



UNAP



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON
MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y ESTRUCTURAL DE LA SUBUNIDAD
BIOTIN-CARBOXILASA DE LA ENZIMA ACETIL-COA CARBOXILASA
DE UNA MICROALGA OLEAGINOSA *ANKISTRODESMUS SP***

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN LA INDUSTRIA DEL
PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTADO POR: ANDRY MERCEDES MAVILA SORIA

ASESORES: BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.

BLGO. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, DR.

IQUITOS, PERÚ

2024



UNAP



FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON
MENCIÓN EN INDUSTRIA DEL PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

TESIS

**CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y ESTRUCTURAL DE LA SUBUNIDAD
BIOTIN-CARBOXILASA DE LA ENZIMA ACETIL-COA CARBOXILASA
DE UNA MICROALGA OLEAGINOSA *ANKISTRODESMUS SP***

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS Y
TECNOLOGÍAS AMBIENTALES CON MENCIÓN EN LA INDUSTRIA DEL
PETRÓLEO Y MEDIO AMBIENTE**

PRESENTADO POR: ANDRY MERCEDES MAVILA SORIA

ASESORES: BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.

BLGO. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, DR.

IQUITOS, PERÚ

2024



UNAP

Escuela de Postgrado
"Oficina de Asuntos Académicos"



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
N°156-2024-OAA-EPG-UNAP

En Iquitos en la Escuela de Postgrado (EPG) de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP) a los veinticuatro días del mes de octubre de 2024 a las 11:00 a.m., se dió inicio a la sustentación de la tesis denominada: "CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA Y ESTRUCTURAL DE LA SUBUNIDAD BIOTIN-CARBOXILASA DE LA ENZIMA ACETIL-COA CARBOXILASA DE UNA MICROALGA OLEAGINOSA ANKISTRODESMUS SP", aprobado con Resolución Directoral N°1704-2024-EPG-UNAP, presentado por la egresada ANDRY MERCEDES MAVILA SORIA, para optar el Grado Académico de Maestra en Ciencias y Tecnologías Ambientales con mención en Industria del Petróleo y Medio Ambiente, que otorga la UNAP de acuerdo a la Ley Universitaria 30220 y el Estatuto de la UNAP.

El jurado calificador designado mediante Resolución Directoral N°1265-2024-EPG-UNAP, esta conformado por los profesionales siguientes:

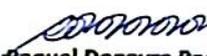
Blga. Marjorie Raquel Donayre Ramírez, Dra.	(Presidenta)
Ing. Quím. Wilfredo Ruiz Mesia, Dr.	(Miembro)
Blgo. Marx Peña Hidalgo, Dr.	(Miembro)

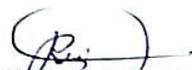
Después de haber escuchado la sustentación y luego de formuladas las preguntas, éstas fueron respondidas: Satisfactoriamente

Finalizado la evaluación; se invitó al público presente y a la sustentante abandonar el recinto; y, luego de una amplia deliberación por parte del jurado, se llegó al resultado siguiente:

La sustentación pública y la tesis ha sido: Aprobada con calificación Buena.

A continuación, la Presidenta del Jurado da por concluida la sustentación, siendo las 12:00 del veinticuatro de octubre de 2024; con lo cual, se le declara a la sustentante Apto, para recibir Grado Académico de Maestra en Ciencias y Tecnologías Ambientales con mención en Industria del Petróleo y Medio Ambiente.


Blga. Marjorie Raquel Donayre Ramírez, Dra.
Presidenta


Ing. Quím. Wilfredo Ruiz Mesia, Dr.
Miembro


Blgo. Marx Peña Hidalgo, Dr.
Miembro


Blgo. Juan Carlos Castro Gómez, Dr.
Asesor


Blgo. Diego Antonio Leonardo Cabrejos, Dr.
Asesor

Somos la Universidad licenciada más importante de la Amazonía del Perú, rumbo a la acreditación

Calle Los Rosales cuadra 5 s/n San Juan Bautista, Maynas, Perú
Celular: 953 664 439 - 956 875 744
Correo electrónico: postgrado@unapquitos.edu.pe www.unapquitos.edu.pe



TESIS APROBADA EN SUSTENTACIÓN PÚBLICA EL 24 DE OCTUBRE DEL 2024
EN LA ESCUELA DE POSTGRADO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA
AMAZONÍA PERUANA, EN LA CIUDAD DE IQUITOS-PERÚ



BLGA. MARJORIE RAQUEL DONAYRE RAMIREZ, DRA.
PRESIDENTE



ING. QUIM. WILFREDO RUIZ MESIA, DR.
MIEMBRO



BLGO. MARX PEÑA HIDALGO, DR.
MIEMBRO



BLGO. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, DR.
ASESOR



BLGO. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, DR.
ASESOR

NOMBRE DEL TRABAJO

EPG_M_TESIS_MAVILA SORIA.pdf

AUTOR

ANDRY MERCEDES MAVILA SORIA

RECUENTO DE PALABRAS

13081 Words

RECUENTO DE CARACTERES

71554 Characters

RECUENTO DE PÁGINAS

56 Pages

TAMAÑO DEL ARCHIVO

2.3MB

FECHA DE ENTREGA

May 28, 2024 10:41 AM GMT-5

FECHA DEL INFORME

May 28, 2024 10:42 AM GMT-5**● 10% de similitud general**

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para cada base de datos.

- 9% Base de datos de Internet
- Base de datos de Crossref
- 5% Base de datos de trabajos entregados
- 2% Base de datos de publicaciones
- Base de datos de contenido publicado de Crossref

● Excluir del Reporte de Similitud

- Material bibliográfico
- Coincidencia baja (menos de 10 palabras)

A mi familia, lo más preciado que tengo en esta vida: A mi mamá, Marina Soria por su apoyo incondicional, por su amor y comprensión, por darme la fortaleza de seguir adelante. A mis hermanos, Ángel Bruno y Said Laura.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología por financiar la tesis, bajo el marco del Proyecto: “Caracterización estructural y funcional de la Acetil-Coenzima A carboxilasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*: Enzima clave para la producción sustentable y eco amigable de biodiesel en la Amazonia Peruana”. (contrato N° PE501082477-2023-PROCIENCIA). Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Bajo la responsabilidad del Dr. Diego Leonardo.

A mis asesores: Dr. Juan Carlos Castro Gómez por brindarme las construcciones con la que inicie este trabajo y al Dr. Diego Leonardo Cabrejos, por el invaluable apoyo y orientación brindado a lo largo de este proceso. Gracias por su paciencia y por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis compañeros y amigos del laboratorio, de la Unidad Especialidad de Biotecnología (CIRNA), Diego Leonardo, Jhon Vargas, Napoleón Rodríguez, Joao Fasabi, y a todo el equipo del laboratorio Biofísica y Biología Estructural (IFSC) por acogerme e instruirme durante mi estancia.

A Jhon por su constante apoyo, por su paciencia y enseñanza, por las largas jornadas de laboratorio compartidos, las charlas motivacionales y por involucrarme en este mundo de la ciencia.

Agradecer enormemente al Dr. Richard Charles Garratt, por brindarme la oportunidad de realizar gran parte de este trabajo en las instalaciones del Laboratorio de Biofísica y Biología Estructural, Instituto de Física de Sao Carlos- Brasil (IFSC). Mi más grande estima y admiración personal. Sin duda, un excelente profesional y gran ser humano.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Páginas
Carátula	i
Contracátula	ii
Acta de sustentación	iii
Jurado	iv
Resultado del informe de similitud	v
Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Índice de contenido	viii
Índice de tabla	ix
Índice de figuras	x
Resumen	xi
Abstract	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	4
1.1. Antecedentes	4
1.2. Bases teóricas	7
1.3. Definición de términos básicos	14
CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS	16
2.1. Variables y su operacionalización	16
2.2. Formulación de la Hipótesis	16
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	17
3.1. Tipo y diseño de la investigación	17
3.2. Población y muestra	17
3.3. Técnicas e instrumentos	18
3.4. Procedimientos de recolección de datos	19
3.5. Técnicas de procesamientos y análisis de los datos	28
3.6. Aspectos éticos	29
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	30
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	47
CAPÍTULO VI: PROPUESTA	55
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES	57
CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXOS	
1. Mapa genético del vector de expresión	
2. Matriz de consistencia	
3. Operacionalización de variables	

ÍNDICE DE TABLA

	Página
Tabla N° 1. Cebadores utilizados para la amplificación del gen de interés	20

ÍNDICE DE FIGURAS

	Páginas
Figura N° 1. Biosíntesis de ácidos grasos y ácidos grasos poliinsaturados	9
Figura N° 2. Organización de subunidades/dominios de ACCasa	12
Figura N° 3. La catálisis de la acetil-CoA carboxilasa	12
Figura N° 4. Construcción del gen pET-Duet-BC	31
Figura N° 5. Expresión y purificación de <i>AnkBC</i>	33
Figura N° 6. Cromatograma SEC-MALS de la enzima <i>AnkBC</i>	34
Figura N° 7. Espectro de CD de la enzima BC	35
Figura N° 8. Curva de desnaturalización térmica	36
Figura N° 9. Cristales de la enzima recombinante <i>AnkBC</i>	37
Figura N° 10. Predicción de la proteína <i>AnkBC</i> de <i>Ankistrodesmus sp.</i>	38
Figura N° 11. Topología de <i>AnkBC</i>	40
Figura N° 12. Sobreposición de <i>AnkBC</i> con diferentes estructuras de BC	41
Figura N° 13. Cambios conformacionales del sitio activo de <i>AnkBC</i>	42
Figura N° 14. Mecanismo molecular de Mg-ADP en <i>AnkBC</i>	44
Figura N° 15. Alineamiento de secuencias homólogas de <i>AnkBC</i>	46

RESUMEN

El agotamiento de los recursos fósiles, la preocupación relacionada con sus emisiones y sobre todo el incremento de la contaminación ambiental han generado la exploración de nuevas fuentes de energías renovables, que se basan en materias primas naturales como las microalgas oleaginosas. Entre estas, *Ankistrodesmus sp.*, una microalga nativa de la Amazonía peruana, puede ser aprovechada con fines bioenergéticos. El objetivo de la presente investigación fue caracterizar biofísica y estructuralmente la subunidad Biotin carboxilasa de la enzima ACCasa de una microalga oleaginosa amazónica *Ankistrodesmus sp.* El gen que codifica la BC fue clonado, expresado y la proteína recombinante (*AnkBC*) purificada por cromatografía. Posteriormente, *AnkBC* fue caracterizada biofísica y estructuralmente. La proteína *AnkBC* monomérica purificada mostró una masa molecular de 56 kDa en SDS-PAGE. El perfil de dispersión de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS) demostró que la proteína forma un homodímero de 105,47 kDa. La espectroscopía de dicroísmo circular reveló que el homodímero mostró estabilidad conformacional. Finalmente, el análisis *in silico* de *AnkBC* mostró un homodímero conformado por tres dominios, característicos de la superfamilia de unión a biotina dependientes de ATP. En conclusión, el estudio proporciona una comprensión detallada de las características biofísicas y estructurales de la subunidad biotina carboxilasa (BC) de *Ankistrodesmus sp.*, abarcando desde su clonación hasta la determinación de su estructura tridimensional por métodos bioinformáticos, esta información no solo profundiza en el conocimiento fundamental sobre la enzima ACCasa en microalgas oleaginosas, sino que también abre nuevas posibilidades en la aplicación práctica de esta información en la biotecnología y la producción de biocombustibles.

Palabras clave: *Ankistrodesmus sp.*, microalga, biotina carboxilasa, biocombustibles.

ABSTRACT

The depletion of fossil resources, concerns about their emissions and, above all, the increase in environmental pollution have led to the search for new sources of renewable energy based on natural raw materials such as oleaginous microalgae. Among these, *Ankistrodesmus sp.*, a microalga native to the Peruvian Amazon, can be used for bioenergy purposes. The aim of the present work was the biophysical and structural characterization of the biotin carboxylase subunit of the ACCase enzyme from an Amazonian oleaginous microalga, *Ankistrodesmus sp.* The gene encoding BC was cloned, expressed and the recombinant protein (*AnkBC*) purified by chromatography. Subsequently, *AnkBC* was characterized biophysically and structurally. The purified monomeric *AnkBC* protein had a molecular mass of 56 kDa on SDS-PAGE. Multi-angle light scattering profiling (SEC-MALS) showed that the protein forms a homodimer of 105,47 kDa. Circular dichroism spectroscopy revealed that the homodimer is conformationally stable. Finally, *in silico* analysis of *AnkBC* revealed a three-domain homodimer characteristic of the ATP-dependent biotin-binding superfamily. In conclusion, the study provides a detailed understanding of the biophysical and structural properties of the biotin carboxylase (BC) subunit from *Ankistrodesmus sp.* From its cloning to the determination of its three-dimensional structure by bioinformatics methods, this information not only deepens the fundamental knowledge about the ACCase enzyme in oleaginous microalgae, but also opens new possibilities in the practical application of this information in biotechnology and biofuel production.

Keywords: *Ankistrodesmus sp.*, microalgae, biotin carboxylase, biofuel.

INTRODUCCIÓN

Los estudios sobre energías renovables y biocombustibles han ganado notable interés en los últimos años, este interés se atribuye a la limitada disponibilidad de combustibles fósiles, la preocupación relacionada con sus emisiones y sobre todo al incremento de la contaminación ambiental ⁽¹⁻⁴⁾. En el Perú, el uso de combustibles fósiles suscita una amenaza ambiental latente, evidenciada principalmente por los derrames constantes de petróleo, incidentes que generaron y siguen generando impactos de gran magnitud en los diversos ecosistemas acuáticos ⁽⁵⁻⁷⁾. Ante estos desafíos ambientales, la exploración de nuevas fuentes de energías renovables y eco amigables, utilizando diversas materias primas, se ha vuelto fundamental en nuestro país ⁽⁸⁻¹⁰⁾.

En este contexto, se destaca el uso de microalgas como materia prima para la producción de biocombustibles ⁽¹¹⁻¹⁶⁾. En comparación con los cultivos vegetales, las microalgas ofrecen una huella ambiental reducida, una eficiente absorción de dióxido de carbono ^(17,18) y un alto contenido de lípidos, especialmente triacilglicéridos (TAG), que se han aprovechado para fines de bioenergía denominándose así biocombustibles de tercera generación ^(19,20). Se ha demostrado el potencial de ciertas especies microalgales amazónicas en la producción de lípidos ⁽²¹⁻²⁴⁾, entre estas especies, *Ankistrodesmus sp.* destaca como una opción relevante debido a su capacidad para acumular 50% de su peso seco en lípidos totales (con predominio de triglicéridos), característica que la posiciona como una alternativa prometedora para la producción de biodiesel en Loreto ^(24,25). No obstante, para lograr que los biocombustibles derivados de microalgas sean económicamente competitivos en comparación con el petróleo, es esencial adoptar un enfoque integral a fin de seleccionar o diseñar una microalga óptima capaz de satisfacer de manera más efectiva las demandas del mercado ^(26,27).

En los últimos años los estudios se han centrado en la enzima acetil CoA carboxilasa (ACCase) con la finalidad de mejorar la producción de lípidos en diferentes especies oleaginosas ⁽²⁸⁻³⁰⁾ debido a su participación crucial en la biosíntesis de ácidos grasos al convertir acetil-CoA en malonil-CoA ⁽³¹⁾. En

general esta enzima, está formada por tres dominios funcionales: la biotín carboxilasa (BC), la proteína de unión a carboxilo de biotina (BCCP) y las carboxiltransferasas α y β (CT). Dentro de esta enzima, la subunidad BC adquiere especial relevancia al participar en la catálisis inicial de la carboxilación de la acetil-CoA ⁽³²⁾. Por lo tanto, dada su participación directa en la acumulación de lípidos, es imperativo abordar el estudio biofísico y estructural de la subunidad Biotín-Carboxilasa de la enzima acetil-Coa carboxilasa de *Ankistrodesmus sp.* Este enfoque se presenta como una tarea esencial para impulsar nuestra capacidad de aprovechar el potencial biotecnológico de esta microalga. A pesar de que se han identificado estructuras cristalinas tridimensionales del dominio catalítico individual de BC en diversas especies bacterianas y eucariotas ^(33–36), la disponibilidad de modelos de resolución atómica para la subunidad BC en microalgas es limitada ⁽³⁷⁾. Esta escasez de información estructural dificulta la comprensión precisa de las interacciones entre dominios y la dinámica molecular que conducen a la formación del complejo ACCasa en microalgas. Esto impide el diseño de estrategias eficientes para optimizar la producción futura de biodiesel a partir de *Ankistrodesmus sp.*, limitando así su potencial como una fuente sostenible de biocombustible en Loreto.

Al caracterizar la subunidad Biotín-Carboxilasa (BC) de la enzima Acetil-Coa carboxilasa (ACCasa) de *Ankistrodesmus sp.*, no solo ampliamos nuestra comprensión fundamental de los procesos bioquímicos del dominio BC y la dinámica molecular que conducen a la formación del complejo ACCasa en esta especie microalgal, sino que también abrimos nuevas oportunidades para la ingeniería metabólica y el diseño de estrategias mejoradas y respetuosas con el medio ambiente para contemplar la producción futura de biocombustibles. Estos avances son particularmente significativos, ya que se consideran la mejor alternativa a la situación actual generada por el uso de combustibles fósiles convencionales ^(38,39). Este trabajo de tesis busca contribuir al conocimiento básico científico actual y proporcionar información relevante para una futura aplicación biotecnológica de *Ankistrodesmus sp.* en la búsqueda de fuentes de energías renovables sostenibles. Por tales motivos, se planteó la siguiente interrogante de investigación: ¿Cuáles son las

características biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*?, y como objetivo general: Caracterizar biofísica y estructuralmente la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*, finalmente los objetivos específicos incluyen: Clonar, Producir y purificar la cadena polipeptídica de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*, Evaluar las características biofísicas y determinar la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

En el 2008, se realizó un análisis detallado de las estructuras de BC de varias bacterias cristalizadas en presencia de análogos de ATP. Estas nuevas estructuras incluyen, la estructura de BC unida a AMPPNP (un análogo no hidrolizable del ATP) y los dos iones de magnesio catalíticamente esenciales, aclarando las inconsistencias entre la cinética de mutantes del sitio activo de BC y las estructuras previamente reportadas de BC. Al examinar la estructura de la BC unida a AMPPNP, se observó que la cadena de polifosfato se pliega sobre sí misma en lugar de adoptar la conformación correcta y extendida para la catálisis, respaldando la hipótesis del sinergismo inducido por sustrato. Se postula que el homodímero BC exhiba reactividad en semisitios donde los sitios activos "cambian" sus ciclos catalíticos. Una estructura de BC mostró el análogo de ATP AMPPCF₂ P unido a una subunidad, mientras que la otra subunidad no estaba ligada. La subunidad ligada adoptaba la conformación cerrada o catalítica, mientras que la subunidad no ligada estaba en la conformación abierta, las dos subunidades de BC alternan reacciones catalíticas, de modo que mientras una subunidad se une al sustrato y realiza catálisis, la otra subunidad está liberando el producto. Este hallazgo proporciona la primera evidencia estructural de reactividad sitios intermedios en la BC ⁽³⁶⁾.

