

Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ingeniería

“Obtención de la enzima lactato oxidasa y su aplicación en un biosensor nanofluídico autoalimentado”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Maestro en Ciencias línea terminal Nanotecnología

Presenta:

Jassihel Ordaz Núñez

Dirigido por:

Janet Ledesma García

Co-Director:

Lenin Sánchez Calderón

Santiago de Querétaro, Qro. junio de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Obtención de la enzima lactato oxidasa y su
aplicación en un biosensor nanofluídico
autoalimentado

por

Jassihel Ordaz Núñez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: IGMAC-300412



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ingeniería
Maestría en Ciencias línea terminal Nanotecnología

Obtención de la enzima lactato oxidasa y su aplicación en un biosensor nanofluídico autoalimentado
Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias línea terminal Nanotecnología

Presenta:

I.B. Jassihel Ordaz Núñez

Dirigido por:

Dra. Janet Ledesma García

Co-dirigido por:

Dr. Lenin Sánchez Calderón

Dra. Janet Ledesma García
Presidente

Firma

Dr. Lenin Sánchez Calderón
Secretario

Firma

Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando
Vocal

Firma

Dr. Eduardo Arturo Elizalde Peña
Suplente

Firma

Dr. José Alberto Rodríguez Morales
Suplente

Firma

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio, 2023
México

DEDICATORIA

A mis padres, por enseñarme a nunca rendirme.

A mi abuela Benita, por motivarme a querer ser investigador.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo financiero otorgado durante los dos años que fui estudiante de la Maestría en Ciencias con línea terminal en Nanotecnología.

Al personal académico y administrativo del programa de Maestría de la Universidad Autónoma de Querétaro, por sus enseñanzas y disposición, así como la orientación y el seguimiento brindando durante la realización de este trabajo.

Al laboratorio de Genómica Evolutiva de la Universidad Autónoma de Zacatecas liderado por el Dr. Lenin Sánchez Calderón por abrirme las puertas y acogerme durante mi estancia para la realización de la presente tesis. Gracias por los consejos que permitieron enriquecer mi tesis. De igual forma al Laboratorio de Electroquímica de la Unidad Académica de Ciencias Químicas dirigido por el Dr. Sergio Miguel Durón Torres, y en especial al Dr. Jairo Daniel Lozano López por ser mi tutor en electroquímica.

A la Dra. Janet Ledesma García mi más sincero agradecimiento por estar al pendiente en cada una de las etapas de esta tesis desde mi ingreso al posgrado. Gracias por los consejos, las pocas, pero enriquecedoras convivencias, y su preocupación constante. Por siempre plantear alternativas cuando sentí que el mundo se me venía encima, por nunca dejar de confiar en mí y por siempre mostrar una actitud positiva.

Al Dr. Lenin Sánchez Calderón por permitirme unirme a su equipo de trabajo, por ser un guía importante durante mi proceso de formación profesional y académica, por las pláticas mientras tomaba un café que me ayudaron a formar mi carácter y madurez durante este periodo, por ver potencial en mí y no permitirme desperdiciarlo al siempre exigirme más, por las convivencias que tuvimos, los regañones que me ayudaron a dejar mis malos vicios y sobre todo por su infinita paciencia para conmigo. Gracias por preocuparse siempre por mí.

Al Dr. Ricardo Antonio Escalona Villalpando por su monitoreo constante y aleatorio durante mi estancia en Zacatecas y en cada parte de la tesis, por siempre estar al pendiente de cada movimiento que realicé, su carácter alivianado al momento de darme observaciones y ser un apoyo más en la realización de este trabajo. Gracias por ser el que me presentó al Dr. Lenin y por gestar la estancia en la Universidad Autónoma de Zacatecas.

A mis padres, mis hermanos, mis abuelos, mis primos y mis tíos, por su apoyo, preocupación y dedicación durante toda la maestría, gracias por estar al pendiente siempre de mí.

A todos mis compañeros de generación, de laboratorio, alumnos de otras carreras y docentes con los que me relacioné durante la maestría. Contar con su apoyo y compañía durante esta etapa fue de lo más enriquecedor. Especialmente a Sofía, por siempre apoyarnos durante toda la maestría, mis mejores deseos para ti.

A mi madre y abuela sustitutas, Sandra y Eva, durante mi estancia en Zacatecas, por sus regaños y todas las veces que me motivaron a seguir adelante, aunque yo no tuviera ganas, por preocuparse siempre por mis comidas, por las risas que compartimos juntos, por los apapachos cuando extrañé mi casa y por seguir al pendiente de mí aun en la distancia.

A Mónica, por todas las experiencias que vivimos juntos dentro y fuera del lab, por decir que somos cosa 1 y cosa 2, por aconsejarme siempre cuando perdí la perspectiva, por escucharme cuando me sentía agobiado, por ser la que me secundaba en todas mis locuras, por siempre explicarme lo que desconocía, por ayudarme a darle un mejor formato a mi tesis y por ser una gran amiga, aprendimos tanto juntos.

