Oral 5

Caracterización cinética, estructural y evolutiva de 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina-fosfato quinazas involucradas en la biosíntesis de vitamina B1

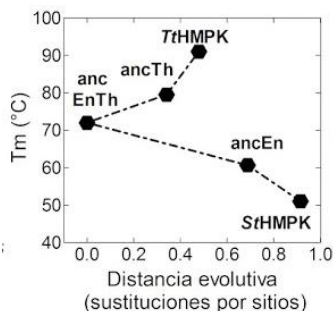
Pablo Cea¹, Pablo Maturana¹, Gissela Araya¹, Gabriel Vallejos¹, Rodrigo Recabarren², Jans Alzate-Morales², Victoria Guixé¹ y Víctor Castro-Fernández^{1*}

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Centro de Bioinformática y Simulación Molecular, Facultad de Ingeniería, Universidad de Talca, Talca, Chile

*Autor correspondiente: vcasfe@uchile.cl

Las 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina-fosfato quinazas (HMPPK) en bacterias se encuentran codificadas en el gen *ThiD* y participan de la biosíntesis y salvataje de tiamina (vitamina B1). Estas enzimas realizan dos fosforilaciones consecutivas de 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina (HMP) produciendo HMP-P y HMP-pirofosfato. En nuestro grupo se ha caracterizado la HMPPK de la bacteria mesófila *Salmonella typhimurium* (StHMPPK) y del termófilo *Thermus thermophilus* (TtHMPPK), encontrando características cinéticas conservadas entre ambas enzimas, a pesar de su lejanía filogenética, aunque consistente con su alta similitud estructural (RSMD 0.9 Å). En cuanto a su termoestabilidad, estas enzimas presentan una diferencia de 40 °C entre sus T_m, lo que es consistente con los nichos ecológicos de los que provienen. Análisis paleo-bioquímicos mediante reconstrucción de proteínas ancestrales muestran que la termoestabilidad de StHMPPK y TtHMPPK son el resultado de tendencias divergentes de las T_m de sus ancestros. La determinación de las estructuras cristalográficas de estos ancestros muestra su alta conservación estructural a través de la evolución y análisis de dinámica molecular para proteínas ancestrales y actuales y evidencia que la adaptación a ambientes mesófilos y termófilos está dictada principalmente por la modulación de redes dinámicas de puentes salinos, además de la composición del núcleo hidrofóbico de estas proteínas. Los resultados que se presentan ilustran la importancia de la información evolutiva para comprender cómo surge o se pierde naturalmente la termoestabilidad en enzimas, propiedad relevante para aplicaciones industriales.



Evolución de la termoestabilidad en HMPPK de bacterias. La resurrección ancestral muestra que el ancestro común (ancEnTh) entre *Enterobacteriales* y *Thermales* presenta una T_m intermedia entre las enzimas actuales, divergiendo hacia los respectivos linajes mesófilos (ancEn) y termófilos (ancTh).

Agradecimientos: REDI170497, U-inicia UI 2018/23, Fondecyt iniciación 11181133

Presentación Oral 6

Where is the catalytic region in agmatinase like protein (ALP)?

Elena-Amparo Uribe, Ma Belén Reyes, Ignacio Martínez, Kelly Mella, José Martínez-Oyanedel.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

*Corresponding author: auribe@udec.cl

Agmatine is a neurotransmitter with hypoglycemic actions and anticonvulsant, anti-neurotoxic and antidepressant-like effects¹. It is converted to putrescine and urea by agmatinase and also by an agmatinase-like protein (ALP), a new type of enzyme cloned in our laboratory, which is present in human and rodent brain tissues². Recombinant rat brain ALP is the only mammalian protein that exhibits significant agmatinase activity *in vitro* and generate putrescine under *in vivo* conditions³. ALP, in spite of differing in amino acid sequence, like all members of the ureahydrolase family, is strictly dependent on Mn^{2+} for its catalytic activity⁴. However, the Mn^{2+} ligand is yet undefined and any approximation to the enzyme active site is impeded by the lack of structural information and the low sequence identity of ALP with all known ureohydrolases. In urea hydrolases, aspartate and histidine are known to be ligands for the metallic cofactor. However, mutation of all five histidine residues in ALP yielded a single mutant species, the H206A variant, with a 10-fold decreased affinity for Mn^{2+} binding⁴. These results indicate that, in contrast to *Escherichia coli* agmatinase and arginases, His residues are not critical for the catalytic activity of ALP. Then, for determining the catalytic region of ALP, a comparative structural model was generated, considering the very low sequence similarity (30-38%) between ALP and the template of crystal structures of prokaryotic agmatinases and new putative metal ligands are proposed. Of these putative Mn^{2+} ligands of ALP, a simple mutant D215A, a double mutant E287A/K289A and a triple mutant N211A/Q213A/D215A were generated, and the three variants did not present agmatinase activity. Therefore, these residues would be relevant for the agmatinase activity of ALP. In addition, a sequence of 210 amino acids has been cloned and expressed, here designed as central-ALP that include the putative metal-ligands proposed (ALP containing 523 amino acids in total). The results indicate that central-ALP is catalytically active as agmatinase, with a K_m for agmatine of 1.2 ± 0.37 mM, similar to the wild-type, but with a decreased in the catalytic activity. Like the wild-type, central-ALP was activated by Mn^{2+} with an activation constant of 2.18×10^{-8} M. In addition, central-ALP maintained the typical thermostability of the urea hydrolases. The results obtained, indicate that ALP-central contain the active site for agmatine hydrolysis and, together with the studies of ALP mutants, support the present proposal for a Mn^{2+} binding site in ALP.

Acknowledgement: Proyecto VRID-Enlace 217.037.022-1 Universidad de Concepción.

References:

1. Laube, G., Bernstein, H-G., Agmatine: Multifunctional arginine metabolite and magic bullet in clinical neuroscience? *Biochemical Journal* **2017**, 474 (15), 2619-2640.
2. Uribe, E., Salas, M., Enríquez, S., Orellana, M.S., Carvajal, N., Cloning and functional expression of a rodent brain cDNA encoding a novel protein with agmatinase activity, but not belonging to the arginase family. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2007**, 461 (1), 146-150.
3. Castro, V., Fuentealba, P., Henríquez, A., Vallejos, A., Benítez, J., Lobos, M., Díaz, B., Carvajal, N., Uribe, E., Evidence for an inhibitory LIM domain in a rat brain agmatinase-like protein. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2011**, 512 (1), 107-110.
4. Quiñones, M., Cofre, J., Benítez, J., García, D., Romero, N., González, A., Carvajal, N., García, M., López, V., Schenk, G., et al., Insight on the Interaction of an agmatinase-like protein with Mn^{2+} activator ions. *Journal of Inorganic Biochemistry* **2015**, 145, 65-69.



Presentación Oral 7

Regulación alostérica en enzimas de archaea: mecanismo de activación por AMP en la enzima bifuncional PFK/GK dependiente de ADP de *Methanococcus maripaludis*

Gabriel Vallejos^{1*}, Sixto M. Herrera¹, Sergio B. Kaufman², Rodolfo M. González-Lebrero², Víctor Castro-Fernández¹, Victoria Guixé¹

¹ Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

² Departamento de Química Biológica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

*Autor correspondiente: gvallejos@ug.uchile.cl

En la mayoría de las arqueas del género *Euryarchaeota* la vía de Embden–Meyerhof o Glicólisis presenta importantes modificaciones, siendo una de las más relevantes la utilización de ADP en lugar de ATP como dador de fosforilo en las reacciones glucoquinasa (GK) y fosfofructoquinasa (PFK). Por otro lado, en organismos del orden *Methanococcales* una sola enzima bifuncional realiza ambas actividades. Canónicamente estas actividades constituyen puntos clave para la regulación del flujo de la vía; sin embargo, las enzimas que realizan estas actividades en arqueas se han descrito como no reguladas. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha reportado que AMP actúa como activador de las actividades GK y PFK de la enzima bifuncional de *Methanococcus maripaludis* (MmPFK/GK). En este trabajo se describe el mecanismo de activación por AMP de dicha enzima, para lo cual se ha propuesto un modelo matemático basado en datos obtenidos mediante estudios cinéticos de estado estacionario, junto con evidencia proveniente de estudios de unión de ligandos. Se determinó que el mecanismo cinético de ambas actividades corresponde a uno secuencial ordenado con MgADP como primer sustrato en entrar y AMP como último producto en salir. Ambas actividades presentan inhibición por el sustrato azúcar (glucosa o F6P), la que ocurre por unión de éste a la enzima libre, produciendo un complejo no productivo. Para ambas actividades esta inhibición se ve incrementada por la presencia de AMP. Estudios de modificación química con un análogo fotoactivable de AMP mostraron una estequiometría de unión de 2 moles de AMP/mol de proteína, lo que indica la presencia de un sitio alostérico. El mecanismo de activación ocurre principalmente mediante un aumento en la afinidad por el sustrato azúcar como consecuencia de la unión de AMP, lo que explica además el aumento en la inhibición por sustrato provocado por el activador. La constante de activación para AMP está en el mismo orden de magnitud para la actividad GK y PFK, aunque el incremento en la afinidad por glucosa es al menos un orden de magnitud mayor que en el caso de F6P. Se espera que estos resultados contribuyan a la comprensión del complejo metabolismo de las arqueas metanogénicas y su regulación.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1191321; Beca CONICYT Doctorado Nacional 21150993

Presentación Oral 8

Inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* sobre soportes heterofuncionales con distintos largos de cadenas de alquilo

Yerko Fredes, María Elvira Zuñiga, Zaida Cabrera

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

*Autor correspondiente: y.a.fredes@gmail.com

Distintas estrategias de inmovilización han sido estudiadas para obtener biocatalizadores que posean una alta actividad, estabilidad y selectividad. Una de estas estrategias es la inmovilización de lipasas sobre soportes heterofuncionales, los cuales poseen más de un grupo funcional en su superficie lo que permite interactuar en más de una forma con la estructura proteica¹. En particular, el diseño de soportes heterofuncionales hidrofóbicos reúne las ventajas de la inmovilización por adsorción hidrofóbica (mayor actividad) y la inmovilización covalente (mayor estabilidad). El objetivo de este trabajo fue diseñar diferentes soportes heterofuncionales hidrofóbicos, con el fin de evaluar el efecto del largo de la cadena alquilo sobre el proceso de inmovilización de la lipasa *Rhizopus oryzae* (ROL). Para alcanzar este objetivo se sintetizaron tres soportes heterofuncionales de agarosa, cada uno con una cadena alquil diferente (butil, octil y undecil) para favorecer la interacción hidrofóbica, y grupos glioxil para favorecer la interacción covalente. Los resultados muestran que los biocatalizadores de ROL obtenidos utilizando soportes heterofuncionales presentaron, en todos los casos, valores de actividad específica y estabilidad superiores a los obtenidos con su contraparte monofuncional (Tabla 1). Además, los resultados obtenidos muestran que a medida que aumenta el largo de la cadena alquilo, se obtienen catalizadores más activos, pero menos estables, efecto que podría estar relacionado con la congruencia geométrica entre la lipasa y el soporte.

Tabla 1: Actividad específica [UI/g] y factor de estabilización (FE) de los catalizadores de ROL en distintos soportes de agarosa.

Tipo de soportes	Biocatalizador	Actividad [UI/g]	FE
Mofuncional Covalente	Ag-Gli-ROL	112 ± 3	3,3 ± 0,4
Monofuncional Hidrofóbico	Ag-But-ROL	126 ± 5	1,4 ± 0,1
	Ag-Oct-ROL	129 ± 5	1,6 ± 0,1
	Ag-Und-ROL	139 ± 8	2 ± 0,3
Heterofuncional	Ag-But-Gli-ROL	135 ± 3	9 ± 0,2
	Ag-Oct-Gli-ROL	144 ± 2	6,1 ± 0,1
	Ag-Und-Gli-ROL	156 ± 5	5,1 ± 0,4

Agradecimientos: PUCV-Proyecto Asignable código 203.799/2013.

Referencia:

¹ Wang, Y., Zhang, X., Han, N., Wu, Y., Wei, D., *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 120, 100-108.

Presentación Oral 9

Estimación del factor de efectividad de catalizadores de enzima inmovilizada mediante ensayos de conversión

Pedro Valencia^{1*}, Francisco Ibañez¹

¹ *Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile*

*Autor correspondiente: pedro.valencia@usm.cl

Resumen

El factor de efectividad es un parámetro que evalúa la eficiencia de un catalizador en presencia de restricciones difusionales respecto de la ausencia de dichas restricciones. Debido a su importancia en la caracterización de estos catalizadores y lo costoso de su determinación, se ha propuesto una nueva metodología para la estimación del factor de efectividad de catalizadores de enzima inmovilizada. La metodología consiste en la determinación de la productividad tanto del reactor con enzima inmovilizada como la del que utiliza la enzima soluble. Dichas productividades se grafican en función de la conversión, para luego calcular la razón entre ambas productividades, la cual corresponde al estimador del factor de efectividad. Para evaluar la metodología, se simuló curvas de conversión en reactor por lotes con enzima soluble e inmovilizada para diferentes valores de la razón S_0/K_M y el módulo de Thiele (Φ). Dos casos con diferente orden de reacción fueron evaluados: una cinética de primer orden y una cinética basada en la ecuación de Michaelis-Menten con inhibición por producto. Los resultados mostraron que la razón de productividades entre la enzima inmovilizada y la enzima soluble, sigue satisfactoriamente el perfil de comportamiento del factor de efectividad. Esta simple metodología está basada en experimentos de conversión que rutinariamente se realizan en el laboratorio, de tal modo que se evita una caracterización exhaustiva de la cinética y la transferencia de masa del catalizador de enzima inmovilizada.

Referencia:

Valencia, P., Ibañez, F. Estimation of the effectiveness factor for immobilized enzyme catalysts through simple conversion assay. *Catalysts* 2019, 9(11), 930.

<https://doi.org/10.3390/catal9110930>



Presentación Oral 10

A novel strategy for the immobilization of β -galactosidase as carrier-free bio-inorganic nanoflowers

Luigi Tavernini*, Lorena Wilson

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Avenida Brasil 2085, P.O. Box 4059, Valparaíso, Chile

*Corresponding author: luigi.caesare@gmail.com

Hybrid organic/inorganic materials in the form of bio-inorganic flower-shaped nanocrystals or “bio-inorganic nanoflowers”, have received much attention as carrier-free immobilized biocatalysts due to their simple synthesis, high efficiency, and structural features that favor enzyme activity and stability^[1]. The process involves the biomineralization of metal-phosphates in the presence of proteins where mineral nucleation points start growing until forming nano to micro scale particles named nano-/micro-flowers^[1, 2].

The present work introduces a biomineralization strategy for the formation of hybrid nanoflowers from β -galactosidase, an enzyme mostly known for the hydrolysis of lactose with multiple applications in dairy, food processing, and pharmaceutical industries^[3]. Commercial β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* was contacted with CaCl_2 salt solution to yield calcium-phosphate nanoflowers. Biomineralization time, metallic salt to protein mass ratio, and pH were studied. Activity immobilization yield (IY), specific activity (SA), and stability were measured as response parameters.

The results show no significant effect of biomineralization time between 30 min to 2 h. Optimum IY and SA were obtained at $11.6 \text{ g}_{\text{Ca}}/\text{g}_{\text{protein}}$, being 41% and $21,000 \text{ IU}/\text{g}_{\text{biocatalyst}}$ respectively at pH 7.4. Results at pH 9.0 revealed a significant improvement over pH 7.4 with $37,000 \text{ IU}/\text{g}_{\text{biocatalyst}}$ of SA and 72% of IY at $16.4 \text{ g}_{\text{Ca}}/\text{g}_{\text{protein}}$.

The immobilized biocatalyst was considerably more stable than the free enzyme with half-life times of 7 h, 41.3 h and 80 h for the free enzyme, nanoflowers made at pH 7.4 and nanoflowers made at pH 9 respectively.

The features displayed by the β -galactosidase calcium-phosphate nanoflowers along with the simplicity of the immobilization process makes this strategy a more attractive alternative than carrier-bound biocatalysts, and also a highly competitive one in relation to other carrier-free immobilization strategies developed for this enzyme, such as crosslinked enzyme aggregates^[4]. A robust immobilized biocatalyst of β -galactosidase was developed with competitive cost-efficient potential applications.

Acknowledgements: Work funded by FONDECYT Grant 190709

References:

- [1] Escobar, S. et al., *Journal of Materials. Chemistry. B.* **2017**, 5, 4478-4486.
- [2] Ge, J. et al., *Nature Nanotechnology* **2012**, 7, 428-432.
- [3] Saqib, S. et al., *3 Biotech.* **2017**, 7(1), 79
- [4] Li, L. et al., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63(3), 894-901.



Presentación Oral 11

Immobilized enzyme, eco-friendly solvents and continuous flow reactor: a triple synergy for sustainable esterifications

Nadia Guajardo^{1*}, Katherine Ahumada², Pablo Domínguez de María³

¹ Programa Institucional de Fomento a la I+D+i (UTEM), Santiago, Chile

² IONCHEM Ltda., Viña del Mar, Chile

³ Sustainable Momentum SL, Las Palmas de Gran Canaria, España

*Corresponding author: nguajardo@utem.cl

The mere use of a biocatalyst does not assure that a synthetic process can be regarded as sustainable. Aspects related to the reaction medium (e.g. solvents), as well as the reactor type must be addressed too.^[1-5] In this work, we study the esterification of benzoic acid with glycerol catalyzed by cross-linked aggregates of *Candida antarctica* lipase B immobilized in polyvinyl alcohol (Lentikats[®]) (CALB-CLEA-LT). A packed-bed continuous reactor was set-up, and deep eutectic solvents (DES) with buffer as co-solvent to decrease viscosity (and allow a continuous process) were employed. As DES, the one formed by choline chloride/ glycerol was chosen as reaction medium and substrate at the same time (Figure 1). The results showed that in the repeated batch mode of operation the biocatalyst reached a high stability, reducing the conversion by 22% from the first batch to the sixth batch of reaction. In continuous mode, after 24 hours of operation the conversion obtained was 7.7% at a flowrate of 0.03 mL / min with 1.7 g of biocatalyst. The reuse of the reaction media in 6 cycles – with low loss of activity among cycles –, allowed to increase the conversion to 50%. This proof-of-concept demonstrates that low viscous DES-buffer media can be used in continuous processes with immobilized enzymes, opening promising options for sustainable chemical processes.

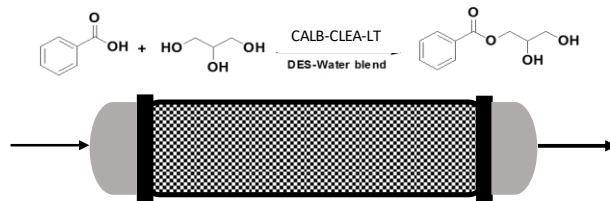


Figure 1: Continuous bioreactor to produce α -MBG using low viscous DES-buffer as reaction media and catalyzed by CALB-CLEA-LT.

Acknowledgement:

Financial support from Fondecyt Project N° 11150215 (Chile).

References:

- [1] Domínguez de María, P., Hollmann, F., *Frontiers in Microbiology* **2015**, 6, 1257.
- [2] Guajardo, N., Domínguez de María, P., *ChemCatChem*, **2019**, 11, 3128-3137.
- [3] Guajardo, N., Schrebler R.A., Domínguez de María, P., *Bioresource Technology* **2019**, 273, 320-325.
- [4] Guajardo, N., Ahumada, K., Domínguez de María, P., Schrebler R.A *Biocatalysis and Biotransformations* **2019**, 37, 106-114

Presentación Oral 12

Biochemical characterization of a novel thermostable amine-transaminase from Antarctica

Sebastián L. Márquez-Miranda^{1,2}, Jenny M. Blamey^{1,2*}

¹ Facultad de Química y Biología, Departamento de Biología, Universidad de Santiago de Chile

² Fundación Científica y Cultural Biociencia, Santiago, Chile

*Corresponding author: jenny.blamey@usach.cl

Amine-transaminases (ATAs) are enzymes that catalyze the reversible transfer of an amino group between primary amines and carbonyl compounds (generally ketones) that have been widely studied in the last decades for their application in stereoselective synthesis of chiral amines, one of the most valuable building blocks for the production of pharmaceuticals. Advantageous properties such as excellent enantioselectivity, high catalytic constants, the use of low-cost substrates and no need for cofactor recycling has turned these enzymes into an excellent biocatalytic alternative to the conventional methods of chemical synthesis for obtaining chiral amines. Nevertheless, the number of these enzymes that can be applied directly in industrial processes remains limited because most currently available ATAs are scarcely tolerant to harsh reaction conditions such as high temperatures and the presence of organic solvents and also suffer from unfavorable equilibrium.

A novel (*S*)-amine-transaminase was discovered in a thermophilic microorganism screened and isolated from an antarctic environmental sample (*Albidovulum* sp. SLM16). The gene encoding the transaminase was identified in the genome of the microorganism, cloned and overexpressed in *Escherichia coli* for biochemical characterization. The optimum temperature and pH for the recombinant ATA activity were 65 °C and 9.5, respectively. The enzymatic activity under optimal conditions was 33 U/mg and the catalytic efficiency (k_{cat}/K_M) for the transamination of (*S*)- α -methylbenzylamine and pyruvate as substrates was 55.8 s⁻¹mM⁻¹. Purified ATA_SLM16 eluted with an apparent molecular of 75 kDa on size exclusion chromatography and subunits were estimated to be ~37 kDa by SDS-PAGE, suggesting a homodimeric structure. The enzyme showed low substrate/product inhibition and good tolerance to organic solvents. Additionally, the substrates specificity was in good agreement with the expected theoretical behavior for (*S*)-amine-TAs. Finally, the enzyme turned out to be exceptionally thermostable, keeping 80 % of its activity after 5 days of incubation at 50 °C. The obtained results indicate that ATA_SLM16 is an excellent candidate for potential applications in biocatalytic synthesis of chiral amines at high temperatures.

Acknowledgements: INACH, Programa Formación de Capital Humano Avanzado, CONICYT.



Presentación Oral 13

Mejoramiento del rendimiento y la selectividad de la reacción de síntesis de lactulosa con β -galactosidasa de *Bacillus circulans*

Carla Aburto¹, Claudia Ubilla¹, Nicolás Ramírez¹, Carlos Vera² Andrés Illanes¹, Cecilia Guerrero^{1*}

¹ Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

² Departamento de Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.

*Autor correspondiente cecilia.guerrero@pucv.cl

La lactulosa (4-O- β -D-galactopiranosil-D-fructofuranosa) es un disacárido sintético reconocido como prebiótico. Es ampliamente utilizado como nutracéutico y fármaco para el tratamiento del estreñimiento crónico, la encefalopatía hepática, la prevención de tumores y la regulación de los niveles de glucosa e insulina en la sangre. La producción industrial de lactulosa es aún realizada por síntesis química a pesar de las ventajas que ofrece la biocatálisis. Ello motiva una constante búsqueda de nuevas enzimas que alcancen altos rendimientos de síntesis de lactulosa. Así, el propósito de este trabajo fue evaluar el desempeño de la enzima β -galactosidasa de *Bacillus circulans*. Para ello, se evaluó el impacto de las variables operacionales: pH (4.0 – 7.0), temperatura (30 – 60 °C), concentración inicial de azúcares totales (30 – 60 % p/p), razón enzima/sustrato (50 – 400 UI·g⁻¹) y razón molar fructosa-lactosa, F/L (1 – 20) en la productividad (π_{Lu}), selectividad (S_{Lu}) y rendimiento (Y_{Lu}) de síntesis de lactulosa. Los resultados obtenidos mostraron que sólo la concentración inicial de azúcares totales y F/L tuvieron efectos significativos en los parámetros π_{Lu} , S_{Lu} y Y_{Lu} . F/L fue la variable de mayor relevancia (**Figura 1**), obteniéndose los mejores resultados a F/L de 20, siendo $Y_{Lu} = 0.54$, $\pi_{Lu} = 0.043$ g·h⁻¹·mg⁻¹ y $S_{Lu} = 30.9$. A F/L de 8 y 12 también se obtuvieron buenos valores de π_{Lu} y Y_{Lu} de modo que debe ponderarse la reducción en S_{Lu} con el menor consumo de fructosa.

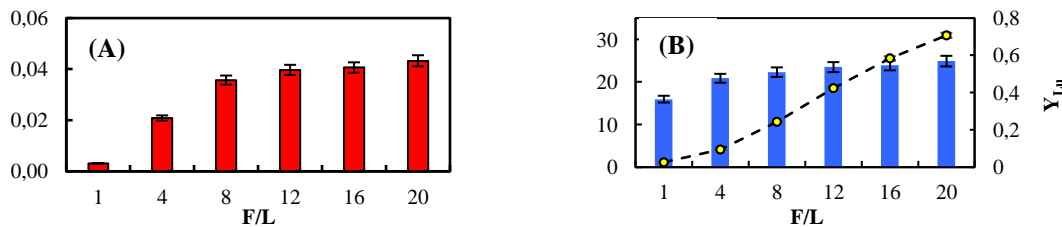


Figura 1: Efecto de la razón molar fructosa-lactosa en: **(A):** Productividad de lactulosa (π_{Lu} , g Lu·h⁻¹·mg⁻¹); **(B):** rendimiento de lactulosa (Y_{Lu}) (barras azules) y selectividad de transgalactosilación (S_{Lu}) (círculos amarillos). Los rendimientos alcanzados con β -galactosidasa de *B. circulans* son mayores que los obtenidos con enzimas de otros orígenes en condiciones similares, pudiendo considerarse una buena alternativa para la producción de lactulosa.

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt 1190104, 11180282 y Beca Posdoctoral DI 37.0/2019 PUCV.

Presentación Oral 14

Discovery and production of carbohydrate esterases (CE) from fungal genomes and their potential industrial applications

Felipe Venegas^{1,2*}, Justin Powlowski^{1,2}

¹Center for Structural and Functional Genomics, Concordia University, Montreal, Canada.

²Department of Chemistry and Biochemistry, Concordia University, Montreal, Canada

* Corresponding author: venegas.fa@gmail.com

In plant biomass, hemicelluloses are the second most abundant type of polysaccharide, corresponding to 30-40% of plant biomass. Due to their composition (pentose and hexose sugars) they may be used for various industrial applications. Some examples are: second generation biofuels (non-food crops biomass, generated for instance from forestry industrial waste), the synthesis of biodegradable films for biomedical applications or food preservation; or the production of chemical building blocks such as hydroxymethylfurfural used as a precursor in the synthesis of new plastics like polyethylene furanoate (PEF). A detailed understanding of the structural features of hemicelluloses is important in order to understand their properties, which in turn impact their potential applications.