En el 2009, se describió la estructura del dominio BC humano de ACC2, la estructura revela similitudes y diferencias marcadas con las estructuras de levaduras y bacterias (conformación cerrada del dominio B en ausencia de ATP), ofreciendo información valiosa para comprender el mecanismo de regulación de ACC2 por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK). Sus hallazgos revelaron que las subunidades BC bacterianas adoptan una estructura dímera, mientras que el dominio BC de ACC2 humano no exhibe una interfaz de dímero

comparable en el empaquetamiento cristalino. Similar al dominio BC de levadura, el dominio BC de ACC2 humano mostró notables diferencias conformacionales en el extremo N-terminal en comparación con las subunidades BC bacterianas. Estas discrepancias pueden explicar por qué los dominios BC de mamíferos, incluido ACC2, adoptan una estructura monomérica en solución y, en consecuencia, presentan una inactividad catalítica ⁽⁴⁰⁾.

En el 2009, se informó la estructura cristalina de BC de *E. coli* tipo salvaje en complejo con sus sustratos: biotina, bicarbonato y Mg-ADP a una resolución de 2.0 Å. La configuración estructural revela una organización precisa de los sustratos en el sitio activo, evidenciando interacciones cruciales entre bicarbonato y residuos como Arg, así como una disposición ordenada de biotina y Mg-ADP. Proponen que, durante la unión de ATP, se observa un movimiento considerable del dominio B con implicaciones en la exposición del sitio activo y la competencia catalítica en presencia de sustratos como BCCP-biotina. Además, un átomo de oxígeno del bicarbonato se posiciona estratégicamente para iniciar el ataque nucleofílico al ATP, formando el intermedio de carboxifosfato. Este oxígeno también se sitúa cercano al átomo N_{1'} de la biotina, respaldando la evidencia de que el grupo fosfato, derivado de la descomposición de carboxifosfato, actúa como la base general para extraer el protón en dicho átomo N_{1'}. Las observaciones estructurales se respaldan con mutagénesis y estudios cinéticos. En conjunto, esta primera estructura de BC en complejo con sus sustratos proporciona una visión sin precedentes del mecanismo molecular y estructural de la catálisis de esta familia de enzimas ⁽³⁵⁾.

En el 2013, se informó el primer modelo de asociación heteromérica de la enzima ACCasa de la microalga *Chlorella variabilis*, una materia prima de biocombustible de microalgas oleaginosas. El estudio abordó los mecanismos de unión, los cambios conformacionales, los movimientos de dominio concertados y los enlaces de hidrógeno intermoleculares (enlaces H a través de la combinación de modelos de

homología, acoplamiento y simulaciones dinámicas moleculares. Los estudios de simulación revelaron una flexibilidad considerable para los dominios BC y CT en las formas unidas a BCCP, lo que indicó el comportamiento adaptativo de BCCP. Además, el análisis de componentes principales reveló que, en presencia de BCCP, los dominios BC y CT adoptaron una conformación de estado abierto a través de la rotación hacia afuera en el sentido de las agujas del reloj de las hélices de unión. Estos cambios conformacionales podrían ser responsables de la unión del dominio BCCP y su translocación a los respectivos sitios activos. También, revelaron que los residuos conservados Glu201 BCCP/Arg225 BC y Asp224 BCCP/Gln228 CT desempeñan un papel vital en el mantenimiento de la estabilidad entre los dominios que interactúan. Los resultados obtenidos ofrecen perspectivas valiosas para la ingeniería de la enzima ACCasa, con posibles implicaciones en la mejora de la producción de biocombustibles derivados de microalgas ⁽⁴¹⁾.

En el 2015, se dio a conocer la primera información estructural del dímero de holoenzima ACCasa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de 500 kDa de longitud. Se mencionó notables diferencias estructurales respecto a las otras carboxilasas dependientes de biotina. La región central con sus cinco dominios es importante para posicionar los dominios BC y CT para la catálisis. La estructura mostró inesperadamente un dímero del dominio BC y amplias diferencias conformacionales en comparación con la estructura del dominio BC solo, que es un monómero. Estos cambios estructurales revelaron por qué el dominio BC monomérico es catalíticamente inactivo y define el mecanismo molecular para la inhibición de la ACCasa eucariótica. Finalmente, mencionan que debido a que las estructuras de los dominios BC y CT de los ACCasa humanos y de levadura son muy similares y consistentes con su fuerte conservación de secuencia, es probable que la estructura general de la holoenzima ACCasa humana sea similar a la ACCasa de la levadura ⁽⁴²⁾.

1.2. Bases teóricas

1.2.1. Descripción general de la microalga *Ankistrodesmus sp.*

Ankistrodesmus, es un género de microalgas verdes unicelulares perteneciente a la familia *Selenastraceae*, se caracteriza por sus células alargadas de forma falciformes, aciculares y estrechas, con posibles variaciones morfológicas entre especies. Las dimensiones típicas oscilan entre 55-60 micras de longitud y 3-4 micras de ancho ⁽⁴³⁾. Forma parte del fitoplancton de una variedad de hábitats acuáticos, desde aguas dulces hasta ambientes más salinos. Su presencia está relacionada con la calidad del agua y la disponibilidad de nutrientes ⁽⁴⁴⁾.

Ankistrodesmus sp., es una microalga aislada de la concesión para conservación de la Universidad Científica del Perú, situada en la cuenca alta del río Itaya, al sureste de la ciudad de Iquitos, entre los ríos Amazonas, Marañón y Nanay, en la región norte del Perú ⁽⁴⁵⁾. Esta cepa ha demostrado una gran capacidad para biosintetizar y acumular cantidades significativas de lípidos (~264 mg/g de biomasa seca) bajo estrés nutricional, revelando un gran potencial para la producción de biodiesel ^(24,46). Recientemente, se ha informado sobre la obtención de biodiesel a partir de los lípidos de *Ankistrodesmus sp.*, logrando un rendimiento notable del 85,11% en condiciones de ausencia de nitrógeno en Loreto, Perú. Estos resultados sugieren la viabilidad de aplicar estrategias contemporáneas de inducción, como la ingeniería genética y la generación de mutantes, para mejorar la producción de lípidos. Además, el biodiesel, como fuente de energía renovable, se presenta como una alternativa respetuosa con el medio ambiente, independiente de los combustibles fósiles, lo que podría contribuir significativamente a reducir la contaminación ambiental en la Región Loreto ⁽²⁵⁾.

1.2.2. Biosíntesis de ácidos grasos en microalgas

La comprensión detallada de las rutas biosintéticas de los ácidos grasos resulta fundamental para diseñar estrategias que aumenten su presencia celular ⁽⁴⁷⁾. La vía de biosíntesis de ácidos grasos implica la formación de ácidos grasos saturados de 16 (ácido palmítico) y 18 (ácido esteárico) carbonos de longitud a partir del metabolito intermedio acetil-CoA. Aunque gran parte del conocimiento en este campo se ha derivado de estudios en plantas y animales, se han revelado los mecanismos biosintéticos en algunas especies microalgales, como *C. reinhardtii* ⁽⁴⁸⁾, *N. oceánica* ⁽⁴⁹⁾, *P. tricornutum* ⁽⁵⁰⁾ y *Ankistrodesmus sp* ⁽⁵¹⁾.

Los mapas metabólicos reconstruidos de *Ankistrodesmus sp.* muestran diversos procesos metabólicos que suministran acetil-Coa (Figura 1). La primera fuente que se describe es el ciclo de Calvin, donde el dióxido de carbono se fija para originar gliceraldehído-3-fosfato, el cual se transforma en piruvato y posteriormente en acetil-CoA a través de la acción enzimática de las enzimas glicolíticas y el complejo de piruvato deshidrogenasa (PDH) ⁽⁵¹⁾. La segunda fuente proviene de los intermedios metabólicos del ciclo de Krebs, específicamente citrato, oxalacetato y malato, que son convertidos enzimáticamente a acetil-CoA usando ATP. La tercera fuente de acetil-Coa es el catabolismo parcial de la glucosa a piruvato a través de la glucólisis. El piruvato se convierte en acetil-CoA por PDH, así como acetil-CoA también puede ser sintetizado a partir de piruvato mediante dos derivaciones adicionales de PDH ⁽⁵¹⁾. Las moléculas de acetil-CoA son carboxiladas por acetil-Coa carboxilasa (ACC) para la síntesis de malonil-CoA, que se enlaza de manera covalente a la proteína portadora de acilo (ACP) mediante la acción de la malonil-CoA. El malonil-ACP se incorpora al ciclo de biosíntesis de ácidos grasos mediante la β -cetoacil-ACP sintasa. Esta enzima cataliza la condensación de acil-ACP con malonil-ACP, dando como resultado la formación de β -cetoacil-ACP, que se convierte secuencialmente en β -hidroxiacil-ACP, Trans-D2-enoil-ACP y

1.2.3. Biosíntesis de Triacilgliceroles (TAG) en microalgas

La capacidad de las microalgas para acumular TAG se ha convertido en un área de interés significativa debido a su potencial aplicación en la producción de biocombustibles y productos químicos sostenibles ⁽⁴⁷⁾. La comprensión detallada de la biosíntesis de TAG es crucial para optimizar los rendimientos y las propiedades de estos compuestos lipídicos en microalgas, contribuyendo así a la búsqueda de fuentes de energía renovable y sostenible ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾.

En el ensamblaje enzimático de TAG, participan tres moléculas de ácidos grasos activados (acil-CoA), una molécula de L-glicerol-3-fosfato y la enzima glicerol quinasa. En las microalgas existen al menos tres vías metabólicas activas para el ensamblaje de TAG. La primera es la ruta Kennedy, la segunda es la ruta del monoacilglicerol y la tercera es catalizada por la enzima fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa. El TAG producido son almacenados en cuerpos lipídicos citoplasmáticos, los cuales son la materia prima para obtener biodiesel ⁽⁵¹⁾. La ruta completa desde la fijación del dióxido de carbono hasta la síntesis de TAG en algas tiene lugar dentro de una sola célula, mientras que en las plantas solo ocurre en tejidos u órganos especiales ⁽⁵⁵⁾.

1.2.4. Acetil Coa Carboxilasa (ACCasa)

La acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) es una enzima multifuncional, clave en la biosíntesis y el metabolismo de los ácidos grasos, su principal función es la carboxilación del acetil-CoA para formar malonil-CoA ⁽⁵⁶⁾. En la naturaleza, existen dos formas funcionales de ACCasa (Figura 2): la forma homomérica (hmACCasa), común en el citosol de levaduras, animales, hongos y plástidos de plantas gramíneas, mientras que la forma heteromérica (htACCasa), es predominante en organismos procariotas, plantas no gramíneas y plastidios de algas ^(29,31,57). Desde el punto de vista estructural, la forma heteromérica

consta de cuatro cadenas polipeptídicas, comprendidas en tres subunidades: biotina carboxilasa (BC), proteína transportadora de biotina carboxilo (BCCP) y carboxiltransferasas (CT, subdivididas en CT- α y CT- β) (Figura 2A). En la forma homomérica, estas subunidades se ensamblan en un único polipéptido, pudiendo descomponerse fácilmente en sus subunidades individuales ^(58,59). Sus secuencias primarias constan de tres secciones principales, con el dominio BC, CT (interacción BC-CT) y BCCP en el N-terminal, el dominio CT en el C-terminal y un singular dominio central ACC no catalítico (AC) en el medio (Figura 2B).

La catálisis de la acetil-CoA carboxilasa (ACCase) en la conversión de acetil-CoA a malonil-CoA implica un proceso de dos pasos (Figura 3). La biotina unida covalentemente a una Lys conservada del dominio BCCP experimenta carboxilación en el dominio BC, el primer sitio activo de la reacción. Este evento se lleva a cabo mediante el aporte del grupo carboxilo proveniente del bicarbonato, junto con la energía derivada de la hidrólisis del ATP, para la cual se requieren cationes divalentes, tales como Mg²⁺ o Mn²⁺. El grupo carboxilo activado en la biotina se transfiere al sustrato acetil-CoA en el dominio CT, el segundo sitio activo de la reacción que se produce por el ensamblaje de las subunidades α y β -CT, dando como resultado la formación de malonil-CoA, sin ningún aporte de energía adicional ⁽⁶⁰⁾. Durante la catálisis, se creía inicialmente que la translocación de la biotina hacia los sitios activos BC y CT se realizaba mediante un modelo de "brazo oscilante". Sin embargo, investigaciones recientes han revelado que la conexión entre la biotina y el BCCP es más flexible de lo previamente considerado, pudiendo extenderse hasta 16 Å. A pesar de este descubrimiento, análisis de las estructuras en holoenzimas de diversas carboxilasas muestran que la distancia entre los sitios activos BC y CT varía entre 55 y 85 Å, lo cual contradice el modelo tradicional de "brazo oscilante". Por lo tanto, se propone un modelo alternativo denominado "dominio oscilante", sugiriendo que tanto la biotina como el dominio BCCP deben translocarse durante la catálisis ^(59,61).

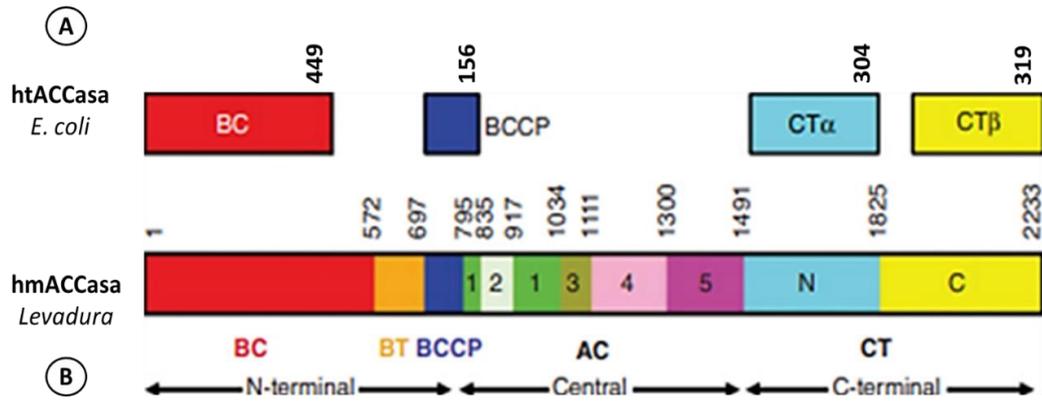


Figura 2. Organización de subunidades/dominios de ACCasa. (A) Forma heteromérica en *Escherichia coli*. (B) Forma homomérica en levadura, AC: dominio central no catalítico; BC: biotin carboxilasa; BCCP: proteína transportadora de biotina carboxilo; BT: interacción BC-CT; CT: Carboxiltransferasa. Fuente: Adaptado de Wei y Tong ⁽⁵⁹⁾.

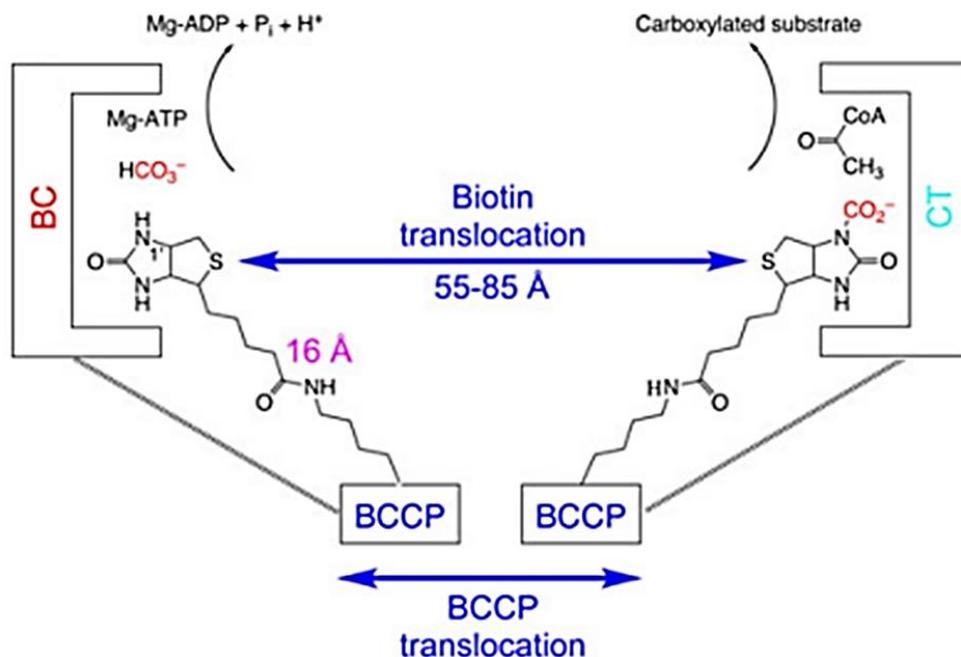


Figura 3. La catálisis de la acetil-CoA carboxilasa (ACCasa). La biotina se carboxila en el sitio activo BC, utilizando bicarbonato como donador de CO₂ con hidrólisis concomitante de ATP. Luego, la biotina se transloca al sitio activo de CT, donde el CO₂ se transfiere al sustrato acetil-CoA. Se muestra el modelo de brazo oscilante. Fuente: Lian Tong ⁽⁶¹⁾.

1.2.5. Biotin Carboxilasa (BC)

La primera estructura de BC reveló la existencia de tres dominios: dominio A, dominio B y dominio C ⁽³³⁾, con un segmento enlazador (enlazador AB) entre los dominios A y B en el dominio BC eucariótico, lo que explica en parte su mayor tamaño (~550 residuos) en relación con las subunidades BC bacterianas (~450 residuos) ^(33,40). Asimismo, en los ACCasa, se observa un loop de unión de ATP compartido por varias enzimas relacionadas con la acilación dependiente de ATP ⁽⁶²⁾.

Una diferencia notable entre el dominio BC eucariota y la subunidad BC procariota radica en los cambios conformacionales en el dominio B durante el proceso catalítico de BC ^(35,36). En el dominio BC de levadura la conformación del dominio B suele permanecer cerrada incluso en ausencia de ATP en el sitio activo ^(40,59). Contrariamente, la subunidad BC bacteriana experimenta un cambio significativo en la conformación del dominio B durante la catálisis. En cuanto a la subunidad BC de *E. coli*, tras la unión de ATP, el dominio B sufre un cambio conformacional de estado abierto a cerrado, siguiendo un patrón análogo a otras enzimas de esta superfamilia ^(35,63). El dímero BC activo funciona mediante un mecanismo de “reactividad de medio sitio” alternando reacciones catalíticas entre subunidades. Mientras una subunidad se une al sustrato con catálisis posterior, la otra subunidad libera el producto de biotina carboxilada, impidiendo la catálisis simultánea en ambos sitios activos ⁽³⁶⁾. La estructura de la subunidad BC de *E. coli* en complejo con sustratos, proporciona información detallada de la reacción, reconociendo una red intrincada de interacciones iónicas, de enlaces de hidrógeno y de Vander Waals. Uno de los átomos de oxígeno del bicarbonato inicia un ataque nucleofílico al ATP, formando carboxifosfato, donde los residuos Glu²⁹⁶ y Arg³³⁸ tienen papeles cruciales, actuando Glu²⁹⁶ como base general para extraer el protón del bicarbonato y Arg³³⁸ para extraer el protón del bicarbonato ⁽³⁵⁾.

Es probable que este mecanismo se comparta entre todas las carboxilasas dependientes de biotina, y Glu²⁹⁶ y Arg³³⁸ de *E. coli BC* se conserven entre estas enzimas. El mecanismo de unión del ATP ejerce control sobre la actividad de BC. En presencia de biotina, el ATP asume un modo de unión productivo y extendido, haciéndolo receptivo a la hidrólisis. En ausencia de biotina, el ATP se une de manera no productiva, siendo incapaz de reaccionar con el bicarbonato, evitando ciclos inútiles de hidrólisis ⁽³⁶⁾. Este mecanismo ilustra un ejemplo de sinergia inducida por sustrato donde la hidrólisis de ATP aumenta 1.100 veces en presencia de biotina libre ⁽³⁶⁾. Además, en concentraciones elevadas, el ATP puede inhibir la actividad catalítica y funcionar como un inhibidor competitivo del bicarbonato para regular la actividad del ACCasa ⁽⁶⁴⁾.