A mis amigos de Coatzacoalcos, que me mandaban mensajes de forma esporádica para ver cómo iba mi avance principalmente Daniela y Joskua, gracias por devolverme a la realidad. A mis amigos virtuales que en más de una ocasión se desvelaron conmigo para evitar que me quedara dormido, por ser mi escape cuando necesitaba distraerme un poco de la vida académica, por estar cuando los necesité y porque siempre encontraban una manera de hacerme volver a escribir aun cuando yo ya no quería.

INDICE

CONTENIDO

INDICE DE TABLAS	5
INDICE DE FIGURAS	6
ABREVIATURAS Y SIGLAS	7
RESUMEN	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUCCIÓN	10
2. ANTECEDENTES	11
2.1. Dispositivos microfluídicos	11
2.1.1 Dispositivos Autoalimentados	11
2.1.2 Biocelda de Combustible	12
2.2. Biosensor	12
2.2.1 Clasificación de Biosensores	14
2.2.2 Caracterización Electroquímica	16
2.2.3 Mecanismos de Transferencia de Electrones	18
2.3. Enzimas.....	19
2.3.1. Enzimas Recombinantes	20
2.3.2. Inmovilización de Enzimas.....	20
2.3.3. Enzimas en Dispositivos Microfluídicos	21
2.4. Lactato en Fluidos Humanos	22
3. HIPOTESIS	23
4. OBJETIVOS	24
4.1. Objetivo General	24
4.2. Objetivos Específicos	24
5. METODOLOGÍA.....	24
5.1. Análisis bioinformáticos para la selección del gen a clonar.....	24
5.1.1. Revisión bibliográfica de trabajos anteriores	24
5.1.2. Búsqueda en bases de datos.....	25
5.1.3. Alineamiento múltiple de secuencias	25
5.1.4. Filogenia.....	25
5.3. Inmovilización de la enzima lactato oxidasa en el bioelectrodo.	26
5.4. Evaluación de la actividad catalítica de los bioelectrodos por técnicas electroquímicas.	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.1. Procedimiento para la selección del gen	27
6.1.1. Revisión bibliográfica de investigaciones que clonaron lactato oxidasa	27
6.1.2. Análisis de la secuencia de lactato oxidasa de <i>Aerococcus viridans</i>	28
6.1.4. Metodología propuesta para la clonación, sobreexpresión y purificación de la enzima lactato oxidasa	37
6.1.5. Evaluación electroquímica en la inmovilización de la enzima lactato oxidasa comercial.....	42
7. CONCLUSIONES	51
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Microorganismos fuente para la clonación de lactato oxidasa	26
2	Programa de PCR	35

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Secuencia de aminoácidos de la enzima lactato oxidasa de <i>Aerococcus viridans</i> .	28
2	Alineamiento de secuencias de proteínas LOx de bacterias pertenecientes al orden Bacilales.	30
3	Estructura tridimensional del monómero de lactato oxidasa de <i>Aerococcus viridans</i> .	31
4	Árbol filogenético generado utilizando el método Maximum Likelihood usando el modelo de sustitución LG+G+I	32
5	Estructura de lactato oxidasa de <i>Aerococcus viridans</i> que rodea al FMN	34
6	Evaluación por espectroscopía de impedancia electroquímica a electrodos de carbón vítreo	43
7	Evaluación por espectroscopía de impedancia electroquímica a electrodos de carbón modificado	44
8	VC de grafito usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de TTF con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	45
9	VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/TTF/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	46
10	VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.	47
11	VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	48
12	VC de grafito modificado con LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	49
13	VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	49
14	Densidad de corriente contra concentración de ácido láctico del electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx sumergido en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de lactato (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	51
15	Relación de la diferencia de potencial con respecto a la concentración de lactato generado a partir de las voltamperometrías del electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx sumergido en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s	52

ABREVIATURAS Y SIGLAS

μA	Microamperio
Ag	Plata
AgCl	Cloruro de plata
BFC	Biofuel cell (inglés)
	Biocelda de combustible, también BCC
CdTeQD	Quántum dots de telurio de cadmio
DET	Direct electron transfer (inglés)
	Transferencia directa de electrones
FeMeOH	Ferroceno metanol
FMN	Flavin mononucleótido
GSH	Glutati3n reducido
IPTG	Isopropil-beta-d-1-tiogalactopiran3sido
LOx	Lactato oxidasa
MET	Madiated electron transfer (inglés)
	Transferencia mediada de electrones
mM	Milimolar
PBS	Phosphate buffer solution (inglés)
	Soluci3n amortiguadora de fosfatos
pDEST	Plasmid destination (inglés)
	Plásmido destino
pDONR	Plasmid donor (inglés)
	Plásmido donador
rProt	Recombinant proteins (inglés)
	Proteínas recombinantes
TMPyP	5,10,15,20-tetrakis(N-metil-4-piridil) Porfirina
TTF	Tetratiafulvaleno
V	Voltaje
VC	Voltamperometría cíclica
Ω	Ohm