Xylans, xyloglucans and mannans are the three types of hemicellulose found in plant cell walls. The first corresponds to chains of xylose units randomly substituted with (methyl)glucuronic acid and/or arabinose. Xyloglucans are composed of chains of glucose substituted with xylose, which at the same time can be substituted with fucose and/or galactose. Finally, mannans correspond to chains of mannose, formed into polymers alone or with glucose and/or galactose (glucomannans, galactomannans, galactoglucomannans) units. In all cases these polymers are also commonly decorated with acetyl groups. Acetylation influences not only their biological and structural functions¹, but it is also important when considering rheological properties or hemicellulose saccharification².

The production, activity screening, purification (in some cases) and characterization of fungal carbohydrate esterases (CEs) deacetylating hemicelluloses will be addressed. Particular emphasis will be placed on Proton Nuclear Magnetic Resonance (¹H-NMR) and Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry (MALDI-MS) applied to detect carbohydrate acetylation/deacetylation patterns in Aspen xylan oligosaccharides, Arabidopsis xylan, Arabidopsis xyloglucan oligosaccharides and konjac glucomannan considering how these tools can be used to track hemicellulose deacetylase activity. CEs (CAZy database³) from families 5 and 16, and their enzymatic specificity/ability to deacetylate natural-model hemicelluloses (and/or their oligosaccharides) is discussed.

Acknowledgements: Funding came from NSERC (Natural Sciences and Engineering Research Council) Industrial Biocatalysis Network (IBN) and the Genozymes project (Genozymes for Bioproducts and Bioprocesses Development) from Genome Canada, Genome Quebec, and Genome Alberta.

References:

¹ Joseleau, J.P., Pérez, S., Complex polysaccharide nano-composites. *Glycopedia*, **2014**, <https://www.glycopedia.eu/e-chapters/the-plant-cell-walls/>

² Pawar, P.M., Koutaniemi, S., Tenkanen, M., Mellerowicz, E.J., Acetylation of woody lignocellulose: significance and regulation. *Frontiers in Plant Science* **2013**, 4,118.

³ Lombard, V., et al., The carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Research* **2014**, 42 (Database issue): p. D490-5.



Presentación Oral 15

Síntesis de butil- β -D-galactósido en el medio de reacción ternario: 1-butanol/acetona/agua

Diego Ahumada¹, Cecilia Guerrero², Carlos Vera^{1*}

¹ Universidad de Santiago de Chile. Facultad de Química y Biología, Chile

² Pontificia Universidad de Santiago de Chile, Escuela de Ingeniería Bioquímica, Chile

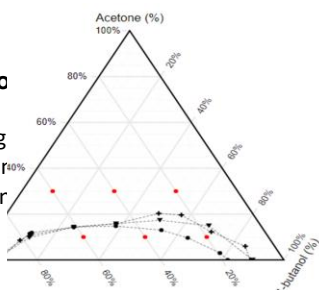
*Autor correspondiente: carlos.vera.v@usach.cl

Las β -galactosidasas, además de catalizar la reacción de hidrólisis de la lactosa, pueden catalizar reacciones de transgalactosilación. Estas últimas, han ganado interés recientemente, porque permiten obtener una amplia gama de productos de alto valor agregado utilizando un sustrato donador de muy bajo costo como la lactosa y una enzima robusta, segura y comercialmente disponible a gran escala como la β -galactosidasas. En este trabajo, se utilizó 1-butanol y lactosa como sustratos para la síntesis de butil- β -D-galactósido (BG), el cual presenta aplicaciones como precursor en síntesis orgánica y solubilizante en productos de limpieza y anticorrosivos.

El mayor desafío en la síntesis de BG radica en la diferencia de polaridad de los sustratos lo que limita su disponibilidad en el medio de reacción. El 1-butanol es parcialmente miscible en agua y la lactosa presenta una moderada solubilidad en medios acuosos y más baja aún en medios orgánicos. Por este motivo, en este trabajo se estudió el uso de acetona como cosolvente. Así, inicialmente se caracterizó el equilibrio líquido-líquido del sistema 1-butanol/acetona/agua (conteniendo tampón McIlvaine 50 mM pH 4,5 y lactosa 5 g/L) a 30, 40 y 50 °C (ver ejemplo en Figura A). Estos resultados, permitieron definir las zonas donde el sistema se comporta de manera mono- y bi-fásica. Para evaluar el efecto del número de fases y la concentración de los sustratos y el cosolvente en la síntesis de BG con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* se seleccionaron las condiciones indicadas en rojo en la Figura 1. Los resultados obtenidos en la síntesis de BG a las condiciones evaluadas son mostrados en la Tabla 1. Los mejores resultados en términos de rendimiento fueron obtenidos siempre en el sistema monofásico a altas concentraciones de los solventes orgánicos, donde se alcanzó un rendimiento máximo de 0.77 mol/mol. Se concluye que la adición de acetona como cosolvente favorece la síntesis de BG, ya que aumenta la disponibilidad del sustrato aceptor (1-butanol) y disminuye la actividad de agua, deprimiendo la hidrólisis de BG.

a A. Diagrama ternario

(Círculo), tampón (Triángulo), más lactosa (cruz). En rojo se seleccionaron para los ensayos de síntesis de BG.



1. Síntesis de butil- β -galactósido a 30°C

Síntesis bifásica		Síntesis monofásica	
Agua/Acetona/1-Butanol	Rendimiento (mol/mol)	Agua/Acetona/1-Butanol	Rendimiento (mol/mol)
20/10/70	0.689739001	20/30/50	0.772723614
40/10/50	0.378388016	40/30/30	0.460240626
60/10/30	0.274621994	60/30/10	0.309575544

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt Iniciación 11180282 y Fondecyt 1190104.

Presentación Oral 16

Diseño de nuevos derivados de feniletilamina como potenciales inhibidores del transportador de dopamina

Luis Dinamarca^{1*}, Agustín Robles¹, Edwin Pérez¹, Jorge Campusano², Angélica Fierro¹.

¹ Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: ladinamarca@uc.cl

El sistema monoaminérgico (SM) se encarga de procesos cruciales en el desarrollo, sobrevivencia y reproducción de diversos insectos. Las aminas biogénicas: dopamina (DA), serotonina (5-HT), octopamina (OA) y tiramina (TA), cuyas concentraciones extracelulares son reguladas por diversos transportadores (DAT, SERT y OAT), cumplen funciones relevantes en las conductas mencionadas anteriormente. En nuestro grupo se están realizando estudios, experimentales y computacionales, con la finalidad de describir de mejor manera el sistema monoaminérgico en *Drosophila melanogaster* como insecto modelo en el proceso de oviposición. Los antecedentes estructurales obtenidos han sido utilizados para el diseño de nuevos ligandos de los transportadores de monoamina. Así, dos nuevos derivados de feniletilamina, β -fluor-feniletilamina y p -cloro- β -fluor-feniletilamina, fueron estudiados *in silico* mediante acoplamiento molecular y dinámica molecular. Los complejos formados con el transportador de dopamina indicaron energías de formación favorables (-5.36 y -6.01 kcal/mol respectivamente). Posteriormente mediante dinámica molecular convencional de 1,5 μ s y cálculos de MM-PBSA se obtuvieron las energías libres de unión proteína-ligando.

Una vez realizado el estudio computacional, se realizaron estudios *in vivo* para evaluar el efecto de estos compuestos sobre el proceso de oviposición en *Drosophila melanogaster*, utilizando cuatro cepas diferentes de esta mosca (W1118, CS, T β h y DAT6), observando que en las cuatro cepas ambas moléculas generan una disminución en la oviposición. Se concluye que la manipulación o perturbación del sistema monoaminérgico, generan un impacto negativo en la postura de huevos de insectos expuestos a ambos compuestos sintéticos, pudiendo generar un control sobre la reproducción del insecto. Adicionalmente se obtuvieron nuevos datos sobre el sistema monoaminérgico en insectos y dos nuevos posibles ligandos del transportador de dopamina en *Drosophila melanogaster* que podrían concordar con los datos obtenidos para inhibidores de la recaptura (bloqueadores de DAT).

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1161375.

Presentación Oral 17

Unveiling the sequence and structure features enabling enzymatic degradation of PET at low temperatures

Paula Blázquez¹, Pablo Galaz-Davison¹, Felipe Engelberger¹, Victoria Guixé², Wolfgang Zimmermann³, Marcos Sotomayor⁴, César A. Ramírez-Sarmiento^{1,*}

¹Institute for Biological and Medical Engineering, Schools of Engineering, Medicine and Biological Sciences, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

³Institut für Biochemie, Universität Leipzig, Leipzig, DE

⁴Department of Chemistry and Biochemistry, The Ohio State University, Columbus, OH, USA

*Corresponding author: cesar.ramirez@uc.cl

Polyethylene terephthalate (PET) is a highly consumed plastic with an annual production of 50 million tons, but its low biodegradability leads to its high accumulation as waste. However, several hydrolases with PET degradation activity have been found in thermophilic fungi and bacteria, whose optimal activities at high temperatures are due to PET becoming more accessible for enzymatic degradation. Strikingly, it has been recently described that a PET hydrolase from *Ideonella sakaiensis* (termed PETase) degrades PET at room temperature. This enzyme could be cornerstone for the efficient treatment of PET waste worldwide, wherefore it is crucial to understand the molecular basis of its activity at lower temperatures. Here, the crystal structure of PETase was determined at 2.02 Å. Then, it was observed via molecular dynamics that the active site of PETase has higher flexibility at room temperature than thermophilic hydrolases. This flexibility is controlled by a novel disulfide bond in its active site, which stabilizes its catalytic triad and is relevant for enzyme activity. Lastly, molecular docking of a model substrate predicts that PET binds in a unique conformation due to key substitutions within its active site, whose energetic contributions to PET binding have been experimentally validated.

Reasoning that other enzymes could also degrade PET at room temperature, two PET hydrolases from Antarctic organisms were identified and biochemically characterized. These enzymes exhibit high degradation activity against polycaprolactone and potential degradation of PET films at room temperature. The reported results are valuable for rationally increasing the PET degradation efficiency of PETase and similar enzymes.

Acknowledgements:

INACH RG-47-16, INACH DG-11-18

References:

Fecker, T., Galaz-Davison, P., Engelberger, F., Narui, Y., Sotomayor, M., Parra, L. P., Ramírez-Sarmiento, C. A., Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase. *Biophysical Journal* **2018**, 114(6), 1302-1312.

Presentación Oral 18

Engineering anchor peptides for polymer and plant surfaces

Felix Jacob^{1*}, Ulrich Schwaneberg²

¹ DWI – Leibniz-Institut für Interaktive Materialien e.V., Forckenbeckstr. 50, 52056, Aachen, Germany

*Corresponding author: email @ f.jakob@biotec.rwth-aachen.de

Anchor peptides enable the attachment of functional building blocks, e.g. enzymes, microgels, or particles to synthetic and natural polymers at ambient temperature in water. Wherein, protein engineering allows to tune interactions and to generate responsive hybrid materials based on functional building blocks. Research focusses on the identification and engineering of anchor peptides for polymer and plant leaf applications [1, 2]. Application areas comprise the functionalization of textiles including antimicrobial properties and dyeing, as well as the immobilization of microgels and antifungal proteins on plant leaves for efficient nutrient (foliar fertilization) and pesticide supply [3].

Foliar fertilization is already commonly used in areas such as viticulture, when the leaves on the vines turn yellow due to a mineral deficiency. A rainfasten and continues nutrient (Fe^{3+}) release system was developed and validated on the example of iron deficient cucumber plants. Microgel-containers were loaded with iron and a slow iron release was achieved. The surface of the microgels was decorated with anchor peptides binding securely to leaf surfaces to hinder rinsing away of the microgels. Yellow leaves of iron-deficient cucumber plants rapidly turned green in spots where the new rainfasten foliar fertilization system was applied.

In this presentation, an anchor peptide-based toolbox for green and versatile functionalization of polymer and plant surfaces will be presented.

References:

- [1] Rübsam, K., Stomps, B., Böker, A., Jakob, F., Schwaneberg, U., Anchor peptides: A green and versatile method for polypropylene functionalization. *Polymer* **2017**, 116, 124-132.
- [2] Rübsam, K., Weber, L., Jakob, F., Schwaneberg, U., Directed evolution of polypropylene and polystyrene binding peptides. *Biotechnology and Bioengineering* **2018**, 115, 321-330.
- [3] Meurer, R. A., Kemper, S., Knopp, S., Eichert, T., Jakob, F., Goldbach, H. E., Schwaneberg, U., Pich, A., Biofunctional microgel-based fertilizers for controlled foliar delivery of nutrients to plants. *Angewandte Chemie* **2017**, 56, 7380-7386.





Jbiocat

II JORNADA DE BIOCATÁLISIS

Presentaciones en formato Póster



Temática 1: Ingeniería de Proteínas

Póster 1

Identification and characterization of the regulatory iron binding site from the *Acidithiobacillus ferrooxidans* transcription factor FUR.

Yerko Argandoña, Patricia Obando, Francisco Imas, Claudia González, Andrea Olivos, Mauricio Arenas-Salinas.

Póster 2

Caracterización y estandarización de la sobreexpresión de transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* en organismos GRAS.

Francisco Imas, Yerko Argandoña, Claudia González, Mauricio Arenas-Salinas.

Póster 3

Expresión heteróloga del cDNA de la mirosinasa de *Brassica oleracea* var *italica* en *Saccharomyces cerevisiae*.

Noelia Castillo, Carolina Curiqueo, Juan Román, Andrea Mahn, Antonio Castillo.

Póster 4

Expresión del cDNA de la enzima mirosinasa de *Brassica oleracea* var *italica* en *Escherichia coli*.

Juan Román, Noelia Castillo, Carolina Curiqueo, Andrea Mahn, Antonio Castillo.

Póster 5

Engineering and immobilization of Siie adhesin from *Salmonella enterica*.

Fernanda Contreras, J Andrés Rivas Pardo.

Póster 6

Determinación de la actividad específica de la enzima mirosinasa en vegetales crucíferos.

Cristian Erazo Palma, Noelia Castillo Barría, Andrea Mahn Osses.

Póster 7

Estudio de la interacción mirosinasa-glucosinolatos en inflorescencia de brócoli, para mejorar las condiciones de hidrólisis y de cuantificación de glucosinolatos totales.

Raidel Comet, Noelia Castillo, Javiera Osorio, Andrea Mahn.

Póster 8

Mejora en la termoestabilidad de una xilanasa activa en frío mediante la ingeniería de proteínas.

Luis Pinuer, Juan Asenjo, Loreto Parra Atala.

Póster 9

Diseño y búsqueda de drogas con acción en los receptores de vasopresina y de oxitocina con potencial terapéutico como antidepresivos o antiadictivos.

Carol Vidal, Juan Román, Andrea Mahn, Georgina Renard, Miguel Reyes-Parada.

Póster 10

Platform for covalent polymerization and immobilization of proteins.

Andrea San Martín, Fernanda Contreras, J Andrés Rivas Pardo.

Póster 11

Mal plegamiento de proteínas como mecanismo común de toxicidad de metal(oid)es blandos en *Escherichia coli*.

María Paz Sandoval-Díaz, Fabián Cornejo, Claudio Vásquez, Felipe Arenas-Salinas.

Póster 1

Identification and characterization of the regulatory iron binding site from the *Acidithiobacillus ferrooxidans* transcription factor FUR

Yerko Argandoña¹, Patricia Obando¹, Francisco Imas¹, Claudia González¹, Andrea Olivos¹, Mauricio Arenas-Salinas^{*1}.

1. Centro de Bioinformática, Simulación y Modelado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Talca. Talca. Chile

*Corresponding author: email: mauricioa@gmail.com

Acidithiobacillus ferrooxidans is a bacterium of biotechnological interest due to its particular physiological properties. It has the ability to gain energy from the oxidation of iron (Fe^{2+}), and lives in an acidic environment (pH 2) that can have very high concentrations of iron. *A. ferrooxidans* has developed a highly efficient system to regulate iron homeostasis, maintaining intracellular concentrations of iron to prevent oxidative stress damage and balancing the availability of iron as an essential micronutrient versus its use as an energy source (1).

One of the key components involved is the transcription factor Fur (Ferric Uptake Regulator) in charge of sense and respond to fluctuations in iron availability, mainly through iron-sensing. In *E. coli*, FUR regulates the expression of more than 100 genes that are implicated in iron transport and storage, ROS resistance, and pathogenicity. The capability to be a global regulator, makes it an attractive putative therapeutic target for antibacterial drugs (2).

Fur from *A. ferrooxidans* (Fur_{AFE}) has the capacity to regulate genes associated with a variety of cellular functions like metal trafficking (e.g. *feoPABC*, *tdr*, *tonBexbBD*), utilization (e.g. *fdx*, *nif*), transcriptional regulation (e.g. *phoB*, *irr*, *iscR*) and redox balance (*grx*, *trx*, *gst*), but information about its structural properties is scarce. Fur is present in many bacterial groups and has been observed to respond to differences in iron concentration, being activated by binding Fe^{2+} . Additionally, it has the ability to recognize and bind to a 19 bp palindromic nucleotide sequence (fur box) located near the promoter region of genes under its regulation (3, 4).

Using biophysical analysis and bioinformatic predictions, it was possible to characterize the metal-binding sites and determine the critical amino acids for functioning. It was determined that Fur_{AFE} binds one zinc atom and four iron atoms per monomer. Bioinformatic approaches predicted three possible metal binding sites where the residue Cys145 and His93 are key to protein functioning, as demonstrated by EMSA analyzes.

References:

1. Ingledew, W.J., *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochimica et Biophysica Acta* **1982**, 683,89-117.
2. Bagg, A., Neilands, J.B., Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **1987**,26(17):5471–5477.
3. Quatrini, R., Lefimil, C., Holmes, D.S., Jedlicki, E., The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **2005**,151(Pt 6):2005–15.
4. Deng Z, Wang Q, Liu Z, Zhang M, Machado ACD, Chiu T-P, et al. Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nature Communications* **2015**, 6, 7642.

Póster 2

Caracterización y estandarización de la sobreexpresión de transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* en organismos GRAS

Francisco Imas¹, Yerko Argandoña¹, Claudia González¹, Mauricio Arenas-Salinas^{1*}.

1. Centro de Bioinformática, Simulación y Modelado. Facultad de Ingeniería. Universidad de Talca. Talca. Chile

*Autor correspondiente: email: mauricioa@gmail.com

La transglutaminasa (EC 2.3.2.13) es una enzima aciltransferasa que cataliza la formación de un enlace iso-peptídico entre el grupo carboxiamida de glutamina (residuo donante) y el grupo amina de diversos aminoácidos (residuo aceptor). Fue descubierta en 1959 en el hígado de *Cavia porcellus* y posteriormente en diversas especies que incluyen mamíferos, insectos, plantas y microorganismos. Se determinó que en su sitio activo existen tres residuos responsables de la catálisis (Asp, His, Cys). Adicionalmente, se sabe que la transglutaminasa de microorganismos no depende de ningún cofactor enzimático a diferencia de organismos superiores que son dependientes de calcio.

Actualmente, esta enzima es de gran interés para la industria biotecnológica. La transglutaminasa de *Streptomyces mobaraensis* se utiliza en la preparación de una gran variedad de alimentos como embutidos cárnicos, kanikama, masas, etc. para mejorar su textura y estabilidad, manteniendo la calidad nutricional del producto. Esta enzima forma parte del listado de enzimas aceptadas en el 'Codex Alimentarius', por lo que está reconocida como un aditivo seguro. Esta enzima presenta una funcionalidad óptima a 20 - 40 °C y a pH 6.0 – 7.0 por lo que sus aplicaciones industriales están limitadas a estas condiciones. Mediante herramientas bioquímicas y bioinformáticas se busca encontrar los residuos claves para poder mejorar el funcionamiento de la enzima en rangos de temperatura y pH más adecuados para aplicaciones industriales.

Para esto, en el presente trabajo se presenta la implementación y estandarizado de un sistema de sobreexpresión para obtener y purificar la transglutaminasa de *S. mobaraensis* en un sistema heterólogo. Para ello se utiliza la bacteria *Bacillus subtilis* 168 como hospedador ya que es un organismo reconocido como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA, por lo que puede ser utilizado directamente en la producción de alimentos.

Esta bacteria posee un mecanismo donde una ribonucleoproteína (denominada SRP) reconoce una secuencia de aminoácidos específica (péptido-síntesis) y la dirige a una vía de secreción de proteínas. De esta manera, se introdujo el gen codificante para la transglutaminasa en un vector comercial inducible por IPTG que permite la purificación de la enzima desde el medio de cultivo gracias a la presencia de un péptido señal reconocido por *Bacillus*. Se evaluaron diversas condiciones de clonamiento, crecimiento, sobreexpresión, purificación y análisis de la actividad enzimática, las cuales permitieron determinar las condiciones óptimas para la producción de la proteína en escala de laboratorio.

Póster 3

Expresión heterológica del cDNA de la mirosinasa de *Brassica oleracea* var *italica* en *Saccharomyces cerevisiae*

Noelia Castillo ¹, Carolina Curiqueo², Juan Román ¹, Andrea Mahn ¹, Antonio Castillo ^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Chile

²Departamento de Biología, Universidad de Santiago de Chile, Av. Lib. Bernardo O'Higgins 3660, Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: antonio.castillo@usach.cl

La enzima mirosinasa es una glicoproteína presente en los vegetales de la familia de las *Brassicaceae*, tales como el brócoli, coles de Bruselas, rábano y repollo. Esta enzima es la responsable de la hidrólisis del enlace β -tioglucósido de los glucosinolatos, para dar lugar a la formación de isotiocianatos¹. En el brócoli, *Brassica oleracea* var *italica*, el glucosinolato glucorafanina es el que se encuentra en mayor proporción, el cual al ser hidrolizado da origen a sulforafano, compuesto al cual se le han atribuido propiedades anticancerígenas y antibacterianas².

Las levaduras se utilizan como sistemas de producción de proteínas, debido a su alta tasa de transformación, estabilidad del plásmido y expresión de genes heterólogos. *Saccharomyces cerevisiae* MGY70 es una mutante de delección del gen esencial MOB1 y además contiene un plásmido de mantenimiento, que permite la viabilidad celular antes que se introduzca en el hospedero el plásmido de expresión pMG1. Este plásmido se mantiene de manera estable, incluso en medios de cultivo ricos en nutrientes, optimizando así la producción de biomasa y los rendimientos de la proteína recombinante³.

El objetivo del presente estudio fue expresar el cDNA de la enzima mirosinasa en el sistema de expresión eucariótico de *S. cerevisiae* MGY-70. Para ello, se subclonó el cDNA de la mirosinasa de brócoli en el vector de expresión pMG1. Posteriormente, para la producción de la enzima, se transformó la cepa *S. cerevisiae* MGY70 Δ y se realizó inducción de la expresión de mirosinasa con galactosa, según el método descrito por Geymonat et al. (2007). Se purificó la enzima mediante cromatografía de afinidad con GST y se confirmó su presencia mediante Western Blot. Como resultado se obtuvo un monómero de aproximadamente 60 KDa. Este trabajo entrega resultados preliminares para posteriores estudios de sobreproducción de mirosinasa en biorreactores a mediana o gran escala.

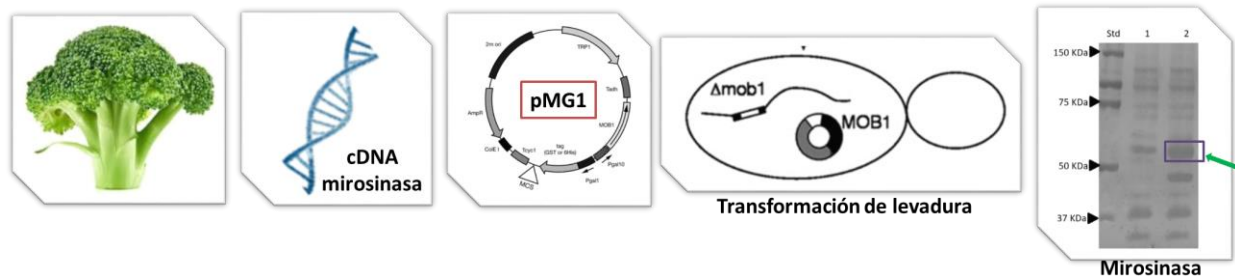


Figura1. Esquema de la expresión del cDNA de la mirosinasa de brócoli en *Saccharomyces cerevisiae* MGY70.

Agradecimientos: Proyecto 081911MO_PAP, Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Santiago de Chile.

Referencias:

1. Román, J., Castillo, A., Cottet, L., Mahn, A. *Food Chemistry* **2018**, 254, 87-94.
2. Mahn, A., Angulo, A., Cabañas, F. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, 62, 11666-11671.
3. Geymonat, M., Spanos, A., Sedgwick S.G. *Gene*. **2007**, 399, 120-128.

Póster 4

Expresión del cDNA de la enzima mirosinasa de *Brassica oleracea* var *italica* en *Escherichia coli*

Juan Román¹, Noelia Castillo¹, Carolina Curiqueo², Andrea Mahn¹, Antonio Castillo^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Química (DIQ), ²Departamento de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Av. Lib. Bernardo O'Higgins 3660, Santiago, Chile,

*Autor correspondiente: antonio.castillo@usach.cl

La enzima mirosinasa (EC 3.2.1.147) es una glicoproteína que pertenece a la familia de las *Brassicaceae*, y cataliza la hidrólisis de glucosinolatos, los cuales son metabolitos secundarios que al ser hidrolizados generan diversos productos¹. En particular, la hidrólisis del glucosinolato glucorafanina genera un metabolito denominado sulforafano, el cual posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y anticancerígenas². Recientemente, se obtuvo la secuencia aminoacídica de la mirosinasa de brócoli y se construyó un modelo teórico de su estructura tridimensional^{3,4}. El objetivo de este trabajo fue expresar el cDNA de mirosinasa de brócoli en *Escherichia coli*, con el fin estudiar las características bioquímicas y cinéticas de la enzima producida en un microorganismo procarionte. Para ello, se subclonó el cDNA de 1749 pb (obtenido anteriormente por PCR utilizando *primers* específicos), en el vector pET-22b (+) y luego se expresó en *E. coli* tal como se muestra en la figura 1. Posteriormente, la mirosinasa producida en *E. coli*, se purificó mediante cromatografía por afinidad aprovechando el tag de polihistidina en el extremo carboxilo del polipéptido. Los resultados revelaron que la enzima producida en *E. coli*, se encuentra presente como un monómero de ~ 54 kDa, y su actividad máxima usando sinigrina como sustrato, se obtuvo a 30°C y pH 3.0. La actividad específica de la mirosinasa producida en *E. coli* fue (6,41 U/mg). El comportamiento cinético de la enzima producida en *E. coli* se ajustó al modelo de Michaelis – Menten. En este trabajo se estudió por primera vez la expresión heteróloga del cDNA de mirosinasa de brócoli en *E. coli*. Los resultados obtenidos podrían permitir diseñar un sistema de sobreproducción de esta enzima a mediana escala.