1.3. Definición de términos básicos

Microalgas oleaginosas: Son un tipo de microalgas con capacidades de almacenar triglicéridos gracias a sus características fotobiosintéticas. Frente a los cambios de condiciones ambientales responden con cambios al metabolismo de los lípidos, indicando mayores tasas de producción por biomasa seca ⁽⁶⁵⁾.

PCR: La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), desarrollada por ⁽⁶⁶⁾. Permite copiar millones de veces una secuencia específica de ADN blanco mediante una poderosa catálisis llevada a cabo por una enzima conocida como ADN polimerasa, de tal manera que cantidades pequeñas de ADN pueden ser sintetizadas y copiadas fielmente.

Plásmido: Es una molécula circular de ADN extracromosómico. Son muy utilizados en ingeniería genética para la replicación de ADN recombinante. Plásmidos que contienen ADN recombinante se introducen en un hospedador, generalmente cepas bacterianas, para

que replique este ADN y obtener así numerosas copias. Es decir, se utilizan como vectores genéticos para clonación y amplificación de material genético.

Clonación: La clonación se refiere al proceso de aislar una secuencia de DNA de interés, insertarlo en un plásmido, generando así un DNA recombinante y obtener múltiples copias de ella en un organismo.

Transformación: Es la técnica mediante la cual se introduce DNA exógeno en células procariontas. El DNA exógeno es el plásmido que contiene la secuencia genética que queremos expresar.

Cromatografía: Técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificarlos.

Purificación de proteínas: Es una técnica para separación de proteínas según sus propiedades físicas.

Proteína recombinante: Son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o una línea celular distinta a la célula original ⁽⁶⁷⁾.

CAPÍTULO II: VARIABLES E HIPÓTESIS

2.1. Variables y su operacionalización

2.1.1. Independiente

Secuencia de aminoácidos de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa de *Ankistrodesmus sp.*

2.1.2. Dependiente

Características biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa de *Ankistrodesmus sp.*

2.2. Formulación de la Hipótesis

Las características biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa heteromérica de *Ankistrodesmus sp.* presenta similitud con la familia de proteínas de unión a biotina dependientes de ATP presente en otras especies de eucariotas y procariotas debido a que su función catalítica es conservada durante el proceso evolutivo.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de la investigación

El presente trabajo de investigación fue de tipo básico, porque se buscó generar el conocimiento científico sobre la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa de *Ankistrodesmus sp*, una microalga oleaginosa de importancia bioenergética. No se enfocó en una aplicación inmediata de los hallazgos, sino en una comprensión detallada de los aspectos moleculares y estructurales que, en un futuro, podrían ser útiles para optimizar la producción de biodiesel. El nivel de profundización del conocimiento adquirido fue de tipo descriptivo, ya que el objetivo fue caracterizar las propiedades biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa en la microalga. El diseño abordado fue de tipo no experimental, porque se centró en la observación y análisis de muestras y no implicó la manipulación de variables independientes como en los estudios controlados tradicionales. El número de mediciones de las variables de estudio fue de tipo transversal, ya que los datos se obtuvieron en un solo momento, en un tiempo específico. Finalmente la toma de datos fue de tipo prospectivo, ya que los datos se obtuvieron a medida que se realizaron los ensayos respectivos ⁽⁶⁸⁾.

3.2. Población y muestra

3.2.1. Población de estudio

Estuvo constituido por todos los genes que codifican proteínas de la vía de biosíntesis de ácidos grasos de *Ankistrodesmus sp*.

3.2.2. Tamaño de la muestra de estudio

Estuvo constituido por el gen que codifica a la cadena polipeptídica de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*

3.2.3. Tipo de muestreo y procedimiento de selección de la muestra

Se empleó el muestreo no probabilístico, por conveniencia. Debido a que el objetivo principal del trabajo fue estudiar a la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*

3.2.4. Criterios de selección

Se seleccionaron los genes que codificaran proteínas de la vía de síntesis de ácidos grasos, siguiendo algunos criterios.

3.2.5. Criterios de inclusión

Proteínas que pertenecían a la vía de síntesis de ácidos grasos y que usaban a Acetil-CoA como sustrato.

3.2.6. Criterios de exclusión

Proteínas que pertenecían a la vía de síntesis de ácidos grasos y que no usaban a Acetil-CoA como sustrato.

3.3. Técnicas e instrumentos

Los procedimientos de clonación se realizaron de acuerdo con las técnicas estándar de clonación molecular descritas por Sambrook y Russell ⁽⁶⁹⁾. Secuencias de ADN se amplificaron usando la técnica de PCR, utilizando oligonucleótidos específicos ⁽⁷⁰⁾. La transformación celular se realizó utilizando células competentes con el método de

choque térmico ⁽⁷¹⁾. Los productos de PCR, expresión y purificación fue monitoreado con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE ⁽⁷²⁾.

3.4. Procedimientos de recolección de datos

3.4.1. Clonación molecular del gen que codifica a la cadena polipeptídica de BC de la enzima ACCasa

La clonación de la secuencia codificante (CDS) de la subunidad BC de la enzima ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*, se llevó a cabo a partir de ADN plasmídico proporcionado por el Dr. Juan Carlos Castro, docente investigador de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Luego, el CDS de interés fue subclonado en el vector de expresión pET-Duet-1. El Sistema de expresión Duet satisface todos los requisitos para la expresión génica de múltiples objetivos. El vector Duet contiene dos sitios de clonación múltiple (MCS), cada uno de los cuales está precedido por un promotor T7/ operador *lac* y un sitio de unión a ribosomas (rbs). El vector también porta el replicón ColE1 derivado de pBR322, el gen *lacI* y el gen de resistencia a ampicilina (Anexo 1). Las etapas de la subclonación están descritas como sigue:

a) Diseño de oligonucleótidos (cebadores)

Los oligonucleótidos fueron diseñados manualmente a partir de la secuencia del gen que codifica a BC para la inserción en los sitios de restricción de las enzimas *BamHI* y *HindIII* presentes en el plásmido pET-Duet (Tabla 1). La selección de los sitios de restricción fue en base a la ausencia de estos en el gen de interés y sitios de restricción comunes al vector de expresión.

Tabla 1. Cebadores utilizados para la amplificación del gen de interés.

Cebadores	Secuencia
F-BC	5'-AT GGATCC GATGCCGCAGCAACGT-3'
R-BC	5'-AT AAGCTT TTACACAACCCACCTT-3'

a) Amplificación del gen de interés

La amplificación del gen de interés se llevó a cabo mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando un termociclador BIORAD T100™. La reacción se realizó en un volumen final de 50 µL, que contenía 0,5 µM de cada oligonucleótido, 0,5 ng/µL de ADN, una mezcla de dNTP de 200 µM (Invitrogen), y Buffer de la enzima Taq DNA Polymerase High Fidelity 1X (Invitrogen). El protocolo de amplificación inició con una desnaturalización del ADN a 98°C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos a 98°C por 10 segundos. Mediante un perfil de temperaturas (57, 58, 59, 61, 63, 65, 66 y 67°C) se estableció una temperatura de alineamiento óptima de 65°C durante 30 segundos, seguido de una incubación a 72°C por 45 segundos para la etapa de extensión. La reacción concluyó con una amplificación final a 72°C durante 5 minutos. Posteriormente, el producto de PCR se analizó en un gel de agarosa al 1%, preparado con tampón TAE 1X (EDTA 10 mM; Tris-acetato 40 mM pH 8,0) y conteniendo Syber Green (Invitrogen). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta con tampón TAE 1X a 100 voltios durante 1 hora. Finalmente, el gel fue visualizado, el gen amplificado extraído y purificado mediante el kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen), siguiendo las especificaciones del fabricante.

b) Preparación del inserto y vector

Con el objetivo de facilitar la eficiente ligación en el vector de clonación, los productos resultantes de la PCR fueron sometidos a una reacción

de adenilación (A), siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante (New England Biolabs). Posteriormente, estos fragmentos fueron ligados al vector pGEM®-T Easy Vector (Promega Systems) mediante la enzima T4 ADN Ligasa (Fermentas Life Sciences). Para evitar la recirculación del vector y permitir la idónea unión de los productos de PCR en los extremos (A), se llevaron a cabo digestiones con la enzima de restricción *EcoRI*. Las colonias transformadas fueron seleccionadas mediante la expresión de la β -galactosidasa, utilizando X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-galactopiranosido), un sustrato cromogénico que permite distinguir fácilmente entre colonias que no contienen el plásmido, porque forman colonias azules, y aquellas que sí contienen el plásmido, las cuales forman colonias blancas. Posteriormente se cultivaron en caldo nutritivo LB, agitado durante 16 horas para garantizar el crecimiento adecuado. Concluido este proceso, el plásmido resultante (pGEM-T-BC) se purificó utilizando el kit Wizard® Plus SV Minipreps ADN Purification (Promega Systems) y se procedió a cuantificar en un Nanodrop a 260 nm.

c) Reacción de digestión y ligación

Tanto pGEM-T-BC y el plásmido pETDuet fueron sometidos a una digestión con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* (Invitrogen) como parte del proceso de subclonación, creando fragmentos compatibles que posibilitaron la ligación en la región MCS-I del plásmido utilizando la enzima T4 ADN Ligasa. La reacción de digestión se llevó a cabo en un termociclador (Eppendorf) con condiciones óptimas, alcanzando un volumen final de 20 μ L y una incubación a 37°C durante 1 hora. El producto resultante de la ligación fue analizado mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%, y la cantidad de ADN fue estimada al comparar las intensidades de las bandas con las del marcador molecular 1Kb ADN Ladder (BioLabs). La reacción de ligación posterior se realizó utilizando la enzima 1X T4 ADN Ligasa (Fermentas Life Sciences) en un volumen final de 40 μ L, con una incubación a 16°C durante 16 horas.

d) Transformación bacteriana

El producto resultante de la ligación fue empleado para la transformación de células bacterianas competentes de *Escherichia coli* DH5 α , utilizando la técnica de shock térmico. Inicialmente, las cepas se mantuvieron en reposo sobre hielo durante 15 minutos para su descongelación. Luego, se añadieron 20 μ L de la reacción de ligación a un volumen de 80 μ L de las cepas, y se incubó en hielo durante 30 minutos, seguido de un shock térmico a 42°C durante 1 minuto. Después de este tiempo se incubó nuevamente en hielo por 1 minuto y 30 segundos. Se adicionó 500 μ L de medio LB, seguido de un periodo de crecimiento a 37°C, en agitación horizontal a 150 rpm, durante 1 hora. Finalmente, las células se sembraron en medio LB sólido (agar 15 g, triptona 10 g, extracto de levadura 5 g, NaCl 5 g por 1L de solución), incorporando los antibióticos correspondientes para la selección de las bacterias transformadas (ampicilina 100 μ g/mL). Las placas resultantes fueron incubadas a 37°C por 16 horas. Es importante destacar que todas estas fases del procedimiento se llevaron a cabo en una cabina de flujo laminar para mantener condiciones asépticas y garantizar la integridad del experimento.

e) Análisis del plásmido recombinante

Para verificar la correcta inserción del gen de interés en el plásmido, colonias seleccionadas fueron sometidas a PCR de colonias. La reacción de PCR contenía, tampón de Taq Polymerase 1X (fermentas), DNTP mix 0,2 mM (Invitrogen), MgCl₂ 2 mM (Fermentas), cebadores 0,4 μ M, 1 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas), en un volumen final de 50 μ L. Las muestras obtenidas fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Además, como segundo método de confirmación de la clonación las muestras fueron digeridas con enzimas restrictivas (*Pst*I, *Dpn*I) y se dejó incubar a 37°C durante 4 horas. Después de verificar la inserción, los plásmidos recombinantes fueron transformados en células de expresión de *Escherichia coli*

Rosetta DE3 usando el método de shock térmico, descrito anteriormente y se almacenaron a -80°C en preparación para los ensayos de expresión subsiguientes.

3.4.2. Producción y purificación de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

Los ensayos fueron realizados optimizando las mejores condiciones de concentración del agente inductor Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y temperatura con la finalidad de maximizar el rendimiento y la solubilidad.

3.4.2.1. Test inicial de expresión para pETDuet-BC

A partir de glicerenado de células transformadas en *E. coli* Rosetta (DE3) se preparó pre-inóculos suplementados con antibióticos, cloranfenicol (34 mg/mL), ampicilina (200 mg/mL) y se dejó incubando overnight sobre un agitador orbital. Al siguiente día se realizó la expresión en 100mL de caldo Luria Bertani (LB), agregando el volumen completo de un pre-inóculo (5mL) a cada 100mL de LB (3 condiciones), se dejó agitando a 37°C a 150 rpm hasta alcanzar una densidad óptica apropiada ($\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,4$ a $0,8$), seguidamente se añadió Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como agente inductor, variando las concentraciones (0,1,0,3 y 0,5 mM), cada concentración fue incubada a diferentes temperaturas (18, 20 y 37°C) por 16 horas. Después de este tiempo, las células se cosecharon a 4000 rpm durante 45 minutos a 4°C . El precipitado bacteriano resultante fue resuspendido en un buffer de lisis (NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, β -mercaptoetanol 5 mM, glicerol al 10% v/p), seguidamente se sonicó la muestra por 10 minutos a 30 segundos ON, 59 segundos OFF y 40% de amplitud, posteriormente se centrifugó la suspensión a 13000 rpm durante 45 minutos a 4°C . El precipitado y el sobrenadante fueron analizados

mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 12% para verificar el rendimiento y la solubilidad de la proteína expresada.

3.4.2.2. Expresión de pETDuet-BC bajo la mejor condición

Con las condiciones ideales de expresión, se procedió a expresar para un 1L de medio LB suplementado con ampicilina ($100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y cloranfenicol ($34 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), previo a ello se realizó el pre-inóculo de pET-Duet-BC+Rosseta DE3. La inducción se realizó con $0,3 \text{ mM}$ de IPTG, después de que el cultivo alcanzó la densidad adecuada $\text{DO}_{600\text{nm}} = 0,6-0,8$, para luego dejar en agitación a 150 rpm a 18°C durante 16 horas. Después de la expresión, las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 4000 rpm durante 45 minutos a 4°C y posteriormente suspendidas en un tampón de lisis compuesto por NaCl (300 mM), Tris-HCl (20 mM , pH 7,5), β -mercaptoetanol (5 mM), y glicerol al 10% v/p. Se sonicó la muestra por 10 minutos a 30 segundos ON, 59 segundos OFF y 40% de amplitud, posteriormente se centrifugó la suspensión a 13000 rpm durante 45 minutos a 4°C . El precipitado y el sobrenadante fueron analizados mediante electroforesis en gel SDS-PAGE 12% para verificar el rendimiento y la solubilidad de la proteína expresada.

3.4.2.3. Purificación

La purificación de la proteína se realizó en dos etapas: La primera etapa fue la purificación por afinidad, para ello la fracción soluble se cargó en una columna con 5 ml de resina His60 Ni-Superflow (Clontech) previamente equilibrada con el tampón de lisis. Después, la resina se lavó con 5 volúmenes de tampón de lisis y 5 volúmenes de tampón de lisis +50 mM de imidazol para remover impurezas. La elución de la proteína se llevó a cabo utilizando 2 volúmenes de tampón de lisis (sin glicerol) con una concentración de 250 mM de imidazol (2X). Para conferir el grado de pureza de la proteína se realizó una corrida electroforética en SDS-PAGE al 12%.

Seguidamente, se procedió a concentrar (Concentrador Amicon-30 kDa) la elución que contenía la proteína con menos contaminante para un volumen final de 2mL. La segunda etapa de purificación fue la de Exclusión molecular (SEC), se inyectó la proteína concentrada (2mL) en una columna Superdex 200 XK-16 (GE Healthcare) pre-equilibrada con tampón (NaCl 300 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, β -mercaptoetanol 5 mM, 10% v/p de glicerol). Esta etapa se realizó en un sistema de purificación (AKTA pure 25L), este sistema cuenta con detector de UV a 280 nm y un colector que puede ser configurado de 1-5mL. Las fracciones fueron colectadas a 1mL/1min, el pico de mayor absorbancia fue analizada por electroforesis en SDS-PAGE al 12%. Después de conferir el grado de pureza de la proteína, se concentró para diferentes concentraciones (1-10mg/mL) y se almaceno a - 80 grados para realizar los próximos experimentos.

3.4.3. Características biofísicas de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

3.4.3.1. Cromatografía de exclusión por tamaño junto con dispersión de luz multiángulo

El estado oligomérico de *AnkBC* se evaluó utilizando un detector de dispersión de luz de tres ángulos miniDAWN TREOS (Wyatt Technology) y un refractómetro Optilab T-rEX (Wyatt Technology). Este sistema se acopló a un sistema HPLC Waters 600 (Waters) para la cromatografía de exclusión por tamaño. Se cargaron 150 μ l de muestra a 3 mg·ml⁻¹ en una columna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) equilibrada en Tris 20 mM (pH 7,8), NaCl 300 mM. La recopilación y el análisis de datos se realizaron mediante el software ASTRA7 (Wyatt Technology).

3.4.3.2. Dicroísmo circular (CD)

Para analizar el plegamiento y termo estabilidad de la proteína, se utilizó una alícuota de proteína pura de *AnkBC* a $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, que fue diluida en una solución de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5 + NaCl 100 mM para una concentración final de $[0,25 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}]$. Los análisis fueron registrados en un espectrómetro de CD Jasco J-715 (Tokio, Japón) monitoreando en el rango de longitud de onda de 200 – 260 nm, con una resolución de 0,2 nm a 25 °C y utilizando una celda de cuarzo con un camino óptico de 0,1 cm. En cuanto al experimento de estabilidad térmica, la proteína se sometió a un gradiente de temperatura que osciló entre 4 °C y 80 °C, con incrementos de 2 °C, medida a una longitud de onda de 222 nm.

3.4.3.3. Ensayos de cristalización

Los ensayos de cristalización de BC se llevaron a cabo mediante el método de difusión de vapor en gota sentada utilizando $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de concentración de proteína. Para promover la formación de cristales se utilizaron los kits comerciales MORPHEUS II (Molecular Dimensions), JCSG+Suite (Qiagen), BCS (Molecular Dimensions) e Index (Hampton Research), estableciendo los experimentos con un robot de cristalización Crystal Gryphon (Art Robbins). Instruments) con placas de 96 pocillos. Las placas montadas se incubaron a 18°C.

3.4.4. Estudios de Bioinformática Estructural de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

La predicción estructural de la subunidad Biotin Carboxilasa (BC) del complejo enzimático ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*, se realizó en base a la secuencia de aminoácidos de las cadenas polipeptídicas de *AnkBC*, utilizando el programa ColabFold, una extensión online del software AlphaFold2, un sistema de Inteligencia Artificial (IA) desarrollado por DeepMind para la predicción estructural de proteínas con precisión atómica, incluso en casos en los que no se conoce una estructura similar⁽⁷³⁾. Las cualidades de las estructuras proteicas tridimensionales modeladas por ColabFold, demostraron una precisión competitiva con las estructuras experimentales y fueron validadas por una prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT) ⁽⁷⁴⁾. (https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/batch/AlphaFold2_batch.ipynb?authuser=0&pli=1)

Para el análisis estructural de validación, comparación, superposición y producción de imágenes 3D de alta calidad de las estructuras proteicas se utilizó el programa PyMOL (<https://pymol.org/2/>), una herramienta de visualización de fuente abierta disponibles para el análisis complejo de estructuras moleculares, mediante el lenguaje de programación Python ⁽⁷⁵⁾. Se realizó un Protein BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para la búsqueda de secuencias homólogas. BLAST, es un programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local, que compara una secuencia problema (nucleótidos o proteínas) con todas las secuencias de una base de datos para encontrar regiones de similitud local. El algoritmo encuentra un homólogo en la base de datos, que tiene mayor identidad de secuencia con la secuencia problema y calcula la significación de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen⁽⁷⁶⁾. Los resultados finales de la alineación de secuencias se visualizaron a través del programa Jalview (<http://www.jalview.org>) ⁽⁷⁷⁾ y los análisis de topología, se realizó

mediante el programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) ⁽⁷⁸⁾.