RESUMEN

Los dispositivos microfluídicos permiten trabajar con volúmenes pequeños, en condiciones de reacción controladas, son accesibles y transportables. Pueden ser utilizados en conjunto con algunas moléculas orgánicas permitiendo desarrollar sistemas que generen energía o ayuden en la detección de algún analito; entre estas moléculas orgánicas destacan las enzimas como catalizadores biológicos. El objetivo de este estudio fue proponer una estrategia metodológica que permita obtener un dispositivo nanofluídico autoalimentado utilizando a la enzima lactato oxidasa. Se realizó un análisis bioinformático para seleccionar el gen de la bacteria que codifica para lactato oxidasa; posteriormente se propuso la obtención de la enzima mediante clonación utilizando la técnica Gateway tomando como bacterias fuente a *Enterococcus faecium* y a *Aerococcus viridans* para su expresión en *E. coli* BL21(DE). Se planteó realizar la purificación mediante columnas de centrifugación y la caracterización utilizando la reacción acoplada de peroxidasa de rábano con ABTS. El desempeño de la matriz de Porfirina/GSH-CdTeQ se evaluó mediante espectroscopía de impedancia electroquímica al presentar un aumento en la resistencia del 450% respecto a la matriz sin enzima inmovilizada. La actividad catalítica del bioelectrodo fue evaluada a través de voltamperometrías cíclicas (VC) para determinar si la inmovilización permitía desarrollar actividad, las condiciones bajo las se llevaron a cabo los experimentos fueron sin agitación, utilizando un contraelectrodo de Ag/AgCl y mediante adiciones sucesivas de lactato y se encontró actividad catalítica hasta la concentración 10 mM de lactato, esto nos permite inferir que la proteína propuesta también podrá utilizar el mismo soporte para su inmovilización.

Palabras clave: biosensor, clonación, enzima, nanofluídico

ABSTRACT

Microfluidic devices allow working with small volumes, under controlled reaction conditions, are accessible and transportable. They can be used in conjunction with some organic molecules, allowing the development of systems that generate energy or help in the detection of analytes; among these organic molecules, enzymes stand out as biological catalysts. The objective of this study was to propose a methodological strategy that allows obtaining a self-powered nanofluidic device using lactate oxidase. A bioinformatic analysis was performed to select the bacterial gene that codes for lactate oxidase; subsequently, it was proposed to obtain the enzyme by cloning using the Gateway technique, taking *Enterococcus faecium* and *Aerococcus viridans* as source bacterium for its expression in *E. coli* BL21(DE). Spin column purification and characterization using the coupled reaction of horseradish peroxidase with ABTS was planned. The performance of the Porphyrin/GSH-CdTeQ matrix was evaluated by electrochemical impedance spectroscopy, presenting a 450% increase in resistance compared to the matrix without immobilized enzyme. The catalytic activity of the bioelectrode was evaluated through cyclic voltammetry (CV) to determine if the immobilization allowed it to develop activity, the conditions under which the experiments were carried out were without stirring, using an Ag/AgCl counter electrode and by successive additions of lactate and catalytic activity was found up to 10 mM lactate concentration, this allows us to infer that the proposed protein can also use the same support for its immobilization.

Keywords: biosensor, cloning, enzyme, nanofluidic

1. INTRODUCCIÓN

Los biosensores tiene múltiples ventajas, una de las principales es su practicidad que permite la cuantificación *in situ*; otras características son la posibilidad de producción y rápida distribución, aunque existen algunas limitantes cuando se trabaja con enzimas inmovilizadas tales como cambios en la actividad catalítica, la desnaturalización producida por una variación en el pH, el tiempo de vida útil y los costos de producción, por mencionar algunos (Gamella *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2020).

A pesar de los avances que se tienen en el área de biosensores, y en específico, en el área biomédica, son recientes las investigaciones relacionadas con la detección y cuantificación de analitos presentes en el cuerpo, ya sea con fines de investigación o para la prevención y detección de enfermedades en etapas tempranas (Shafiee *et al.*, 2018).

Desde el punto de vista fisiológico, un aumento en la concentración de lactato en el sudor puede estar relacionado con diferentes causas que pueden incluir desde fatiga muscular, hipoxia o fibrosis quística, entre otras. El sudor puede ser utilizado para diagnosticar otras enfermedades como el síndrome de Frey o trastorno de pánico, acidosis láctica (Luo *et al*, 2021; Derbyshire *et al*, 2012; Arrudi-Moreno *et al*, 2020; Hauke *et al*, 2020)

La ingeniería de proteínas es una de las estrategias que pueden ser llevadas con la finalidad de ampliar el rango dinámico de un biosensor además de que sus principales técnicas permiten obtener enzimas recombinantes (Campás *et al.*, 2019).

Para el caso de la enzima lactato oxidasa, su producción es inexistente en el país y las formas comerciales que existen presentan una alta sensibilidad al exterior de forma que su manipulación debe realizarse con sumo cuidado y manteniendo condiciones especiales, sin mencionar que requiere una superficie para anclarse.

En la presente investigación se planteó la metodología para producir la enzima recombinante lactato oxidasa proveniente de *Aerococcus viridans* en *E. coli* BL21 (DE3), la cual tiene modificaciones genéticas que reducen la contaminación por oxígeno, y su aplicación futura en un biosensor nanofluídico autoalimentado que permita cuantificar lactato presente en algunos fluidos corporales.