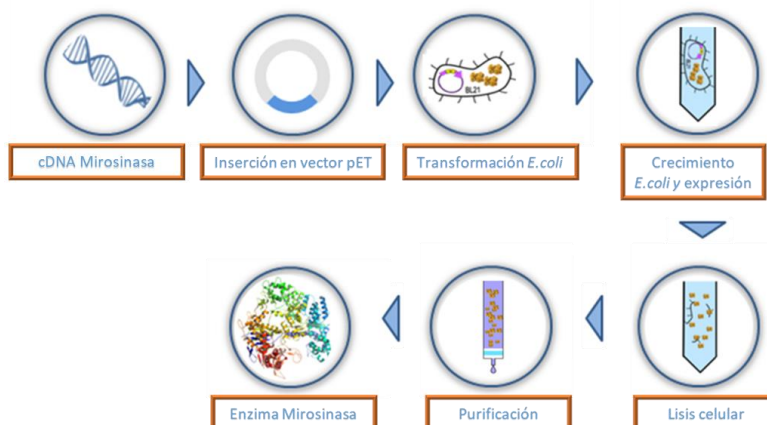


Figura 1. Etapas de obtención de mirosinasa, mediante expresión heteróloga en *E. coli*.

Agradecimientos: Proyectos **081911MO_POSTDOC** y **081911MO_PAP**, Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Santiago de Chile.

Referencias:

1. Bhat, R., Vyas, D., *Critical Reviews in Biotechnology* **2019**, 39, 508-523.
2. Vanduchova, A., Anzenbacher, P., Anzenbacherova, E. *Journal of Medicinal Food* **2019**, 22, 121-126.
3. Roman, J., Castillo, A., Cottet, L., Mahn, A., *Food Chemistry* **2018**, 254, 87-94.
4. Román, J., Castillo, A., Mahn, A., *Molecules*. **2018**, 23, 1313-1327.

Póster 5

Engineering and immobilization of Siie adhesin from *Salmonella enterica*

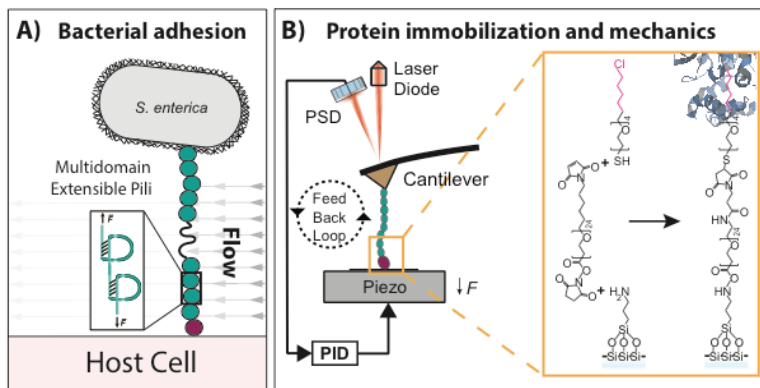
Fernanda Contreras*, J. Andrés Rivas Pardo

¹ Center for Genomics and Bioinformatics, Universidad Mayor, Santiago, Chile

*Corresponding author email: fernanda.contreras.t@usach.cl

Human pathogens, such as *Salmonella enterica*, use multiple strategies to adhere themselves to host cells and other surfaces (1). Specialized surface proteins, known as bacterial adhesin or pili, allow the anchoring of the bacterium withstanding hundreds of picoNewtons of pulling force imposed by the host (1, 2). The mucus flow, peristaltic movements of the gastrointestinal tract, and other cell mechanism are constantly challenging the adhesion of pathogenic bacteria (3). In the Gram-negative *S. enterica*, the Siie is one of the surface proteins that participates in the adhesion to the gastrointestinal epithelium. Siie is a giant protein made of 53 immunoglobulin-like (Blg) domains, which anchors to the cell wall to the epithelium, allowing the adhesion of *Salmonella*. Here, we a short Siie was engineered to allow protein immobilization and evaluate the elasticity of the molecule through atomic force microscopy (AFM). The engineered Siie considers a total of 12 Blg domains, including a HaloTag and a terminal CysTag, for the covalent immobilization on glass. The Siie polyprotein is made of five proximal and seven distal Blg, mimicking the anchoring to the cell wall and host cell. The Siie polyprotein construct was expressed and purified successfully, obtaining a homogenous preparation adequate for protein immobilization. Furthermore, glass was functionalized with Halo-ligand to enable the covalent immobilization of the engineered Siie. This protein anchoring strategy permit to inspect the elasticity of the molecule through AFM. Preliminary data indicate that the molecule is mechanically stable showing protein unfolding above the 100 pN. These findings are the first step to implement new strategies which aim to intervene with the adhesion of human pathogens.

Figure 1. Bacterial adhesion and protein mechanics. (A) *Salmonella enterica* use a 53 Blg domains Siie protein to attach to the host cell during intestinal colonization.



Each Blg domain contains a mechanical clamp which respond to the mechanical physiological perturbation. **(B)** Scheme of the protein immobilization and atomic force spectroscopy experiments. The engineered Siie protein is expressed as a HaloTag fusion molecule, allowing the covalent immobilization on a functionalized glass: 1) amine-silane, 2) glutaraldehyde, and 3) Halo-ligand.

Acknowledgement: This project is funded by Grant FONDECYT Iniciación 11180705

References:

1. Persat, A, et al, The mechanical world of Bacteria. *Cell* **2015**, 161(5), 988-997
2. Contreras, F., Rivas-Pardo, J.A., Interfering with the folding of pili proteins. *Methods in Molecular Biology* **2019** (in press).
3. Proft, T., Baker, E.N., Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria -structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **2009**, 66: 613-635.

Póster 6

Determinación de la actividad específica de la enzima mirosinasa en vegetales crucíferos

Cristian Erazo Palma*, Noelia Castillo Barría, Andrea Mahn.

Laboratorio de Biotecnología de Alimentos, Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: cristian.erazo@usach.cl

Los cultivos vegetales de la familia de las *Brassicaceae* contienen diversos compuestos que presentan beneficios a la salud, que incluyen glucosinolatos (GSL), flavonoides, carotenoides y vitaminas. Los glucosinolatos en sí mismos no son bioactivos pero se convierten en múltiples productos de hidrólisis, incluyendo isotiocianatos y nitrilos, a través de la acción de la enzima mirosinasa endógena. Esta enzima y el sustrato se encuentran separados físicamente, y la hidrólisis es posible una vez que el tejido vegetal es dañado, y la enzima es liberada. Las actividades de mirosinasa de seis diferentes vegetales crucíferos (Brócoli, coles de bruselas, coliflor, rábano, repollo blanco y repollo morado) fueron determinadas. En el caso del brócoli (*Brassica oleracea var. Italica*) se analizó su inflorescencia y para la coliflor (*Brassica oleracea var. Botrytis*) se analizó su inflorescencia y sus hojas. Los extractos proteicos se realizaron mediante la pulverización del vegetal con nitrógeno líquido y parte de este pulverizado fue resuspendido en tampón fosfato de sodio (pH 7). Para realizar la respectiva determinación de la actividad específica, se analizó la cinética de degradación de sinigrina 1mM, donde se incubó el extracto proteico junto con la sinigrina a 40°C. La mirosinasa de rábano, repollo morado y brócoli presentaron las mayores actividades específicas: 0,44749, 0,19364 y 0,17166 ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}\text{proteína}$) respectivamente a esas condiciones. Estos resultados pueden ser relevantes para la producción de alimentos y proporcionar información para el control de la hidrólisis de los glucosinolatos durante la preparación y procesamiento de alimentos.

Póster 7

Estudio de la interacción mirosinasa-glucosinolatos en inflorescencia de brócoli, para mejorar las condiciones de hidrólisis y de cuantificación de glucosinolatos totales.

Raidel Comet¹, Noelia Castillo¹, Javiera Osorio¹, Andrea Mahn^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Química (DIQ), Universidad de Santiago de Chile, Av. Lib. Bernardo O'Higgins 3660, Santiago, Chile

* Autor correspondiente: andrea.mahn@usach.cl

La enzima mirosinasa (β -tioglucosidasa glucohidrolasa; EC 3.2.1.147), presente en los vegetales de la familia *Brassicaceae*, representa un gran interés para la comunidad científica y mercantil, al ser responsable principal de la formación de los isotiocianatos bioactivos a partir de los metabolitos secundarios glucosinolatos, una vez que se producen daños en el tejido vegetal. Desde el punto de vista industrial, es de interés controlar la hidrólisis de los glucosinolatos, por lo que resulta necesario lograr su correcta cuantificación y estudiar su interacción con mirosinasa exógena en diferentes condiciones de razón sustrato-enzima, tiempo, temperatura y condiciones de agitación. El objetivo de este estudio fue determinar las mejores condiciones de hidrólisis enzimática de glucosinolatos totales a partir de inflorescencias de brócoli sometidas a diferentes condiciones de pretratamiento, agitación, temperatura y tiempo de reacción. Se aplicó un diseño experimental multifactorial ($2^2 \times 3^3$), para los factores pretratamiento (inflorescencia fresca o deshidratada), agitación (con y sin), temperatura (25, 40 y 55°C) y tiempo (5, 30 y 55 min), con análisis de superficie de respuesta. Estudios preliminares con estándares del sustrato (sinigrina) y mirosinasa, ambos aislados de *Sinapis alba*, permitieron establecer una relación de 400 μg de sinigrina por unidad enzimática de mirosinasa, encontrándose una posible inhibición por sustrato a cantidades superiores. La hidrólisis de los glucosinolatos se cuantificó por métodos colorimétricos y enzimáticos, mediante la liberación equimolar de glucosa, encontrando el mayor contenido de glucosinolatos totales (27,6 $\mu\text{mol} / \text{g}_{\text{bs}}$ a 55°C), sin agitación y a tiempos de 37 min, para brócoli pretratado, permitiendo establecer condiciones de operación para procesos industriales de degradación enzimáticos y a su vez para establecer un protocolo analítico que permita cuantificar fehacientemente el contenido total de estos sustratos. Los resultados permitieron caracterizar el contenido molar del glucosinolato de interés glucorafanina (cuantificado por HPLC), precursor del anticancerígeno sulforafano, siendo de hasta un 30% en las condiciones ensayadas.

Agradecimientos: Beca Doctorado Nacional 2015 folio 21150164, CONICYT, Chile; Proyecto DICYT código 081711MO USACH, Chile.

Referencias:

1. Román, J., Castillo, A., Mahn, A., *Food Chemistry* **2018**, 254, 87-94.
2. Pérez, C., Román, J., Mahn, A., *Food Chemistry* **2014**, 145, 264-271.
3. Liu, M.S., Ko, M.H., Li, H.C., *International Journal of Molecular Sciences* **2014**, 15, 15188-15209.

Póster 8

Mejora en la termoestabilidad de una xilanasa activa en frío mediante la ingeniería de proteínas.

Luis Pinuer^{1,2}, Juan Asenjo², Loreto Parra Atala^{3*}

¹ Departamento de Ingeniería Química y de Bioprocesos, Facultad de Ingeniería, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

² Centro de Biotecnología y Bioingeniería, CeBiB, Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

³ Instituto de Ingeniería Biológica y Médica, Escuelas de Ingeniería, Medicina y Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: lparrat@uc.cl

Desde hace algunos años, se ha reconocido que las enzimas adaptadas al frío tienen un amplio potencial a nivel comercial y biotecnológico. Las características de las enzimas psicrófilas o activas en frío que potencian su uso en la biotecnología son su alta actividad específica y bajo requerimiento energético, permitiendo una disminución de los costos de operación. Además, en la industria alimenticia son especialmente útiles al reducir las reacciones químicas adversas y la contaminación bacteriana (Kuddus, 2018). No obstante, las enzimas activas al frío suelen presentar inconvenientes para su uso en la industria debido a su corta vida media y baja termoestabilidad (Collins, Gerday, & Feller, 2005). Una de las estrategias por la cual se puede mejorar la termoestabilidad de una enzima es la ingeniería de proteínas, la cual se refiere a la modificación de las características de una enzima a través de la manipulación de su secuencia génica (Kumar, Dangi, & Shukla, 2018; Liu, Xun, & Feng, 2018).

En este estudio se realizaron técnicas de ingeniería de proteína sobre la xilanasa activa en frío XyL-L, aislada de un microorganismo antártico. Se utilizaron dos técnicas de ingeniería de proteínas; la primera de ellas fue la rigidización de sitios flexibles (RFP) mediante el acortamiento secuencial de *loops* expuestos en el sitio catalítico (Dagan et al., 2013; Gavrillov, Dagan, & Levy, 2015), mientras que la segunda fue la delección de dominios accesorios de XyL-L denominados dominios de unión a carbohidratos (CBM) y los respectivos *linkers*. Se utilizó como parámetro la temperatura a la cual se pierde la mitad de la actividad luego de 60 minutos de incubación conocido como parámetro T5060. Los mejores resultados se obtuvieron en las variantes de dominios donde la variante delecionada del dominio CBM está ubicada en el extremo C-terminal (variante Δ CBM22) de XyL-L, lográndose una mejora de 8°C en la T5060 en relación a la enzima original. Los resultados sugieren que la variante Δ CBM22 posee mayor potencial de aplicaciones industriales que la enzima original dado a su mayor termoestabilidad.

Agradecimientos:

Al Departamento de Química de la Universidad Ártica de Noruega, Tromsø, Noruega, por proporcionar los vectores pCOLD. Al proyecto FONDEQUIP EQM160019 por proporcionar el sistema ÅKTA para la purificación de proteínas.

Referencias:

- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* **2005**, 29(1), 3-23.
- Dagan, S., Hagai, T., Gavrillov, Y., Kapon, R., Levy, Y., Reich, Z., Stabilization of a protein conferred by an increase in folded state entropy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2013**, 110(26), 10628-10633.
- Gavrillov, Y., Dagan, S., Levy, Y., Shortening a loop can increase protein native state entropy. *Proteins* **2015**, 83(12), 2137-2146.
- Kuddus, M., Cold-active enzymes in food biotechnology: An updated mini review. *Journal of Applied Biology and Biotechnology* **2018**, 6(3), 58-63.
- Kumar, V., Dangi, A. K., Shukla, P., Engineering thermostable microbial xylanases toward its industrial applications. *Molecular Biotechnology* **2018**, 60(3), 226-235.
- Liu, Q., Xun, G., Feng, Y. The state-of-the-art strategies of protein engineering for enzyme stabilization. *Biotechnology Advances* **2018**



Póster 9

Diseño y búsqueda de drogas con acción en los receptores de vasopresina y de oxitocina con potencial terapéutico como antidepresivos o antiadictivos

Carol Vidal¹, Juan Román¹, Andrea Mahn¹, Georgina Renard², Miguel Reyes-Parada^{2*}

¹Departamento de Ingeniería Química (DIQ), ²Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile, Av. Lib. Bernardo O'Higgins 3660, Santiago, Chile

* Autor correspondiente: miguel.reyes@usach.cl

Se ha trabajado en la búsqueda de drogas que, a través de una acción polifarmacológica, es decir con efectos simultáneos sobre varios receptores farmacológicos, permitan obtener compuestos con acción antidepresiva de alta eficacia y seguridad. En este contexto, los neuropéptidos vasopresina y oxitocina, a través de la activación de sus receptores (V1a, V1b y OXTR, respectivamente) ubicados a nivel del sistema nervioso central, cumplen una función importante en regular la respuesta a la ansiedad, muchas veces de manera antagónica. Además, la oxitocina modula los procesos de adaptación asociados con la adicción, incluidas las respuestas de recompensa, tolerancia, aprendizaje asociativo, memoria y estrés¹. Por su parte, la vasopresina tiene múltiples funciones dentro del cerebro relacionadas con la regulación de los comportamientos sociales, el estrés y las respuestas de ansiedad, todas ellas alteradas por el abuso de drogas². El objetivo de este trabajo fue investigar la interacción entre V1a, V1b y OXTR y drogas de acción polifarmacológica, mediante simulaciones computacionales, con el fin de describir nuevos fármacos con potencial acción antidepresiva. Se estimaron las propiedades fisicoquímicas de los receptores de oxitocina y vasopresina, utilizando herramientas bioinformáticas, obteniendo que el receptor OXTR tiene un punto isoeléctrico de 9,63, masa molecular de 42,771 kDa e índice alifático de 109,67. El receptor V1a tiene un punto isoeléctrico de 9,48, masa molecular de 46,799 kDa e índice alifático de 82,34. El receptor V1b tiene un punto isoeléctrico de 9,21, masa molecular de 46,970 kDa e índice alifático de 101,7. Se generaron modelos estructurales tridimensionales de OXTR, V1a y V1b, a partir de sus secuencias aminoacídicas reportadas en UniProt, mediante el servidor I-Tasser (Figura 1). Finalmente, considerando el concepto de reposicionamiento farmacológico (*repurposing*), que propone la búsqueda de nuevas acciones para drogas conocidas, en este trabajo se realiza la búsqueda de drogas que actúen sobre los receptores de los neuropéptidos mencionados, obteniendo las simulaciones de la interacción *in silico* mediante *docking* molecular, con el fin de encontrar moléculas con capacidad de unirse a los tres receptores o combinaciones de ellos.

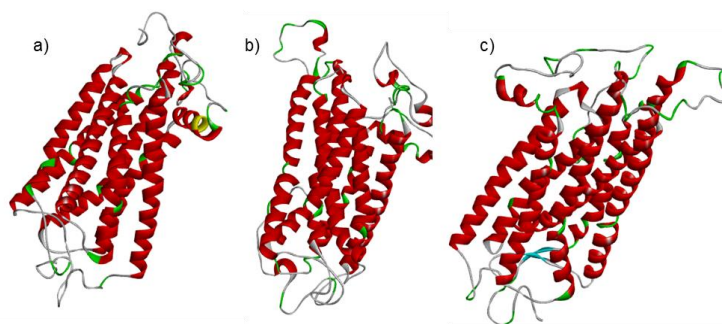


Figura 1: Modelos estructurales tridimensionales obtenidos mediante el servidor I-Tasser³ de los receptores (a) OXTR, (b) V1a y (c) V1b.

Agradecimientos: Fondecyt Proyecto1170962, Universidad de Santiago de Chile.

Referencias:

1. Lee, M., Weerts, E., *Behavioural Pharmacology* **2016**, 27, 640-648.
2. Godino, A., and Renard, G., *Journal of Neuroendocrinology*. **2018**, 30:e12611.
3. Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y., *Nature Methods*. **2015**, 12, 7-8.

Póster 11

Mal plegamiento de proteínas como mecanismo común de toxicidad de metal(oid)es blandos en *Escherichia coli*

Maria Paz Sandoval-Díaz^{1*}, Fabián Cornejo¹, Claudio Vásquez¹, Felipe Arenas-Salinas¹

¹ Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

*Autor correspondiente: maria.sandoval.d@usach.cl

Introducción: Los metal(oid)es blandos son lesivos para la mayoría de los microorganismos y su toxicidad depende de sus propiedades fisicoquímicas y preferencias por ligandos macromoleculares, principalmente proteínas^[1]. La tendencia de los metal(oid)es blandos [Ag(I), As(III), Au(III), Cd(II), Hg(II) y Te(IV)] utilizados en este estudio corresponden a ácidos blandos, los cuales se unen preferentemente vía enlaces covalentes a bases blandas como grupos sulfhidrilo, tioeter, fenilo e imidazol, entre otras^[2]. Esta interacción interfiere con las actividades fisiológicas de proteínas específicas que poseen estos grupos, lo que puede conducir a un plegamiento incorrecto y agregación de proteínas, fenómeno que inclusive ocurre bajo condiciones de ausencia de especies reactivas de oxígeno (ROS).

Metodología: Se analizó y determinó si la exposición a metal(oid)es blandos genera agregados proteicos en *Escherichia coli* en condiciones anaeróbicas, mediante la purificación de agregados proteicos, a través de centrifugaciones diferenciales y posterior evaluación por SDS-PAGE. Los agregados de proteínas obtenidos fueron identificadas y cuantificadas por espectrometría de masa "label free quantification". Posteriormente se evaluó la participación de la agregación proteica en la viabilidad celular de *E. coli* cuando es expuesta a estos metal(oid)es blandos, evaluándose la sensibilidad de mutantes involucrados en la proteostasis celular (proteasa ClpP o chaperona ClpB), mediante ensayos de viabilidad. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y se construyó curvas de crecimiento en presencia de cada uno de los metal(oid)es.

Resultados: Se determinó que ocurre agregación de proteínas cuando *E. coli* es expuesta a los metal(oid)es blandos y se purificó estas proteínas agregadas (Figura 1). Un análisis proteómico determinó que las proteínas agregadas eran principalmente citoplasmáticas y correspondían a proteínas asociadas a rutas metabólicas de biosíntesis, unión a proteínas y unión a metales, entre otras. Por otra parte, se evaluó si los agregados proteicos citoplasmáticos son tóxicos para la célula, mediante la determinación de la participación de la proteasa ClpP y la chaperona ClpB en la proteostasis celular. Se observó que en presencia de la mayoría de los tóxicos las cepas mutantes evaluadas fueron más sensibles que la cepa parental (Figura 2).

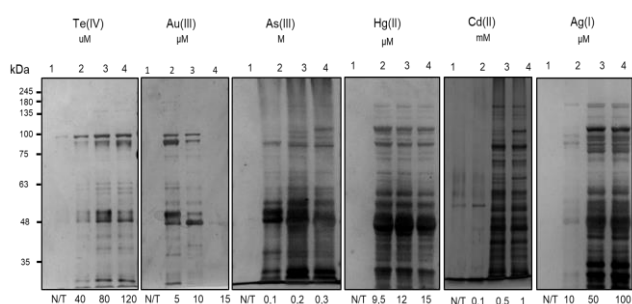


Figura 1. SDS-PAGE de los agregados proteicos.

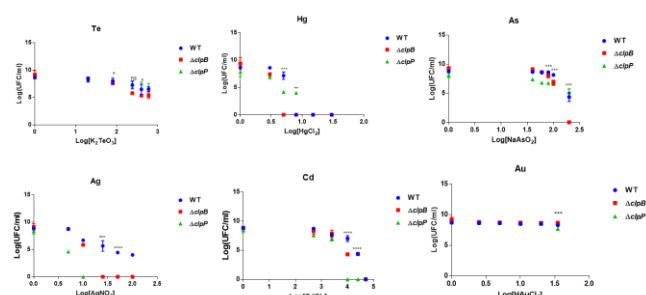


Figura 2. Ensayos de viabilidad WT y mutantes

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT regular 1160051

Referencias: ^[1] Gray, H.B., Biological inorganic chemistry at the beginning of the 21st century. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**, 100(7), 3563-3568.

^[2] Pearson, R.G., Acids and bases. *Science* **1966**, 151(3707), 172-177.

Temática 2: Enzimología Estructural

Póster 12

Hidroximetil-pirimidina-fosfato quinasas realizan doble fosforilación de sustrato en bacterias mesófilas y termófilas.
Gissela Araya, Pablo Cea, Victoria Guixé y Víctor Castro-Fernández.

Póster 13

Anti - Helicobacter pylori activity of the pre-purified proteolytic extract from fruits of Solanum granuloso-leprosum (Solanaceae).
Ángel Gabriel Salinas Ibañez, Diego Balada, Florencia Ferramola, Mauricio Adaro, Diego Vallés, Sonia Barberis, Alba Vega.

Póster 14

Estudios “in vitro” e “in silico” de alquilcatecoles y alquilresorcinoles como potenciales inhibidores de 5-lipoxigenasa humana.
Alejandro Cisterna, Carolina Mascayano, Alejandra Muñoz.

Póster 15

Enzyme catalysis at extreme salt concentrations.
Nicolás Fuentes-Ugarte, Victoria Guixé, Víctor Castro-Fernández.

Póster 16

Kinetic characterization of a halophilic ADP-dependent phosphofructokinase from a new *Archaeal class*.
Amparo Núñez, Víctor Castro, Victoria Guixé.

Póster 17

Mecanismo molecular de acción antibacteriana de acaciaina peptidasa, utilizando técnicas proteómicas y genómicas.
Héctor Gustavo Quiroga, Ángel Gabriel Salinas, María Aida Mattar, Alba Vega, Sonia Barberis.

Póster 18

Estudio de inhibición enzimática de acetofenonas y benzaldehídos frente a 5 lipoxigenasa humana.
Claudia Torrent, Yesseny Vásquez-Martínez, Mauricio Osorio, Carolina Mascayano.

Póster 12

Hidroximetil-pirimidina-fosfato quinzas realizan doble fosforilación de sustrato en bacterias mesófilas y termófilas

Gissela Araya*, Pablo Cea, Victoria Guixé y Víctor Castro-Fernández.

¹Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

* Autor correspondiente: gissela.araya.rojas@gmail.cl

Las hidroximetil-pirimidina-fosfato quinzas (HMPPKs) son enzimas que participan en las vías de rescate y biosíntesis de tiamina (vitamina B1), catalizando dos reacciones relacionadas en pasos consecutivos: la fosforilación de 4-amino-5-hidroximetil-2-metilpirimidina (HMP) para producir HMP-fosfato (HMP-P) y la posterior fosforilación de éste último para generar HMP-pirofosfato (HMP-PP), utilizando ATP como dador de fosfato en ambas reacciones. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las riboquinzas, las cuales presentan un rango amplio de sustratos aceptores de fosfato, los que son todos fosforilados en un grupo hidroxilo. Curiosamente, las HMPPKs, además de ser las únicas en presentar el fenómeno de doble fosforilación, utilizan en la segunda reacción de fosforilación un grupo fosfato como grupo aceptor, en lugar de uno hidroxilo. Se desconocen los mecanismos estructurales que permiten esta segunda reacción. Hasta la fecha, solo se ha probado experimentalmente la doble fosforilación consecutiva de la HMPPK de *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus*. Para probar si este fenómeno de doble fosforilación de HMPPK es un rasgo ubicuo que se encuentra presente en los ortólogos de otras especies bacterianas y si se conserva en organismos que están bajo diferentes presiones evolutivas, se evaluó esta capacidad en dos enzimas distantes filogenéticamente, la HMPPK del mesófilo *Salmonella typhimurium* (StHMPPK) y la del termófilo *Thermus thermophilus* (TtHMPPK). Para esto se purificaron las enzimas y luego se separaron y analizaron sus productos de reacción mediante HPLC, confirmándose la producción de dos productos fosforilados, correspondientes a HMP-P y HMP-PP. Los resultados sugieren fuertemente que ambas enzimas poseen la capacidad de catalizar una reacción de doble fosforilación en HMP y que esta es una característica que se conserva en todas las quinzas de HMPP.