3.5. Técnicas de procesamientos y análisis de los datos

El procedimiento para clonación se realizó de acuerdo a la técnica estándar de clonación molecular descrita por Sambrook y Russell ⁽⁶⁹⁾. Para ello secuencias de ADN específicos se amplificaron utilizando la técnica de PCR una técnica descrita por Kary Mullis ⁽⁶⁶⁾, utilizando oligonucleótidos específicos y ciclos de temperaturas ⁽⁷⁰⁾. Para la transformación celular se utilizaron células competentes para internalizar el plásmido alterando la permeabilidad de la membrana mediante la técnica de choque térmico ⁽⁷¹⁾. Se utilizó el sistema de la T7 polimerasa como técnica estándar de expresión de proteínas en sistemas bacterianos, descrito por ⁽⁷⁹⁾. Para la purificación de la proteína recombinante se utilizaron las técnicas de cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión molecular.

Los productos de la expresión y purificación fueron analizadas de forma cualitativa mediante la técnica de electroforesis en el gel de poliacrilamida, SDS-PAGE descrita por Laemmli ⁽⁷²⁾, que determina el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos. La cristalografía es una de las principales técnicas para la determinación de los modelos atómicos experimental de macromoléculas en alta resolución ⁽⁸⁰⁾. Los ensayos de cristalización fueron realizados utilizando la técnica de vapor por gota sentada automatizada, a través de un robot de cristalización. La predicción y el análisis estructural de la subunidad Biotin Carboxilasa (BC) se utilizaron programas como ColabFold, una extensión online del software AlphaFold2 ^(73,74), el programa PyMOL ⁽⁷⁵⁾, Clustal Omega ⁽⁷⁸⁾ y Jalview ⁽⁷⁷⁾.

3.6. Aspectos éticos

La investigación se diseñó de manera que no incluyera la participación de sujetos humanos ni animales de experimentación, lo que refleja un compromiso con principios éticos y de bienestar. Asimismo, durante el desarrollo de los procedimientos de laboratorio, se implementaron rigurosas medidas de bioseguridad para garantizar un ambiente controlado y minimizar cualquier riesgo potencial que pueda comprometer la salud de las personas involucradas o del entorno. Estas medidas incluyen protocolos estrictos de manejo de materiales, uso adecuado de equipos de protección personal y cumplimiento de normativas de seguridad establecidas.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Clonación de la subunidad Biotin-Carboxilasa (BC)

Tal como se describe en la metodología, la subunidad BC de la enzima ACCasa fue subclonado en la región MCS-I del vector pETDuet utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, a partir de ADN plasmídico. Asimismo, cabe mencionar que en este estudio solo se contempló estudiar la subunidad Biotin carboxilasa de la enzima ACCasa.

La secuencia codificante (CDS) de AnkBC fue amplificado mediante la reacción de PCR, no obstante, se observó la amplificación de fragmentos inespecíficos. En respuesta, se testearon diferentes perfiles de temperatura buscando la temperatura de alineación óptima para los cebadores utilizados (Figura 4A). En este sentido, consideramos ideal utilizar la temperatura de 65°C para los siguientes procesos, debido a que a esta temperatura se obtuvo la especificidad deseada sin la presencia de bandas inespecíficas. Los resultados demostraron que los cebadores se alinearon específicamente a nuestro gen de interés y el fragmento amplificado fue del tamaño esperado (1563 pb) (Figura 4B). Posteriormente, tras realizar la adenilación al producto de PCR obtenido, el gen que codifica a AnkBC fue clonado con éxito en el vector de policlonaje pGEMT-AnkBC (Figura 4C). Luego, este fragmento fue digerido con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* y a continuación ligado en la región MCS-I del vector pETDuet (Figura 4D). Finalmente, para verificar la ligación de BC, el plásmido fue digerido con enzimas restrictivas (*PstI*, *DpnI*), se observó la presencia de bandas esperadas (Figura 4E), dando lugar a la construcción final pETDuet-BC.

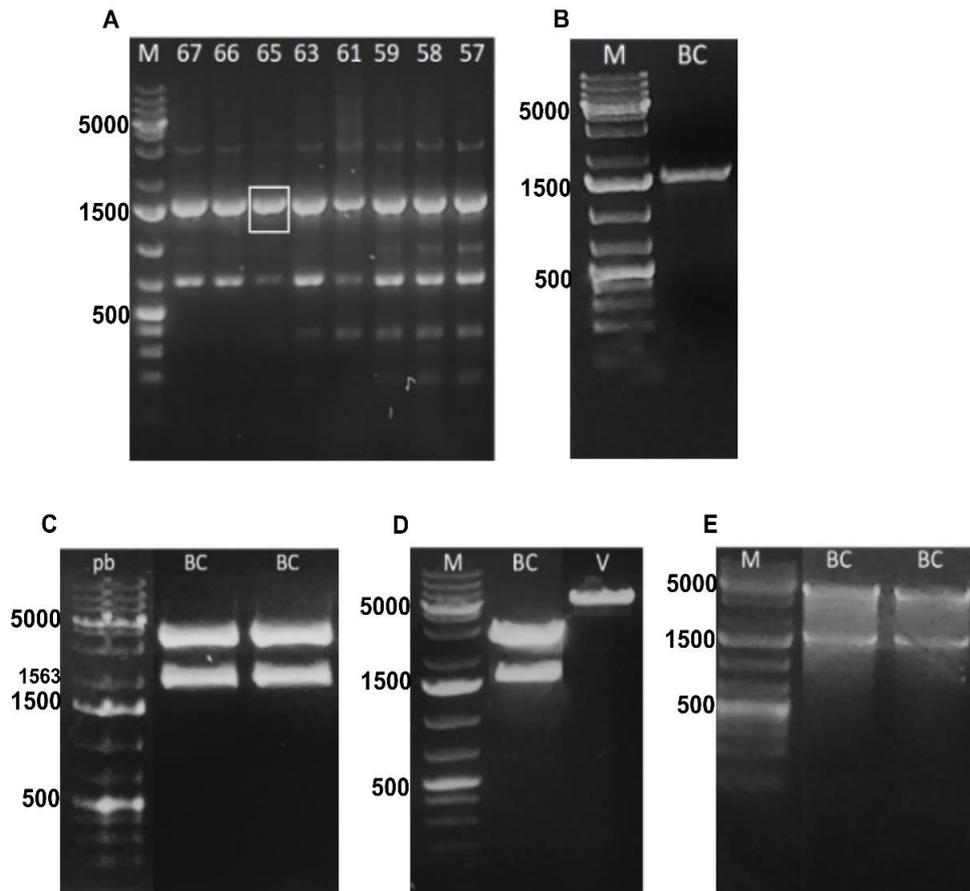


Figura 4. Construcción del vector de expresión pET-Duet-BC. A) Perfil de temperatura de amplificación B) Fragmento del gen de BC C) Clonación pGEMT del gen BC D) Vector pET-Duet-BC (BC=abierto y V=cerrado) E) Verificación de la construcción pET-Duet-BC. Fuente: Elaborado por el autor.

4.2. Producción y purificación de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

Se realizaron ensayos de expresión en diferentes condiciones, tales como la temperatura y la concentración de IPTG. Los resultados obtenidos revelaron la presencia significativa de proteína soluble al emplear una concentración de 0,3 mM de IPTG a una temperatura de 18°C; sin embargo, contrastando esta observación, la aplicación de una concentración más alta, 0,5 mM de IPTG a una temperatura de 37°C, resultó en la ausencia de expresión, lo que se dedujo por la falta de detección de bandas en los análisis. (Figura 5A). Una vez optimizado las condiciones de expresión para *AnkBC*, se procedió a realizar la producción de la proteína recombinante a una escala mayor a 1L, logrando obtener una cantidad suficiente de proteína soluble para el subsiguiente proceso de purificación.

La purificación se realizó en dos etapas: la primera etapa se realizó por cromatografía de afinidad en resina de Níquel (Ni^{+2}), aplicamos un gradiente ascendente de imidazol para conseguir separar la proteína de interés. El análisis de las fracciones eluidas de la columna de afinidad se llevó a cabo mediante electroforesis SDS-PAGE 12%, los resultados obtenidos confirmaron la pureza de las fracciones eluidas con 250 mM y 500 mM de imidazol en las cuales se presenta una única banda 56 kDa (Figura 5B). La segunda etapa se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular con la finalidad de separar agregados proteicos y de identificar los diferentes estados oligoméricos que la proteína *AnkBC* podría experimentar. A pesar de la presencia de un pequeño pico de agregado detectado entre los volúmenes 28 y 34 mL, la proteína se eluyó entre los volúmenes 35 y 45 mL, mostrando un único pico homogéneo de alta pureza al ser analizada por SDS-PAGE (Figura 5C).

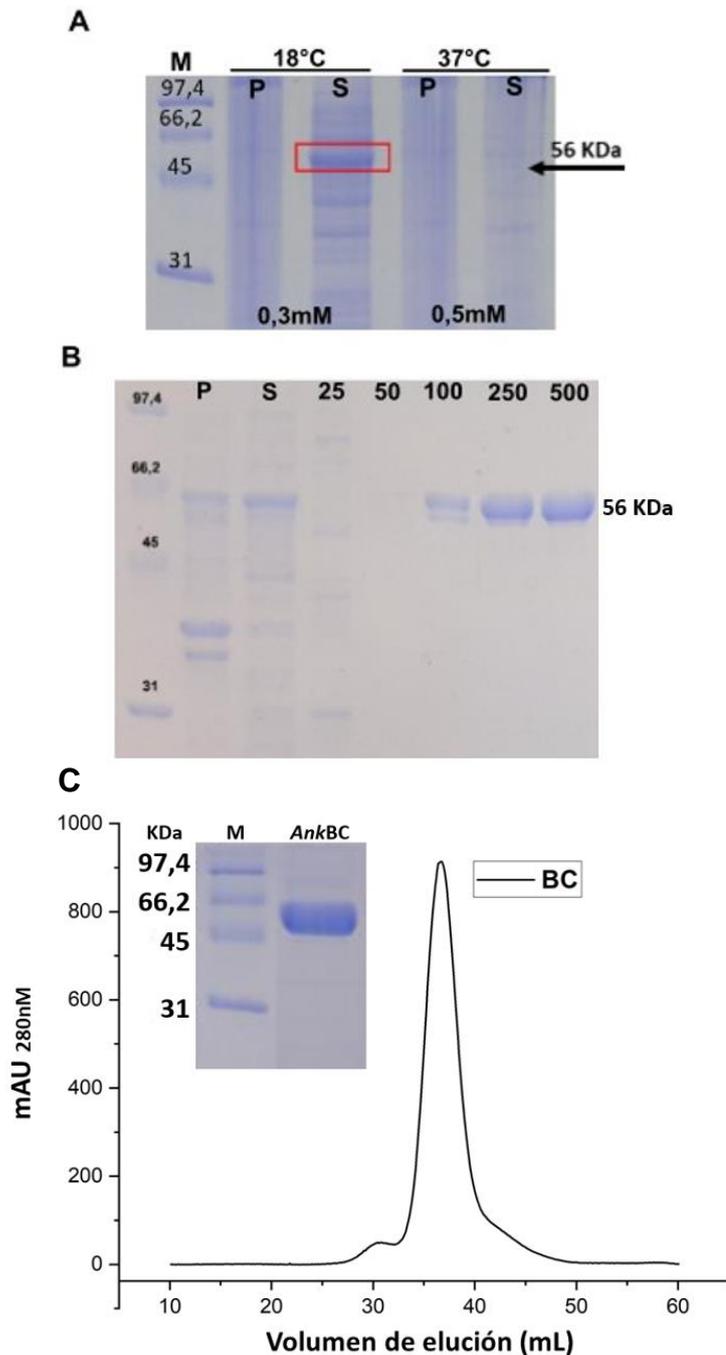


Figura 5. Expresión y purificación de *AnkBC*. A) SDS-PAGE del Test de expresión de la enzima BC. B) SDS-PAGE de la purificación de afinidad. M: marcador de masa molecular, P: precipitado, S: fracción soluble, 25: lavado con tampón de lisis + 25 mM de imidazol, 50: lavado con tampón de lisis + 50 mM de imidazol, 100: lavado con tampón de lisis + 100 mM de imidazol, 250: lavado con tampón de lisis + 250 mM de imidazol, 500: lavado con tampón de lisis + 500 mM de imidazol. C) Cromatografía de exclusión de tamaño de la proteína BC. Fuente: Elaborado por el autor.

4.3. Características biofísicas de la cadena polipeptídica recombinantes de BC de la enzima ACCasa

Para definir la homogeneidad y estado oligómero de la enzima *AnkBC*, usamos la cromatografía de exclusión por tamaño – acoplada a los perfiles de dispersión de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS), el perfil muestra un pico homogéneo, correspondiente a una molécula de 105,47 kDa (Figura 6). Esta masa es coherente con un dímero de la enzima *AnkBC*, una vez que la masa molecular teórica del monómero es de 56 kDa.

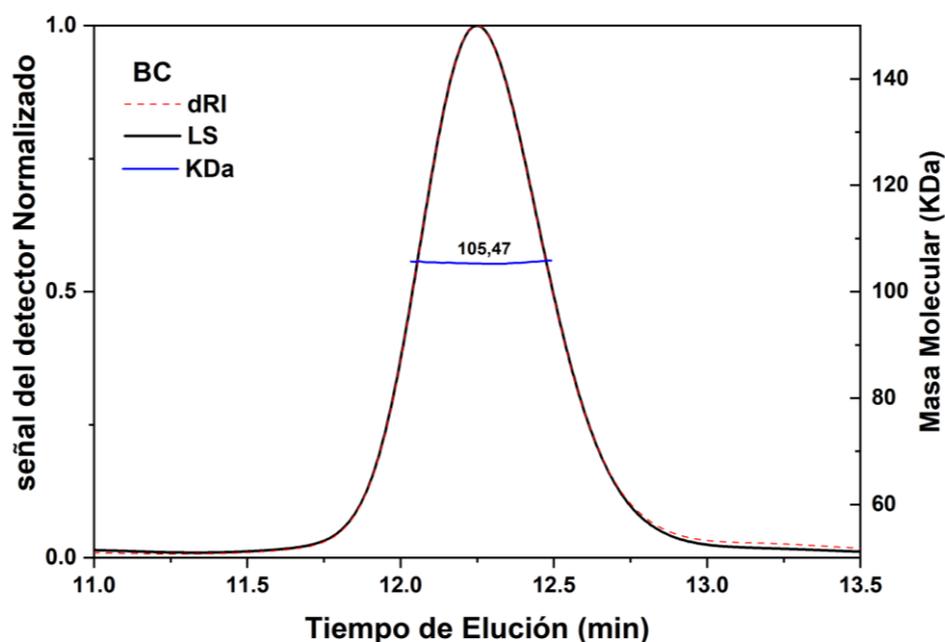


Figura 6. Cromatograma SEC-MALS de la enzima *AnkBC*. En Rojo puntillada observamos las curvas correspondientes al cambio en el índice de reflexión normalizado. En negro la intensidad de luz difractada normalizada a 90°. En azul la masa molecular calculada a través del pico correspondiente. La masa molecular (MW) determinado corresponde al valor esperado para un homodímero de la enzima BC. LS: Dispersión de luz, dRI: índice refractivo diferencial. Fuente: Elaborado por el autor.

Analizamos el estado de plegamiento de la proteína mediante el monitoreo del espectro de CD, a cada 2°C, en función del aumento de temperatura usando gradiente de 20° a 80°. La Figura 7, muestra los espectros de CD de la enzima *AnkBC* en temperaturas donde ocurrió cambios significativos de señal. A 20°, observamos mínimos negativos en 222 y 208 nm, característico de proteínas que presentan elementos de estructura secundaria tipo $\alpha\beta$ con predominancia de señal referente a las contribuciones de hélices α . Los espectros antes de 60°C no muestran una diferencia significativa, contrario a lo observado a medida que se aproxima a 70°C, donde se observa una alta diferencia, que estaría relacionado con la pérdida de elementos de estructura secundaria de la enzima BC.

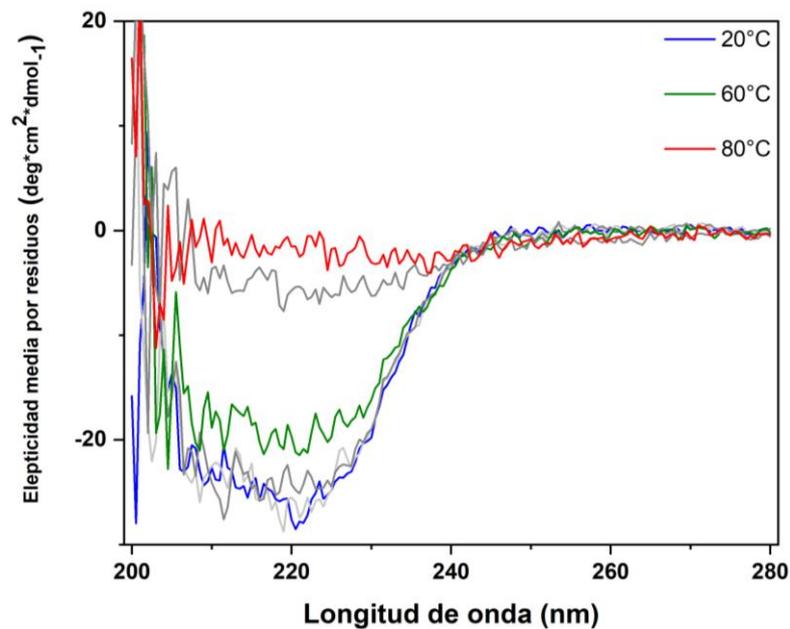


Figura 7. Espectro de dicroísmo circular de la enzima BC. Espectros más representativos obtenidos entre 20°C a 80°C. Fuente: Elaborado por el autor.

Por otro lado, la desnaturalización térmica de la enzima BC, monitoreado a 222 nm, muestra una temperatura de transición, también conocido como temperatura de melting (T_m), obteniendo con un ajuste de *Boltzman* un T_m de $64 \pm 0,22$ °C (Figura 8), este proceso no fue reversible.