2. ANTECEDENTES

2.1. Dispositivos microfluídicos

Los dispositivos microfluídicos se componen de un chip con canales pequeños y cámaras de reacción para la detección de analitos (Muzammil *et al.*, 2022). Desde su comienzo plantearon el desarrollo continuo encaminado a aplicaciones biológicas y biomédicas. Características como la capacidad de llevar a cabo procesos múltiples de forma simultánea y la necesidad de volúmenes de reactivos bajos, han llevado a que estos dispositivos sean apropiados para desarrollar análisis bioquímicos, cribado de alto rendimiento y análisis de alta sensibilidad (Jiang & Korivi, 2014).

En años más recientes, la microfluídica ha cobrado relevancia en el área médica debido a su potencial en una variedad de aplicaciones que van desde ensayos enzimáticos, reacciones de hibridación de ADN, separación de biomoléculas, entre otras teniendo en algunos casos relación con los dispositivos autoalimentados (Wang *et al.*, 2020).

2.1.1 Dispositivos Autoalimentados

Un dispositivo autoalimentado puede ser un sensor químico, nuclear o biológico, en el que la presencia del analito produce suficiente energía para la señalización. En un principio los sensores autoalimentados fueron planteados para sensores nucleares (USA Patente nº 0213379, 2010), posteriormente se utilizaron en el área química y biológica (Han *et al.*, 2010) y recientemente se ha ampliado el término a aquellos sensores que recogen energía del ambiente (Arechederra & Minter, 2011).

Un dispositivo electroquímico autoalimentado utiliza una biocelda de combustible como fuente de energía a la par de biosensor, lo que simplifica el sistema del biosensor debido a que ya no requiere de un potencióstato, energía para el potencióstato y/o energía para el dispositivo de señalización (Grattieri & Minter, 2017).

2.1.2 Biocelda de Combustible

Una celda de combustible es un dispositivo microfluídico en el que las funciones de suministro de fluido, remoción, sitio de reacción y componentes del electrodo se encuentran confinados en un canal. Estas celdas pueden trabajar con un modo de flujo laminar sin requerir de una barrera física que separe al combustible de la especie oxidante (Jiang & Korivi, 2014).

Un subtipo de celda de combustible son las bioceldas de combustible (BFC) que generan energía mediante el uso de moléculas biológicas, las bioceldas de combustibles a su vez se clasifican en celdas de combustible microbiano y celdas de combustible enzimáticas las cuales dependiendo del biocatalizador que ocupan pueden convertir energía química en energía eléctrica directamente con la ayuda de la biocatálisis (Hao *et al.*, 2020; Abreu *et al.*, 2018).

2.2. Biosensor

El desarrollo y la comercialización de los biosensores comenzó alrededor de los años 60, enfocados principalmente aplicaciones clínicas y de índole bioquímico. En 1962, se diseñó el primer sensor enzimático que tenía la finalidad de determinar la concentración de glucosa en la sangre a través de la reacción catalizada por la glucosa oxidasa; para realizar este dispositivo se acopló la proteína a un electrodo selectivo de oxígeno (Clark & Lyons, 1962).

Un biosensor es un sensor químico en el que el sistema de reconocimiento utiliza un mecanismo bioquímico. De manera general, un sensor químico contiene dos componentes básicos que se encuentran conectados en serie: el sistema de reconocimiento (receptor) y el transductor fisicoquímico. La fuente de la que un

sensor obtiene información puede variar, desde la concentración de un componente presente en una muestra hasta el análisis de la composición total, y esto es obtenido a través de una señal analítica útil (Thévenot *et al.*, 2001; Cammann, 1977; Turner *et al.*, 1987).

El sistema de reconocimiento biológico se encarga de traducir la información del dominio bioquímico, usualmente la concentración de un analito, en una señal de salida química o física con una sensibilidad definida. Su principal función es proveer al sensor con un alto grado de selectividad por el analito a ser medido. La parte del sensor que transduce tiene como función transferir la señal obtenida en el dominio de salida del sistema de reconocimiento, generalmente al dominio eléctrico. Esta parte del biosensor a veces se conoce como detector, sensor o electrodo, pero se prefiere el término transductor para evitar confusión (Thévenot *et al.*, 2001). Es importante destacar que las características fisicoquímicas del analito de interés serán determinantes en la selección del material biológico de reconocimiento, mientras que por su lado el tipo de elemento de reconocimiento es el que determina el sistema transductor (Jiménez & León, 2009).

De acuerdo con Shafiee *et al.* (2018), diversos parámetros son considerados para evaluar un biosensor:

- I. Rango de Medición: son los límites máximos y mínimos que un sensor es capaz de detectar.
- II. Sensibilidad: que es la proporción del cambio de salida resultante de un cambio de entrada dado.
- III. Tiempo de Respuesta: definido como el tiempo requerido por el sensor para alcanzar un valor de salida de estado estable en respuesta a una entrada variable.
- IV. Exactitud: la cual se define como la diferencia entre el valor detectado y la cantidad real, se determina mediante una relación y se muestra como un porcentaje.

