

15.1 Laboratorio de Fermentaciones y Biocatálisis

El Laboratorio de Fermentaciones y Biocatálisis es un laboratorio en el que estudiantes del Doctorado en Ciencias Químicas interesados en la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento de Bioquímica realizan sus trabajos de tesis.

En este laboratorio se realiza investigación en los siguientes temas:

- Producción de enzimas robustas (lipasas y esterases) obtenidas a partir del cultivo de microorganismos (arqueas y hongos).
- Clonación, expresión, producción y purificación de enzimas lipolíticas de arqueas halófilas.
- Producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas de hongos, mediante técnicas de fermentación en medio sólido, empleando residuos agroindustriales.
- Síntesis de ésteres empleando lipasas en solventes no acuosos (Biocatálisis).
- Inmovilización de enzimas para su aplicación en biocatálisis.
- Producción de bioplásticos y biocombustibles (bioetanol y biodiesel), empleando residuos agroindustriales como materias primas.

Actualmente, dos proyectos de investigación se llevan a cabo en este laboratorio:

- 1) *Manejo sustentable del lirio acuático para el saneamiento y protección de cuerpos de agua*, (Proyecto de desarrollo científico para atender Problemas Nacionales, CONACYT: Modalidad: Grupo de Investigación).

En este proyecto se busca entender el impacto ambiental del empleo del lirio acuático en los cuerpos de agua (lagos y ríos).

Las actividades que se realizan en este proyecto son:

- i) El análisis de la composición del lirio acuático (lignina, polisacáridos, cenizas y metaloides pesados).
 - ii) La sacarificación de la planta (hidrólisis de los polisacáridos que componen la biomasa de la planta: principalmente celulosa y hemicelulosa), mediante estrategias químicas y enzimáticas (enzimas comerciales), para la obtención de oligosacáridos y de azúcares fermentables. Los oligosacáridos podrían ser utilizados como prebióticos y los azúcares fermentables en la producción de bioetanol y biodiesel.
 - iii) Aislamiento de cepas de hongos productores de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas.
 - iv) Producción de enzimas celulolíticas y hemicelulolíticas, empleando las cepas de hongos recientemente aisladas y técnicas de fermentación en medio sólido.
 - v) La sacarificación del lirio acuático empleando enzimas producidas en el Laboratorio de Fermentaciones y Biocatálisis, para la obtención de oligosacáridos y de azúcares fermentables.
- 2) *Estudio de las propiedades bioquímicas de las enzimas lipolíticas nativas y recombinantes de la arquea halófila *Natronococcus* sp. TC6*, (Proyecto de Investigación Científica Básica CONACYT).

En este proyecto se busca encontrar enzimas lipolíticas estables en solventes no acuosos (solventes orgánicos), para realizar reacciones de síntesis de ésteres (Biocatálisis). Para ello, se llevan a cabo cultivos líquidos con el arquea halófila *Natronococcus* sp. TC6, buscando maximizar la producción de la enzima lipolítica. Posteriormente, se purificará la

enzima y se caracterizará bioquímicamente.

Paralelamente, se ha llevado a cabo la secuenciación del genoma de *Natronococcus* sp. TC6 y mediante herramientas de bioinformática, se han localizado genes relacionados con la síntesis de enzimas lipolíticas. Mediante técnicas de Biología Molecular (ADN recombinante), se está realizando la amplificación de genes de interés, mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La clonación y transformación se lleva a cabo en un hospedero heterólogo (*E. coli*) y uno homólogo (*Haloferax volcanii*). Empleando estos hospederos, se producirán enzimas recombinantes en cultivos líquidos. Para lograr la purificación de las enzimas, se recurrirá a las técnicas cromatográficas (cromatografías: hidrofóbica, por afinidad y de exclusión molecular). Las enzimas puras serán caracterizadas bioquímicamente: peso molecular, punto isoeléctrico, actividad y estabilidad ante la temperatura y el pH, estabilidad ante los solventes no acuosos y otros agentes químicos desnaturizantes. Posteriormente, se estudiará el efecto que ejerce la concentración salina en la conformación proteica y en la actividad enzimática. Finalmente, las enzimas serán inmovilizadas en un soporte y se llevarán a cabo reacciones de síntesis de ésteres, empleando solventes no acuosos (Biocatálisis).

El Laboratorio de de Fermentaciones y Biocatálisis cuenta con los siguientes equipos:

a) Espectrofotómetro iMark de Bio Rad. Este espectrofotómetro es un equipo compacto ideal para muchos ensayos biológicos basados en microplacas de 96 pozos. Cuenta con varios filtros de longitudes de onda que incluyen el UV. Las aplicaciones fotométricas principales que se realizan son: la cuantificación de ácidos nucleicos y de proteínas, ensayos de actividad enzimática de punto final e incluso de cinéticas rápidas.

b) Campanas de flujo laminar. Las campanas de flujo laminar permiten obtener una zona estéril y evitar cualquier contaminación microbiana del espacio de trabajo. Los equipos que se tienen son de las marcas Labconco y Supcris.

c) Centrífugas con control de temperatura. El control de temperatura es importante y tomado como referencia para los enzimólogos y biólogos celulares, porque garantiza las condiciones necesarias para la reproducibilidad de la etapa de preparación de muestras. Permite la separación de células y macromoléculas de la muestra. Una de ellas de la marca Firlabo, la capacidad de la centrifuga es de ocho tubos falcón de 50 mL o 16 tubos de 15 mL. La otra centrífuga es de la marca SORVALL, la capacidad de la centrifuga es de volúmenes más grandes (tubos de hasta 500 mL por posición).

d) Incubadora de la marca Terlab controla temperaturas entre 5 y 70 °C. Es una incubadora de gran capacidad útil para el cultivo de microorganismos

e) Ultracongelador de la marca Fryka. En este ultracongelador las muestras biológicas se pueden conservar a -80 °C durante años sin que los microorganismos pierdan su viabilidad.

A continuación se presenta evidencia fotográfica de este laboratorio.