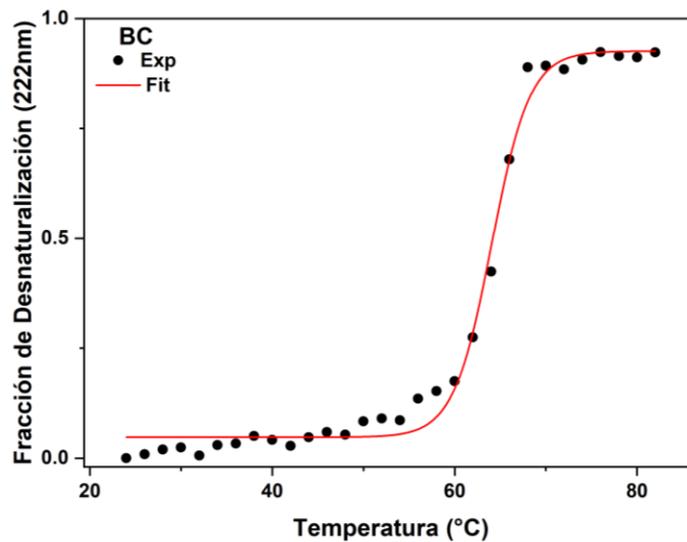


Figura 8. Curva de desnaturalización térmica. Temperatura de melting (T_m) de $64^{\circ}\text{C} \pm 0,22$ de la enzima BC. Fuente: Elaborado por el autor.

En este trabajo de investigación también abordamos ensayos de cristalización de la proteína de estudio, de las cuales algunas condiciones resultaron en cristales con calidad de difracción de rayos-X (Figura 9). Los datos de difracción aún no fueron analizados para este trabajo.

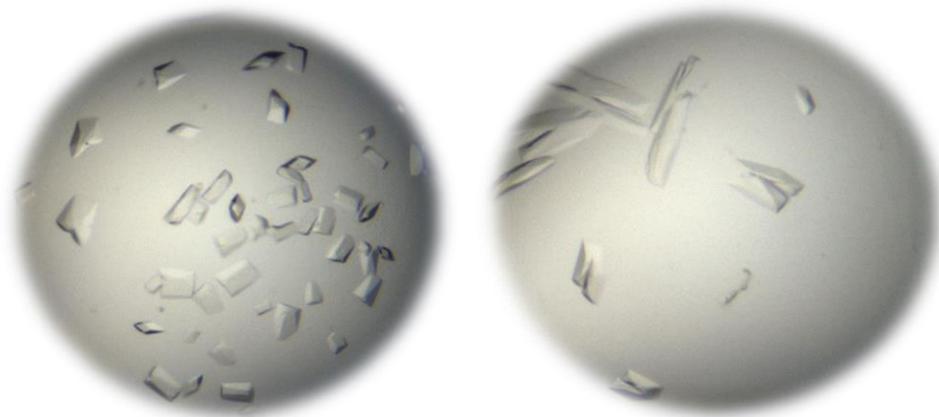


Figura 9. Cristales de la enzima recombinante AnkBC. Izquierda, cristales obtenidos en la condición E5 (0,1 M MOPAS/HEPES-Na (pH7.5), 10% p/v PEG 20000, 20% v/v PEG MME 550). Derecha, cristales obtenidos en la condición E6 (0.1M MOPS/HEPES-Na (pH7.5),10% w/v PEG 8000, 20% v/v etilenglicol). Ambas condiciones del Kit de cristalización “Morpheus II”. Fuente: Elaborado por el autor.

4.4. Predicción de la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

Con el programa AlphaFold se predijo la estructura del dominio BC de la enzima ACC de la microalga *Ankistrodesmus sp.* La imagen A y B de la figura 10 muestra un código por colores, indicando el grado de confiabilidad del modelo, de manera que, a mayor proximidad al 90% de confianza el color azul se intensifica. El modelo muestra una alta confiabilidad en los átomos predichos en la estructura de BC según la prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT). La estructura presentó dos monómeros simétricos que se combinan para formar un dímero, corroborando así que la forma oligomérica observada a través de la técnica SEC-MALS puede ser estable en términos de estructura proteica.

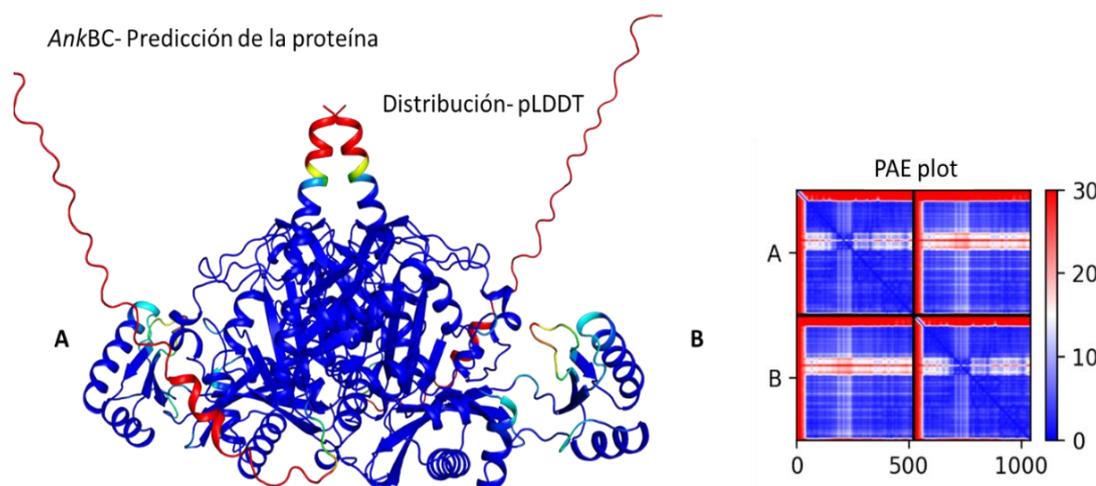


Figura 10. Predicción de la proteína *AnkBC* de *Ankistrodesmus sp*, basado en la prueba de diferencia de distancia local predicha (pLDDT). El color azul muestra un nivel de confiabilidad cercano al 90%. Modelo predicho por el programa ColabFold. Fuente: Elaborado por el autor.

La estructura *AnkBC* presenta una organización tridimensional compuesta por tres dominios principales: A (N-terminal), B (dominio de unión de ATP) y C (C-terminal) (Figura 11A). El dominio A está conformado por cuatro hojas β paralelas ($\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$), flanqueadas por un total de siete hélices α (αA , αB , αC , αD , αE , αF , αG). Por su parte, el dominio B se pliega en dos regiones de hélices α (αH , αI) y tres cadenas de hojas β antiparalelas ($\beta 5$, $\beta 6$, $\beta 7$). Siguiendo el subdominio B, la cadena polipeptídica se pliega nuevamente hacia el cuerpo de la proteína para conformar el dominio C. Este último, consta de una hoja β antiparalela de ocho cadenas ($\beta 8$, $\beta 9$, $\beta 10$, $\beta 11$, $\beta 12$, $\beta 13$, $\beta 16$, $\beta 18$) y adicionalmente una hoja β antiparalela más pequeña de cuatro cadenas ($\beta 14$, $\beta 15$, $\beta 17$, $\beta 19$), complementadas con nueve hélices α (αJ , αK , αL , αM , αN , αO , αP , αQ , αR) (Figura 11B). Además de estos tres dominios estructurales principales, se observa un segmento conector AB, que conecta los dominios A y B de *AnkBC* (Figura 11A).

La sobreposición de la estructura *AnkBC* con diferentes estructuras resueltas de BC, y además un alineamiento múltiple de secuencias mostró una notable conservación en la composición de aminoácidos entre especies bacterianas y *AnkBC*. Sin embargo, las diferencias más significativas se observan en la conformación del dominio B, donde claramente los aminoácidos de la biotina carboxilasa demuestran flexibilidad conformacional, lo cual suele atribuirse a una característica distintiva de la superfamilia de las enzimas de unión de ATP (Figura 12 y Figura 15).

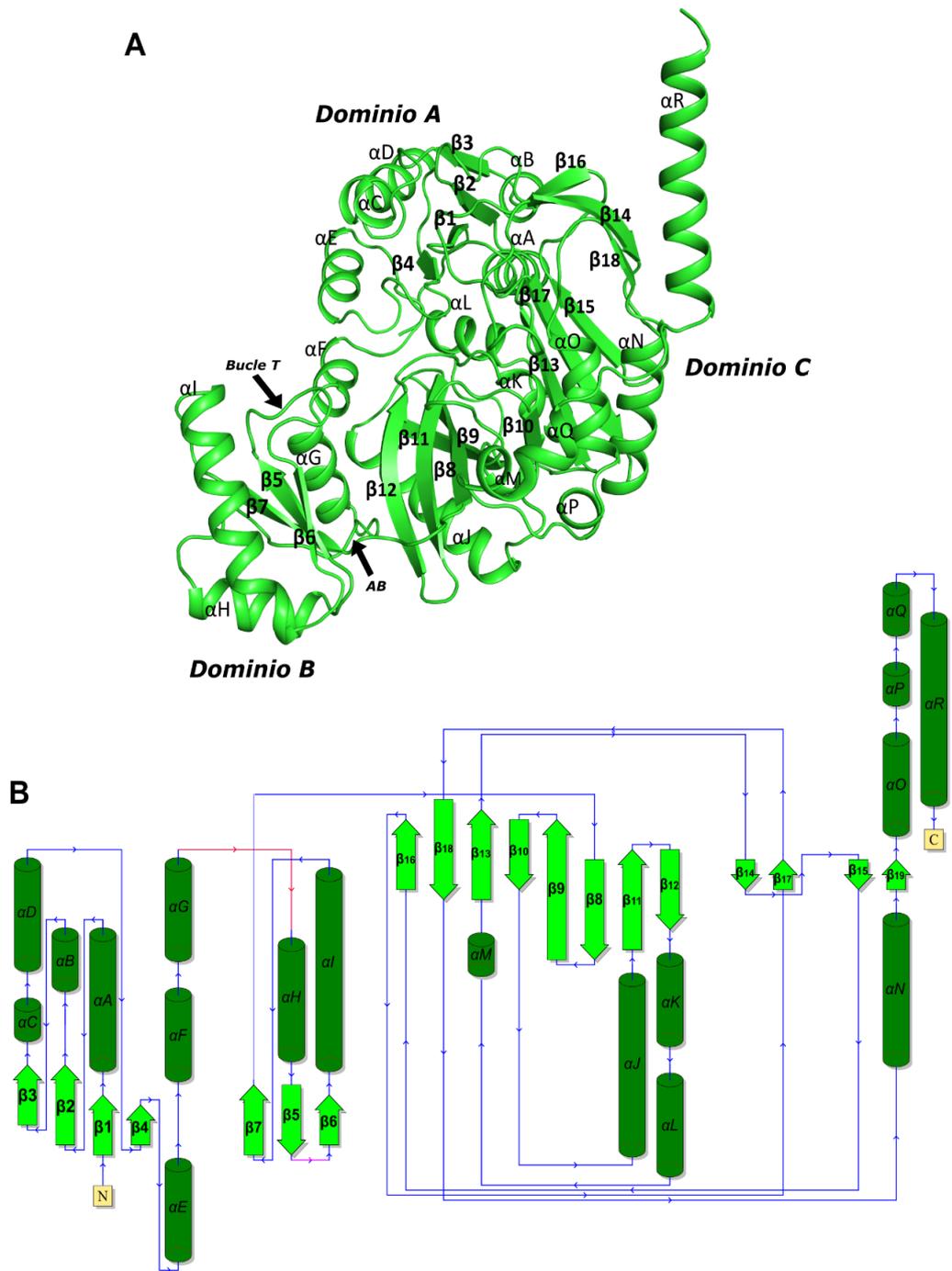


Figura 11. Topología de *AnkB*. (A) Representación en cinta del monómero del dímero de *AnkB* mostrando los tres dominios principales (A, B y C), el segmento AB que conecta ambos dominios y el bucle T, se señalan en flechas de color negro. (B) Diagrama de topología mostrando la conformación de hojas β (verde) y hélices α (verde limón). Fuente: Elaborado por el autor.



Figura 12. Sobreposición de *AnkBC* (verde) con diferentes estructuras de BC: *S. aureus* (celeste), *C. aurantiacus* (fucsia), *E. coli* (rosado, naranja), *H. influenzae* (blanco) y *P. aeruginosa* (morado). Fuente: Elaborado por el autor.

Para el análisis del sitio activo de *AnkBC* se construyó un modelo de *AnkBC* en complejo con biotina, bicarbonato y Mg^{2+} -ADP basándonos en un modelo de *E. coli* (código PDB: 3G8C, porcentaje de identidad 55.66%). *AnkBC* al igual que *E. coli* experimenta un cambio conformacional en el dominio B con una rotación significativamente hacia afuera de los dominios N y C terminales en ausencia de cofactor (Figura 13 A). Sin embargo, en presencia de cofactor (Mg^{2+} -ADP), el dominio B experimenta un movimiento en sentido horario en relación a los otros dos dominios, cerrándose hacia el sitio activo (Figura 13 B). Cabe destacar que la posición consolidada del cofactor en este trabajo es más cercana al bicarbonato, lo que potencialmente aumentaría la eficiencia catalítica de la enzima.

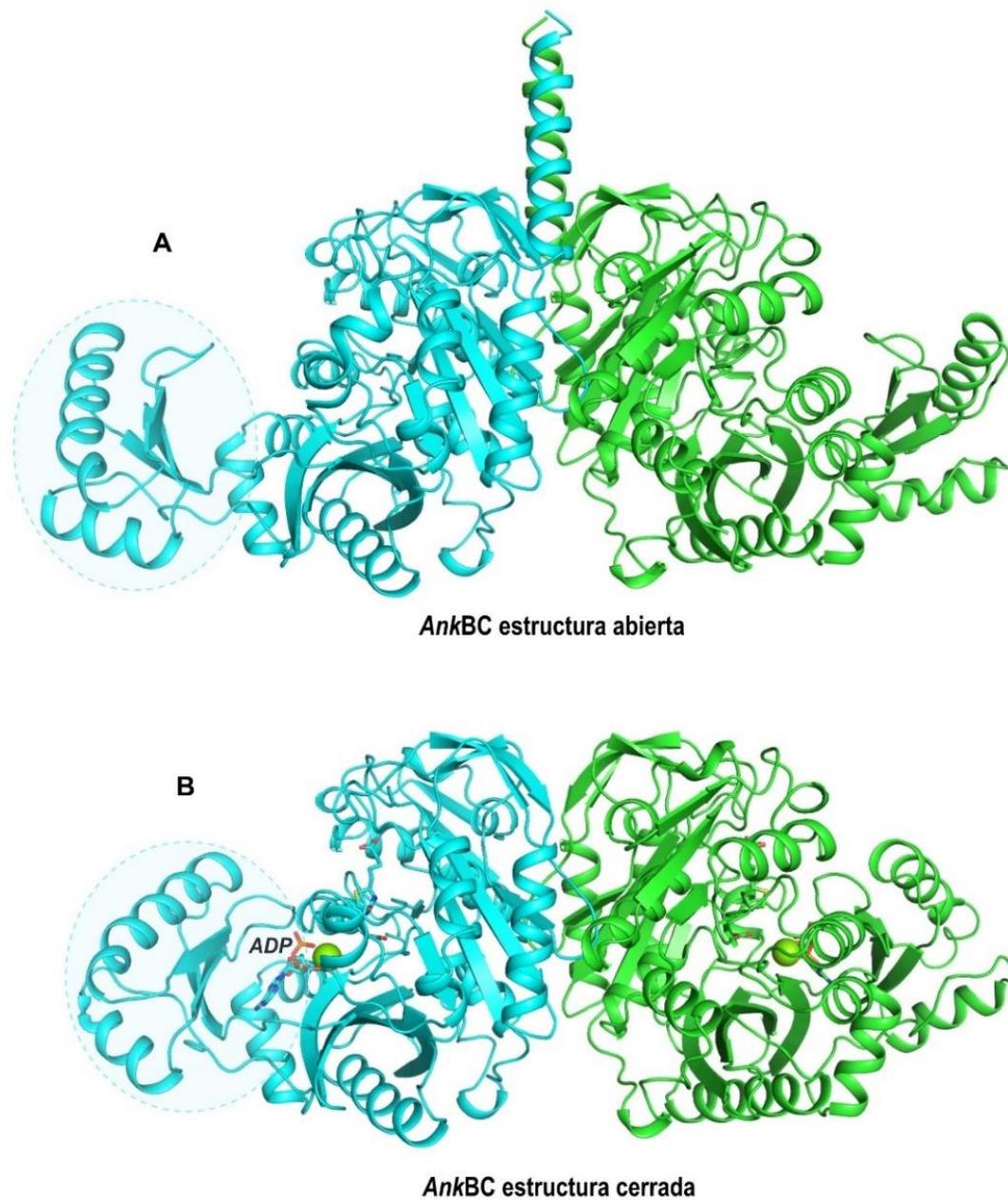


Figura 13. Cambios conformacionales del sitio activo de *AnkBC*. (A) Representación en cinta del dímero de *AnkBC* en su forma apo sin sustratos o cofactores (estructura abierta). (B) Representación en cinta del dímero de *AnkBC* con biotina, bicarbonato y Mg^{2+} -ADP (estructura cerrada). Fuente: Elaborado por el autor.

El análisis del mecanismo molecular de *AnkBC* revela interacciones específicas con la biotina, bicarbonato y Mg^{2+} -ADP. El complejo ADP- Mg^{2+} -*AnkBC* es estable por un conjunto de interacciones del tipo electrostática (carga), enlaces de hidrogeno e interacciones hidrofóbicas. Además, los dominios B y C son los que contribuyen principalmente para la ligación del ADP- Mg^{2+} (Figura 14A). El ion Mg^{2+} es estabilizado por el alfa y beta fosfato del ADP, además de la interacción con Glu²⁷⁵ y Glu²⁸⁷ del dominio C. Por otro lado, cada una de las regiones del ADP realizan interacciones específicas con aminoácidos de *AnkBC*. Los grupos fosfatos interactúan mediante enlaces del tipo electrostática con Lys¹¹⁶ y Lys¹⁵⁸, la ribosa forma enlaces de hidrogeno directamente con His²⁰⁸ y Gln²³² y la adenina forma enlaces hidrofóbicos con Met¹⁵⁶, Tyr²⁰² y Leu²⁷⁷, enlace electrostático con Arg²⁰¹ y enlaces de hidrogeno con Val²⁰³ (Fig. 14A). El resto de los aminoácidos mostrados en la figura 14A interactúan usando fuerzas de Van der Waals. La biotina es estabilizada principalmente por el dominio C, sin embargo, algunos residuos del dominio A forman interacciones de Van der Waals (Asn⁹, Gly⁸³ y Phe⁸⁴). Entre las interacciones que destacan son la electrostática entre Arg¹⁰ y la cadena del ácido valérico de la biotina, grupo de enlaces de hidrogeno con Gln²³⁶, Arg³³⁷, Asp³⁸² y el bicarbonato, y una interacción hidrofóbica entre Tyr⁸² y el anillo tetrahidrotiofeno (Fig. 14B). Finalmente, el bicarbonato se encuentra estable mediante la interacción con los aminoácidos Glu²⁹⁵ (carga), Lys²³⁷, Arg³³⁷, Val²⁹⁴ y Arg²⁹¹ (mediante enlaces de hidrogeno).