- V. Precisión: se relaciona con la reproducibilidad de la medición bajo condiciones similares.
- VI. Resolución: se refiere al cambio de entrada más pequeño que es detectable por el sensor.
- VII. Reproducibilidad: es la proximidad de los valores de salida cuando la misma cantidad de entrada es suministrada al sensor bajo condiciones similares.
- VIII. Límite de Detección: uno de los parámetros más importantes, representa la mínima cantidad de un analito detectable por el biosensor.
- IX. Histéresis: en algunos sensores existe un comportamiento en la entrada y salida que sigue un comportamiento no lineal, dependiendo de si la entrada aumenta o disminuye.

La nanotecnología también ha contribuido a seguir enriqueciendo el desarrollo de los biosensores (LaFleur & Yager, 2013). Por ejemplo, algunos nanomateriales son empleados en la biodetección, como los nanotubos y las nanopartículas. Los nanotubos son estructuras unidimensionales que presentan una alta relación superficie-volumen (Liu, 2008), un ejemplo son los nanotubos de carbono utilizados para inmovilizar anticuerpos o cadenas de ADN en su superficie de forma que cuando el antígeno o la hebra de ADN interactúe, según sea el caso, se genere un cambio en la conductancia eléctrica en el nanotubo. Las nanopartículas tienen diámetros entre 1 y 100 nm, usualmente mono dispersas y comúnmente hechas de oro modificado por la adsorción de proteínas como anticuerpos; presentan propiedades ópticas de dispersión y absorción únicas que son aprovechadas ampliamente en métodos de imagenología (Aslan *et al.*, 2005).

2.2.1 Clasificación de Biosensores

De acuerdo con Jiménez y León (2009), los biosensores pueden agruparse tomando como referencia diferentes variables:

- I. Tipo de interacción: biocatalíticos o de bioafinidad

- II. Método de detección: directo o indirecto
- III. Elemento de reconocimiento: célula, organela, tejido, enzima, receptor, anticuerpo, ácido nucleico, polímero de impresión molecular.
- IV. Sistema de transducción: nanomecánico, piezoeléctrico, electroquímico, termoeléctrico u óptico.

2.2.1.1 Biosensores Electroquímicos

Un biosensor electroquímico es un biosensor que posee un transductor electroquímico, es considerado un electrodo modificado químicamente debido a que el material conductor electrónico, semiconductor o conductor iónico está recubierto con una película bioquímica (Durst *et al.*, 1997; Kutner *et al.*, 1998; Thévenot *et al.*, 2001).

Algunos aspectos positivos importantes del uso de enzimas en los biosensores son la simplicidad, la flexibilidad, el costo-eficacia, portabilidad y selectividad superior (Singh *et al.*, 2010; Mishra & Rajakumari, 2019). El desarrollo de biosensores enzimáticos ha mejorado y acelerado el diagnóstico de varias enfermedades como la diabetes, el cáncer, el VIH, el dengue, el colesterol alto y otros desórdenes que involucran análisis de plasma (Metkar & Girigoswami, 2019; Mohankumar *et al.*, 2021).

Actualmente una gran variedad de enzimas son utilizadas en distintos ámbitos de detección en el área de la medicina. Una de las más destacadas es la glucosa oxidasa empleada en biosensores enzimáticos amperométricos (Witkowska *et al.*, 2016; Yoo & Lee, 2010). Otro tipo de biosensores usados en el diagnóstico clínico se relacionan con la detección de lactato, o ácido láctico (Rathee *et al.*, 2016; Dungchai *et al.*, 2009). El aumento de la concentración de esta molécula en el humano puede resultar en acidosis láctica, que causa múltiples problemas como fallos en el corazón y en el sistema hepático, sepsis, diabetes, entre otros (Rathee *et al.*, 2016; Ricci & Palleschi, 2005). Las dos enzimas comúnmente usadas en este tipo de biosensores son la L-lactato deshidrogenasa y la L-lactato oxidasa. Múltiples

estrategias han sido planteadas para mejorar la sensibilidad y selectividad de los sensores de lactato que involucran nanomateriales, principalmente nanoestructuras a base de carbono que pueden llegar incluso a aumentar la longevidad de este tipo de biosensores (Bravo *et al.*, 2019; Batra *et al.*, 2016; Chu *et al.*, 2017).

2.2.2 Caracterización Electroquímica

Existen diversas técnicas que permiten medir o evaluar el funcionamiento de un biosensor. En el caso de los dispositivos electroquímicos, una señal eléctrica se introduce en el sistema; la señal brinda información del sistema mediante la respuesta eléctrica que genera el transductor (Cano, 2009). Un transductor electroquímico mide la corriente que se produce como resultado de las reacciones de oxidación y reducción debido a la interacción del biosensor con un analito (Perumal & Hashim, 2014; Wang *et al.*, 2008). Esta corriente generada por el sensor se puede correlacionar con la concentración del analito o su proporción de producción o consumo (Grieshaber *et al.*, 2008; Shafie *et al.*, 2018).