Agradecimientos:

U-inicia UI 2018/23 y Fondecyt iniciación 11181133

Referencias:

Cheng, G., Bennett, E.M., Begley, T.P., Ealick, S.E., Crystal structure of 4-amino-5-hydroxymethyl-2-methylpyrimidine phosphate kinase from *Salmonella typhimurium* at 2.3 Å resolution. *Structure* **2002**, 10(2), 225-235.

Mizote, T., Tsuda, M., Smith, D. D. S., Nakayama, H., Nakazawa, T., Cloning and characterization of the thiD/J gene of *Escherichia coli* encoding a thiamin-synthesizing bifunctional enzyme, hydroxymethylpyrimidine kinase/phosphomethylpyrimidine kinase. *Microbiology* **1999**, 145(2), 495-501.

Póster 13

Anti - *Helicobacter pylori* activity of the pre-purified proteolytic extract from fruits of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae)

Ángel Gabriel Salinas Ibañez¹, Diego Balada¹, Florencia Ferramola¹,
Mauricio Adaro^{2,3}, Diego Vallés⁴, Sonia Barberis^{2,3}, Alba Vega¹

¹ Laboratorio de Microbiología, ² Laboratorio de Bromatología,
Universidad Nacional de San Luis (UNSL), San Luis, Argentina

³ INFAP CCT - San Luis - CONICET. Chacabuco y Pedernera (5700) San Luis, Argentina.

⁴ Laboratorio de Enzimas Hidrolíticas

Univesidad de la República (UdelaR), Montevideo, Uruguay

*Corresponding author: soniaebarberis@gmail.com

Helicobacter pylori is a Gram-negative micro-aerophilic bacteria that selectively colonizes the human stomach and induces the development of pathologies such as chronic active gastritis that can evolve into peptic ulcers or gastric adenocarcinoma [1]. Treatment of the infection includes the use of antibiotics and proton pump inhibitors in triple or quadruple therapies. Therapeutic failure due to the emergence of resistant strains has encouraged the investigation on new compounds against *H. pylori* from plant enzymes, and natural and synthetic compounds [2].

The aim of this work is to evaluate the activity of granulosain, the pre-purified proteolytic extract obtained from the fruits of *Solanum granuloso leprosum* (Dunal), against *Helicobacter pylori* NCTC 11638 and other three strains isolated from gastric biopsies. Fruits of *Solanum granuloso leprosum* were ground using abrasives and centrifuged at 6,656 x g for 30 min at 4 °C. The supernatant was filtered through gauze and the filtrate (crude extract, CE) was stored at - 20 ° C. One volume of CE was mixed with five volumes of cold acetone (- 20 ° C) and stirred gently. Then, the mixture was allowed to stand at - 20 ° C for 20 min, and centrifuged at 16,000 x g for 30 min. The acetonic precipitate was dissolved in one volume of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6) and stored at - 20 ° C. This pre-purified extract was called granulosain. Acetone prevented oxidation and irreversible reactions between enzymes and phenolic compounds of CE. For the antimicrobial activity assays, the pre-purified extract was diluted in the same volume of 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8) and the corresponding volumes were taken. Granulosain from fruits of *Solanum granuloso-leprosum* (Solanaceae) showed 2.47 ± 0.01 mg/mL of total protein content and specific proteolytic activity of 84 ± 0.02 IU/mg of protein in 0.1 M Tris – HCl buffer pH 8, at 37 °C, using Cys (20 mM) as activator.

Anti - *Helicobacter pylori* activity of granulosain (2.44 – 1250 µg of total protein /ml) was tested against a reference strain (*Helicobacter pylori* NCTC 11638) and other three strains isolated from gastric biopsies. The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by plaque microdilution according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), with subsequent culture in Müeller-Hinton agar supplemented with 5 % blood to establish the minimum bactericidal concentration (CBM). Serial dilutions of amoxicillin (Sigma-Aldrich) were used as a control in the sensitivity test. The tests were performed in duplicate. For all studied strains, a MIC of 150 mg/mL and a CBM of 300 mg /mL was obtained, except for the HP661 strain resistant to levofloxacin where a MIC of 300 mg /mL and a CBM of 1250 mg /mL were obtained. These results suggest that granulosain could be used for the alternative treatment of infections caused by *H. pylori*.

References:

[1] Boyanova, L., Hadzhiyski, P., Kandilarov, N., Markovska, R., Mitov, I., *Expert Review of Clinical Pharmacology* **2019**, DOI: 10.1080/17512433.2019.1654858.

[2] Vinasco, K., Mitchell, H.M., Kaakoush, N.O., Castaño-Rodríguez, N., *BBA - Reviews on Cancer* **2019**, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.07.004>

Póster 14

Estudios “*in vitro*” e “*in silico*” de alquilatecoles y alquilresorcinoles como potenciales inhibidores de 5-lipoxigenasa humana.

Alejandro Cisterna*, Carolina Mascayano, Alejandra Muñoz

Universidad de Santiago de Chile, Facultad de química y biología, Departamento de Ciencias del Ambiente, Chile

*Autor correspondiente: alejandro.cisternau@usach.cl

Los leucotrienos (LT) son uno de los mediadores más importantes del proceso inflamatorio, ya que regulan una gran variedad de mecanismos de la respuesta inicial en la inflamación (1). Esto es de gran importancia, ya que esta molécula derivada del ácido araquidónico (AA) es clave en el desarrollo de la inflamación (2), razón por la cual en la actualidad LT y la enzima que cataliza su síntesis, la 5-lipoxigenasa (5-LOX) son un blanco terapéutico de relevancia. Si bien en la actualidad existen varios inhibidores conocidos de 5-LOX, su uso terapéutico es limitado, debido a su inespecificidad y a los efectos secundarios que su uso conlleva (3), siendo la búsqueda de nuevos inhibidores un campo en crecimiento. Actualmente, metabolitos secundarios de origen vegetal como inhibidores de 5-LOX han sido reportados; entre ellos se destaca la molécula “*litreol*”, la cual se extrae de la planta “*Lithraea caustica*” y que en literatura se ha informado que posee interesantes propiedades anti-inflamatorias, encontrándose en este grupo de investigación que es un potente y selectivo inhibidor de 5-LOX. Este metabolito, se destaca por poseer características estructurales similares al sustrato original de la enzima, AA, ya que ambas poseen largas cadenas de carbonos, con la presencia de insaturaciones (4). Es por este motivo, que este estudio se centra en analizar cómo influye la estructura de este ligando en su afinidad por la enzima y con relación con su inhibición, para lo cual se analiza mediante técnicas “*in silico*” como “*docking*” y dinámica molecular en el no equilibrio (SMD), de los distintos derivados sintéticos del “*litreol*”, de distintos largos de cadena y variaciones en el grupo aromático, como resorcinol, metilresorcinol y pirogalol. Estos estudios permitirán determinar cómo estas características estructurales pueden influir en la capacidad de inhibir a 5-LOX.

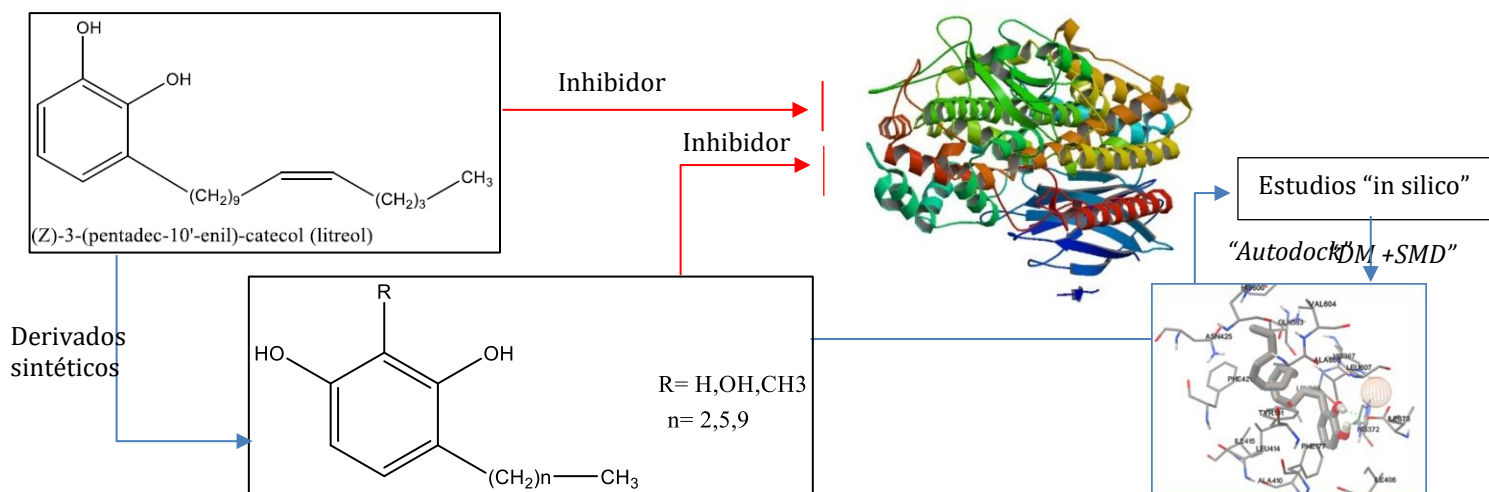


Figura 1. Esquema indicando las modificaciones realizadas para la síntesis de derivados sintéticos del litreol, a analizar mediante las herramientas “*in silico*” autodock y dinámica molecular respecto a 5-LOX.

Referencias

- Mitchell, K.V., Patología humana **2008**, España: Elsevier
- Holtzman, M.J, Arachidonic acid metabolism in airway epithelial cells. *Annual Review of Physiology* **1992**, 54
- Joshi, E.M.H.B, In vitro metabolism of 2-acetylbenzothiophene: relevance to zileuton hepatotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, 17.
- Muñoz, A., Determinación estructural de los metabolitos secundarios de parte aérea de “*Lithraea caustica*” como inhibidores de procesos inflamatorios mediante la inhibición de las enzimas 5-lipoxigenasa y 15-lipoxigenasa. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Chile **2018**.

Póster 15

Enzyme catalysis at extreme salt concentrations

Nicolás Fuentes-Ugarte^{1*}, Victoria Guixé¹, Víctor Castro-Fernández¹

¹ Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile

*Corresponding author: nicolas.fuentes@ug.uchile.cl

Extremophilic enzymes constitute a vast repertoire of attractive biomolecules for industrial applications given their adaptation to function in extreme environments. Among them, halophilic enzymes present several industrial advantages, since they can be used in the presence of organic solvents with no loss of catalytic activity [1]. Moreover, halophilic enzymes, like esterases and lipases, have a wide spectrum of use in industrial applications such as biofuel production, textile processing, waste treatment, and as detergent additives.

However, heterologous expression of these proteins in non-halophilic organisms, like *Escherichia coli*, leads to misfold and inclusion bodies formation which has prompted the search for different refolding strategies [2,3]. In an aim to understand catalysis at high salt concentrations the glucose-6-phosphate dehydrogenase from the extreme halophilic archaea, *Haloferax volcanii* (HvG6PDH) was used. Bioinformatic analysis of HvG6PDH show that the enzyme displays the canonical structural adaptations reported for haloadaptation in *Halobacteria* proteins [4].

The enzyme was express in *E. coli* and purified from inclusion bodies after exploring different refolding strategies. The kinetic parameters were determined in the presence of different salts at different concentrations. The highest activity was obtained in the presence of KCl at a concentration of 1.5 M or higher. KCl and NaCl affected the kinetic parameters differently: while both salts increase the V_{max} , a significant decrease in the K_m value for glucose-6P was observed only in the presence of NaCl, being the effect of KCl in this parameter negligible. These results will contribute to our understanding of enzyme catalysis at high salt concentrations and how the structural adaptations of halophilic enzymes enabled them to perform catalysis.

Acknowledgment: Funding by Fondecyt Project 1191321

References:

- [1] Marhuenda-Egea F.C., Bonete, M.J., Extreme halophilic enzymes in organic solvents. *Current Opinion in Biotechnology* **2002**, 13:385-389.
- [2] Connaris, H., Chaudhuri, J.B., Danson, M. J., Hough, D.W., Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* **1999**, 64(1), 38-45.
- [3] Díaz, S., Pérez-Pomares, F., Pire, C., Ferrer, J., Bonete, M.J., Gene cloning, heterologous overexpression and optimized refolding of the NAD-glutamate dehydrogenase from *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles* **2006**, 10(2), 105-115.
- [4] Sorokin, D. Y., Makarova, K.S., Abbas, B., Ferrer, M., Golyshin, P.N., Galinski, E.A., Koonin, E.V. Discovery of extremely halophilic, methyl-reducing euryarchaea provides insights into the evolutionary origin of methanogenesis. *Nature Microbiology* **2**, **2017**.

Póster 16

Kinetic characterization of a halophilic ADP-dependent phosphofructokinase from a new Archaeal class

Amparo Núñez, Víctor Castro, Victoria Guixé*

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias,
Universidad de Chile, Santiago, Chile.

*Corresponding author: vguixe@uchile.cl

Unlike mesophilic enzymes, enzymes from extremophilic organisms are functional at extreme pH, temperature and salt concentration. These unique characteristics make them biomolecules of high relevance for biotechnological applications, able to overcome limitations found in the use of traditional biocatalysts¹. Halophiles from the Archaea domain provide the main source of extreme halophilic enzymes being organisms from the *Halobacteria* class the most studied. These proteins are characterized for having a negatively charged surface and a small hydrophobic core^{2,3}. However proteins from the *Methanosarcinales* order, show that halophilic protein adaptation can be achieved by an alternative strategy, with no reduction in the hydrophobic core nor a significant abundance of acidic residues at the surface⁴. Recently, a new class of non-cultivable halophilic archaea, named Nanohaloarchaea, was discovered⁵. However, to date there are no studies of their proteins or how they adapt to high salt concentrations. In this work, a protein from an extreme halophilic Nanohaloarquea was characterized. This protein has the conserved sequence motifs associated to the ADP-dependent sugar kinase family and is annotated as a bifunctional enzyme, possessing glucokinase and phosphofructokinase activities. Due to its halophilic character, the protein was expressed using the halophilic archaea *Haloferax volcanii*. The protein was purified, characterized and its structure determined by homology modeling. Only the phosphofructokinase activity could be detected, which increased along with an increment in the concentration of salt (KCl). Unlike other ADP-dependent sugar kinases reported, the Km values for both substrates (fructose-6P and MgADP) were high, being in the order of millimolar. Structurally, the enzyme has the same architecture reported for other ADP-dependent kinases. This characterization will help in subsequent studies regarding protein structural adaptations and in obtaining a better understanding of the haloadaptation mechanism of this novel class of Archaea.

References:

1. Gomes, J., Steiner, W., The biocatalytic potential of extremophiles and extremozymes. *Food Technology and Biotechnology*, **2004**, 42(4), 223-225.
2. Nath, A., Insights into the sequence parameters for halophilic adaptation. *Amino Acids* **2015**, doi:10.1007/s00726-015-2123-x 20.
3. Paul, S., Bag, S.K., Das, S., Harvill, E.T., Dutta, C., Molecular signature of hypersaline adaptation: insights from genome and proteome composition of halophilic prokaryotes. *Genome Biology* **2008**, 9.
4. Gonzalez-Ordenes, F. et al., ADP-Dependent kinases from the archaeal order methanosarcinales adapt to salt by a non-canonical evolutionarily conserved strategy. *Frontiers in Microbiology* **2018**, **9**, 1-15.
5. Emerson, J.B., Brocks, J.J., Heidelberg, K.B., Banfield, J.F., Allen, E.E., De novo metagenomic assembly reveals abundant novel major lineage of Archaea in hypersaline microbial communities. *ISME Journal* **2011**, 81-93.

Póster 17

Mecanismo molecular de acción antibacteriana de acaciaina peptidasa, utilizando técnicas proteómicas y genómicas

Héctor Gustavo Quiroga^{1*}, Ángel Gabriel Salinas², María Aida Mattar², Alba Vega², Sonia Barberis^{1,3}

¹ Laboratorio de Bromatología, ² Laboratorio de Microbiología,
Universidad Nacional de San Luis (UNSL), San Luis, Argentina

³ INFAP CCT - San Luis - CONICET. Chacabuco y Pedernera (5700) San Luis, Argentina.

*Autor correspondiente: gussquiroga@gmail.com

Acacia caven (Mol.) Molina es una planta que crece en Argentina, Chile, y otros países de América del Sur. Su polen está caracterizado y se puede obtener fácilmente y en grandes cantidades. A partir del extracto polínico acuoso, se obtuvo, aisló, purificó y caracterizó una enzima de 75 kDa perteneciente a la familia de las proteasas serínicas denominada acaciaina peptidasa [1]. En estudios preliminares, se evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* de dicha peptidasa, frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos. En dichos estudios se aplicaron concentraciones crecientes de acaciaina peptidasa (0 a 120 mg de proteína total/ml) en los ensayos de actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (MRSA). Se observó que acaciaina peptidasa no produjo inhibición de *E. coli* dentro del rango estudiado, mientras una completa inhibición de *S. aureus* se produjo cuando la concentración proteica fue de 41,5 mg/mL, mientras que hasta 13,8 mg/mL no se observó ningún efecto. La concentración inhibitoria mínima (MIC) fue de 45 µg de proteína total/mL [2].

El objetivo de este trabajo fue estudiar los mecanismos de acción antibacteriana de acaciaina peptidasa de polen de *Acacia caven* (Mol.) Molina Fabaceae, una planta autóctona difundida en la región sudamericana, para su potencial aplicación en la industria alimenticia y farmacéutica.

El polen de *A. caven* ("espinillo") se recolectó manualmente en las sierras de San Luis, Argentina; se protegió de la luz y se mantuvo a temperatura ambiente y en desecador. 6 mg de granos de polen se suspendieron en 100 mL de solución salina (pH 7), y se agitaron lentamente durante 24 h a 4 °C. Se centrifugó a 35.000 rpm durante 1 h y se separó el sobrenadante (extracto crudo). El extracto crudo fue sujeto a varios pasos cromatográficos (DEAE-celulosa en batch, exclusión molecular e intercambio iónico) que llevaron a la purificación de una proteína soluble de 75 kDa (SDS-PAGE) [2]. Se evaluaron los posibles cambios morfológicos y a nivel de membrana celular de *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* ATCC 25923 (MRSA) en presencia de acaciaina peptidasa mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía de fluorescencia (MF). Contrariamente a lo esperado, se observó que la enzima no produjo lisis microbiana ni alteró la pared ni la membrana celular, lo que puso en evidencia que los mecanismos moleculares de inhibición del crecimiento microbiano fueron debidos a la acción de acaciaina peptidasa en otros sitios específicos del metabolismo. Mediante estudios de genómica y proteómica se observó que a concentraciones sub-inhibitorias se produjo la disminución de la expresión a nivel transcripcional de un factor de virulencia clave en la interacción patógeno - hospedador (expresión génica de *isdA*, que codifica para la síntesis de la proteína de superficie reguladora del hierro y le confiere resistencia a antibióticos hidrofóbicos a *S. aureus* MRSA). Además, dicho extracto inhibió la síntesis de 94 proteínas de *S. aureus* (MRSA) con diversas funciones biológicas del metabolismo microbiano, lo que impidió el crecimiento bacteriano. Los resultados obtenidos permiten inferir que acaciaina peptidasa puede ser un agente alternativo, aislado o combinado con otros agentes antimicrobianos aplicados en la industria alimenticia y farmacéutica, a los efectos de facilitar la erradicación de la infección en un contexto de cepas resistentes.

Referencias:

[1] Barcia, C., Coelho, S., Barberis, S., Veríssimo, P., Acaciain peptidase: the first South American pollen peptidase involved in respiratory allergy. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **2019**. Aceptado.

[2] Barberis, S., Quiroga, H., Barcia, C., Talia, J., Debattista, N., Food safety and preservation: Modern Biological Approaches to Improving Consumer Health **2017**, Elsevier, pp. 1-45.

Póster 18

Estudio de inhibición enzimática de acetofenonas y benzaldehídos frente a 5 lipoxigenasa humana.

Claudia Torrent^{1,2*}, Yesseny Vásquez-Martínez^{2,4}, Mauricio Osorio³, Carolina Mascayano¹

¹ Departamento de Ciencias del Ambiente, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Programa Centro de Investigaciones Biomédicas Aplicadas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

³ Laboratorio de Productos Naturales, Departamento de Química, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

⁴ Laboratorio de Virología Molecular y Control de Patógenos, Departamento de Biología.

*Autor correspondiente: clautorrent@gmail.com

Las lipoxigenasas son enzimas que se encargan de catalizar la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Éstas se encuentran implicadas en la cascada del ácido araquidónico, que resulta en la producción de leucotrienos y que está relacionado con la inflamación del organismo (1). Es por esta razón que es importante la búsqueda de nuevos inhibidores, ya que en la actualidad sólo existe un fármaco comercial conocido como zileutón, inhibidor de 5 lipoxigenasa humana (5-hLOX). En el presente estudio, se midió la capacidad de diferentes polifenoles, acetofenonas (serie AC) y benzaldehídos (serie BS), para inhibir la 5-hLOX, debido a que los polifenoles tienen capacidad antiinflamatoria. Además, a estas moléculas se les agregó un grupo prenil, ya que se ha visto que al prenilar algunas moléculas, se genera mayor inhibición frente a 5-hLOX (3). Como resultado, se observa que las moléculas preniladas aumentan la inhibición (Tabla 1) de la actividad de la enzima, siendo ACP1, ACP4 y BSP2 las que generaron mayor inhibición. A estas moléculas, se les realizó estudios enzimáticos, obteniéndose los resultados resumidos en la Tabla 2, en que la molécula ACP1 compite por el sustrato, mientras que ACP4 y BSP2 tienen un mecanismo mixto.

Tabla 1

Moléculas no preniladas	% de inhibición	Moléculas preniladas	% de inhibición
AC1	0	ACP1	79,3
AC2	8.4	ACP2	13,2
AC3	15.6	ACP3	27,1
AC4	22.7	ACP4	55,4
BS1	16.1	BSP1	26,9
BS2	88.8	BSP2	92,1

Tabla 2

Molécula	IC ₅₀	Tipo de inhibición	Ki (µM)
ACP1	2.2	Competitivo	1.917
ACP4	17.4	Mixta	21.1
BSP2	0.3	Mixta	0.21

Agradecimientos: DICYT 021941MC

Referencias:

- (1) Brash, A.R., Lipoxygenases: Occurrence, functions, catalysis and acquisition of substrate. *Journal of Biological Chemistry* **1999**.
- (2) Eleni, P., Dimitra, H.L. Review in quantitative structure activity relationships on lipoxygenase inhibitors, *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2003**.
- (3) Sook, Y., et al., Effects of naturally occurring prenylated flavonoids on enzymes metabolizing arachidonic acid: Cyclooxygenases and lipoxygenases. *Biochemical Pharmacology* **2001**.

Temática 5: Modelación y simulación de procesos enzimáticos

Póster 19

Estudio in silico de la estructura de péptidos de la interfase interdimérica (C1-C4) de FBP1, y su efecto en la actividad enzimática *in vitro*.

Juan Pablo Toledo, Joel Asenjo, Juan Carlos Slebe.

Póster 20

Simulación de la interacción molecular entre las proteínas ESP y NSP y tiorhidroxamato-O-sulfonato.

Dorian González, Juan Román, Mario Inostroza, Andrea Mahn.

Póster 21

Estudio in silico de tiramina como potencial sustrato del transportador de dopamina.

Matías Marambio, Sandra Arancibia-Opazo, Luis Dinamarca, Angélica Fierro.

Póster 22

Estudio de aminas biogénicas en el proceso de oviposición en *Drosophila melanogaster*.

Agustín Robles, Luis Dinamarca¹, Jorge Campusano, Angélica Fierro.

Póster 19

Estudio *in silico* de la estructura de péptidos de la interfase interdimérica (C1-C4) de FBP1, y su efecto en la actividad enzimática *in vitro*

Juan Pablo Toledo, Joel Asenjo*, Juan Carlos Slebe
Instituto de Bioquímica y Microbiología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile
*Autor correspondiente: joelasenjo@uach.cl

La fructosa-1,6-bisfosfatasa (FBP1) es una enzima homotetramérica clave dentro de la vía gluconeogénica y por lo mismo se ha posicionado como un blanco para el tratamiento farmacológico de condiciones como la diabetes mellitus de tipo 2. Diversos fármacos dirigidos contra FBP1 han sido ensayados, pero no han conseguido buena biodisponibilidad en hígado, principal órgano gluconeogénico. FBP1 posee tres alfa-hélices en la interfase C1-C4, las que estabilizan su estructura homotetramérica, además de ser blanco de los moduladores naturales y artificiales de la enzima.

El uso de péptidos como fármacos ha cobrado gran relevancia para el tratamiento de diversas patologías, pero el estudio de las interacciones entre péptidos y proteínas requiere la utilización de herramientas bioinformáticas especializadas.

En el presente trabajo se estudió el uso de péptidos representativos de las tres alfa-hélices de la interfase C1-C4 de FBP1 como moduladores de la actividad de la enzima. Para esto se realizaron modelaciones estructurales de cada péptido, ensayos de *docking* entre FBP1 y cada uno de los péptidos, y ensayos de actividad enzimática en presencia de concentraciones crecientes de ellos. Se logró generar modelos de interacción para cada molécula analizada, a través de un bolsillo presente en FBP1 que a la fecha no había sido descrito. Además se evidenció que el péptido H2 logra aumentar la actividad de la enzima por su interacción con residuos circundantes del sitio activo, mientras que H3 la inhibe ya que la mayor parte de sus interacciones se centra en el sitio de unión de AMP.

Agradecimientos: Al equipo del laboratorio de enzimología molecular del Instituto de Bioquímica y Microbiología de la Universidad Austral de Chile y al financiamiento otorgado por el proyecto FONDECYT No. 1141033; DID-UACH S-2013-45.

Referencia:

Toledo, J.P. Estudio *in silico* de la estructura de péptidos de la interfase interdimérica (c1-c4) de fbp1, putativas interacciones y su efecto en la actividad enzimática *in vitro*, 2019, Tesis de pregrado, Escuela de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Univ. Austral de Chile.