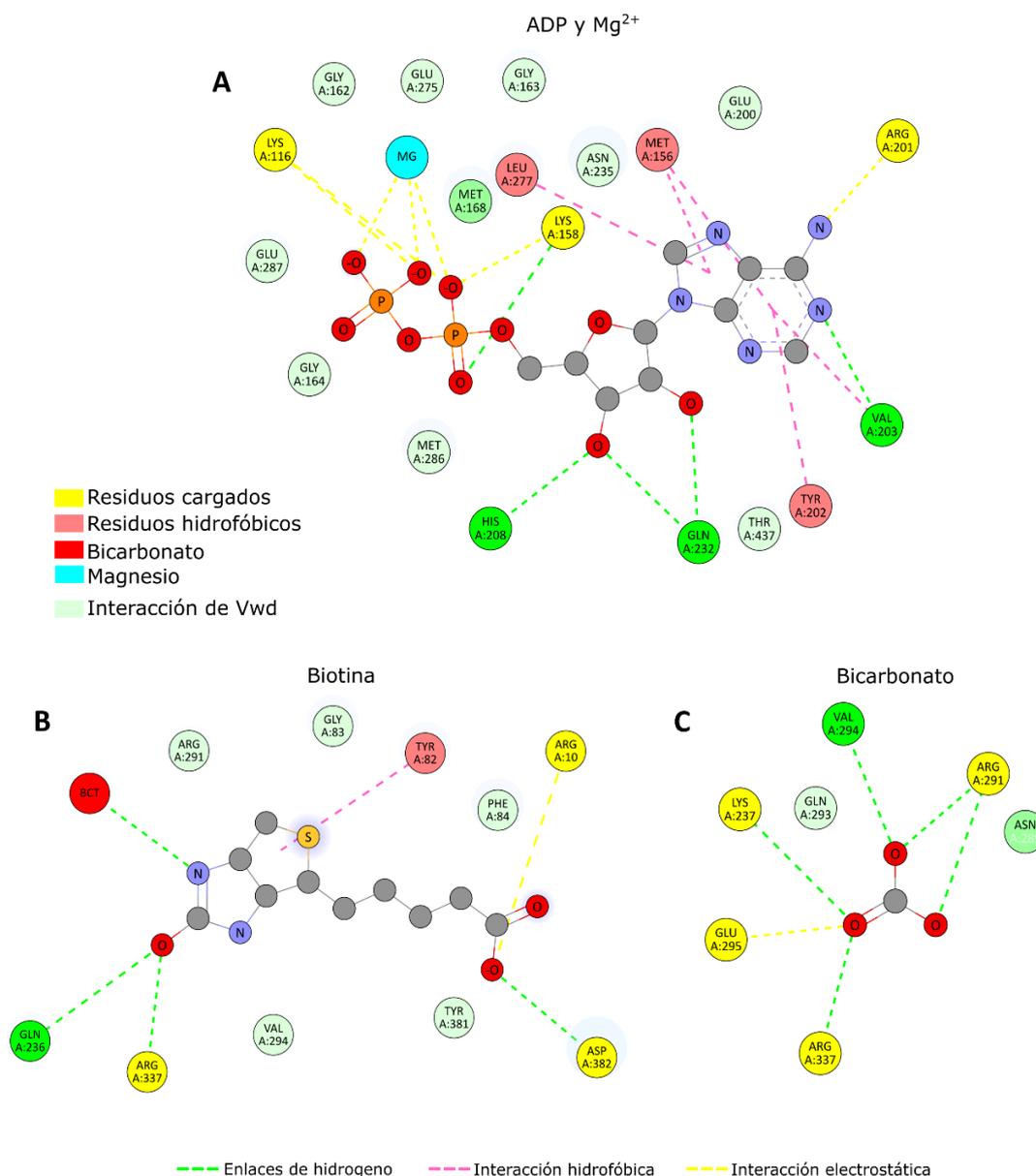


Figura 14. Mecanismo molecular de Mg²⁺-ADP, Biotina y Bicarbonato en *AnkBC*. Se muestra los residuos cargados (amarillo), residuos hidrofóbicos (rosado) e interacciones de Van der Waals (verde agua) que interaccionan con ADP, el ión Mg²⁺ (turquesa), biotina y bicarbonato (rojo), mediante interacciones hidrofóbicas (líneas discontinuas de color magenta), interacciones electrostáticas (líneas discontinuas de color amarillo) y enlaces de hidrogeno (líneas discontinuas de color verde). Fuente: elaborado por el autor.

El alineamiento de secuencias entre estructuras homólogas de *AnkBC* sugieren una conservación funcional entre enzimas (Figura 15). Los residuos importantes para la unión de biotina están conservados, sin embargo Tyr⁸² y Arg³³⁷ presentan una sustitución de Trp y Ala en *S. cerevisiae*. Los residuos Lys²³⁷, Arg²⁹¹, Val²⁹⁴, Glu²⁹⁵ están conservados entre especies el cual sugiere un papel importante en el reconocimiento y unión del bicarbonato (sustrato). Por otra parte, Glu²⁸⁷ que tiene interacción con el ion Mg²⁺ no es conservado y presenta sustitución de Lys en *E coli*-ATP. Aunque algunos de los residuos implicados en la unión de ADP no se conservan entre sí (Lys¹¹⁶, Met¹⁵⁶, Tyr²⁰², Leu²⁷⁷, Arg²⁰¹ y Val²⁰³), la naturaleza de los enlaces generados sigue siendo iguales. Por ejemplo, en *Ankistrodesmus sp.*, donde hay una Arg²⁰¹, en las otras especies se encuentra una Lys²⁰¹, manteniendo una carga positiva similar. Asimismo, mientras en *Ankistrodesmus sp.* se encuentra una Val²⁰³, en las demás especies varía siempre un aminoácido hidrofóbico de cadena corta como Ile, Ala y Leu (Figura 15).

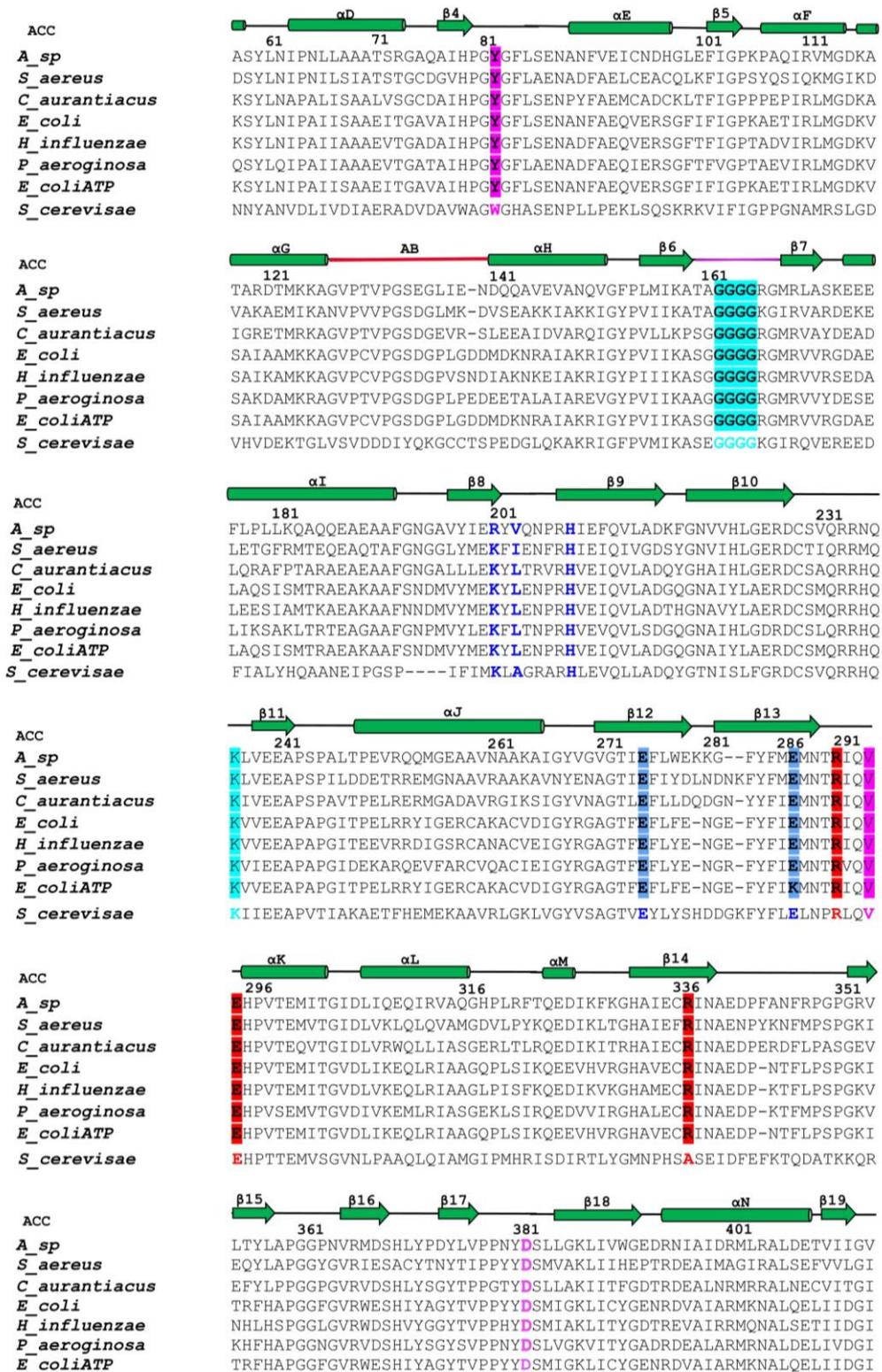


Figura 15. Alineamiento de secuencias homólogas de AnkB BC. Se muestra los residuos que son importantes para la unión de la biotina (fucsia y rojo), bicarbonato (rojo) y Mg-ADP (azul) para la subunidad BC de la enzima ACCasa de diferentes organismos.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

5.1. Clonación de la subunidad Biotin-Carboxilasa (BC)

Los trabajos centrados en clonación molecular en su mayoría se basan en estrategias y protocolos estándares que han demostrado ser robustas y reproducibles a lo largo del tiempo ^(81,82). La selección adecuada de una estrategia de clonación es fundamental y dependerá de varios factores, tales como el número de genes a expresar, el uso de múltiples vectores conteniendo diferentes blancos o promotores, así como el equipamiento y presupuesto disponible ⁽⁸³⁾.

En este estudio, se logró amplificar la secuencia codificante del gen de *AnkBC* mediante la estrategia de clonación estándar de PCR. El producto de PCR fue preparado en un vector de policlonación (pGEMT) dando lugar al constructo pGEMT- *AnkBC* mediante un proceso de adenilación de los extremos, un paso que permite aumentar la eficiencia de ligación de los productos de PCR en el vector ^(84,85). Posteriormente, el constructo antes mencionado fue subclonado en el vector pETDuet utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, obteniendo un constructo final que fue clave en la siguiente etapa de expresión y purificación de la proteína recombinante de este estudio. El vector pETDuet fue seleccionado por su capacidad de coexpresar varios genes dianas en sistemas bacterianos como *E. coli*, esta característica es particularmente valiosa para el estudio de complejos proteicos, permitiendo investigar no solo la funcionalidad de una proteína individual, sino también sus interacciones dentro de un sistema multigénico ⁽⁸⁶⁾. Aunque el objetivo principal del estudio fue clonar la subunidad *AnkBC* de *Ankistrodesmus sp.*, este avance abre puertas a investigaciones próximas orientadas al clonaje de todo el complejo multienzimático de ACCasa en *Ankistrodesmus sp.*, lo cual podría ampliar nuestra comprensión de las interacciones y dinámica molecular que conducen a la formación del complejo ACCasa, ofreciendo un enfoque integral hacia su aplicación biotecnológica.

5.2. Producción y purificación de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

Los procesos vinculados a la expresión y purificación de proteínas recombinantes, aunque son similares, también enfrentan desafíos, como la expresión ineficiente de la proteína o la expresión insoluble, lo que dificulta su purificación. Por lo tanto, optimizar las condiciones de expresión y purificación es crucial para asegurar la obtención de proteínas puras ⁽⁸⁷⁾. Por ejemplo, en el 2004, expresaron la proteína recombinante de BC de levadura en células Rosetta de *E. coli* BL21 (DE3) a una temperatura de 20°C lo cual se asoció con una mayor solubilidad y menor agregación de la proteína ⁽⁸⁸⁾. En el 2008, otro estudio sobre BC de ACCasa humana utilizó células BL21 de *E. coli*, induciendo su expresión con 1 mM de IPTG durante un periodo de 18 horas lo cual también fue efectivo en la producción de proteínas solubles y funcionales ⁽⁴⁰⁾. Finalmente, en el 2009, BC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se expresaron con 1 mM de IPTG durante 5 horas a 30 °C y 250 µM de IPTG a 15 °C durante 18 horas, respectivamente optimizando así tanto la temperatura como la duración de la inducción para cada organismo ⁽³⁶⁾.

En el presente estudio, se expresó la proteína recombinante *AnkBC* de ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*, en células de *E. coli* Rosetta BL21 (DE3), con una concentración de 0,3 mM de IPTG a 18°C de temperatura durante un periodo de 16 horas. La elección de estos parámetros fue clave para encontrar el equilibrio adecuado entre la solubilidad y el rendimiento de la proteína. Sin embargo, al aumentar la concentración a 0,5 mM de IPTG a una temperatura de 37°C, no se observó expresión, lo que se tradujo en la ausencia de bandas. La ausencia de bandas puede deberse a factores desencadenados por una alta tasa inicial de expresión, producido tanto por el aumento de la temperatura de inducción como el incremento en la concentración de IPTG, los cuales pueden ocasionar el mal plegamiento de la proteína generando gran cantidad de proteínas insolubles. La expresión de

AnkBC mostró versatilidad que también pueden estar relacionada al plásmido utilizado, las características específicas de la proteína recombinante y a factores bioquímicos ^(87,89).

Por otra parte, en este estudio logramos purificar la proteína recombinante *AnkBC* de ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*, a través de cromatografía de afinidad y cromatografía de exclusión molecular, se determinó que la proteína tiene una masa molecular aproximada de 56 kDa. Este tamaño resulta coherente con valores reportados en otros organismos, donde la subunidad BC presenta una conservación en su masa molecular, la cual varía generalmente entre 49 y 56 kDa. Por ejemplo, en estudios con *Pisum sativum* la subunidad BC tiene una masa de 53 kDa determinada mediante cromatografía de filtración en gel ⁽³¹⁾, mientras que en *E. coli*, las masas registradas son de 49 kDa ⁽⁹⁶⁾ y 50 kDa, dependiendo de si la purificación se realizó en coexpresión con la proteína transportadora de biotina (BCCP) ⁽⁹⁷⁾.

Históricamente, los primeros estudios sobre la purificación de ACCasa tanto en eucariotas como en procariontes revelaron un monómero ⁽⁹¹⁾, con un tamaño entre 210-250 kDa en plantas ⁽⁵⁷⁾, muy similar a las variantes observadas en animales ⁽⁹²⁾, levaduras ⁽⁹³⁾ y algas ⁽⁹⁴⁾. Esta forma, conocida como la homomérica (eucariotas), se caracteriza por una estructura monomérica compacta. Sin embargo, en 1999 se identificó en *Glycine max* una ACCasa de forma heteromérica (procariontes), que exhibe un peso molecular de aproximadamente 650-800 kDa, pero que se disocia con facilidad en sus subunidades individuales ⁽⁹⁵⁾. Estos estudios comparativos sugieren una notable variabilidad en la organización estructural y tamaño de la ACCasa entre organismos, reflejando diferentes adaptaciones moleculares en procariontes y eucariotas. Finalmente, la subunidad BC en *Ankistrodesmus sp.*, mantiene un tamaño comparable al de otras proteínas BC en diversos organismos. Esta conservación en el tamaño molecular podría indicar la existencia de restricciones evolutivas en la estructura de BC necesarias para mantener su función dentro del complejo multienzimático ACCasa.

5.3. Características biofísicas de la cadena polipeptídica recombinantes de BC de la enzima ACCasa

Analizamos las propiedades biofísicas de la proteína *AnkBC*, centrándonos en aspectos claves como la homogeneidad y el estado oligomérico de la proteína, factores cruciales para dar continuidad a las próximas etapas de caracterización. Utilizando cromatografía de exclusión por tamaño acoplada a los perfiles de dispersión de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS) ⁽⁹⁸⁾, se obtuvo un perfil homogéneo con un pico único, correspondiente a una masa molecular de 105,47 kDa. Este valor sugiere un estado dimérico de *AnkBC* considerando que la masa molecular teórica del monómero es de 56 kDa. Este hallazgo representa la primera confirmación del estado oligomérico de la subunidad BC de la microalga *Ankistrodesmus sp.*, sugiriendo su similitud con la forma dimérica observada en organismos procariotas, lo cual resulta sorprendente al tratarse de un organismo eucariota.

La oligomerización de BC parece estar ligada con la función de la proteína, la cual puede experimentar variaciones dependiendo del tipo celular, ya sea eucariota (monomérica) o procariota (dimérica). Un hallazgo interesante es el de 2015, *S. cerevisiae* describió un dímero de BC de 500 kDa, en lugar del monómero que se esperaba observar ⁽⁵⁹⁾. Este fenómeno, también se ha observado en algas y se ha propuesto como resultado de un evento endosimbiótico primario ⁽²⁹⁾. En contraste, los homólogos eucariotas de BC, también pueden existir como monómeros en solución y carecer de actividad catalítica. Esto indicaría, que *AnkBC* podría haber retenido características estructurales y funcionales ancestrales de sus contrapartes procariotas, en oposición a los cambios evolutivos observados en eucariotas superiores. Este estudio, por lo tanto, ofrece una plataforma única para la variabilidad en los estados oligoméricos entre procariotas y eucariotas podría reflejar adaptaciones evolutivas importantes en la funcionalidad de la ACCasa, lo que hace de *AnkBC* un modelo valioso para el análisis de la activación e inactivación dependiente del estado

oligomérico en el contexto de la evolución de proteínas de organismos fotosintéticos.

Al investigar si la proteína estaba perdiendo su plegamiento en solución, realizamos mediciones de dicroísmo circular (CD), las cuales mostraron un espectro similar al de proteínas $\alpha\beta$, con predominancia de señal referente a las contribuciones de hélices α , evidenciada por picos mínimos en ~ 208 nm y ~ 222 nm. La diferencia observada próxima al espectro de 70 °C, sugiere la pérdida de elementos de estructura secundaria en BC. La curva de desnaturalización obtenida mostró un T_m de 64 °C, indicando una notable estabilidad térmica de *AnkBC*. Este valor se encuentra en un rango superior al observado en proteínas homólogas con aplicaciones biotecnológicas, lo que sugiere que *AnkBC* podría ser particularmente útil en entornos variables, un atributo que podría facilitar su uso en aplicaciones industriales y experimentales donde la estabilidad térmica es esencial.

Además, realizamos ensayos de cristalización de la proteína en estudio, mediante el método de difusión de vapor en gota sentada a una concentración de 10 mg·ml⁻¹. En efecto, bajo estas condiciones, observamos la formación de cristales con calidad de difracción de rayos-X (datos no mostrados en este momento), lo cual representa un avance significativo, ya que cristales de calidad similar han sido obtenidos por otros autores en proteínas de estructuras comparables (35,96,98). Este logro, eventualmente permitirá obtener la estructura tridimensional de *AnkBC*, proporcionando detalles críticos para comprender sus características funcionales y estructurales, facilitando futuros estudios y aplicaciones.

5.4. Estructura tridimensional de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa

Este estudio predice que la estructura de *AnkBC* es un homodímero conformado por tres dominios el dominio central B responsable de la captura de ATP, y los dominios N y C terminales, estructura que se compara a las primeras descripciones de la carboxilasa BC en otros sistemas ^(33,62,64). En la conformación del homodímero, los dominios N y C forman el núcleo de la estructura, mientras que el dominio B se extiende hacia afuera en ausencia de ligando, adoptando una posición cerrada sobre el sitio activo cuando el ligando está presente ⁽⁶³⁾. Esta conformación es característica de la superfamilia de captura de ATP ^(100,101), también ha sido documentado en otras carboxilasas y es crucial para la actividad catalítica de la enzima ⁽¹⁰²⁾. Comparando con otras estructuras bien caracterizadas, como las de *S. aureus*, *P. aeruginosa* ⁽³⁶⁾, *B. thermodenitrificans* ⁽⁹⁸⁾, *H. influenzae* ⁽¹⁰⁴⁾, así como la de *E. coli* ^(35,63), *AnkBC* muestra una conservación estructural que sugiere una función común en la captación de ATP y posicionamiento del ligando.