Las caracterizaciones electroquímicas se realizan recurriendo a sistemas de electrodos. Una celda electroquímica consta de un electrodo de trabajo y de un contraelectrodo, el potencial del electrodo de trabajo es sensible a la concentración del analito y el contraelectrodo cierra el circuito. De esta forma el potencial del electrodo de trabajo se obtiene con respecto al contraelectrodo que actúa como un potencial de referencia; debido a esto, el potencial del contraelectrodo debe permanecer constante. Si esto no se logra, será necesario recurrir a un electrodo auxiliar que permita mantener constante el potencial del contraelectrodo y completar el circuito (Choudhary *et al.*, 2017). Entre las principales técnicas para caracterizar a un biosensor destacan la cronoamperometría y la voltamperometría cíclica.

2.2.2.1 Cronoamperometría

En amperometría, un potencial constante es aplicado al electrodo de trabajo y la corriente es medida como una función del tiempo. La amperometría es utilizada para

la detección de analitos en sistemas de flujo y dada esta particularidad, es posible utilizarla en estudios de sensores incluidos portátiles (Choudhary *et al.*, 2017).

En una cronoamperometría, el potencial de entrada varía y la variación correspondiente de la corriente se registra en función del tiempo. La cronoamperometría sigue la ecuación de Cottrell y esta a su vez se deriva de la segunda ley de Fick de difusión, por lo que es posible encontrar el valor del coeficiente de difusión de las especies electroactivas disponibles en la superficie del electrodo de trabajo. Esta técnica permite predecir la variación en la corriente a lo largo del tiempo al aplicar un paso de potencial bajo condiciones de gran sobrepotencial (Choudhary *et al.*, 2017).

La técnica de cronoamperometría es tan sensible que no requiere de marcar al analito o al bioreceptor y ha sido aplicada en múltiples estudios de forma independiente o a la par de otras técnicas electroquímicas como la voltamperometría cíclica (Guy & Walker, 2016).

2.2.2.2 Voltamperometría Cíclica

Una voltamperometría cíclica (VC) es un tipo específico de voltamperometría que comprende el escaneo de un rango de voltajes mientras se mide la corriente eléctrica y se utiliza para estudiar las propiedades reductoras de algunos compuestos y de algunas estructuras interfaciales (Bałczewski *et al.*, 2008). Una voltamperometría cíclica puede ser utilizada para obtener información relacionada con el potencial de reducción, así como las proporciones de reacción electroquímicas de algunas soluciones de analitos.

En este ensayo, el potencial de un electrodo estacionario se escanea desde un potencial predeterminado hasta un valor final, denominado potencial de conmutación, para obtener posteriormente el escaneo inverso y estos valores se grafican corriente contra voltaje en un voltamograma (Guy & Walker, 2016). La magnitud de las corrientes de oxidación y de reducción y la forma de los

voltamogramas dependen en gran medida de la concentración del analito, las velocidades de escaneo y las condiciones del experimento (Choudhary *et al.*, 2017).

2.2.3 Mecanismos de Transferencia de Electrones

La función de los biosensores amperométricos está relacionada con los procesos de transferencia de electrones entre el sitio activo de una enzima inmovilizada y la superficie de un electrodo que está preparado para un potencial de trabajo apropiado. Dentro de las principales vías de transferencia de electrones se encuentran la transferencia de electrones mediada, el salto de electrones en polímeros redox, transferencia de electrones utilizando enzimas modificadas como mediadores, electrodos de pasta de carbono y transferencia directa de electrones. Un prerequisite esencial para el desarrollo de un biosensor amperométrico que presente alta sensibilidad y respuesta rápida es establecer una transferencia de electrones rápida desde el componente biológico al electrodo (Habermüller *et al.*, 2000).

2.2.3.1 Transferencia de Electrones Mediada

La primera generación de biosensores se aprovecha de que en la naturaleza el grupo protésico de varias enzimas es reciclado por un cosustrato que se difunde libremente. Dado que algunos cosustratos pueden oxidarse o reducirse en un electrodo metálico, estos compuestos pueden ser utilizados como “lanzaderas de transferencia de electrones” entre la enzima y el transductor. Ya sea que se detecte la disminución de la concentración del cosustrato de la enzima o el aumento de la concentración del coproducto mediante la medición de un cambio en la corriente al agregar el sustrato a un potencial de trabajo adecuado (Habermüller *et al.*, 2000).

Para la segunda generación de biosensores, los mediadores redox artificiales han sido usados en lugar de los naturales para eludir la dependencia del oxígeno descrito a la par que reducen el potencial de trabajo, lo cual permite disminuir los compuestos molestos que se reducen u oxidan directamente en la superficie del electrodo (Kulys *et al.*, 1980; Cass *et al.*, 1984).

Algunos ejemplos de este tipo de mediadores son principalmente complejos metálicos solubles de bajo peso molecular con propiedades de transferencia de electrones reversible, entre los cuales se encuentran derivados del ferroceno, $K_4[Fe(CN)_6]$, quinonas y complejos de Os (Ghindilis *et al.*, 1997).

2.2.3.2 Transferencia de Electrones Directa

La tercera generación de biosensores implicaba una comunicación directa entre la enzima y el transductor. En esta generación el atractivo principal era el mecanismo de transferencia de electrones directo, evitando usar intermediarios para la transferencia, a través de reacciones de auto intercambio, por lo que la transferencia directa de electrones debía ocurrir en el potencial redox del propio grupo protésico (Ghindilis *et al.*, 1997).