Póster 20

Simulación de la interacción molecular entre las proteínas ESP y NSP y tiorhidroxamato-O-sulfonato

Dorian González¹, Juan Román¹, Mario Inostroza², Andrea Mahn^{1*}

¹Departamento de Ingeniería Química (DIQ), ²Departamento de Informática, Universidad de Santiago de Chile, Av. Lib. Bernardo O'Higgins 3660, Santiago, Chile

*Autor correspondiente: andrea.mahn@usach.cl

La glucorafanina (GFN) es el glucosinolato (GSL) precursor del sulforafano (SFN), el cual presenta propiedades antimicrobianas y anticancerígenas¹. Además de SFN, los glucosinolatos pueden dar origen a nitrilos y epitionitrilos, que son tóxicos. La hidrólisis enzimática de GFN ocurre en dos etapas, y en ella se produce un intermediario inestable: tiorhidroxamato-O-sulfonato, cuya descomposición conduce a la formación de SFN a pH neutro, o a la formación de nitrilos e epitionitrilos, en presencia de las proteínas nitrilo específica (NSP) y epitioespecífica (ESP)² respectivamente, Fe³⁺ y pH ácido³. El objetivo de este trabajo fue estudiar las interacciones moleculares entre las proteínas ESP y NSP y el ligando tiorhidroxamato-O-sulfonato, mediante *docking* y dinámica molecular, a distintos pH y en presencia de iones metálicos. Se estimaron las propiedades fisicoquímicas de las proteínas ESP y NSP desde bases de datos bioinformáticas. Se obtuvieron los modelos estructurales tridimensionales de las proteínas ESP y NSP a partir de las estructuras cristalográficas de secuencias aminoácidas homólogas reportadas en UniProt mediante el servidor I-Tasser, por modelación *ab-initio-threading*. Se simularon las interacciones entre ESP y NSP con tiorhidroxamato-O-sulfonato a distintos pH y presencia de cofactor metálico, mediante *docking* molecular, usando Maestro 11.9 de Schrödinger y dinámica molecular, mediante Gromacs. Como resultado se obtuvo que las interacciones proteína-ligando más estables ocurren a pH 3 para NSP, con un *docking* score de -3,65 kcal/mol, y a pH 5 para ESP, con un *docking* score de -6,26 kcal/mol. Además, las interacciones más frecuentes con el tiorhidroxamato-O-sulfonato corresponden a los aminoácidos GLN193, MET224, SER226, ALA276, THR436 y THR437 para NSP y MET81, SER135, VAL191 y VAL249 para ESP. Este es el primer estudio de NSP y ESP con la finalidad de determinar el mecanismo de formación de nitrilos y epitionitrilos.

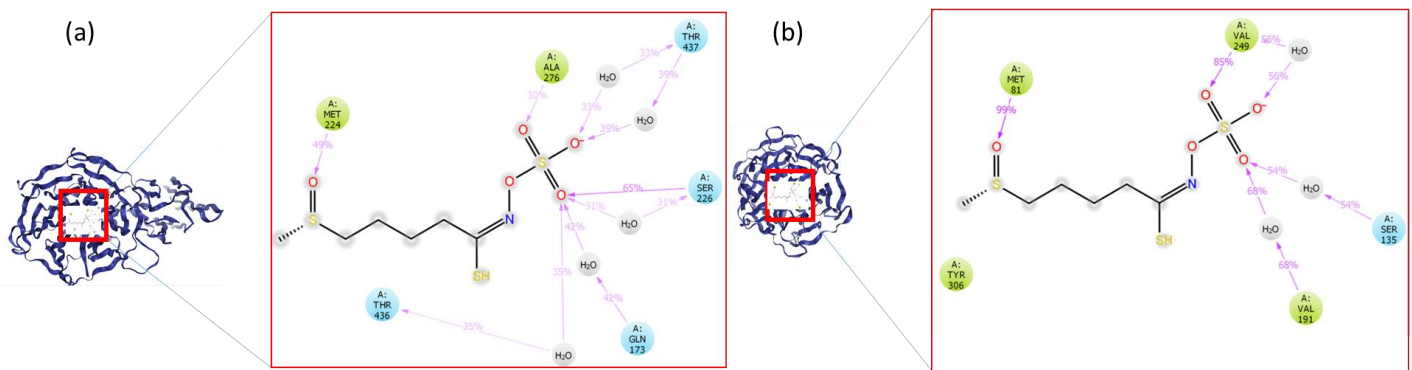


Figura 1: (a) Interacción entre NSP y tiorhidroxamato-O-sulfonato a pH 3; (b) interacción entre ESP y tiorhidroxamato-O-sulfonato a pH 5.

Agradecimientos: Proyecto 81911MO_POSTDOC, Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, Universidad de Santiago de Chile

Referencias:

- Mahn, A., Reyes, A., *Food Science and Technology International* **2012**, 18, 503-514.
- Burow, M., Losansky, A., Muller, R., Plock, A., Kliebenstein, D.J., Wittstock, U., *Plant Physiology* **2009**, 149, 561-574.
- Wittstock, U., Burow, M., *Arabidopsis Book*. **2010**. 8, e0134.

Póster 21

Estudio *in silico* de tiramina como potencial sustrato del transportador de dopamina

Matías Marambio^{1*}, Sandra Arancibia-Opazo¹, Luis Dinamarca¹, Angélica Fierro¹.

¹ Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: marambio@uc.cl

Tiramina (TA) y octopamina (OA) han sido descritas como aminas cruciales en diferentes procesos biológicos en invertebrados. Si bien se ha reportado que estas monoaminas tienen funciones independientes, en nuestro grupo y en otros, se ha descrito que presentan también una función cooperativa altamente relevante. La ausencia de una proteína encargada del transporte de TA y OA no ha sido descrita en algunos invertebrados como *Drosophila melanogaster*.

En búsqueda de información estructural que responda a la interrogante de qué entidad biológica está encargada del transporte de OA y/o TA hacia el espacio intracelular, se desarrollaron estudios de *steered molecular dynamics simulation* (SMD), un método de no-equilibrio para identificar las diferentes interacciones que se establecerían entre las monoaminas y el transportador de dopamina (DAT). Se utiliza esta macromolécula como potencial blanco ya que OA es un análogo funcional de norepinefrina la cual puede, en vertebrados, ser recaptada por DAT.

Los resultados muestran que a medida que avanza la simulación, se generan fuerzas (entre los 900 y 1000 pN) de interacción asociadas a interacciones moleculares del grupo amonio, formando un puente de hidrógeno con el oxígeno de I116 a 1.84 Å y se observan interacciones *T-shape* entre el centro aromático de TA y el anillo de Y123 y F325. Esta información se relaciona con los datos provenientes del mecanismo de transporte de dopamina en DAT y se observó que los perfiles de fuerza se ajustan de manera similar. Estos resultados indican que TA podría ser transportada por DAT.

Agradecimiento: Proyecto Fondecyt 1161375.

Póster 22

Estudio de aminas biogénicas en el proceso de oviposición en *Drosophila melanogaster*

Agustín Robles ^{1*}, Luis Dinamarca¹, Jorge Campusano ², Angélica Fierro ¹.

¹ Facultad de Química y de Farmacia, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

² Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: asrobles@uc.cl

La función de las aminas biogénicas a nivel neuroquímico tiene alto impacto en las diferentes conductas en insectos. Sin embargo, la información detallada de cómo están participando las monoaminas como dopamina (DA), serotonina (5-HT), octopamina (OA) y tiramina (TA) aún es escasa. En este trabajo se estudió mediante metodologías *in vivo* e *in silico* el efecto de aminas biogénicas sobre el proceso de oviposición en la mosca *Drosophila melanogaster*. Esto se realizó mediante ensayos de oviposición en moscas a las cuales se les administró una determinada concentración de aminas biogénicas en la comida. En primer lugar, se realizaron estudios para evaluar el rol de TA, OA y DA en dicho proceso desde un punto de vista fisiológico, evaluando tanto la ruta de síntesis como la recaptación de OA. Para estos estudios se utilizaron moscas mutantes para la enzima clave en la síntesis de OA T β H y para el transportador de DA, DAT6. A partir de los resultados *in vivo* se observó que la oviposición es altamente sensible a cambios en la concentración de la dupla TA-OA. Así, al alterar la concentración de cualquiera de estas dos aminas biogénicas la oviposición se vio disminuida respecto a los controles genéticos. Por otro lado se evidenció un probable rol cooperativo de DA frente a la descompensación de OA. Tirosina presentó un rol predominante sobre la oviposición frente a la menor cantidad de la enzima T β H, elevando el conteo de huevos. Además, datos *in silico* por acoplamiento molecular mostraron que OA generaría interacciones similares a DA en el sitio de unión principal del transportador dDAT.

Agradecimiento: Proyecto Fondecyt 1161375.

Temática 3: Inmovilización de Enzimas

Póster 23

Estudio de la estabilidad de un sistema multienzimático para la producción de jarabe lacto-fructosado
Vanessa Arancibia, Daniela Cid, Oscar Romero, Lorena Wilson.

Póster 24

Catalytic performance of *Bacillus subtilis* lipase A and its mutant (F41L- Δ W42- Δ D43-R44P) as immobilized biocatalysts for the synthesis of novel food emulsifiers.

Manuel Barraza, Karen Rodríguez, Ronny Martínez, Claudia Bernal.

Póster 25

Improving the catalytic behavior of carbonic anhydrase by immobilization on magnetic cellulose.

Liliana Castro, Carlos Pelaez, Nora Restrepo, Ronny Martínez, Claudia Bernal.

Póster 26

Co-immobilization of pectinase complex: Chemistry support influence on enzyme performance.

Darly Concha, Stefanny Muller, Ronny Martinez, Claudia Bernal.

Póster 27

Comparación de distintos métodos de inmovilización de alcohol deshidrogenasa en electrodos de fieltro de carbón.

Lesly Chamorro, Tonia Tommasi, Paula Grez, Debora Fino, Lorena Wilson, Carminna Ottone.

Póster 28

Estudio de las propiedades funcionales y operacionales de la α -amilasa inmovilizada en el proceso de desdoblamiento de almidón.

Adielis Jiménez, Leissy Gómez, Patricia León, Héctor L. Ramírez, Jesús D. Luis, Leydet González, Saúl Dueñas.

Póster 29

Diseño de soportes magnéticos para inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* y su aplicación en la síntesis de un precursor quiral.

Rodrigo Jiménez, Julio Berríos, Zaida Cabrera.

Póster 30

Inmovilización de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en soporte iónico.

Marcela Serey, Cecilia Guerrero¹, Andrés Illanes.

Póster 23

Estudio de la estabilidad de un sistema multienzimático para la producción de jarabe lacto-fructosado

Vanessa Arancibia*, Daniela Cid*, Oscar Romero, Lorena Wilson

Escuela de ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: vanessa.arancibia.tapia@gmail.com; dani.cg17@gmail.com

Los sistemas multienzimáticos, cada vez concitan más atención e importancia, en especial los procesos *one-pot* [1]. Estos sistemas, donde dos o más enzimas operan simultáneamente en un mismo reactor, tienen la ventaja de reducir la inhibición por intermediarios y eliminar pasos de separación y purificación, reduciendo los costos de operación. Para operar en esta modalidad se debe seleccionar cuidadosamente las condiciones de compromiso, que no necesariamente son las óptimas de cada una de las enzimas involucradas. Además, puede ocurrir que las enzimas puedan presentar diferentes estabilidades en condiciones de operación lo que hace necesario estudiar el tiempo de recambio de cada una de ellas. Un ejemplo de lo anterior, es la producción de jarabe lacto-fructosado (LFS) a partir de lactosa utilizando las enzimas β -galactosidasa (β -gal) y glucosa isomerasa (GI) [2]. El esquema de la reacción se presenta en la Figura 1.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de β -gal y GI, a fin de seleccionar la temperatura de compromiso para la producción *one-pot* de jarabe lacto-fructosado. Los biocatalizadores utilizados fueron GI inmovilizada de *Streptomyces murinus* (Sweetzyme® IT, Novozymes) y β -gal de *Aspergillus oryzae* en soportes de metacrilato (Relizyme, Resindion). Para determinar la temperatura de compromiso, se investigaron las cinéticas de inactivación a 40, 50 y 60°C, en medio no reactivo a pH 7. Los resultados obtenidos fueron modelados según lo reportado por Henley y Sadana [3].

A partir de las cinéticas de inactivación obtenidas, se simuló el comportamiento del reactor, realizando el balance de masa correspondiente, utilizando el software MatLab. La simulación permitió obtener las condiciones de operación para llevar a cabo el proceso, considerando la diferencia en la estabilidad que presentan las dos enzimas involucradas.

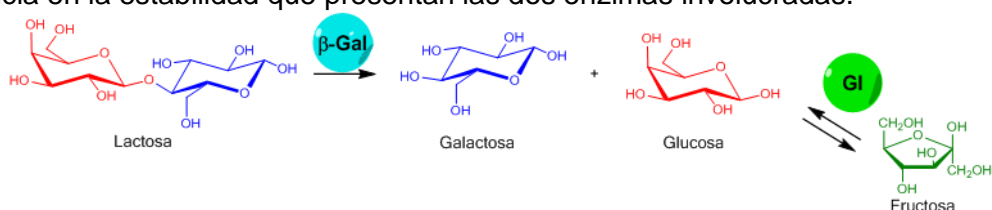


Figura 1: Esquema de reacción para la producción de jarabe lacto-fructosado

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT 1190709

Referencias:

[1] Xue, R., Woodley, J., *Bioresource Technology* **2012**, 115, 183-195.

[2] Araya, E., et al., *Food Chemistry* **2018**, 288, 102-107

[3] Henley, J., Sadana, A., *Enzyme and Microbial Technology* **1985**, 7 50-60.

Póster 24

Catalytic performance of *Bacillus subtilis* lipase A and its mutant (F41L- Δ W42- Δ D43-R44P) as immobilized biocatalysts for the synthesis of novel food emulsifiers.

Manuel Barraza, Karen Rodríguez, Ronny Martínez, Claudia Bernal

Laboratorio de Tecnología de enzimas para Bioprocesos. Departamento de Ingeniería en Alimentos.
Universidad de La Serena. La Serena, Chile.

Emulsifiers are amphiphilic molecules with both polar hydrophilic and non-polar hydrophobic group. Emulsifiers reduce the surface tension of liquids, as well as stabilizing immiscible phases of mixtures of substances of different polarity and functionality having high importance in the chemical and food industry. Emulsifiers can be chemically or enzymatically synthesized; enzymatic synthesis is of special interest, because of their high selectivity and specificity. Conventional chemical catalysis generally involves processes in several stages of synthesis, with the respective formation of byproducts that decrease the efficiency and purity of the desired product. In this work, *Bacillus subtilis* lipase A (BSLA) and the previously identified mutant P5F3 (F41L- Δ W42- Δ D43-R44P, with higher activity against longer chain fatty acids, but lower stability), were immobilized using meso-macroporous silica functionalized with glyoxyl groups, in order to generate biocatalysts for enzymatic synthesis of lipoaminoacids, as novel emulsifiers for industrial food applications. The catalytic performance of the biocatalysts (BSLA and P5F3) obtained was evaluated by comparing their thermal stability in an aqueous medium and in the presence of acetone, finding that immobilized BSLA retained 30% of its initial activity after 48 hours at 50°C, in aqueous medium, whereas the immobilized P5F3 mutant was completely inactivated after 4 hours at the same conditions. Both immobilized biocatalysts lost activity after 30 minutes of incubation in pure acetone at 5°C. On the other hand, at 30°C in aqueous medium, P5F3 and its immobilized biocatalyst showed higher hydrolytic activity against p-nitrophenyl butyrate (pNPB) compared to soluble and immobilized BSLA. The obtained biocatalysts will be tested for the synthesis of lipoaminoacids (lauroyl or palmitoyl serine), comparing the yield of product synthesis between BSLA and its mutant, in soluble and immobilized form. We aim to compare and study how the changes in amino acid found in the mutant P5F3 affect lipoaminoacid synthesis, and if the lack of stability can be overcome by immobilization.

Acknowledgements: We thank the Department of Food Engineering, Universidad de La Serena, and Fondecyt Regular Project N° 1170219 for funding.

Póster 25

Improving the catalytic behavior of carbonic anhydrase by immobilization on magnetic cellulose

Liliana Castro^{1,2*}, Carlos Pelaez², Nora Restrepo, Ronny Martínez¹, Claudia Bernal^{1*}

¹ Laboratorio de Tecnología de Enzimas para Bioprocesos, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán 1305, 1720010 La Serena, Chile

² GIEM, Instituto de Química, Universidad Antioquia Cl. 67 # 53-108, Medellín, Colombia

*Corresponding author: lpcastror@gmail.com; cbernal@userena.cl

Rising atmospheric CO₂ concentration is one of the leading causes of global warming and climate change. CO₂ emissions have followed an increasing trend over the past few decades¹ and are believed to be derived from human activity, especially by combustion of fossil fuels for energy generation. Biomimetic CO₂ capture using the enzyme carbonic anhydrase (CA) is an efficient method for CO₂ sequestration, offering greener, cost-efficient, and safe capture of atmospheric carbon dioxide, which in turn can be used for the synthesis of several useful products². Carbonic anhydrase (CA), a zinc metalloenzyme is the most efficient catalyst for CO₂ hydration, however, there are several challenges when using free CA for CO₂ capture such as low thermal stability, narrow pH range, difficult enzyme recovery and short half-life at reaction conditions³ (4).

This work presents the immobilization of CA on magnetic cellulose by covalent attachment assisted by glutaraldehyde, evaluating immobilization yield, expressed activity and biocatalyst stability under typical CO₂ sequestration conditions (50°C, pH 9.5), and in the presence of ions (Ca²⁺, Mg⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻ and SO₄²⁻).

The immobilized CA biocatalyst exhibited a high expressed activity (110 U/g) when immobilized on cellulose type II, probably because this material is very reactive, giving an immobilization yield of 295%. This hyperactivation can be the result of increased beneficial conformations of the enzyme when attached to the support. Similarly, thermal stabilization was increased with respect to the soluble enzyme, keeping 100% activity after 90 hours at 50°C, whereas the soluble enzyme keeps only 52% activity under the same conditions.

These are promising results for the design of a robust biocatalyst for application in CO₂ fixation processes.

Acknowledgement: This research is funded by COLCIENCIAS -647

References:

¹ Khaled, M., *Science of the Total Environment* **2017**, 598, 639-646.

² Drake K. et al., *Environmental Management* **2015**, 56, 998-1008.

³ Anjana S., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2010**, 67, 122–128.

Póster 26

Co-immobilization of pectinase complex: Chemistry support influence on enzyme performance.

Darly Concha¹, Stefanny Muller², Ronny Martinez¹, Claudia Bernal^{1*}

¹ Laboratorio de Tecnología de Enzimas para Bioprocesos, Departamento de Ingeniería en Alimentos, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán 1305, 1720010 La Serena, Chile

² Departamento de Química, Universidad de La Serena, Av. Raúl Bitrán 1305, 1720010 La Serena, Chile

*Autor correspondiente: cbernal@userena.cl

Pectin is one of the main components of fruit and vegetable peels, widely present in food and agriculture residues, contributing to current environmental challenges. Enzymatic pectin waste depolymerization requires the action of pectintranseliminase, polygalacturonase and pectinesterase. When this multi-enzyme process is carried out as a one-pot cascade reaction, isolation and purification processes of reaction intermediates are eliminated, reducing costs and waste generation. In this work, pectinase complex from *Aspergillus niger* was immobilized, studying the effect of the surface chemistry of the silica support. For that, three supports were used: glyoxyl silica (support for covalent attachment of the enzyme), amino silica (support for electrostatic attachment), aminoglyoxyl silica (support for combined electrostatic-covalent attachment)^{1,2}. The generated supports were characterized by FTIR and the process was characterized by enzyme adsorption kinetics and SDS-PAGE. The biocatalyst obtained was studied in order to understand the chemical surface and the immobilization yield (IY) of each enzymatic component of the pectin complex on expressed activity (EA) and thermal stability at 50°C in aqueous media. The results show that the support surface chemistry affected the adsorption profile for each enzymatic component of the pectinase complex, with the biocatalyst obtained with the heterofunctional support showing the highest activity and IY (60 U/g and 37% respectively). In this case, immobilization on glyoxyl silica was not successful, probably because enzymes from the pectinase complex do not have enough exposed lysine residues for attachment, resulting in IY lower than 5%. Furthermore, biocatalysts obtained using amino silica support showed poor increase in thermal stability (stabilization factor: 1.5), probably because the enzyme-support interactions are weak or some enzyme from the pectinase complex exhibits different inactivation kinetics. These results are promising as a first step to design a one-pot process to obtain galactaric acid from pectin.

Acknowledgements: Support from FONDECYT Grant 1190260

Referencias:

¹ Bernal, C., et al., *Langmuir* **2014**, 30, 3557-3566.

² Bernal et al. *Chemical Engineering Journal* **2018**, 334, 760-767.

Póster 27

Comparación de distintos métodos de inmovilización de alcohol deshidrogenasa en electrodos de fieltro de carbón

Lesly Chamorro¹, Tonia Tommasi³, Paula Grez², Debora Fino³, Lorena Wilson¹, Carminna Ottone^{1*}

¹ Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

² Department of Applied Science and Technology, Politecnico di Torino, Italy

³ Instituto de Química, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: carminna.ottone@pucv.cl

El uso de sistemas electroquímicos para las reacciones redox catalizadas por oxidorreductasas ha demostrado ser una alternativa económica para la regeneración de cofactores de tipo NAD(H) y FAD [1]. La inmovilización de enzimas sobre electrodos resulta en un desafío para este tipo de sistemas con procesos continuos y largos tiempos de operación. Los métodos más utilizados para la inmovilización de enzimas en electrodos son mediante uniones iónicas o por atrapamiento con polímeros. Sin embargo, estas técnicas no aseguran una adecuada retención de la proteína, generando pérdidas de actividad en el tiempo, debido a la desorción de la enzima del soporte. En literatura se demuestra que el método de inmovilización por enlace covalente con el soporte elimina el problema de la retención y aumenta la estabilidad térmica de las oxidorreductasas [2]; sin embargo, hay pocos estudios donde utilizan enlace covalente en la inmovilización de enzimas en electrodos. En este trabajo se realizó un estudio comparativo de tres distintos métodos de inmovilización de alcohol deshidrogenasa en un electrodo poroso a base de grafito para su posterior uso como biocatalizador en la oxidación de etanol con regeneración electroquímica de NAD⁺.

Las pruebas se realizaron con la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) de *Saccharomyces cerevisiae*. Se estudiaron tres métodos de inmovilización: (1) por atrapamiento con polímero conductivo Nafion®; (2) por enlace iónico con polietilenimina; y (3) por unión covalente con grupos aldehídos presentes en el soporte. La actividad de los catalizadores se midió a 30°C, en una solución tamponada a pH 7.5 con etanol (230 mM) y NAD⁺ (5 mM), mediante la aparición de NADH cuantificada mediante absorbancia a 340 nm. Se realizaron pruebas de estabilidad de los catalizadores a 30°C y pH 7.5 y se midió la desorción de la proteína en el tiempo. Las pruebas electroquímicas, con la simultánea regeneración de cofactor, se realizaron en una celda de dos cámaras, separadas con una membrana de intercambio catiónico. En el ánodo se usó el bioelectrodo de ADH. La solución anódica estaba formada por etanol 5mM y NADH 5mM. En el cátodo se usó una solución 15 mM de K₃[Fe(CN)₆]. Ambas soluciones se prepararon en tampón fosfato 100 mM pH 7.5.

Se seleccionó el catalizador producido mediante unión covalente a la enzima para realizar la reacción electroquímica de oxidación de etanol, por ser el biocatalizador con menor pérdidas de proteínas del soporte y más estable térmicamente. Se probaron distintas cargas enzimáticas y diferentes temperaturas donde a 30°C se obtuvieron las mayores conversiones (30%) de etanol a ácido acético.

Agradecimientos: Proyecto FONDECYT No. 11180967

Referencias:

- [1] Chiranjeevi, P., et al., Current trends in enzymatic electrosynthesis for CO₂ reduction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* **2019**, 16, 65-70.
- [2] Ottone, C., et al., *Applied Microbiology and Biotechnology* **2018**, 102(1), 237-247.

Póster 28

Estudio de las propiedades funcionales y operacionales de la α -amilasa inmovilizada en el proceso de desdoblamiento de almidón

Adielis Jiménez^{1*}, Leissy Gómez², Patricia León², Héctor L. Ramírez², Jesús D. Luis², Leydet González², Saúl Dueñas²

¹Departamento de Ingeniería Química (DIQ), Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

²Departamento de Química, Universidad de Matanzas, Cuba

*Autor correspondiente adielis.jimenez@usach.cl

El almidón constituye una impureza que influye en las operaciones del proceso de producción de azúcar crudo y en la calidad del producto final, siendo necesario el control y la regulación de su contenido, mediante hidrólisis enzimática. Por ello el objetivo de la investigación es realizar un estudio de la hidrólisis enzimática del almidón mediante la enzima α -amilasa inmovilizada para su aplicación posterior a la industria. Para ello se caracterizó la enzima libre con relación a su actividad catalítica y concentración proteica. Posteriormente se realizó la síntesis del soporte quitina-quitosana y se determinaron las condiciones óptimas para la inmovilización a través de un diseño de experimento compuesto central para superficie de respuesta. Posteriormente se determinaron las propiedades de pH y temperatura óptima, la constante de Michaelis Menten (K_m) y la velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$). Se determinó que con el método de inmovilización por adsorción no específica se obtiene mejores resultados que con el entrecruzamiento y se estableció que las propiedades del conjugado Quit-QSA- α -amilasa son pH óptimo 6,5 y temperatura óptima 60 °C. Su K_m disminuyó 2,5 veces y $V_{m\acute{a}x}$ se incrementó en 1,2 veces con respecto a la enzima nativa.

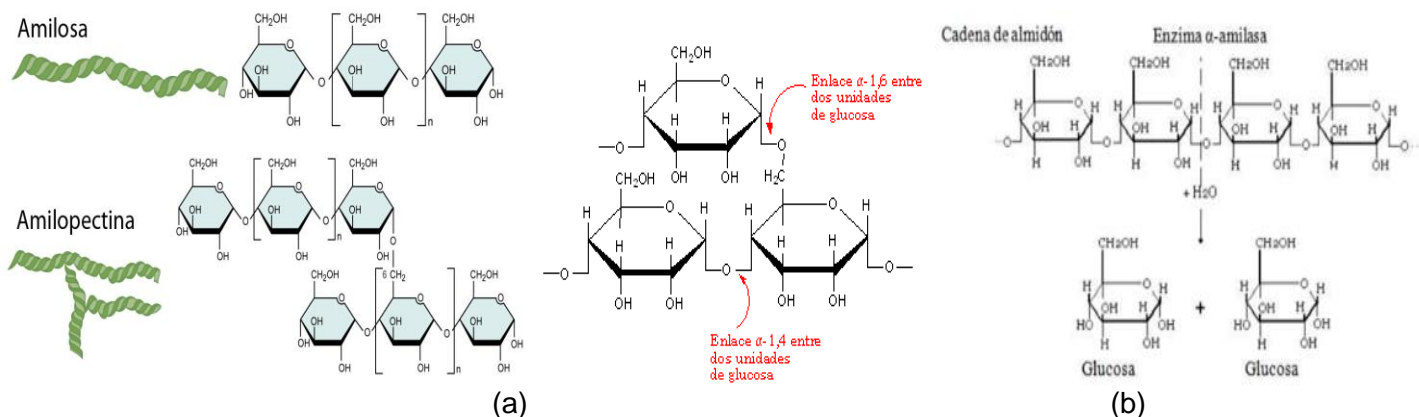


Figura 1: Estructura del almidón (a) y su desdoblamiento con α -amilasa (b). Fuente: Jimenez (2017).