El dominio B de *AnkBC* destaca por un movimiento conformacional que facilita el acercamiento de la molécula de biotina al sitio activo, lo cual podría aumentar la eficiencia catalítica, similar a lo observado en otras estructuras de BC ⁽¹⁰³⁾. Este cambio conformacional es relevante porque, en ausencia de biotina, el ATP se une de forma no productiva y el fosfato se enrolla sobre sí mismo, impidiendo la reacción con el bicarbonato ⁽³⁶⁾. Este fenómeno se conoce como sinergia inducida por sustrato ⁽¹⁰³⁾. Además, se observa en el dominio B de *AnkBC* una región altamente flexible, en comparación con los dominios N y C, que es rica en glicinas (Figura 15). Estas glicinas, presentes en el bucle T del dominio B a partir de Gly¹⁶² (Figura 11), parecen desempeñar un papel estructural importante, lo cual concuerda con hallazgos de otras estructuras cristalinas de BC que sugieren que esta flexibilidad es clave para la función catalítica de la enzima ⁽⁶³⁾. Al analizar la sobreposición de diversas estructuras de BC, se observó variaciones particularmente

en la disposición del dominio B de captación de ATP entre especies bacterianas, sugiriendo adaptaciones específicas que puede ser esencial para futuras investigaciones de ingeniería de enzimas adaptadas a contextos industriales o ambientales específicos.

Por otro lado, el análisis del mecanismo molecular de *AnkBC* se enfoca en las interacciones involucradas en la activación del dominio BC y cómo estas moléculas contribuyen al proceso de carboxilación. Basándonos en el modelo detallado de *E. coli* reportado por Chou y colaboradores ⁽³⁵⁾, se construyó el modelo de *AnkBC* en complejo con biotina, bicarbonato y Mg^{2+} -ADP. Durante este proceso, se encontró residuos que interactúan específicamente con biotina, bicarbonato y Mg^{2+} -ADP de *AnkBC*, reconocidos por una intrincada red de interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, de enlaces de hidrógeno y de Van der Waals. Al igual que en *E. coli*, se observaron interacciones críticas en *AnkBC* entre residuos específicos como Lys²³⁷, Arg²⁹¹, Val²⁹⁴, Glu²⁹⁵ y Arg³³⁷ con el bicarbonato, con Glu²⁹⁵ y Arg³³⁷ desempeñando un papel esencial en la estabilización del sitio activo en el proceso de carboxilación y en la deprotonación del bicarbonato ^(35,37). Estos resultados concuerdan con estudios previos de mutagénesis y ensayos cinéticos sobre el sitio activo de la enzima BC en diversas especies ^(105,106).

Además, se encontró que la interacción entre la biotina y Asp³⁸² es esencial para posicionar la biotina de manera óptima al bicarbonato, facilitando la transferencia eficiente del grupo carboxilo desde el bicarbonato a la biotina, un paso crítico en la catálisis de la enzima ⁽¹⁰⁷⁾. Por otro lado, el ión magnesio se encuentra coordinado por seis ligandos unidos por las cadenas laterales de Glu²⁷⁵ y Glu²⁸⁷, permitiendo la correcta disposición del complejo en la hendidura del sitio activo ⁽¹⁰⁰⁾. Esta coordinación difiere de la reportada en *S. aureus* complejada con AMPPNP (un análogo no hidrolizable de ATP) ⁽³⁶⁾ y otras enzimas pertenecientes a la superfamilia de captación de ATP ^(108,109). Respecto al complejo Mg^{2+} -ADP, las interacciones específicas

de ADP con residuos como Lys¹¹⁶, Met¹⁵⁶, Lys¹⁵⁸, Arg²⁰¹, Tyr²⁰², Val²⁰³, His²⁰⁸, Gln²³² y Leu²⁷⁷, aseguran la estabilidad del complejo. No obstante, el análisis comparativo de secuencias mostró sustituciones interesantes, estas variaciones pueden estar asociados con adaptaciones evolutivas específicas en *AnkBC* ⁽²⁹⁾. Al comparar *AnkBC* con enzimas de procariontes y eucariotes, como *S. cerevisiae*, se observan sustituciones relevantes en los residuos asociados a la unión de biotina⁽⁸⁸⁾. Sin embargo, los residuos críticos Lys158, His208, Gln232, Lys237, Arg291, Val294 y Glu295 se mantienen conservados evolutivamente, tanto en bacterias como en eucariotes, lo que sugiere una presión selectiva para preservar su función catalítica a lo largo del tiempo. En general, estos hallazgos ofrecen una primera aproximación molecular al proceso catalítico de *AnkBC* en *Ankistrodesmus sp.*, y destacan la importancia de obtener una estructura cristalina del complejo completo con Mg²⁺-ADP, bicarbonato y biotina. Esto permitiría elucidar las diferencias estructurales observadas y proporcionar una comprensión más integral del mecanismo catalítico de la enzima BC en este organismo.

CAPÍTULO VI: PROPUESTA

Esta propuesta plantea extender nuestro enfoque hacia la caracterización biofísica y bioquímica del complejo multienzimático de Acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) de *Ankistrodesmus sp.*, con el objetivo de generar aplicaciones prácticas que impulsen el aprovechamiento de este recurso autóctono en la producción de biocombustibles. A través del estudio en profundidad de este complejo enzimático, se busca desarrollar cepas de microalgas optimizadas para incrementar la acumulación de lípidos, además de mejorar los procesos de bioconversión, lo que permitiría una producción de biodiesel más rápida, económica y rentable. Al aprovechar los recursos locales, esta iniciativa propone tecnologías sustentables que beneficien directamente a la región, consolidando una industria bioenergética ecoamigable con alto potencial de transferencia tecnológica a nivel local. En conjunto, la ampliación de nuestro enfoque no solo enriquecerá la base de conocimientos en este campo, sino que también podría abrir nuevas perspectivas para la aplicación biotecnológica de nuestros hallazgos en procesos de producción ecoamigables y sustentables de biodiesel en nuestra región.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- ✚ Se clonó el gen BC de la enzima ACCasa de la microalga *Ankistrodesmus sp.*, empleando enzimas de restricción para su clonación en el vector pETDuet, proporcionando así un constructo funcional que fue utilizado en posteriores análisis.
- ✚ Se expresó y purificó de forma soluble la proteína recombinante de BC de la microalga *Ankistrodesmus sp.*, en cantidades suficientes y con alta pureza para su caracterización funcional.
- ✚ Los análisis biofísicos de BC de la microalga *Ankistrodesmus sp.*, se caracterizó por su homogeneidad y estado homodimérico, contribuyendo al entendimiento de su funcionamiento, además de comportarse como una enzima termoestable.
- ✚ Los análisis estructurales confirmaron la presencia de los residuos necesarios para la unión de ATP, biotina y bicarbonato. Lo que conlleva de que la ACCasa es una enzima activa.

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

- ✚ Realizar la clonación molecular de las subunidades (BCCP, α CT y β CT) de todo el complejo multienzimático de ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*
- ✚ Realizar ensayos de expresión y purificación de las subunidades (BCCP, α CT y β CT) de todo el complejo multienzimático de ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*
- ✚ Complementar con estudios de caracterización bioquímica de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginosa *Ankistrodesmus sp.*
- ✚ Determinar la estructura tridimensional de todo el complejo multienzimático de ACCasa de *Ankistrodesmus sp.*

CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Varela E. Cómo la guerra en Ucrania afecta el precio (y subsidio) de la gasolina [Internet]. 2022 [citado 25 de marzo de 2022]. Disponible en: <https://tec.mx/es/noticias/estado-de-mexico/educacion/como-el-conflicto-en-ucrania-afecta-el-precio-de-la-gasolina-en-mexico>
2. Ramamurthy PC, Singh S, Kapoor D, Parihar P, Samuel J, Prasad R, et al. Microbial biotechnological approaches: renewable bioprocessing for the future energy systems. *Microb Cell Factories*. 2 de marzo de 2021;20(1):55.
3. Li N, Zhang Y, Meng H, Li S, Wang S, Xiao Z, et al. Characterization of Fatty Acid Exporters involved in fatty acid transport for oil accumulation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Biofuels*. 2019;12:14.
4. Kumar A, Kaushal S, Saraf SA, Singh JS. Microbial bio-fuels: a solution to carbon emissions and energy crisis. *Front Biosci Landmark Ed*. 1 de junio de 2018;23:1789-802.
5. Zárate J. Opinion | The Amazon Was Sick. Now It's Sicker. *The New York Times* [Internet]. 2 de octubre de 2020 [citado 24 de febrero de 2022]; Disponible en: <https://www.nytimes.com/2020/10/02/opinion/amazon-pollution-oil.html>
6. Hinojosa G. Convoca.pe - Agenda Propia. 2020 [citado 24 de febrero de 2022]. 14 derrames de petróleo han ocurrido durante la pandemia en el Perú. Disponible en: <http://convoca.pe/agenda-propia/14-derrames-de-petroleo-han-ocurrido-durante-la-pandemia-en-el-peru>
7. Taj M. Oil Spill Triggered by Tsunami Devastates Coast of Peru. *The New York Times* [Internet]. 21 de enero de 2022 [citado 24 de febrero de 2022]; Disponible en: <https://www.nytimes.com/2022/01/21/world/americas/peru-oil-spill-tonga-tsunami.html>
8. Anto S, Mukherjee SS, Muthappa R, Mathimani T, Deviram G, Kumar SS, et al. Algae as green energy reserve: Technological outlook on biofuel production. *Chemosphere*. marzo de 2020;242:125079.
9. Bhattarai K, Stalick WM, McKay S, Geme G, Bhattarai N. Biofuel: an alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises. *J*

- Environ Sci Health Part A Tox Hazard Subst Environ Eng. 2011;46(12):1424-42.
10. Patel A, Sartaj K, Pruthi PA, Pruthi V, Matsakas L. Utilization of Clarified Butter Sediment Waste as a Feedstock for Cost-Effective Production of Biodiesel. *Foods Basel Switz*. 29 de junio de 2019;8(7):E234.
 11. Salami R, Kordi M, Bolouri P, Delangiz N, Asgari Lajayer B. Algae-Based Biorefinery as a Sustainable Renewable Resource. *Circ Econ Sustain*. 20 de julio de 2021;1-17.
 12. Pikoli MR, Sari AF, Solihat NA, Permana AH. Characteristics of tropical freshwater microalgae *Micractinium conductrix*, *Monoraphidium* sp. and *Choricystis parasitica*, and their potency as biodiesel feedstock. *Heliyon*. 1 de diciembre de 2019;5(12):e02922.
 13. Wang F, Gao B, Huang L, Su M, Dai C, Zhang C. Evaluation of oleaginous eustigmatophycean microalgae as potential biorefinery feedstock for the production of palmitoleic acid and biodiesel. *Bioresour Technol*. 1 de diciembre de 2018;270:30-7.
 14. Kim GY, Yun YM, Shin HS, Han JI. Cultivation of four microalgae species in the effluent of anaerobic digester for biodiesel production. *Bioresour Technol*. 1 de enero de 2017;224:738-42.
 15. Yee W. Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. *World J Microbiol Biotechnol*. abril de 2016;32(4):64.
 16. Blatti JL, Michaud J, Burkart MD. Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. *Curr Opin Chem Biol*. junio de 2013;17(3):496-505.
 17. Mehariya S, Goswami RK, Karthikeysan OP, Verma P. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere*. octubre de 2021;280:130553.
 18. Hussian AEM. The Role of Microalgae in Renewable Energy Production: Challenges and Opportunities [Internet]. *Marine Ecology - Biotic and Abiotic Interactions*. IntechOpen; 2018 [citado 25 de febrero de 2022]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/chapters/61371>
 19. Soni VK, Krishnapriya R, Sharma RK. Algae: Biomass to Biofuel. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2021;2290:31-51.

20. Ganesan R, Manigandan S, Samuel MS, Shanmuganathan R, Brindhadevi K, Lan Chi NT, et al. A review on prospective production of biofuel from microalgae. *Biotechnol Rep Amst Neth.* septiembre de 2020;27:e00509.
21. Cobos M, Paredes JD, Maddox JD, Vargas-Arana G, Flores L, Aguilar CP, et al. Isolation and Characterization of Native Microalgae from the Peruvian Amazon with Potential for Biodiesel Production. *Energies.* febrero de 2017;10(2):224.
22. Cobos M, Lopez LC, Paredes JD, Maddox JD, Vargas-Arana GE, Flores L, et al. Media compositions affects the fatty acids profiles of three oleaginous microalgae from peruvian amazon. *Asian J Microbiol Biotechnol* [Internet]. 21 de enero de 2017 [citado 1 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/881>
23. Águila A del, Alejandra K. Perfil de ácidos grasos de *Ankistrodesmus* sp., *Scenedesmus* sp., *Chlorella* sp. sometidas a diferentes concentraciones de nitrato. *Univ Científica Perú* [Internet]. 19 de mayo de 2017 [citado 25 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/557>
24. Cobos Ruiz M, Castro Gómez JC, Cerdeira Gutierrez LA. Potencial biotecnológico para la producción sustentable de biodiesel de microalgas oleaginosas aisladas del Río Itaya, Loreto, Perú. *Ecol Apl.* julio de 2014;13(2):169-75.
25. Bardales Grández KM. Obtención de biodiesel a partir de lípidos de *Ankistrodesmus* sp. bajo condiciones de ausencia de nitrógeno en la Amazonía Peruana. *Univ Nac Trujillo* [Internet]. 2021 [citado 25 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/18192>
26. Blatti JL, Michaud J, Burkart MD. Engineering fatty acid biosynthesis in microalgae for sustainable biodiesel. *Curr Opin Chem Biol.* junio de 2013;17(3):496-505.
27. Koelmel JP, Napolitano MP, Ulmer CZ, Vasiliou V, Garrett TJ, Yost RA, et al. Environmental lipidomics: understanding the response of organisms and ecosystems to a changing world. *Metabolomics Off J Metabolomic Soc.* 19 de abril de 2020;16(5):56.

28. Li DW, Xie WH, Hao TB, Cai JX, Zhou TB, Balamurugan S, et al. Constitutive and Chloroplast Targeted Expression of Acetyl-CoA Carboxylase in Oleaginous Microalgae Elevates Fatty Acid Biosynthesis. *Mar Biotechnol N Y N.* octubre de 2018;20(5):566-72.
29. Huerlimann R, Heimann K. Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Crit Rev Biotechnol.* marzo de 2013;33(1):49-65.
30. Gu K, Chiam H, Tian D, Yin Z. Molecular cloning and expression of heteromeric ACCase subunit genes from *Jatropha curcas*. *Plant Sci Int J Exp Plant Biol.* abril de 2011;180(4):642-9.
31. Sasaki Y, Nagano Y. Plant acetyl-CoA carboxylase: structure, biosynthesis, regulation, and gene manipulation for plant breeding. *Biosci Biotechnol Biochem.* junio de 2004;68(6):1175-84.
32. Huerlimann R, Heimann K. Comprehensive guide to acetyl-carboxylases in algae. *Crit Rev Biotechnol.* marzo de 2013;33(1):49-65.
33. Waldrop GL, Rayment I, Holden HM. Three-dimensional structure of the biotin carboxylase subunit of acetyl-CoA carboxylase. *Biochemistry.* 30 de agosto de 1994;33(34):10249-56.
34. Diacovich L, Mitchell DL, Pham H, Gago G, Melgar MM, Khosla C, et al. Crystal structure of the beta-subunit of acyl-CoA carboxylase: structure-based engineering of substrate specificity. *Biochemistry.* 9 de noviembre de 2004;43(44):14027-36.
35. Chou CY, Yu LPC, Tong L. Crystal Structure of Biotin Carboxylase in Complex with Substrates and Implications for Its Catalytic Mechanism. *J Biol Chem.* 24 de abril de 2009;284(17):11690-7.
36. Mochalkin I, Miller JR, Evdokimov A, Lightle S, Yan C, Stover CK, et al. Structural evidence for substrate-induced synergism and half-sites reactivity in biotin carboxylase. *Protein Sci.* octubre de 2008;17(10):1706-18.
37. Polyak SW, Abell AD, Wilce MCJ, Zhang L, Booker GW. Structure, function and selective inhibition of bacterial acetyl-coa carboxylase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;93(3):983-92.
38. Živković S, Veljković M. Environmental impacts the of production and use of biodiesel. *Environ Sci Pollut Res Int.* enero de 2018;25(1):191-9.

39. Kumar A, Kaushal S, Saraf SA, Singh JS. Microbial bio-fuels: a solution to carbon emissions and energy crisis. *Front Biosci Landmark Ed.* 1 de junio de 2018;23:1789-802.
40. Cho YS, Lee JI, Shin D, Kim HT, Cheon YH, Seo CI, et al. Crystal structure of the biotin carboxylase domain of human acetyl-CoA carboxylase 2. *Proteins.* 1 de enero de 2008;70(1):268-72.
41. Misra N, Panda PK, Patra MC, Pradhan SK, Mishra BK. Insights into molecular assembly of ACCase heteromeric complex in *Chlorella variabilis*--a homology modelling, docking and molecular dynamic simulation study. *Appl Biochem Biotechnol.* julio de 2013;170(6):1437-57.
42. Wei J, Tong L. Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature.* 29 de octubre de 2015;526(7575):723-7.
43. Guiry MD, Guiry GM. "AlgaeBase. World-Wide Electronic Publication [Internet]. 2013 [citado 1 de mayo de 2022]. Disponible en: <https://www.algaebase.org/>
44. Shubert E, Gärtner G. Chapter 7 - Nonmotile Coccoid and Colonial Green Algae. En: Wehr JD, Sheath RG, Kociolek JP, editores. *Freshwater Algae of North America (Second Edition)* [Internet]. Boston: Academic Press; 2015 [citado 2 de mayo de 2022]. p. 315-73. (Aquatic Ecology). Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123858764000074>
45. Castro-Gómez JC, Chávez J del Á, Bosmediano HS. Identificación de microalgas oleaginosas en el área de concesión para conservación, cuenca alta del río Itaya, Loreto-Perú. *Cienc Amaz Iquitos.* 2012;2(2):162-8.
46. Ruiz MC, Rodríguez JDP, Gómez JCC. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta Biológica Colomb.* 1 de enero de 2016;21(1):17-26.
47. Blasio M, Balzano S. Fatty Acids Derivatives From Eukaryotic Microalgae, Pathways and Potential Applications. *Front Microbiol.* 2021;12:718933.