Un diseño de electrodo óptimo debe garantizar que la distancia de transferencia de electrones existente entre una proteína redox y la superficie del electrodo sea lo más corta, de manera que la transferencia de electrones directa solo se logra con aquellas enzimas que están inmovilizadas en la primera monocapa sobre la superficie de un electrodo. El pequeño número de enzimas inmovilizadas que pueden ser sometidas a una transferencia directa de electrones limita concomitantemente propiedades importantes del sensor como lo son la sensibilidad y la estabilidad (Habermüller *et al.*, 2000).

Las enzimas más estudiadas y mejor caracterizadas por poseer propiedades de transferencia de electrones pertenecen al grupo de las peroxidasas: citocromo c, glucosa oxidasa, ferredoxina, plastocianina, azotoflavina, etcétera (Ghindilis *et al.*, 1997).

2.3. Enzimas

Las enzimas son proteínas biocatalizadoras que permiten acelerar las reacciones bioquímicas en los organismos. Se componen de cadenas lineales de aminoácidos que se pliegan dando forma a estructuras terciarias altamente específicas con núcleo hidrofóbico rodeado de capas hidrofílicas (Kuah *et al.*, 2016; Drout *et al.*,

2019). La complejidad de esta estructura (sitio activo) provee del ambiente fisicoquímico necesario donde la catálisis se lleva a cabo (Garske *et al.*, 2017; Arsalan & Younus, 2018).

Los procesos catalíticos que son asistidos por enzimas tienen una eficiencia elevada debido a la posibilidad de operar en tasas de reacción bajas, alta selectividad y especificidad, baja toxicidad física y ambiental, reduce los costos y la generación de desechos, conduciendo a rutas de producción más optimizadas (Singh *et al.*, 2016; Chapman *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018; Cavalcante *et al.*, 2021).

2.3.1. Enzimas Recombinantes

Existe otra forma de obtener enzimas en células animales, mediante la transfección de un gen exógeno a una célula huésped y permitiendo la sobreexpresión de proteínas con aplicaciones en la producción química, farmacéutica, cosmética, salud, agricultura, alimentación y tratamiento de aguas residuales. A este tipo de enzimas se les conoce como proteínas recombinantes (Do *et al.*, 2019).

Las bacterias resaltan dentro de la gama de huéspedes utilizados en la producción de enzimas recombinantes, debido a su ciclo de vida corto, método de cultivo barato y amplio conocimiento de su material genético. *Escherichia coli* es la bacteria más usada en la sobreexpresión de proteínas exógenas ya que su crecimiento exponencial permite obtener cultivos con densidad óptima de 0.5 de absorbancia en cuestión de horas y su método de transformación puede llevarse a cabo en menos de 5 minutos (Gopal & Kumar, 2013; Abinaya & Viswanathan, 2021).

2.3.2. Inmovilización de Enzimas

Las enzimas que son utilizadas en suspensión presentan limitaciones relacionadas con su estabilidad, eficiencia y especificidad. Además, su recuperación y utilización es una tarea difícil (Cavalcante *et al.*, 2021; Rueda *et al.*, 2016). Para reducir o eliminar este tipo de complicaciones se han desarrollado diferentes técnicas de inmovilización, las cuales permiten mejorar la estabilidad, aumentar la actividad y selectividad, tener una buena resistencia, mejorar la separación y purificación de

algunos productos y la posibilidad de reutilización (Monteiro *et al.*, 2019; Cavalcante *et al.*, 2019; Choi *et al.*, 2015; Eş *et al.*, 2015).

La inmovilización enzimática es el proceso mediante el cual una enzima es confinada en la superficie de un soporte (Cavalcante *et al.*, 2021). Esta técnica plantea la conversión de una enzima soluble en agua a una proteína anclada a una forma sólida, conocida como catalizador (Kulkarni, 2002; Nguyen & Kim, 2017; Monteiro *et al.*, 2019).

La inmovilización puede causar alteraciones en las propiedades físicas y químicas de la enzima. Entre los principales cambios observados en una enzima se encuentran: la estabilidad, los efectos conformacionales y estéricos, propiedades cinéticas y efectos en la transferencia de masa y difusión (Shanmugam & Sathishkumar, 2009; Eş *et al.*, 2015).

2.3.2.1. Clasificación de los Métodos de Inmovilización

Los métodos de inmovilización pueden ser clasificados de acuerdo con los modos de interacción entre las enzimas y los soportes en métodos físicos y métodos químicos (Poorakbar *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018). Los métodos físicos presentan interacciones monovalentes débiles como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de van der Waals o enlaces iónicos entre las enzimas y el soporte, o del contenedor mecánico de la enzima con el soporte (Dos Santos *et al.*, 2017; Cavalcante *et al.*, 2021). Por su parte, los métodos químicos presentan la formación de enlaces covalentes entre la enzima y enlaces éter, tioéter, amida o carbonato presentes en el material de soporte (Mohamad *et al.*, 2015).