Agradecimientos: Beca Doctorado de Excelencia para Extranjeros 2019, Vicerrectoría de Postgrado, Universidad de Santiago de Chile, Chile; colaboración Universidad de Matanzas, Cuba.

Referencias:

- Gómez, L. B. Estabilización funcional y operacional de enzimas hidrolíticas de interés industrial. Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Técnicas Universidad de Matanzas, **2016**
- Jiménez, A. Evaluación del comportamiento del contenido de almidón y su desdoblamiento con alfa amilasa en el proceso de producción de azúcar crudo Tesis Presentada como Requisito Parcial para la Obtención del Título de Máster en Ingeniería Asistida por Computadora, **2017**.
- Singh, K., Kayastha, A.M., Optimal immobilization of alpha-amylase from wheat (*Triticum aestivum*) onto DEAE-cellulose using response surface methodology and its characterization. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2014**, 104, 75-81.
- Zouh, M.M., Eggleston, G., Kimbeng, C.A., Issues of starch in sugar cane processing and prospects of breeding for low starch content in sugar cane. *Sugar Cane International* **2008**. 26, 3-17.

Póster 29

Diseño de soportes magnéticos para inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* y su aplicación en la síntesis de un precursor quiral

Rodrigo Jiménez*, Julio Berríos, Zaida Cabrera

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: rodrigojimenez1995@hotmail.com

La quiralidad es un factor clave en la eficiencia y seguridad de muchos fármacos. Debido a esto, en la actualidad es imperativo la síntesis única del enantiómero que posee la actividad biológica deseada. Las enzimas han mostrado ser biocatalizadores ideales para la síntesis de este tipo de compuestos. Sin embargo, su baja actividad y estabilidad en condiciones de proceso dificultan su aplicación a nivel industrial. Este trabajo tiene como objetivo la elaboración de soportes magnéticos hidrofóbicos para la síntesis de biocatalizadores altamente activos y estables^{1,2} para su aplicación en la síntesis del *R*-monometil-3-fenil glutarato (*R*-MMFG) importante precursor de una serie de fármacos quirales. Para alcanzar este objetivo, se evaluó el efecto del material de recubrimiento de la partícula magnética de óxido de hierro, sobre la funcionalización del soporte con una cadena alquilo de ocho carbonos y la inmovilización de la lipasa de *Rhizopus oryzae* (ROL). Los principales resultados muestran que la partícula magnética recubierta con sílice ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Si}$), si bien presenta un 40% menos de hidrofobicidad que la partícula recubierta con quitosano ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Q}$) (Figura 1), presenta rendimientos de inmovilización superiores a los obtenidos con quitosano tanto en actividad como en proteínas (Figura 2). Se evidencia de esta forma que existe un efecto significativo del tipo de recubrimiento de la partícula magnética sobre la funcionalización e inmovilización de ROL. Por otra parte, ambos biocatalizadores presentan hiperactivaciones superiores al 200%, lo que permite obtener biocatalizadores más activos que su contraparte soluble. Finalmente, el carácter magnético de los biocatalizadores obtenidos facilita la recuperación y estabilidad mecánica de los biocatalizadores favoreciendo su uso en la síntesis del *R*-MMFG en un reactor por lotes de tanque agitado en modalidad de lotes repetidos, mejorando así la productividad específica del proceso.

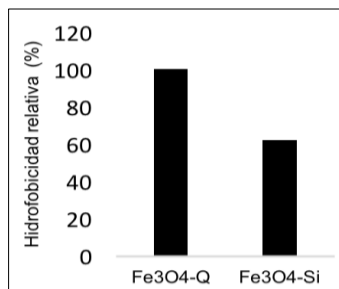


Figura 1: Hidrofobicidad relativa de los soportes magnéticos recubiertos

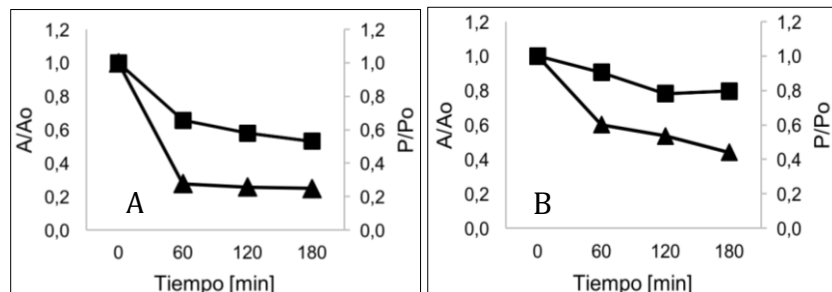


Figura 2. Inmovilización de lipasa ROL en soporte magnético hidrofóbico. A: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Si}$ B: ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Q}$). Actividad residual A/A_0 (■); proteína residual P/P_0 (▲)

Referencias:

¹Rodrigues, R.C., et al., Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances* **2019**, 37, 746-770.

²Bilal, M., et al., Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, 120, 2530-2544.

Póster 30

Inmovilización de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en soporte iónico

Marcela Serey*, Cecilia Guerrero, Andrés Illanes

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: m.serey7@gmail.com

La inmovilización de enzimas permite una mayor eficiencia de uso del biocatalizador, su reutilización y el desarrollo de procesos continuos y de lotes sucesivos.

La enzima β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* ha sido inmovilizada mediante diversas técnicas de inmovilización. Sin embargo, su inmovilización a soportes mediante interacciones iónicas no ha sido abordada en la literatura, no obstante producir baja pérdida de actividad, y permitir la reutilización del soporte. Su limitación radica en la interacción relativamente débil entre la enzima y el soporte, lo cual, dependiendo de las condiciones de reacción, la hace susceptible a la desorción. El objetivo de este trabajo es evaluar la inmovilización iónica de β -galactosidasa de *A. oryzae* en el soporte amonio cuaternario-agarosa. Para ello se evaluó el pH de inmovilización, tamaño de partícula y carga enzimática ofrecida (Fig 1), lográndose un máximo rendimiento de inmovilización (Y_A) y actividad específica del biocatalizador (A_{sp}) a pH 7. Mientras menor fue el tamaño de partícula del biocatalizador, mayor fue el valor de Y_A y de A_{sp} . Se determinó que la máxima capacidad de carga del soporte es de 100 mg de proteína por gramo. Estos resultados son muy prometedores, debido a que se obtuvo catalizadores muy activos en comparación con lo reportado para esta enzima mediante otras técnicas de inmovilización.

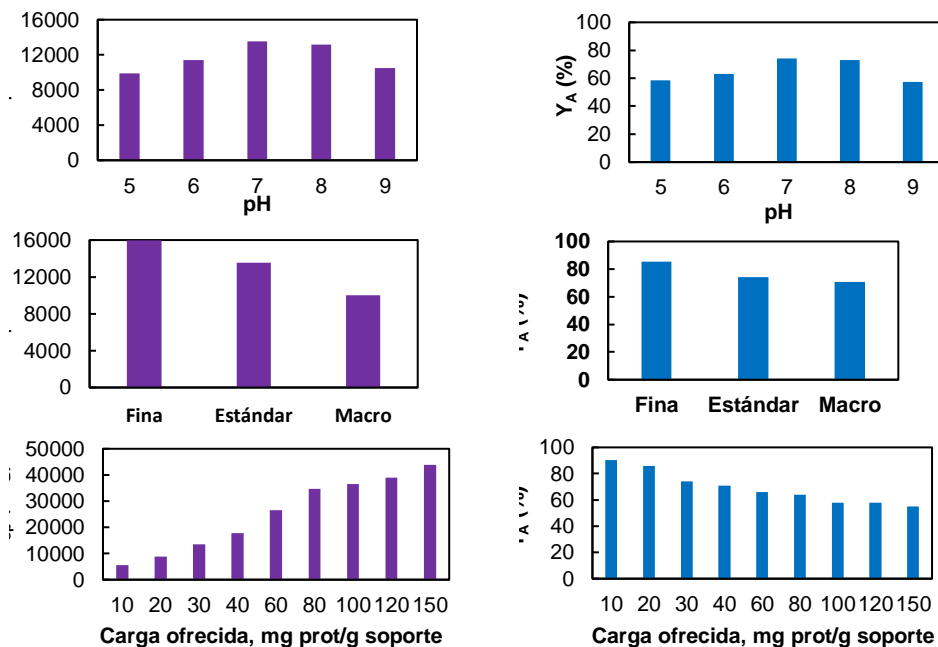


Fig 1: Efecto del pH de inmovilización, tamaño de partícula y carga enzimática ofrecida en la actividad específica (A_{sp}) y el rendimiento de inmovilización en términos de actividad expresada (Y_A), en la inmovilización de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* en soporte amonio cuaternario-agarosa.

Agradecimientos: Beca de Arancel PUCV 2019, Proyecto Fondecyt Regular 1190104.

Temática 4: Biotransformaciones Enzimáticas

Póster 31

Producción y purificación de celobiosa 2-epimerasa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* expresada en *Escherichia coli*.

Benjamín Arancibia, Macarena Huerta, Carlos Vera, Andrés Illanes, Cecilia Guerrero, Carla Aburto.

Póster 32

Desarrollo de un kit enzimático para la cuantificación de lactulosa.

Denisse Benavides-Jiménez, Cecilia Guerrero, Felipe Arenas, Carlos Vera.

Póster 33

Study of the enzyme-assisted extraction of astaxanthin, a potent antioxidant, from processing waste of the crustacean industry in the Coquimbo Region.

Alejandra Cortés-Monroy, Claudia Bernal, Ronny Martínez.

Póster 34

Efecto de la humedad del residuo de aceituna sobre el contenido total de polifenoles para la producción enzimática de hidroxitirosol.

Tamara Galaz, Francisca Mauna, Lorena Wilson, Carminna Ottone.

Póster 35

Caracterización del extracto enzimático de *Streptomyces* sp. G11C utilizado en la hidrólisis de queratina de plumas.

Valentina González, Pedro Valencia, Beatriz Cámara.

Póster 36

Síntesis de lactulosa en modalidad de lote alimentado con β -galactosidasa inmovilizada.

Javiera Campos, Francisca Valencia, Andrés Illanes, Cecilia Guerrero.

Póster 37

Different methods of protein extraction from Chilean shrimp (*Heterocarpus reedi*) and obtaining of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis.

Diana Leiva, Ronny Martínez, Claudia Bernal.

Póster 38

Identificación y purificación de una L-arabinosa isomerasa a partir de un organismo extremófilo para su aplicación en la síntesis de D-tagatosa.

Pamela Mieres-Amigo, Cecilia Guerrero, Felipe Arenas, Carlos Vera.

Póster 39

Estudio de la síntesis de butil- β -galactósido con una β -galactosidasa comercial.

Kevin Muñoz, Cecilia Guerrero, Felipe Arenas, Carlos Vera.

Póster 40

Production of glycerin using porcine pancreatic lipase immobilized in coconut pulp support (*A. aculeata*) as biocatalyst.

Fernando Ortigoza, Yenny González, Fátima Yubero.

Póster 41

Síntesis enzimática de lactulosa en modalidad continua en reactor de tanque agitado.

Nicolás Ramírez, Claudia Ubilla, Carla Aburto, Felipe Valdivia, Cecilia Guerrero, Carlos Vera, Andrés Illanes.

Póster 42

Optimización de la síntesis de propil- β -D-galactosido con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*.

Diego Rice-Muñoz, Cecilia Guerrero-Siancas, Felipe Arenas-Salinas, Carlos Vera-Vera.

Póster 43

Nuevo sistema multienzimático para la síntesis de iminoclitoles.

Bruno Strancar, Lorena Wilson, Marina Guillén, Gregorio Álvaro, Oscar Romero.

Póster 44

Incremento de la extracción de proteínas desde pulpina de ave mediante hidrólisis enzimática por lotes secuenciales.

Luisa Téllez, Pedro Valencia, Marlene Pinto, Sergio Almonacid.

Póster 45

Síntesis enzimática de lactulosa en modalidad de lotes repetidos con agregados entrecruzados de β -galactosidasa (CLAGs) de *A. oryzae*.

Claudia Ubilla; Carla Aburto; Sebastián Suarez; Carlos Vera; Andrés Illanes; Cecilia Guerrero.

Póster 46

Caracterización de enzima comercial para su uso en disminución de amargor de jugos cítricos mediante hidrólisis de naringina.

Paulina Urrutia, Mariela Muñoz, Lorena Wilson.

Póster 47

El método de la mediana (Direct Linear Plot) para la estimación de constantes cinéticas de reacciones enzimáticas.

Pedro Valencia, Carolina Astudillo, Diego Gajardo, Sebastián Flores, Bastián Sepúlveda.

Póster 48

Study of the enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using the immobilized FDH enzyme.

Giuseppe Pietricola, Carminna Ottone, Emanuele Berruto, Melodj Dosa, Marco Piumetti, Tonia Tommasi, Debora Fino. Politecnico di Torino, Italia.

Póster 49

Purificación parcial de L-asparaginasa intracelular de *Enterobacter* sp. M55 halotolerante.

Abad Hurtado, Juan C. Flores-Santos, Stephy Saavedra, Cynthia Esquerre, Amparo Iris Zavaleta.

Póster 31

Producción y purificación de celobiosa 2-epimerasa de *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* expresada en *Escherichia coli*

Benjamín Arancibia¹, Macarena Huerta¹, Carlos Vera², Andrés Illanes¹, Cecilia Guerrero^{1*}, Carla Aburto¹

¹ Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile.

² Facultad de Química y Biología. Universidad de Santiago de Chile, Chile

*Autor correspondiente: cecilia.guerrero@pucv.cl

La lactulosa (4-O-β-D-galactopiranosil-D-fructosa) es un disacárido compuesto de galactosa y fructosa, que es ampliamente utilizado en productos farmacéuticos, nutracéuticos y en la industria alimentaria debido a sus efectos beneficiosos para la salud humana. Se le emplea en el tratamiento del estreñimiento y de la encefalopatía hepática, y se reconoce su efecto en la prevención de tumores, la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y su efecto antidiabético. A nivel industrial se produce por síntesis química, pero se ha demostrado que mediante biocatálisis enzimática se logra un proceso ambientalmente inocuo y se facilita la purificación del producto, lo que lo hace tecnológicamente atractivo. La síntesis enzimática de lactulosa se ha realizado tradicionalmente con β-galactosidasa en una reacción de transgalactosilación de fructosa con lactosa. Sin embargo, recientemente se describió que la enzima celobiosa 2-epimerasa del organismo termófilo *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (CsCE), puede sintetizar lactulosa mediante la isomerización de lactosa, siendo esta una vía de producción más eficiente. Sin embargo, CsCE no se encuentra comercialmente disponible, por lo cual en este trabajo se desarrolló una metodología de producción y purificación de CsCE recombinante expresada en *E. coli* BL21. Para ello se realizó la fermentación en matraces a 37°C y 200 rpm, empleando el medio de cultivo LB y adicionando IPTG 1 mM como inductor después de 5 h de incubación, prolongándose el cultivo durante 18 h. Finalizada la fermentación, las células fueron recuperadas por centrifugación (9500 rpm, 10 min, 4°C) y sometidas a ruptura mediante sonicación. El extracto crudo fue purificado mediante cromatografía de bioafinidad en columnas de níquel. Con la enzima purificada se realizó una reacción de síntesis de lactulosa a 60°C, pH 7 y 100 g/L de lactosa. El rendimiento de lactulosa a partir de lactosa fue de 32% y la actividad enzimática de la enzima purificada fue de 0,175 UI/mL CsCE.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1190104, Conicyt, Chile.

Póster 32

Desarrollo de un kit enzimático para la cuantificación de lactulosa

Denisse Benavides-Jiménez^{1*}, Cecilia Guerrero-Siancas², Felipe Arenas-Salinas¹, Carlos Vera-Vera¹

¹ Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Valparaíso, Chile.

*Autor correspondiente: denisse.benavides@usach.cl

Introducción. La lactulosa, es un disacárido sintético conformado por un residuo de galactosa y fructosa unidos por enlace glucosídico β 1-4 [1]. La síntesis de esta molécula ocurre por isomerización alcalina de la lactosa [2]. Debido a que la lactulosa se forma durante el tratamiento térmico de la leche, se ha propuesto como un indicador analítico para distinguir la leche sometida al método UHT de los demás procedimientos de esterilización [3]. Existen diversos métodos analíticos para la detección de lactulosa; no obstante, la mayoría de estos métodos presentan interferentes, algunos procedimientos son costosos y requieren demasiado tiempo. Los métodos enzimáticos han resultado ser mucho más eficientes al momento de medir lactulosa; actualmente existe un kit certificado a la venta "Lactulose Assay Kit" (Método ISO 11285:2004) que utiliza una secuencia de 9 reacciones, lo cual lo hace poco práctico. Así, en este trabajo se busca simplificar el kit ya existente, logrando que sea más eficiente mediante la hidrólisis selectiva de lactulosa con la β -galactosidasa (β -gal) de *Exigobacterium acetylicum*.

Metodología. Se transformó la bacteria *Escherichia coli* BL21 usando el vector pET/bgal/EA8 que contiene el gen de la enzima β -galactosidasa proveniente de la bacteria termófila *E. acetylicum*; se seleccionaron los clones recombinantes y se procedió a sobreexpresar la proteína mediante inducción con IPTG. Posterior a ello, se realizó la purificación de la enzima mediante columnas de afinidad HisTrap® HP. La pureza de la proteína β -gal se determinó mediante geles de SDS-PAGE. Se caracterizó cinéticamente la proteína y se estudió su especificidad por lactulosa mediante el uso de HPLC. Por otro lado, se utilizarán los kits enzimáticos comerciales Fructose Assay Kit (Colorimetric) de Biovision y D-fructose/D-glucose Assay Kit de Megazyme para la cuantificación de fructosa y se evaluarán posibles interferentes en la cuantificación.

Resultados. Se purificó la β -gal de *E. acetylicum* como se muestra en la Figura 1, con un peso molecular cercano a los 75 kDa, lo cual es consistente con el peso estimado de 79,9 kDa. Luego se caracterizó cinéticamente la proteína y se realizó el seguimiento de la hidrólisis de lactulosa mediante HPLC, determinando que la enzima posee mayor afinidad por lactulosa que por lactosa. Actualmente se está estudiando la integración de la β -gal de *E. acetylicum* a dos kits enzimáticos comerciales para la cuantificación de fructosa, permitiendo de esta forma, la cuantificación de lactulosa.

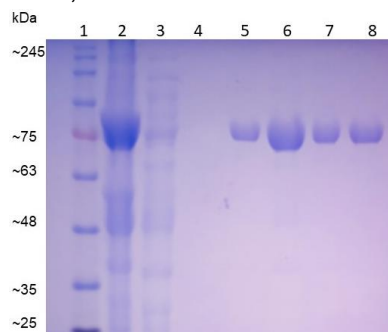


Figura 1: Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalantes (SDS PAGE) para la β -galactosidasa de *E. acetylicum*. Carril 1: estándar de peso molecular, carril 2: extracto crudo, carril 3: fracción recolectada luego de pasar la proteína por la columna HisTrap® HP, carril 4: lavado de la columna; carril 5, 6, 7 y 8: corresponden a la fracción recolectada de la proteína pura.

Referencias

[1] Schumann, C. *European Journal of Nutrition* **2002**, 41, 17-25.

[2] Zokaee, F., Kaghazchi, T., Zare, A., Solimani, M. *Process Biochemistry* **2002**, 37, 629-635.

[3] Amine, A., Moscone, D., Bernardo, R.A., Marconi, E., Palleschi, G.. *Analytica Chimica Acta* **2000**, 406, 217-224.

Agradecimientos Fondecyt Iniciación11180282 y Fondecyt Regular 1190104

Póster 33

Study of the enzyme-assisted extraction of astaxanthin, a potent antioxidant, from processing waste of the crustacean industry in the Coquimbo Region

Alejandra Cortés-Monroy*, Claudia Bernal, Ronny Martínez

Laboratorio de Tecnología de Enzimas para Bioprocesos, Departamento de Ingeniería en Alimentos,
Universidad de la Serena, La Serena, Chile

*Corresponding author: acortes-monroy@alumnosuls.cl

Shrimp waste is a potential source of protein, chitin, and carotenoids. Among the recoverable pigments is astaxanthin (AX), a compound of great interest due to its biological activity as a potent antioxidant also attributed with antidiabetic effect, hepatoprotective and anticancer activity [1]. This research aims to study novel approaches to add value to shrimp residues (shell, tail, head) by extracting astaxanthin using water based solvents and enzymatic pre-treatment. For this purpose, extractions in organic solvent (acetone) and in aqueous phase were compared; the latter in addition was modified by adding lipase (BSLA) or protease (Flavourzyme) as extraction catalysts, in two different stages of the AX extraction protocol. The efficiency of the process was analyzed by HPLC quantification of the extracted astaxanthin, and by spectrophotometric AX determination. The highest yield was obtained in aqueous extraction (1.33 mgAX/50g residue), being lower in acetone extraction (0.041 mgAX/50g residue). The addition of enzymes (lipase and protease) resulted in an increased AX yield when protease was added at the beginning of the extraction process, obtaining a yield of 2.07 mgAX/50g residue. In conclusion, we proposed an aqueous AX extraction as faster, more efficient and more environmentally friendly methodology due to the lesser use of organic solvents than in the acetone/petroleum ether based AX extraction. In addition, the use of an enzymatic pretreatment significantly increased AX yields, resulting in a promising modification of the proposed method.

Table 1: Yields (mgAX/50g residue) obtained from extractions

Method of extraction	Yield (mgAX/50g residue)
Acetone	0,041
Aqueous phase	1,33 ± 0,12
Phase 1 Protease	1,28 ± 0,19
Phase 1 Lipase	1,45 ± 0,08
Phase 2 Protease	2,07 ± 0,19
Phase 2 Lipase	1,98 ± 0,06

Acknowledgements: This research was funded by Fondecyt Project No. 1170219.

Reference:

1. Prameela, K., Venkatesh, K., Mmandi, S.B., Phani, A., Kasturi, K., Krishna, C.R., Mohan, C.M., Next generation nutraceutical from shrimp waste: The convergence of applications with extraction methods. *Food Chemistry* **2017**, 237, 121-132.

Póster 34

Efecto de la humedad del residuo de aceituna sobre el contenido total de polifenoles para la producción enzimática de hidroxitirosol

Tamara Galaz, Francisca Mauna, Lorena Wilson, Carminna Ottone*

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: carminna.ottone@pucv.cl

El hidroxitirosol (HT) es parte de los orto-difenoles que tienen propiedades antioxidantes y cardioprotectoras [1]. El HT se puede obtener por hidrólisis enzimática de la oleuropeína (OP), que se encuentra en mayor concentración en la parte acuosa de la aceituna [2]. Por lo tanto, la producción de HT a partir de los residuos de la aceituna es un proceso interesante para obtener un producto de valor agregado. En este proceso la enzima β -glucosidasa primero hidroliza el glucósido de OP dejando la aglicona de OP. Luego, el éster de la OP aglicona se hidroliza térmicamente liberando HT como producto. El objetivo de este trabajo es evaluar el uso de residuos de aceitunas con diferentes grados de humedad para la transformación enzimática de OP a HT.

Se estudiaron los residuos líquidos y secos provenientes de los procesos de extracción de aceite de oliva en dos y tres fases. Los residuos se clasificaron en función de su contenido de humedad. La concentración de polifenoles totales se determinó mediante el método de Folin Ciocalteu, que se midió como equivalentes de ácido gálico (EAG) por gramo de peso seco. La capacidad antioxidante se midió con el método DPPH [3]. La extracción de polifenoles del residuo de aceituna se realizó con pectinasas y con solvente (metanol). La hidrólisis de OP se realizó con la β -glucosidasa de *Aspergillus niger* a 40 °C. La cuantificación de HT se realizó por HPLC (Jasco, columna C18).

El residuo con mayor contenido de humedad (90%), mostró el mayor contenido de polifenoles totales (70,6 mgEAG/g). La concentración total de polifenoles de los residuos de aceituna fresca (62% de humedad total) fue de 11,8 mg EAG/g que fue diez veces mayor a la obtenida para el residuo seco (8% de humedad total, 0,77 mgEAG/g). La extracción enzimática mostró la preservación de mayores propiedades antioxidantes que el extracto obtenido con metanol. El extracto de polifenoles obtenidos de la etapa de extracción enzimática se utilizó para la etapa de hidrólisis de OP, donde se observó un aumento del poder antioxidante durante las primeras 2 horas de la reacción, simultáneamente con la liberación de HT. En conclusión, la humedad de los dos residuos de aceituna juega un rol fundamental en la valorización del residuo mediante la transformación enzimática de la OP a HT.

Referencias:

1. *EFSA Journal* **2011**, 9(4), 2033.
2. Hamza, M., Sayadi, S., *International Journal of Food Science and Technology*, **2015**, 50(3), 826-833.
3. Shen, Q., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., Ding, X., Li, P., *Anaerobe* **2010**, 16: 380-386.