48. Giroud C, Gerber A, Eichenberger W. Lipids of *Chlamydomonas reinhardtii*. Analysis of Molecular Species and Intracellular Site(s) of Biosynthesis. *Plant Cell Physiol.* 1 de junio de 1988;29(4):587-95.
49. Vieler A, Wu G, Tsai CH, Bullard B, Cornish AJ, Harvey C, et al. Genome, Functional Gene Annotation, and Nuclear Transformation of the Heterokont Oleaginous Alga *Nannochloropsis oceanica* CCMP1779. *PLOS Genet.* 15 de noviembre de 2012;8(11):e1003064.
50. Yang ZK, Niu YF, Ma YH, Xue J, Zhang MH, Yang WD, et al. Molecular and cellular mechanisms of neutral lipid accumulation in diatom following nitrogen deprivation. *Biotechnol Biofuels.* 4 de mayo de 2013;6(1):67.
51. Castro JC, Maddox JD, Paredes JD, Rodríguez HN, Aguilar CP, Marapara JL, et al. De novo RNA-Seq analysis of the oleaginous microalgae *Ankistrodesmus* sp. UCP0001: Gene identification and metabolic pathways reconstruction for the biosynthesis of fatty acids and triacylglycerols. *Plant Cell Biotechnol Mol Biol [Internet].* 15 de mayo de 2017 [citado 1 de marzo de 2022]; Disponible en: <http://repositorio.ucp.edu.pe/handle/UCP/883>
52. Bilal M, Rasheed T, Ahmed I, Iqbal HMN. High-value compounds from microalgae with industrial exploitability - A review. *Front Biosci Sch Ed.* 1 de junio de 2017;9:319-42.
53. Chen D, Yuan X, Liang L, Liu K, Ye H, Liu Z, et al. Overexpression of acetyl-CoA carboxylase increases fatty acid production in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biotechnol Lett.* octubre de 2019;41(10):1133-45.
54. Castiglia D, Landi S, Esposito S. Advanced Applications for Protein and Compounds from Microalgae. *Plants Basel Switz.* 16 de agosto de 2021;10(8):1686.
55. Kong F, Romero IT, Warakanont J, Li-Beisson Y. Lipid catabolism in microalgae. *New Phytol.* junio de 2018;218(4):1340-8.
56. Bellou S, Baeshen MN, Elazzazy AM, Aggeli D, Sayegh F, Aggelis G. Microalgal lipids biochemistry and biotechnological perspectives. *Biotechnol Adv.* diciembre de 2014;32(8):1476-93.
57. Konishi T, Shinohara K, Yamada K, Sasaki Y. Acetyl-CoA carboxylase in higher plants: most plants other than gramineae have both the prokaryotic

- and the eukaryotic forms of this enzyme. *Plant Cell Physiol.* marzo de 1996;37(2):117-22.
58. Cronan JE, Waldrop GL. Multi-subunit acetyl-CoA carboxylases. *Prog Lipid Res.* septiembre de 2002;41(5):407-35.
59. Wei J, Tong L. Crystal structure of the 500-kDa yeast acetyl-CoA carboxylase holoenzyme dimer. *Nature.* 29 de octubre de 2015;526(7575):723-7.
60. Nikolau BJ, Ohlrogge JB, Wurtele ES. Plant biotin-containing carboxylases. *Arch Biochem Biophys.* 15 de junio de 2003;414(2):211-22.
61. Tong L. Structure and function of biotin-dependent carboxylases. *Cell Mol Life Sci CMLS.* marzo de 2013;70(5):863-91.
62. Galperin MY, Koonin EV. A diverse superfamily of enzymes with ATP-dependent carboxylate-amine/thiol ligase activity. *Protein Sci Publ Protein Soc.* diciembre de 1997;6(12):2639-43.
63. Thoden JB, Blanchard CZ, Holden HM, Waldrop GL. Movimiento del dominio B de la biotina carboxilasa como resultado de la unión de ATP*. *J Biol Chem.* 26 de mayo de 2000;275(21):16183-90.
64. Chou CY, Tong L. Structural and biochemical studies on the regulation of biotin carboxylase by substrate inhibition and dimerization. *J Biol Chem.* 8 de julio de 2011;286(27):24417-25.
65. Castellanos IC, González-Peralta K, Pinzón-Torres SJ. Microalgas como alternativa sostenible para la producción de biodiesel. *Rev Ontare [Internet].* 2018 [citado 3 de mayo de 2022];6. Disponible en: <https://journal.universidadean.edu.co/index.php/Revistao/article/view/2425>
66. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* abril de 1990;262(4):56-61, 64-5.
67. M. M. Nelson DLC. *PRINCIPIOS DE BIOQUÍMICA LEHNINGER,5/ED.* Barcelona; 2007. 1296 p.
68. Enrique RA. *Economipedia.* 2020 [citado 14 de abril de 2022]. Tipos de investigación. Disponible en: <https://economipedia.com/definiciones/tipos-de-investigacion.html>
69. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* CSHL Press; 2001. 1368 p.

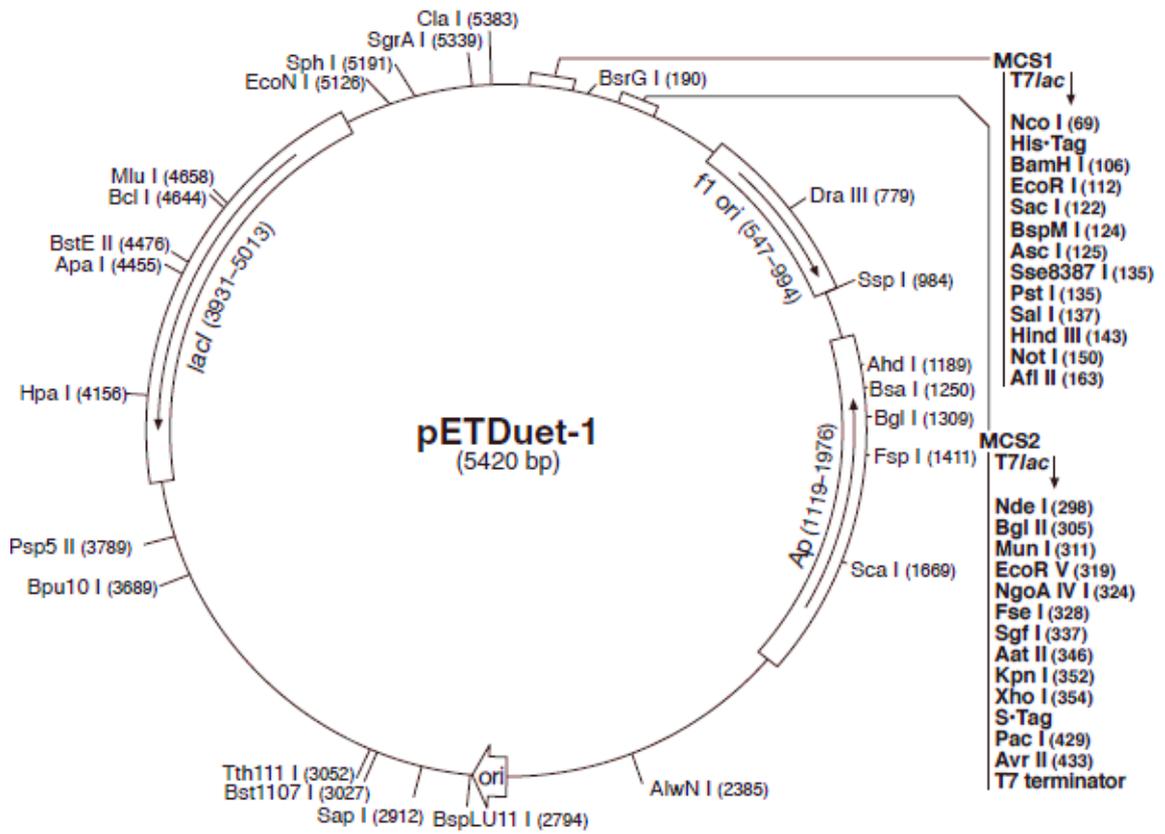
70. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig En Discapac.* 2013;2(2):70-8.
71. Checa Rojas A. Conogasi. 2018 [citado 27 de abril de 2022]. Método: Células competentes y transformación. Disponible en: <https://conogasi.org/articulos/metodo-celulas-competentes-y-transformacion/>
72. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* agosto de 1970;227(5259):680-5.
73. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* agosto de 2021;596(7873):583-9.
74. Mirdita M, Schütze K, Moriwaki Y, Heo L, Ovchinnikov S, Steinegger M. ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat Methods.* junio de 2022;19(6):679-82.
75. Rosignoli S, Paiardini A. Boosting the Full Potential of PyMOL with Structural Biology Plugins. *Biomolecules.* 27 de noviembre de 2022;12(12):1764.
76. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 1997;25(17):3389-402.
77. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinforma Oxf Engl.* 1 de mayo de 2009;25(9):1189-91.
78. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol.* 11 de octubre de 2011;7:539.
79. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol.* 5 de mayo de 1986;189(1):113-30.
80. Sosso GC, Chen J, Cox SJ, Fitzner M, Pedevilla P, Zen A, et al. Crystal Nucleation in Liquids: Open Questions and Future Challenges in Molecular Dynamics Simulations. *Chem Rev.* 22 de junio de 2016;116(12):7078-116.

81. Sambrook JF, Green MR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Internet]. 4th ed. Vol. three-vol-set. New York: Cold Spring harbor Laboratory Press; 2012 [citado 23 de abril de 2022]. 2028 p. Disponible en: <http://www.molecularcloning.com/>
82. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Vols 1,2 and 3 J.F. Sambrook and D.W. Russell, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2100 pp., soft cover | Sigma-Aldrich [Internet]. 2022 [citado 23 de abril de 2022]. Disponible en: <http://www.sigmaaldrich.com/>
83. Ortega C, Abreu C, Oppezzo P, Correa A. Overview of High-Throughput Cloning Methods for the Post-genomic Era. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2019;2025:3-32.
84. Zhou MY, Gomez-Sanchez CE. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol.* enero de 2000;2(1):1-7.
85. Green MR, Sambrook J. Cloning Polymerase Chain Reaction (PCR) Products: TA Cloning. *Cold Spring Harb Protoc.* 1 de junio de 2021;2021(6).
86. Shivaiah KK, Ding G, Upton B, Nikolau BJ. Non-Catalytic Subunits Facilitate Quaternary Organization of Plastidic Acetyl-CoA Carboxylase. *Plant Physiol.* febrero de 2020;182(2):756-75.
87. García J, Santana Z, Zumalacárregui L, Quintana M, González D, Furrázola G, et al. Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en *Escherichia coli*. *Vaccimonitor.* agosto de 2013;22(2):30-9.
88. Shen Y, Volrath SL, Weatherly SC, Elich TD, Tong L. A Mechanism for the Potent Inhibition of Eukaryotic Acetyl-Coenzyme A Carboxylase by Soraphen A, a Macrocyclic Polyketide Natural Product. *Mol Cell.* 22 de diciembre de 2004;16(6):881-91.
89. Ortega C, Oppezzo P, Correa A. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2022;2406:35-64.
90. Alban C, Job D, Douce R. BIOTIN METABOLISM IN PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* junio de 2000;51:17-47.
91. Abu-Elheiga L, Jayakumar A, Baldini A, Chirala SS, Wakil SJ. Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence

- for two isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 de abril de 1995;92(9):4011-5.
92. Al-Feel W, Chirala SS, Wakil SJ. Cloning of the yeast FAS3 gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci*. 15 de mayo de 1992;89(10):4534-8.
93. Roessler PG. Purification and Characterization of Acetyl-CoA Carboxylase from the Diatom *Cyclotella cryptica*¹. *Plant Physiol*. enero de 1990;92(1):73-8.
94. Reverdatto S, Beilinson V, Nielsen NC. A multisubunit acetyl coenzyme A carboxylase from soybean. *Plant Physiol*. marzo de 1999;119(3):961-78.
95. Li SJ, Cronan JE. Growth rate regulation of *Escherichia coli* acetyl coenzyme A carboxylase, which catalyzes the first committed step of lipid biosynthesis. *J Bacteriol*. enero de 1993;175(2):332-40.
96. Broussard TC, Kobe MJ, Pakhomova S, Neau DB, Price AE, Champion TS, et al. The three-dimensional structure of the biotin carboxylase-biotin carboxyl carrier protein complex of *E. coli* acetyl-CoA carboxylase. *Struct Lond Engl* 1993. 2 de abril de 2013;21(4):650-7.
97. Some D, Amartely H, Tsadok A, Lebendiker M. Characterization of Proteins by Size-Exclusion Chromatography Coupled to Multi-Angle Light Scattering (SEC-MALS). *J Vis Exp JoVE*. 20 de junio de 2019;(148).
98. Kondo S, Nakajima Y, Sugio S, Sueda S, Islam MN, Kondo H. Structure of the biotin carboxylase domain of pyruvate carboxylase from *Bacillus thermodenitrificans*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. agosto de 2007;63(Pt 8):885-90.
99. Waldrop GL, Holden HM, Maurice MS. The enzymes of biotin dependent CO₂ metabolism: What structures reveal about their reaction mechanisms. *Protein Sci Publ Protein Soc*. noviembre de 2012;21(11):1597-619.
100. Fawaz MV, Topper ME, Firestine SM. The ATP-grasp enzymes. *Bioorganic Chem*. diciembre de 2011;39(5-6):185-91.
101. Schreiber M, Res I, Matter A. Protein kinases as antibacterial targets. *Curr Opin Cell Biol*. abril de 2009;21(2):325-30.
102. Blanchard CZ, Lee YM, Frantom PA, Waldrop GL. Mutations at Four Active Site Residues of Biotin Carboxylase Abolish Substrate-Induced Synergism by Biotin. *Biochemistry*. 1 de marzo de 1999;38(11):3393-400.

103. Broussard TC, Pakhomova S, Neau DB, Bonnot R, Waldrop GL. Structural Analysis of Substrate, Reaction Intermediate, and Product Binding in Haemophilus influenzae Biotin Carboxylase. *Biochemistry*. 23 de junio de 2015;54(24):3860-70.
104. Sloane V, Waldrop GL. Kinetic characterization of mutations found in propionic acidemia and methylcrotonylglycinuria: evidence for cooperativity in biotin carboxylase. *J Biol Chem*. 16 de abril de 2004;279(16):15772-8.
105. Sloane V, Blanchard CZ, Guillot F, Waldrop GL. Site-directed mutagenesis of ATP binding residues of biotin carboxylase. Insight into the mechanism of catalysis. *J Biol Chem*. 6 de julio de 2001;276(27):24991-6.
106. Attwood PV, Wallace JC. Chemical and catalytic mechanisms of carboxyl transfer reactions in biotin-dependent enzymes. *Acc Chem Res*. febrero de 2002;35(2):113-20.
107. Thoden JB, Raushel FM, Benning MM, Rayment I, Holden HM. The structure of carbamoyl phosphate synthetase determined to 2.1 Å resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. enero de 1999;55(Pt 1):8-24.
108. Thoden JB, Holden HM, Paritala H, Firestine SM. Structural and functional studies of *Aspergillus clavatus* N(5)-carboxyaminoimidazole ribonucleotide synthetase. *Biochemistry*. 2 de febrero de 2010;49(4):752-60.

ANEXOS



Anexo N°1. Mapa genético del vector de expresión pETDuet-1.

Anexo N°2. Matriz de consistencia

Problema investigación	Objetivos de la investigación	Hipótesis	Tipo y Diseño de estudio	Población de estudio y procesamiento	Instrumento de recolección
¿Cuáles son las características biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima Acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i> ?	Caracterizar biofísica y estructuralmente la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i>	La estructura tridimensional de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima ACCasa heteromérica de <i>Ankistrodesmus sp.</i> presenta una alta similitud estructural con la misma enzima presente en otras especies de eucariotas y procariontes debido a que su función catalítica ha sido conservada durante el proceso evolutivo.	<p>Será de tipo básico: porque se generará el conocimiento científico sobre la base estructural y biofísica de la subunidad BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso nativa <i>Ankistrodesmus sp.</i></p> <p>Será descriptivo: porque se realizará la caracterización de la subunidad BC de la enzima ACCasa, lo cual implica una descripción biofísico y estructural de la enzima.</p> <p>Según los medios usados para obtener los datos: será de tipo no experimental, porque la caracterización de la enzima no implicará la manipulación de variables.</p> <p>Según el número de mediciones de las variables de estudio: será de tipo transversal, porque las variables serán medidas en un tiempo específico.</p>	<p>Población de estudios.</p> <p>Estará constituida por todos los genes que codifican proteínas de la vía de biosíntesis de ácidos grasos de <i>Ankistrodesmus sp.</i></p> <p>Procesamiento.</p> <p>Los procesos de clonación se realizarán de acuerdo con las técnicas estándar de clonación molecular descritas por Sambrook & Green. Secuencias de ADN se amplificará usando la técnica de PCR.</p> <p>Los productos de PCR, expresión y purificación serán monitoreados con la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE descrito por Laemmli, 1970.</p> <p>Análisis biofísicos: cromatografía de exclusión molecular, análisis de dispersión dinámico de luz (DLS) y análisis de dicroísmo circular (CD).</p> <p>Para determinación de estructura tridimensional: se utilizará los softwares, Phenix, AlphaFold DB y el paquete CCP4.</p>	<p>Registros fotográficos</p> <p>Se utilizará la cámara de un celular para registrar los resultados de los perfiles electroforéticos realizados.</p> <p>Los equipos. Se utilizará para obtener directamente los datos, sistema de registro para electroforesis en gel, centrifugas refrigeradas, termocicladores, sistema de purificación FPLC Akta. Equipo para DC Zetasizer. Espectropolarímetro Jasco modelo J-815 CD Equipos bioinformáticos, computadoras y laptops.</p>
Problemas Específicos	Objetivos Específicos				
¿Es factible realizar la clonación molecular del gen que codifica la cadena polipeptídica de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i> ?	Realizar la clonación molecular del gen que codifica a la cadena polipeptídica de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i>				
¿Es posible producir y purificar la cadena polipeptídica recombinante de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i> ?	Producir y purificar la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i>				
¿Cuáles son las características biofísicas de la cadena polipeptídica recombinante de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i> ?	Evaluar las características biofísicas de la cadena polipeptídica recombinantes de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i>				
¿Cómo es la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica recombinante de la subunidad Biotin-Carboxilasa de la enzima acetil-CoA carboxilasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i> ?	Determinar la estructura tridimensional de la cadena polipeptídica recombinante de BC de la enzima ACCasa de la microalga oleaginoso <i>Ankistrodesmus sp.</i>				

Anexo N°3. Operacionalización de variables

Variable	Definición conceptual	Definición Operacional	Indicador	Ítems	Instrumento
<p><u>Independiente</u></p> <p>Secuencia de aminoácidos de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa de <i>Ankistrodesmus sp.</i></p>	<p>Secuencias de aminoácidos de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa de <i>Ankistrodesmus sp.</i></p>	<p>Características de las secuencias de aminoácidos de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa.</p>	<p>Secuencias de aminoácidos</p>	<p>50 a 200 aminoácidos</p>	<p>Base de datos GenkBank</p>
<p><u>Dependiente</u></p> <p>Características biofísicas y estructurales de la subunidad Biotin-carboxilasa de la enzima Acetil-Coa carboxilasa de <i>Ankistrodesmus sp.</i></p>	<p>Estructura tridimensional de la enzima Acetil-Coa carboxilasa heteromérica de la microalga oleaginosa <i>Ankistrodesmus sp.</i> caracterizada por presentar estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternaria.</p>	<p>Características de las estructuras primarias, secundarias, terciarias y cuaternaria de la enzima Acetil-Coa carboxilasa heteromérica de la microalga oleaginosa <i>Ankistrodesmus sp.</i></p>	<p>Estructuras secundarias</p> <p>Estructuras terciarias</p> <p>Estructura cuaternaria</p>	<p>Alfa hélice, hojas beta y giros beta</p> <p>Dominios conservados de familias de proteínas</p> <p>1 o más complejos enzimáticos constituido por 4 subunidades</p>	<p>-Sistema de electroforesis en gel de agarosa</p> <p>-Sistema de electroforesis en SDS-PAGE</p> <p>-Sistema de purificación FPLC Akta</p> <p>-Espectropolarímetro Jasco modelo J-815</p>