Póster 35

Caracterización del extracto enzimático de *Streptomyces* sp. G11C utilizado en la hidrólisis de queratina de plumas

Valentina González^{1*}, Pedro Valencia², Beatriz Cámara¹

¹Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología Ambiental, Departamento de Química, & Centro de Biotecnología DAL, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

²Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

*Autor correspondiente: valentina.gonzalez@alumnos.usm.cl

A nivel mundial, la industria avícola genera 5 millones de toneladas de plumas por año [1]. Las plumas son un bio-recurso importante pues poseen un alto contenido de proteínas, que van desde el 75% al 90% en forma de queratina [2]. Esta proteína presenta una alta estabilidad frente a enzimas proteolíticas tradicionales (como tripsina y pepsina), a agentes químicos y a tensiones mecánicas. La mayor aplicación de estos residuos es en la elaboración de harina de pluma, que se utiliza en la fabricación de piensos de animales. Sin embargo, este proceso utiliza tratamientos físico-químicos a elevada temperatura y presión generando una destrucción de los aminoácidos esenciales y una disminución en la calidad nutricional de la harina de plumas [3]. El uso de enzimas o microorganismos queratinolíticos ha mostrado ser una alternativa favorable para este proceso. Queratinasas microbianas pueden ser obtenidas de hongos y algunas bacterias, como *Bacillus* y *Streptomyces* [2]. Las queratinasas son enzimas robustas que muestran alta especificidad hacia sustratos insolubles ricos en queratina como plumas, lana, uñas y pelo, difíciles de degradar [3]. Previamente, en base a un screening de actividad queratinolítica, utilizando residuos de pluma como sustrato, se seleccionó una cepa con alto potencial para la hidrólisis de queratina de plumas: *Streptomyces* sp. G11C, aislada de sedimentos marinos del Golfo de Penas, XI región de Chile. Para la producción de enzimas queratinolíticas, *Streptomyces* sp. G11C fue cultivada en un medio salino con plumas como única fuente de carbono y nitrógeno. Al cabo de cinco días, el cultivo se centrifugó y el sobrenadante fue recuperado para la posterior caracterización. Se midió actividad queratinolítica y proteolítica por espectrofotometría utilizando como sustratos queratina azul y azocaseína respectivamente. La actividad enzimática máxima se observó a pH 8 y 60°C, y presentó una alta estabilidad a diferentes temperaturas, 4, 20, 30 y 60°C, conservando el 82, 80, 73 y 40% de su actividad queratinolítica inicial a las 4 horas de incubación, respectivamente. Adicionalmente, bajo estas condiciones de cultivo, al menos seis proteasas extracelulares fueron producidas, como se evidenció en SDS-PAGE acoplado a zimograma utilizando gelatina como sustrato, presentando pesos moleculares entre 27 y 110 KDa. Este trabajo evidencia el potencial biocatalítico de *Streptomyces* sp. G11C, como productora de enzimas queratinolíticas que pueden ser utilizadas para la valorización de residuos avícolas ricos en queratina.

Agradecimientos: Beca Doctorado Nacional CONICYT N°21161188, Fondecyt Regular N°1171555, Conicyt PIA ACT172128, Beca PIIC, Programa de Incentivos a la Iniciación Científica – UTFSM.

Referencias:

1. Habbeche, A., *et al.*, Purification and biochemical characterization of a detergent-stable keratinase from a newly thermophilic actinomycete *Actinomadura keratinilytica* strain Cpt29 isolated from poultry compost. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **2014**, 117, 413-421.
2. Gupta, R. *et al.*, Revisiting microbial keratinases: next generation proteases for sustainable biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology* **2012**, 33, 1-13.
3. Daroit D., Brandelli A., A current assessment on the production of bacterial keratinases. *Critical Reviews in Biotechnology* **2013**, 1–13.

Póster 36

Síntesis de lactulosa en modalidad de lote alimentado con β -galactosidasa inmovilizada

Javiera Campos, Francisca Valencia, Andrés Illanes, Cecilia Guerrero*

Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

*Autor correspondiente: cecilia.guerrero@pucv.cl

La síntesis enzimática de lactulosa es una reacción compleja en la que compite la reacción de hidrólisis de lactosa con la de síntesis de compuestos transgalactosilados (lactulosa y oligosacáridos transgalactosilados). Es por este motivo que resulta interesante evaluar la modalidad de lote alimentado, ya que esta permite ejercer un control sobre las cantidades de fructosa y lactosa incorporadas al reactor, con lo cual se podrán favorecer las reacciones de transgalactosilación sobre las de hidrólisis.

Se llevó a cabo la síntesis de lactulosa con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*, inmovilizada covalentemente a glioxil agarosa, con el fin de analizar el efecto del flujo de alimentación de sustratos (fructosa y lactosa), la razón molar entre ellos y la concentración inicial de azúcares sobre el rendimiento, productividad y selectividad de la síntesis. Se obtuvo que a mayor flujo de alimentación se produce un incremento en la productividad específica, mientras que a mayor razón molar fructosa/lactosa se obtiene un incremento en la selectividad y el rendimiento de lactulosa. Por su parte, la concentración inicial de azúcares no tuvo un efecto significativo sobre la síntesis de lactulosa en esta modalidad de reacción. De esta manera, se definió, un flujo de alimentación de 5 mL/min a una razón molar fructosa/lactosa de 6, como las condiciones en las que se obtiene el mayor rendimiento de lactulosa (0,16 g/g) y una selectividad de 4 mol/mol. Bajo estas condiciones, se realizó la síntesis de lactulosa en modalidad de lotes alimentados sucesivos, obteniéndose al cabo de 10 lotes un rendimiento de 4,13 kg de lactulosa/g proteína inmovilizada, lo cual es 3,25 veces mayor que lo reportado en modalidad por lotes. Si se considera el recambio de biocatalizador luego de un tiempo de vida media, se obtendría 6,61 kg de lactulosa/g de proteína y, de acuerdo con ello, se necesitaría 52 lotes convencionales para igualar la eficiencia del biocatalizador en función de los kg de lactulosa sintetizados por g de proteína inmovilizada. Por lo tanto, lotes alimentados sucesivos logran superar ampliamente los parámetros obtenidos en la síntesis de lactulosa en modalidad de lotes sucesivos.

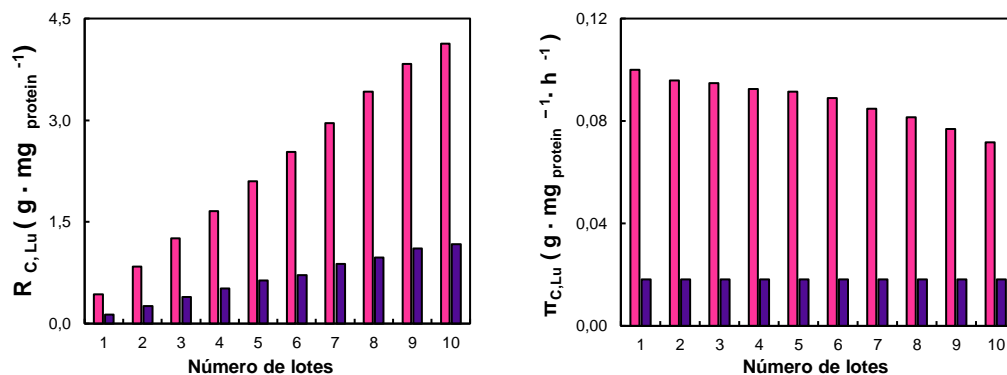


Figura 1: Comparación de la masa acumulada de lactulosa ($R_{C, Lu}$) y productividad específica acumulada ($\pi_{C, Lu}$) en la síntesis de lactulosa con β -galactosidasa inmovilizada en glioxil agarosa a 50 °C, pH 4,5 y concentración inicial de azúcares a 50% p/p. (■) Lote alimentado sucesivo a razón molar F/L 6; (■) Lote convencional sucesivo a razón molar F/L 4.

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt 1190104, Conicyt, Chile.

Póster 37

Different methods of protein extraction from Chilean shrimp (*Heterocarpus reedi*) and obtaining of antioxidant peptides by enzymatic hydrolysis

Diana Leiva*, Ronny Martínez, Claudia Bernal

Laboratorio de Tecnología Enzimática para Bioprocesos (TEB), Departamento de Ingeniería de Alimentos, Universidad de La Serena, La Serena, Chile

*Corresponding author: dleiva@userena.cl

In Coquimbo, shrimp (*Heterocarpus reedi*) industry has a great economic significance, since most of Chile's fishing quota is processed in this Region. However, 80 % of the raw materials end up as shrimp tail processing waste. Currently, waste valorization is focused in the recovery of astaxanthin and the extraction of chitin for chitosan production. On the other hand, shrimp waste protein is not recovered, even though it is the major component in this matrix and high value-added products such as protein isolates and bioactive peptides could be recovered. The aim of this work was to extract proteins and obtain antioxidant peptides from shrimp waste. Three strategies were applied for protein recovery: aqueous extraction (50° C, 30 min); carbohydrase-assisted extraction (α -amylase, β -galactosidase and pectinase); lipase-assisted extraction (lipase B from *Candida antarctica* (CALB)); and alkaline extraction (0.1 M NaOH), the latter widely used in the industry to obtain chitosan. In terms of protein extraction, alkaline solubilization was selected (Figure 1) because it generates the highest protein yield. To obtain the antioxidant peptides, Alcalase was used in a ratio of 1:10 (e / s) for 12 h, then the protein content (Bradford), free amino acids by o-phthaldialdehyde method (OPA) and antioxidant activity by ORAC assay were determined. With alcalase treatment, protein concentration decreased from 2.3 mg mL⁻¹ to 0.28 mg mL⁻¹ after 12 h of hydrolysis. This result is in agreement with the quantification of free amino acids in the same sample, where the variation was from 0.056 to 0.146 meq L⁻¹ of serine from 0 to 12 h of hydrolysis. As for the antioxidant activity, it increased according to the hydrolysis time, reaching a maximum value of 539.02 μ mol trolox equivalent (TE) g⁻¹ protein at 8 h of hydrolysis. With this protein extract, a bioactive hydrolysate with antioxidant activity was obtained using enzyme technology. This work allows to confer a potential commercial value to the protein fraction of shrimp waste through the extraction of proteins and production of bioactive peptides with antioxidant capacity. In addition, this methodology contributes to reducing the high organic load of waste waters, resulting in a lower environmental impact of the fishing industry.

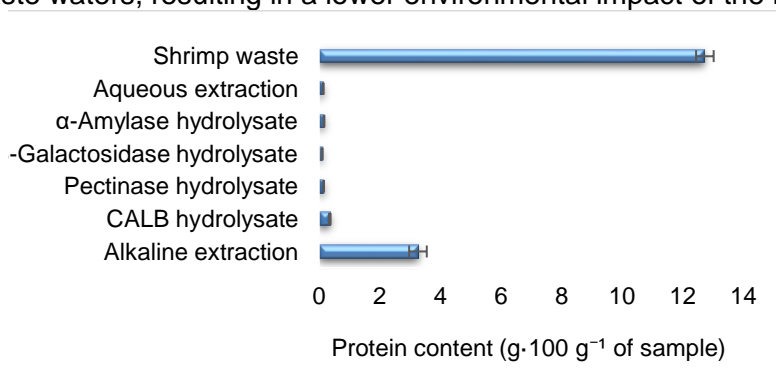


Figure 1. Protein content of shrimp waste and extracts

Póster 38

Identificación y Purificación de una L-Arabinosa Isomerasa a partir de un organismo Extremófilo para su aplicación en la Síntesis de D-Tagatosa

Pamela Mieres-Amigo^{1*}, Cecilia Guerrero-Siancas², Felipe Arenas-Salinas¹, Carlos Vera-Vera¹

¹ Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

**Autor correspondiente: pamela.mieres@usach.cl

Introducción: La D-tagatosa es un azúcar poco común, que se encuentra en muy bajas cantidades en fuentes naturales. Por lo tanto, su producción a escala industrial necesariamente involucra su síntesis a partir de otros carbohidratos [1]. La producción a gran escala de D-tagatosa se realiza desde hace más de una década a través de un proceso enzimático utilizando la enzima L-arabinosa isomerasa (AI), la cual epimeriza D-galactosa a D-tagatosa. La AI es una enzima que no se encuentra comercialmente disponible, por lo cual debe ser aislada y producida desde fuentes pertinentes. En este sentido, son de particular interés las AI termoestables, ya que el equilibrio de la reacción de epimerización se ve favorecido con la temperatura, al igual que la afinidad de la enzima por galactosa [2].

Metodología: Se identificaron y amplificaron mediante PCR los genes *araA* que codifican para la enzima AI de las bacterias termófilas *Exiguobacterium acetylicum* y *Geobacillus lituanicus*. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar para confirmar la integridad del gen *araA*. Luego estos productos de PCR se clonaron en el vector de expresión pET101/D-TOPO (Invitrogen®) y se transformaron, en primera instancia, en *Escherichia coli* Top10 para la selección de clones recombinantes. Posteriormente, luego de purificar el DNA plasmidial y chequear el correcto clonamiento del gen *araA*, se transformaron las bacterias *E. coli* BL21 y *E. coli* C41 con el plásmido recombinante. La sobre-expresión de la proteína se realizó mediante la inducción con IPTG y posterior purificación mediante columnas de afinidad HisTrap® HP. La pureza de la proteína AI se determinó mediante geles de SDS-PAGE. Las proteínas purificadas se sometieron a un análisis tanto de desaturación térmica y de caracterización enzimática en la síntesis de D-tagatosa.

Resultados: Se purificó las proteínas AI de *E. acetylicum* y *G. lituanicus* como se muestra en la Figura 1, ambas de un peso aproximado de 60 kDa, lo cual concuerda con el peso de las enzimas ya reportadas. Posteriormente, se analizó la denaturación térmica de ambas proteínas por dicroísmo circular, obteniéndose una T_m de 60 y 67,5 °C para las AI de *E. acetylicum* y *G. lituanicus*, respectivamente (Figura 2). Estas temperaturas fueron establecidas como límites superiores para realizar los experimentos de caracterización enzimática en la producción de D-tagatosa a partir de galactosa, los cuales a la fecha se encuentran en curso.

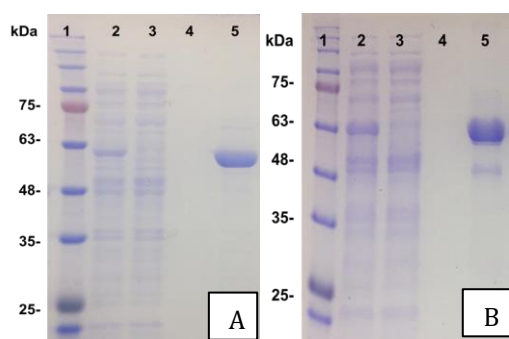


Figura 1: Gel de poliacrilamida en condiciones denaturantes (SDS PAGE) de la proteína recombinante L-arabinosa isomerasa. A: *E. acetylicum*, B: *G. lituanicus*. Carril 1: estándar de peso molecular, carril 5: proteína purificada.

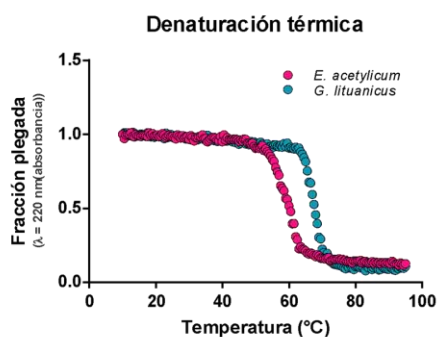


Figura 2: Denaturación térmica de las proteínas L-arabinosa isomerasa purificadas. Rosado: *E. acetylicum*, Celeste: *G. lituanicus*.

Referencias:

- [1] Kim, P., Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2004**, 100, 243-249.
 [2] Oh, D.K., Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2007**, 76, 1-8.

Agradecimientos: Fondecyt Iniciación 11180282 y Fondecyt Regular 11901044

Póster 39

Estudio de la síntesis de butil- β -galactósido con una β -galactosidasa comercial

Kevin Muñoz¹, Cecilia Guerrero², Felipe Arenas¹, Carlos Vera¹

¹ Laboratorio de Microbiología Molecular, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile

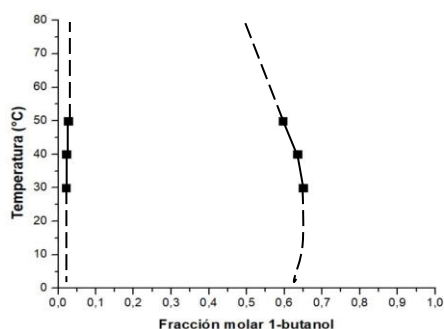
² Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

**Autor correspondiente: kevin.munoz.d@usach.cl

Introducción: Los alquil-glicósidos son agentes tensoactivos no iónicos biodegradables, hipoalergénicos y no tóxicos, en donde la cabeza polar es un carbohidrato y la parte apolar es un alcohol graso. Estos compuestos pueden ser sintetizados por vía química y enzimática, destacando esta última por ser menos agresiva con el medio ambiente. En este trabajo se investiga la síntesis de butil- β -galactósido con una β -galactosidasa comercial, usando como sustratos lactosa y 1-butanol. Este sistema de estudio tiene la particularidad de ser un sistema bifásico en un amplio rango de razones molares 1-butanol a agua, en donde el sustrato y la enzima están en la fase acuosa y el butil- β -galactósido se particiona preferentemente hacia la fase orgánica. Así, este trabajo tiene por hipótesis que un mayor volumen de la fase orgánica favorecerá el rendimiento de la síntesis, porque se evita la hidrólisis del butil- β -galactósido sintetizado.

Metodología: Se caracterizó el equilibrio líquido-líquido para la mezcla butanol/tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 4,5 a temperaturas de 30, 40 y 50 °C. Además, se determinó el coeficiente de partición de los glucosa, galactosa y lactosa para el mismo sistema y temperaturas. Paralelamente, se caracterizó la enzima estudiada (β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*) en términos de su actividad catalítica y por electroforesis en geles de poliácridamida bajo condiciones denaturantes y no denaturantes para determinar la composición del preparado comercial (Enzeco Fungal lactase). Se realizó la síntesis de butil- β -galactósido a diferentes temperaturas, pH 4,5 y razones molares 1-butanol a tampón. Las muestras fueron secadas y sustratos y productos cuantificados por HPLC.

Resultados: Se caracterizó el equilibrio líquido-líquido para la mezcla 1-butanol/tampón citrato-fosfato 50 mM a pH 4,5 mediante el método de la gota (Ver Figura 1); determinándose las razones butanol/tampón a las cuales se un sistema bifásico. Se cuantificó el coeficiente de reparto para lactosa y los otros carbohidratos presentes. Además, se determinó que el preparado enzimático posee una actividad específica de $105,1 \pm 0,042$ UI/mg (Ver Figura 2) y que posee un contenido de proteínas de un 42% de las cuales un 25% corresponde a la β -galactosidasa de *A. oryzae*. Actualmente, se trabaja en el estudio de la síntesis de butil- β -galactósido a razones 1-butanol/tampón de 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 y 0,5 mol/mol, temperaturas de 30, 40 y 50 °C y concentración inicial de lactosa en la fase líquida de 5 g/L.



1. Curva de equilibrio líquido-líquido.

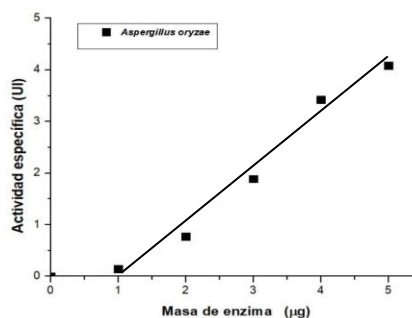


Figura 2. Actividad enzimática de la β -galactosidasa comercial de *A. oryzae*.

Agradecimientos: Fondecyt Inciacion1180282 y Fondecyt Regular 1190104

Póster 40

Production of glycerin using porcine pancreatic lipase immobilized in coconut pulp support (*A. aculeata*) as biocatalyst

Fernando Ortigoza^{1*}, Yenny González², Fátima Yubero¹

¹ Physical Chemistry Department. School of Chemical Sciences (UNA), Asunción, Paraguay

² Botany Department. School of Chemical Sciences, Asunción, Paraguay

*Corresponding author: fernando-ortigoza@hotmail.com

Glycerin is a polyalcohol that is non-toxic, non-irritant, and environmentally stable at room temperature. It is widely used in chemical industries, food, textiles, pharmaceuticals, among others. Obtained mainly by chemical synthesis as a byproduct of biodiesel production, crude glycerin contains high levels of impurities such as methanol, oil residues, alkyl esters, water, and low concentration of pure glycerol. The object of this study was to obtain glycerin through the biotransformation of vegetable oils and methanol using porcine pancreatic lipase (PPL) immobilized in dry powder of coconut pulp (*Acrocomia aculeata*) as support. Enzymatic transesterification was performed using the dry coconut pulp treated with terbutanol and iso-butyl alcohol (1) to support the PPL (2). Coconut and sunflower oil substrates were used with methanol in the presence of terbutanol as a cosolvent. Different methanol:oil ratios with a constant quantity of PPL were evaluated under mild temperature conditions until the ratio which produces the highest quantity of glycerin was found. The quality of glycerin was measured using parameters such as refractive index, density, and melting point. Values of these parameters were found to be similar than referenced values from the Argentinian pharmacopoeia. Also, the content of glycerin and its quality was compared to the indicator reference values of different purity grades, expressed in percentages. A superior purity grade was achieved with respect to crude glycerin.

Percentage of glycerin obtained in the biotransformation of coconut and sunflower oil with different methanol/oil ratios at 38.5°C and 100 rpm using immobilized PPL in coconut pulp support ($p < 0,05$)

Met(OH)/oil (w/w)	% Coconut oil glycerin	% Sunflower oil glycerin
0.95:1.22	91.15 ± 6.39	95.51 ± 2.77
0.95:2.44 1.58:3.66	89.76 ± 5.31 73.63 ± 5.74	97.86 ± 0.97 96.55 ± 1.23

Acknowledgements: This Project was funded by CONOCYT through the program PROCENCIA with resources from Fondo para la Excelencia de la Educación e Investigación – FEEI of FONACIDE.

References:

- Royon, D., Daz, M., Ellenrieder, G., Locatelli, S., Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. *Bioresource Technology* **2007**, 98(3), 648-53.
- Ayala Ortiz, J.R., Derivados inmovilizados de lipasa pancreática sobre matrices de pulpa de coco (*Acrocomia aculeata*-arecaceae) para la obtención de ésteres metílicos **2016**, UNA.

Póster 41

Síntesis enzimática de lactulosa en modalidad continua en reactor de tanque agitado

Nicolás Ramírez^{1*}, Claudia Ubilla¹, Carla Aburto¹, Felipe Valdivia¹, Cecilia Guerrero¹, Carlos Vera, Andrés Illanes¹

¹ Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

² Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

*Autor correspondiente: nicolas.icb@gmail.com

El disacárido lactulosa es producido industrialmente por síntesis química. Dicho proceso tiene desventajas como el uso de elevadas cantidades de catalizadores inorgánicos, rendimientos moderados, alta degradación de la lactulosa y formación de productos no deseados difíciles de remover¹. Debido a ello, la síntesis enzimática de lactulosa en modalidad de operación continua en reactor de tanque agitado con β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* inmovilizada covalentemente a soportes de glioxil agarosa se propone como una alternativa de proceso. La síntesis se llevó a cabo a partir de lactosa y fructosa como sustratos a 50 % p/p de azúcares totales, 50°C, pH 4.5 y carga enzimática de 17.000 UI, variando la razón molar entre fructosa y lactosa en la alimentación (Fig. 1a y 1b) y el flujo de alimentación (Fig. 1c y 1d). En la Fig. 1a y 1b, se observa que el rendimiento de lactosa en lactulosa ($Y_{\text{Lactulosa}}$) y la selectividad ($\text{mol}_{\text{Lactulosa}}/\text{mol}_{\text{oligosacáridos transgalactosilados}}$) aumentan con la razón molar fructosa-lactosa, mientras que $Y_{\text{Lactulosa}}$ aumenta (Fig. 1c) y la selectividad disminuye con el aumento del flujo de alimentación (Fig. 1d).

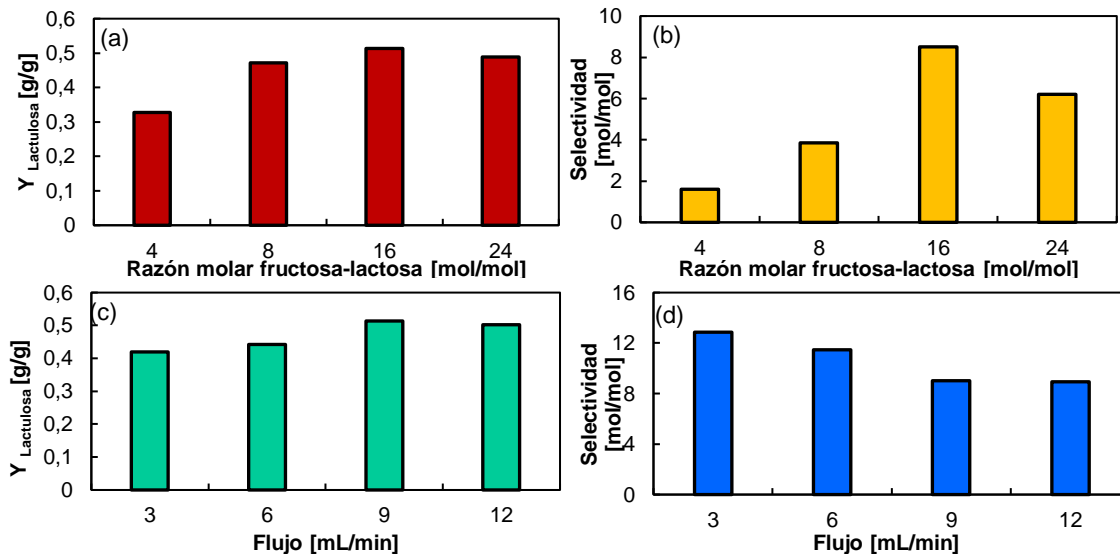


Figura 1: $Y_{\text{Lactulosa}}$ (a y c) y selectividad (b, d) operando en modalidad continua en reactor de tanque agitado a 50 % p/p, 50 °C, pH 4.5, con una carga enzimática de 17.000 [UI] a diferentes razones molares fructosa-lactosa a un flujo de alimentación de 9 mL/min (a y b), y a distintos flujos de alimentación a una razón molar fructosa-lactosa de 16 mol/mol (c y d).

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt Regular 1190104, Conicyt, Chile.

Referencia:

1. Panesar, P.S., Kumari, S. *Biotechnology Advances* **2011**, 29, 940-948.

Póster 42

Optimización de la síntesis de propil- β -galactósido mediante β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae*

Diego Rice-Muñoz¹, Cecilia Guerrero-Siancas², Felipe Arenas-Salinas¹, Carlos Vera-Vera¹

¹ Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile

² Pontificia Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: diego.rice@usach.cl

Introducción: A nivel mundial se producen cerca de 115 millones de toneladas/año de suero de leche, siendo un 47% desechado al medio ambiente [1]. Este abundante residuo tiene un escaso valor comercial y posee una alta demanda biológica de oxígeno (45.000 - 60.000 mg/L), debido a su alto contenido de lactosa y proteínas [1]. Dentro de la gama de compuestos de alto valor agregado que es posible obtener desde la lactosa, esta investigación considera la producción de propil- β -galactósido a partir de lactosa y 1-propanol mediante el uso de una β -galactosidasa comercial de *A. oryzae*. El propil- β -galactósido es un tipo de alquil-glicósido, siendo éstos agentes tensoactivos no-iónicos, no-tóxicos, hipoalergénicos y biodegradables [2].

Metodología: Inicialmente se caracterizó el preparado enzimático de β -galactosidasa (ENZECO® Fungal Lactase) en términos de su actividad específica y contenido de proteínas. Para determinar el efecto del 1-propanol y la temperatura en la síntesis de propil- β -galactósidos, las reacciones fueron llevadas a cabo a concentraciones de 1-propanol entre 20 y 80% v/v y temperaturas de 30 y 45°C. Todas las reacciones de síntesis se condujeron a una concentración inicial de lactosa de 5 g/L, pH 4,5 (tampón citrato-fosfato 50 mM) y 700 UI/mol de lactosa. Se realizó el seguimiento de la reacción durante 120 minutos tomando muestras a intervalos regulares de tiempo. Las muestras se secaron a vacío a 55°C por 6 horas y fueron analizadas en un equipo de HPLC con detector de índice de refracción.

Resultados: Se determinó una actividad enzimática específica de $182,93 \pm 9,83$ (UI/mg) para el preparado enzimático utilizado. La enzima catalizó eficientemente la síntesis de propil- β -galactósido a 30°C (ver Figura 1); no obstante, a 45 °C la enzima se inactivó luego de 20 minutos de reacción. Los mejores resultados fueron obtenidos a 30°C y 80% v/v de propanol (ver Figura 2), donde se obtuvo una concentración del producto de 12,5 mM, lo que equivale a un rendimiento de 75%

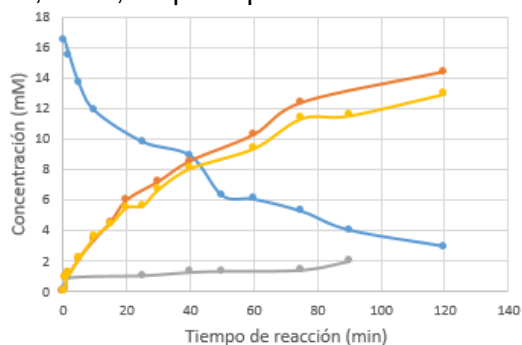


Figura 1. Cinética de reacción de síntesis de propil- β -galactósido a 30°C con 80% v/v inicial de 1-propanol. Azul: lactosa, rojo: glucosa, gris: galactosa y amarillo: propil- β -galactósido.

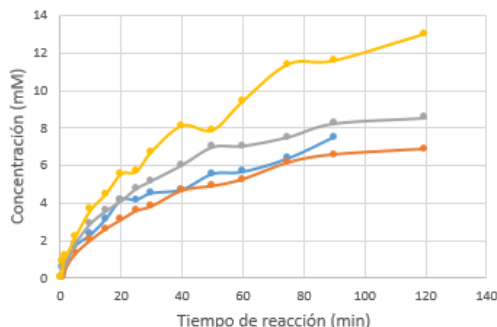


Figura 2. Síntesis de propil- β -galactósido a 30°C. Azul: 20%, naranja: 40%, gris: 60% y amarillo: 80% v/v de 1-propanol.

Agradecimientos: Proyectos Fondecyt Iniciación 11180282 y Fondecyt Regular 1190104.

Referencias:

- [1] Lahouel, N., Kheroua, O. Saidi, D. Yahiaoui, F. Z., *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Science* **2016**, 2456-2458.
 [2] Von Rybinski, W., Hill, K., *Angewandte Chemie International Edition* **1998**. 37(10), 1338.

Póster 43

Nuevo sistema multienzimático para la síntesis de iminociclitoles

Bruno Strancar ¹, Lorena Wilson ¹, Marina Guillén ², Gregorio Álvaro ², Oscar Romero ^{1,*}

¹ Escuela de Ingeniería Bioquímica, PUCV, Valparaíso, Chile.

² Departamento de Ingeniería Química, Biológica y Ambiental, UAB, Barcelona, España.

*Autor correspondiente: oscar.romero@pucv.cl

Los sistemas multienzimáticos cada vez ganan mayor atención, especialmente para la producción de compuestos usados en la industria farmacéutica y cosmética. Estos sistemas presentan interesantes ventajas tales como: reducción de costo y tiempo en recuperación de productos intermedios, manipulación de reacciones reversibles, y control sobre la concentración de inhibidores o intermediarios inestables ^[1].

Este trabajo presenta el desarrollo de un proceso multienzimático para la síntesis de glicofármacos utilizando compuestos de bajo costo, como el glicerol. El sistema está compuesto por tres enzimas: glicerol deshidrogenasa (GlyDH), NADH oxidasa (NOX) y fructosa 6-fosfato aldolasa (FSA). Basado en este sistema multienzimático se estudió la síntesis de preFagomina, un iminociclitol con interesantes propiedades nutracéuticas^[2] (Fig. 1).

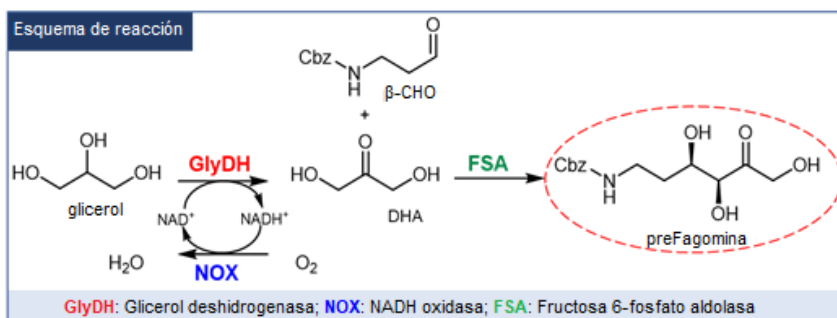


Figura 1. Esquema de la cascada multienzimática

Utilizando herramientas de ingeniería de reacción y de procesos, se determinaron las condiciones de compromiso de pH y concentración de sustratos, para obtener las ventanas de operación del sistema. Los resultados muestran una gran influencia de la concentración del aldehído aceptor (β -CHO) sobre el rendimiento de síntesis. Utilizando alta concentración de este sustrato se produjo la inactivación de todas las enzimas involucradas en la cascada ^[3]. Sin embargo, a moderada concentración de β -CHO (25mM), se obtiene un excelente rendimiento de preFagomina, cercano al 90%.

Los resultados obtenidos muestran una nueva plataforma, que podría ser utilizada para la síntesis enzimática de glicofármacos, usando distintos aldehídos y aldolasas.

Agradecimientos: Fondecyt 3170258; InnoSyn B.V. (Holanda) por la donación de NOX.

Referencias:

[1] Velasco-Lozano, S., et al., *Biocatalysis and Biotransformation* **2018**, 36, 184.

[2] Nash, R.J., et al., *Future Medicinal Chemistry* **2011**, 3, 1513.

[3] Ohs, R., et. al., *Biotechnology Progress* **2018**, 34, 1081.

Póster 44

Incremento de la extracción de proteínas desde pulpina de ave mediante hidrólisis enzimática por lotes secuenciales

Luisa Téllez¹, Pedro Valencia^{2*}, Marlene Pinto², Sergio Almonacid²

¹ Universidad ICESI, Cali, Colombia

² Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: pedro.valencia@usm.cl

La operación de hidrólisis enzimática de proteínas en la modalidad de reactor por lotes se caracteriza por presentar una fase inicial rápida que progresivamente decae a una fase lenta debido a la inhibición que ejercen los productos que se acumulan durante la reacción (Valencia et al., 2014). Para superar este inconveniente, se ha propuesto que, los subproductos sean sometidos a proteólisis en la modalidad de lotes secuenciales separando la fase soluble y sometiendo nuevamente a hidrólisis la fase insoluble. Con el fin de caracterizar el comportamiento de esta modalidad de operación se realizó una hidrólisis enzimática mediante dos lotes secuenciales, cada uno de 30 min, empleando una concentración de pulpina de ave 25% (m/m) a 50°C, pH 8 y 0,5 mUA/g de Alcalase en cada lote y una segunda hidrólisis enzimática bajo las mismas condiciones pero con 0,25 mAU/g de proteasa en cada lote. Lo anterior se comparó con un lote único de 60 min en las mismas condiciones de operación con 0,5 mUA/g de Alcalase. Las muestras se sometieron a hidrólisis total para determinar la cantidad de nitrógeno extraído a la fase soluble utilizando el método del α -ftaldialdehído (OPA). Mediante éste se obtuvieron 8,9 mmol de α -aminos liberados y 0,89 mmol/mAU h de productividad para el primer lote secuencial con 0,5 mAU/g por lote, 10,2 mmol de α -aminos liberados y 0,255 mmol/mAU h de productividad para los 2 lotes secuenciales agregando 0,5 mAU/g a cada lote, 5,5 mmol de α -aminos liberados y 1,1 mmol/mAU h de productividad para el primer lote secuencial con 0,25 mAU/g por lote, 6,9 mmol de α -aminos liberados y 0,345 mmol/mAU h de productividad para los dos lotes secuenciales con 0,25 mAU/g por lote y 8,2 mmol de α -aminos liberados y 0,41 mmol/mAU h de productividad para el control de lote único con 0.5 mAU/g. Se observó una mayor productividad para el caso del lote secuencial con 0,25 mAU/g, concluyéndose que empleando una menor cantidad de enzima, mediante la modalidad de lotes repetidos, se alcanza una mayor extracción de nitrógeno total.

Referencia:

Valencia, P., Pinto, M., Almonacid, S., Identification of the key mechanisms involved in the hydrolysis of fish protein by Alcalase. *Process Biochemistry* **2014**, 49(2), 258-264.

Póster 45

Síntesis enzimática de lactulosa en modalidad de lotes repetidos con agregados entrecruzados de β -galactosidasa (CLAGs) de *A. oryzae*

Claudia Ubilla¹; Carla Aburto¹; Sebastián Suarez¹; Carlos Vera²; Andrés Illanes¹; Cecilia Guerrero¹.

¹Escuela de Ingeniería Bioquímica, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

²Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile, Santiago, Chile.

*Autor correspondiente: clau.ubilla.23@gmail.com

Diversas estrategias se han utilizado para la síntesis de lactulosa mediante β -galactosidasa inmovilizada, la que al ser poco específica, produce reacciones que compiten entre sí, generando lactulosa y oligosacáridos transgalactosilados (TOS)¹ Es por esto que nuevas estrategias de operación pueden permitir aumentar rendimiento, selectividad y productividad de lactulosa. La inmovilización mediante agregación y entrecruzamiento permite obtener biocatalizadores sin soporte de elevada actividad específica, fáciles de preparar a partir de enzimas poco purificadas. La síntesis de lactulosa, empleando agregados enzimáticos entrecruzados de β -galactosidasa de *Aspergillus oryzae* (CLAGs), obtenidos mediante precipitación con etanol y propanol al 50% v/v, se realizó a 50 °C, pH 4.5, 50% p/p de azúcares totales, 200 UI_H*g⁻¹ de enzima, y razón molar fructosa/lactosa 8 en modalidad de lotes repetidos. La masa acumulada de lactulosa por unidad de masa de proteína contactada (RC_{LU}) fue mayor con ambos CLAGs que con la enzima libre (Figura 1a y 1b). Tanto la RC_{LU} como la productividad específica acumulada (π _{LU}) fueron mayores con los CLAG precipitados con etanol que con propanol (Figura 1c y 1d).

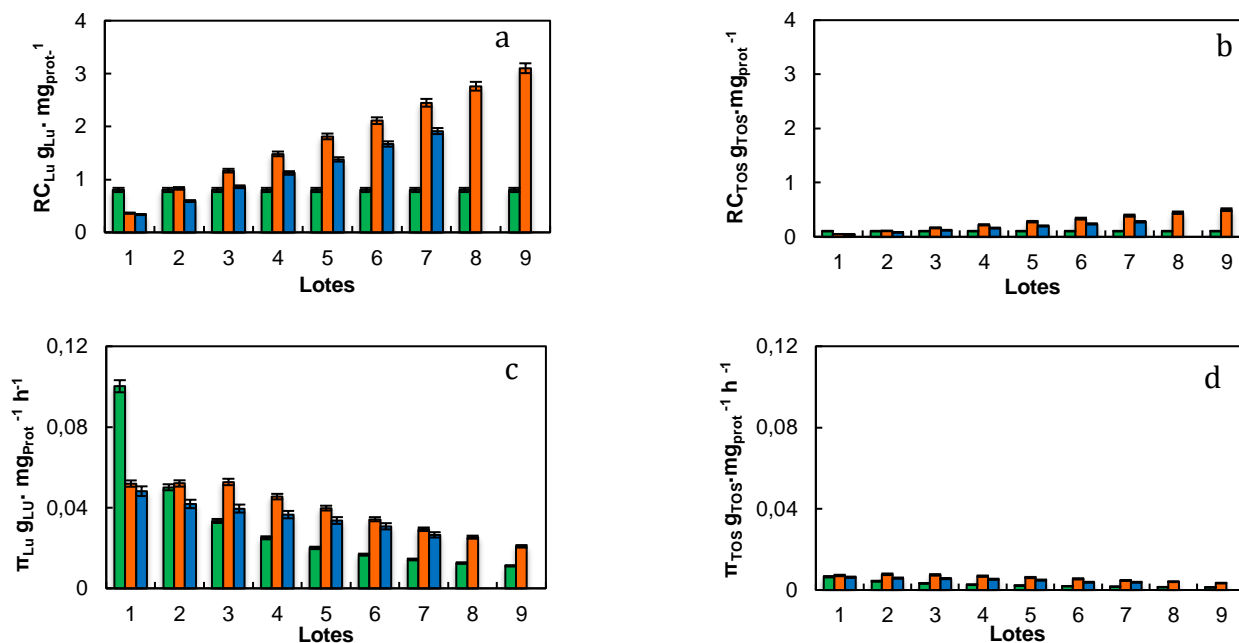


Figura 1. Masa acumulada de lactulosa (RC_{LU}) y de oligosacáridos transgalactosilados (RC_{TOS}) por unidad de masa de proteína contactada (a y b). Productividad específica acumulada de lactulosa (π _{LU}) y de TOS (π _{TOS}) (c y d). Lote con enzima libre (■), Lote repetido con CLAGs precipitados con etanol (■) y propanol (■).

Agradecimientos: Proyecto Fondecyt Regular 1190104, Conicyt, Chile.

Referencia:

1. Panesar, P.S., Kumari, S., *Biotechnology Advance* **2011**, 29, 940-948.

Póster 46

Caracterización de enzima comercial para su uso en disminución de amargor de jugos cítricos mediante hidrólisis de naringina

Paulina Urrutia*, Mariela Muñoz, Lorena Wilson
Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile
*Autor correspondiente: paulina.urrutia@pucv.cl

Los jugos cítricos constituyen uno de los principales jugos de fruta consumidos a nivel mundial, jugando un rol de importancia en la industria alimenticia. A pesar de que los jugos cítricos usualmente son levemente amargos, los consumidores son muy sensibles al grado de amargor afectando la calidad y valor comercial de los productos. Dentro de los compuestos amargos, la naringina es el principal flavonoide responsable por el amargor inmediato de los jugos. La hidrólisis de naringina por la enzima α -L-ramnosidasa (RAM) genera los compuestos prunina y L-ramnosa. El amargor de la prunina es solo un 33% del de la naringina, pudiendo ser posteriormente hidrolizada a naringenina y D-glucosa por una β -D-glucosidasa (GLU), disminuyendo aún más el amargor (Puri et al., 1996). En el presente trabajo se caracterizó un nuevo preparado comercial soluble denominado Novozyme NS 33117, el cual reporta actividad de glucoamilasa, celulasa, alfa-amilasa, β -glucosidasa y 1,4- β -celobiosidasa. Hasta el momento no se ha reportado su uso en la hidrólisis de naringina y en la disminución del grado de amargor de jugos cítricos.

La enzima Novozyme NS 33117 fue caracterizada en términos de contenido y tamaño molecular de proteínas. La actividad de RAM y GLU fue medida a 45°C utilizando los sustratos *p*-nitrofenil- α -L-ramnopiranosido (pNRP) y *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosido (pNGP) a distintos pH. Una unidad internacional de actividad RAM (UI_{RAM}) fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de pNRP por minuto a partir de una solución 5 mM de pNRP en tampón citrato-fosfato 25 mM. Una unidad internacional de actividad GLU (UI_{GLU}) fue definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de pNGP por minuto a partir de una solución 10 mM de pNGP en tampón citrato-fosfato 25 mM. Finalmente, se evaluó la hidrólisis de naringina presente en jugo de pomelo a 45°C. La concentración de naringina, prunina y naringenina fue determinada mediante HPLC con detector DAD.

Se determinó un contenido de proteína de 5,2 mg/mL y se observó mediante electroforesis SDS-PAGE la presencia de dos bandas principales a 37 y 50 kDa. Al evaluar la actividad RAM y GLU a distintos pH (3-6) se encontró en ambos casos un óptimo a pH 4, alcanzando una actividad específica de 3401 $UI_{RAM}/mg_{proteína}$ y 3736 $UI_{GLU}/mg_{proteína}$. La aplicación del preparado enzimático en jugo de pomelo permitió disminuir el contenido de naringina, aumentando la concentración de prunina y naringenina en el tiempo, lo que se explica por la presencia de actividad RAM y GLU.

Agradecimientos: Trabajo financiado por proyecto Fondecyt 11180726.

Referencias:

Puri, M., Marwaha, S.S., Kothari, R.M., Kennedy, J.F., Biochemical basis of bitterness in citrus fruit juices and biotech approaches for debittering. *Critical Reviews in Biotechnology* **1996**, 16, 145-155.

Póster 47

El método de la mediana (Direct Linear Plot) para la estimación de constantes cinéticas de reacciones enzimáticas

Pedro Valencia^{1*}, Carolina Astudillo², Diego Gajardo³, Sebastián Flores³, Bastián Sepúlveda³

¹ Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

² Escuela de Alimentos, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

³ Departamento de Matemática, Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile

*Autor correspondiente: pedro.valencia@usm.cl

Resumen

En 1974 Eisenthal y Cornish-Bowden publicaron el método “direct linear plot” que utiliza la mediana como estimador de las constantes V_{max} y K_m a partir de datos de velocidad inicial versus concentración de sustrato. Este método no-paramétrico resultó ser muy robusto al compararlo con el método de mínimos cuadrados. Sin embargo, su uso quedó relegado a la ecuación de Michaelis-Menten debido a que, en primera instancia, el mismo autor indicó que el método no era fácilmente aplicable a ecuaciones con más de dos constantes cinéticas. Desafortunadamente, este comentario fue mal entendido por otros autores, llegando a decirse que este método no puede extenderse o aplicarse a ecuaciones de más de dos parámetros. Esto resultó en una motivación para explorar los límites de la aplicación de este método. Actualmente, este método ha sido probado con la ecuación de inhibición acompetitiva por sustrato, que cuenta con tres constantes cinéticas. Se implementó un algoritmo computacional para evaluar el efecto del error experimental sobre la estimación de las constantes V_{max} , K_m y K_S . Los resultados mostraron que el método de la mediana y el método de mínimos cuadrados son muy parecidos en exactitud y varianza al estimar las constantes cinéticas. Sin embargo, ante la presencia de valores atípicos en los datos (*outliers*) el método de mínimos cuadrados resultó mucho más afectado que el de la mediana. Además, considerando que el método de la mediana está libre de los requisitos de los mínimos cuadrados y de las arbitrariedades implícitas en los métodos de linealización, el método de la mediana es superior a todos los métodos publicados, incluyendo la regresión no-lineal por mínimos cuadrados. En conclusión, el método de la mediana sí puede ser aplicado a ecuaciones con más de dos parámetros y, claramente, es el método más robusto y confiable para estimar constantes cinéticas de reacciones enzimáticas. El método está actualmente siendo evaluado para ser aplicado con los modelos cinéticos de inhibición por producto, que también cuentan con tres constantes cinéticas.

Referencia:

Valencia, P., Astudillo-Castro, C., Gajardo, D., Flores, S. Application of the median method to estimate the kinetic constants of the substrate uncompetitive inhibition equation. Journal of Theoretical Biology 418, 122-128, 2017.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2017.01.033>

Póster 48

Study of the enzymatic reduction of CO₂ to formic acid using the immobilized FDH enzyme

Giuseppe Pietricola¹, Carminna Ottone², Emanuele Berruto¹, Melodj Dosa¹, Marco Piumetti^{1*}, Tonia Tommasi¹, Debora Fino¹

¹Dipartimento Scienza Applicata e Tecnologia, Politecnico di Torino, Torino, Italia

²Escuela de Ing. Bioquímica, P. Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, Chile

*Corresponding author: marco.piumetti@polito.it

Various methods exist for the production of methanol starting from CO₂, such as the thermocatalytic or electrocatalytic ones. A strategy for methanol production involves the use of enzymes capable of carrying out the CO₂ reduction reaction. In literature, the use of a cascade system with three enzymes has been proposed: 1) Formate dehydrogenase (FDH); 2) Formaldehyde dehydrogenase (FaldDH) and 3) Alcohol dehydrogenase (ADH). Each reaction takes place in aqueous solution at room temperature. In order for each of the three reactions to occur, the use of the NADH cofactor, which acts as a proton and electron donor, is necessary [1]. One of the problems of using soluble enzymes is their low stability. To overcome this limitation, the use of immobilized enzymes on porous supports has been reported in the literature. Moreover, thanks to immobilization, the biocatalyst is easily separated from the final product of interest and can be reused in a new cycle [2]. A further problem of this system is the use of NADH, necessary for the reaction of interest to take place. This is a very expensive cofactor and its regeneration is necessary in order to implement the process in a reactor. In this work an attempt was made to develop a strategy of immobilization of FDH on mesoporous silica in order to study the CO₂ reduction reaction to formic acid. Five types of mesoporous silica were used as possible supports: i) commercial SBA-15; ii) synthesized SBA-15; iii) commercial MCF; iv) synthesized MCF with 0.5 wt. % mesitylene/pluronic ratio; v) synthesized MCF with 0.75 wt. % mesitylene/pluronic ratio. The support functionalization was carried out with glyoxyl groups, in order to covalently bind the enzyme to the support [3]. The catalytic activity of the immobilized enzyme may decrease, and then the biocatalysts were evaluated in terms of their specific activity [2]. Likewise, immobilization yields and thermal stability were also evaluated. As a whole, the immobilized enzyme exhibited higher thermal stability than the free enzyme. Specifically, commercial MCF and synthesized MCF (0.5) exhibited the best immobilization yields: 50% of the enzyme supplied was bound covalently to the support in 40 min. Noteworthy, the synthesized MCF (0.75) seems to be the most promising support since it has a specific activity of 1.36 U/g_{MCF(0.75)} with an immobilization yield in activity of 39%. At present, tests are being carried out to see which type of silica support has the highest specific activity. Following these preliminary tests, the best immobilized biocatalyst will be used for CO₂ conversion tests and the reusability of the catalyst will be studied.

References:

[1] Luo, J., Meyer, A.S., Mateiu, R.V., Pinelo, M., *New Biotechnology* **2015**, 32, 319-327.

[2] Illanes, A., *Enzyme Biocatalysis. Principles and Applications* **2008**, Springer-Verlag, New York Inc., United States.

[3] Bernal, C., Sierra, L., Mesa, M., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2012**, 84, 166-172.

Póster 49

Purificación parcial de L-asparaginasa intracelular de *Enterobacter sp. M55* halotolerante

Abad Hurtado*, Juan C. Flores-Santos, Stephy Saavedra, Cynthia Esquerre, Amparo Iris Zavaleta

Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima 1 – Perú

*Autor correspondiente: abadhurtadog@hotmail.com

Una estrategia empleada en el tratamiento de varios tipos de cáncer es el uso de enzimas como L-asparaginasa (L-ASNasa y L-glutaminasa que privan de un aminoácido a las células cancerosas produciendo su posterior muerte. Este efecto antineoplásico es selectivo dado que las células normales pueden sintetizar los aminoácidos necesarios para su viabilidad. Entre estas enzimas antineoplásicas, la L-ASNasa (L-asparagina amidohidrolasa, EC 3.5.1.1) es la más utilizada y es parte de los protocolos de tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda¹. Sin embargo, algunos pacientes desarrollan respuestas inmunológicas graves y otras reacciones adversas severas que requieren la interrupción del tratamiento. Estas complicaciones se han asociado a la presencia de actividad L-glutaminasa en las preparaciones farmacéuticas. Ante la necesidad de disponer de L-ASNasa con nuevas propiedades y mejores perfiles inmunológicos, el objetivo del presente estudio fue purificar parcialmente una L-ASNasa de *Enterobacter sp. M55* halotolerante. En este aspecto, primero se cultivó la bacteria en medio Czapek Dox suplementado con glucosa y extracto de levadura a 37 °C, 200 rpm durante 16 h. Luego, las células se cosecharon por centrifugación, se resuspendieron en buffer Tris HCl 50 mM, EDTA 1 mM, glicerol 5 % (p/V) a una D.O_{600nm} = 100, y se sonicaron. El extracto enzimático crudo se purificó por una columna de dietilaminoetil celulosa a diferentes pH. Las proteínas se eluyeron con tres volúmenes de una gradiente lineal de NaCl entre 0 y 0,5 M en buffer Tris HCl 20 mM pH 7,5 a un flujo de 0,2 mL/min. Después, se determinaron las actividades L-ASNasa y L-glutaminasa por el método del ácido L-aspartil-β-hidroxámico², y las proteínas totales por el método del ácido bicinconónico (BCA). La actividad L-ASNasa del extracto enzimático fue de 0,18 IU/mL. El pH 7,5 del buffer de equilibrio de celulosa DEAE fue el mejor para recuperar la L-ASNasa libre de proteasas, obteniendo una actividad específica de 0,4 UI/mg y sin actividad de L-glutaminasa. Así, L-ASNasa intracelular de *Enterobacter sp. M55* halotolerante fue purificada 7,2 veces a mediante cromatografía de intercambio iónico con celulosa DEAE.

Agradecimientos: Esta investigación fue financiada por el convenio N° 169 -2017 FONDECYT

Referencias:

1. Shakambari, G., Ashokkumar, B., Varalakshmia, P., L-asparaginase - A promising biocatalyst for industrial and clinical applications. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2019**, 17, 213-224.
2. Drinas, C., Kinghorn, J., Pateman, J., Aspartic Hydroxamate resistance and asparaginase regulation in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Journal of General Microbiology* **1977**, 98:493–501.

Jbiocat

II JORNADA DE BIOCATÁLISIS
22 / 24 DE ENERO DE 2020



AUSPICIAN