2.3.3. Enzimas en Dispositivos Microfluídicos

Los dispositivos microfluídicos que utilizan enzimas son los más utilizados en el ámbito de la investigación científica (Nguyen *et al.*, 2019), esto debido al elevado poder catalítico de las enzimas, aunado a su alta especificidad y a su desempeño en condiciones suaves de reacción (Rocha *et al.*, 2020; Ronkainen *et al.*, 2010). El diseño de un dispositivo microfluídico que acopla enzimas tiene como

características su facilidad de uso, la sensibilidad que presenta a concentraciones bajas de analitos y su alta precisión, el gran potencial de miniaturización y la capacidad de diagnóstico en tiempo real, así como que no se requieren grandes cantidades de muestra y promueve rendimientos altos (Cavalcante *et al.*, 2021; Fathi *et al.*, 2019).

Uno reto que el uso de enzimas en biosensores electroquímicos ofrece es el reconocimiento de biomoléculas, en los que parámetros como la sensibilidad, selectividad y estabilidad moderan su uso. La ingeniería de proteínas en ese sentido se encuentra en ascenso como una posible estrategia que permita mejorar el rendimiento de enzimas nativas (Campàs *et al.*, 2009). La ingeniería de proteínas establece dos estrategias principales: el diseño racional, que mezcla mutagénesis sitio-dirigida con conocimiento detallado de las estructuras presentes en la enzima, y la evolución directa, que no requiere de conocimiento científico dado que se basa en síntesis aleatorias de un conjunto de enzimas mutantes y su subsecuente selección por procesos iterativos (Wong & Schwaneberg, 2003).

2.4. Lactato en Fluidos Humanos

El lactato es conocido como un biomarcador importante en la oxigenación de tejidos y también se estudia cuando el cuerpo se somete a un entrenamiento físico en algunos deportes. Cuando la concentración de lactato aumenta en el cuerpo, se llega a un estado de acidosis láctica en la que el organismo requiere de energía y como consecuencia puede generar dolor muscular. Por estas características es importante el monitoreo del lactato no solo en el ámbito del diagnóstico clínico, sino también en áreas como el deporte, la biotecnología y el análisis de alimentos (Bravo *et al.*, 2019).

El sudor humano es una mezcla fisiológica compleja que contiene diferentes tipos de iones, como Na, K, Cl, y compuestos como lactato, glucosa y amonio. La composición del sudor puede variar dependiendo de las condiciones fisiológicas humanas lo que permite relacionarlo con enfermedades patológicas (Gonzalo *et al.*,

2009), consumo de sal en los alimentos, abuso de drogas y deshidratación en condiciones de calor y de ejercicio (Green *et al.*, 2004; Alvear *et al.*, 2005; Dam *et al.*, 2015). La concentración de lactato en el sudor de forma normal se encuentra entre 5-40 mmol/L (Baker, 2019).

El lactato se produce de forma normal en el citoplasma cuando el piruvato bajo condiciones anaerobias es convertido en ácido láctico por la enzima lactato deshidrogenasa y en solución acuosa se disocia como iones H⁺ y como lactato. Algunas mediciones relacionadas con el lactato se llevan a cabo en espectrofotómetros, pero también puede llevarse a cabo mediante el uso de algunas celdas amperométricas (sensores) los cuales aprovechan la reacción de la enzima lactato oxidasa al producir peróxido de hidrógeno a partir del lactato, este peróxido de hidrógeno es oxidado en un ánodo de platino generando una corriente proporcional a la concentración de lactato (Phypers & Pierce, 2006). De forma convencional, el lactato en el sudor se mide mediante la colecta del sudor, procesamiento y envío de las muestras al laboratorio para análisis en el espectrómetro de masas. El lactato en el sudor puede ser cuantificado a través de mediciones de absorbancia, espectrometría de masas, espectroscopía multidimensional y cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) pero poder utilizar cualquiera de estos métodos de detección se requiere que el sudor recolectado sea tratado previamente en el laboratorio (Luo *et al.*, 2021; Taylor *et al.*, 1994).

3. HIPOTESIS

La estratégica planeación y diseños de obtención de la enzima lactato oxidasa a través de la clonación en un microorganismo permitirá conseguir una proteína con actividad catalítica comparable con la adquirida comercialmente, para su potencial aplicación en un biosensor nanofluídico autoalimentado de lactato a través de la medición de algunos parámetros medibles similares o superiores a los reportados actualmente en la literatura.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Obtener la enzima lactato oxidasa a partir de un organismo genéticamente modificado (ogm) para su aplicación en un biosensor de lactato utilizando un dispositivo nanofluídico autoalimentado.

4.2. Objetivos Específicos

- I. Realizar un análisis bioinformático para la selección del gen que codifique para la enzima lactato oxidasa para su clonación en *E. coli BL21 (DE3)*.
- II. Proponer la metodología para la obtención, purificación y caracterización de la enzima recombinante.
- III. Inmovilizar la enzima lactato oxidasa, por métodos físicos y químicos utilizando nanopartículas de carbón, mediadores redox y nanopartículas metálicas.
- IV. Evaluar la actividad catalítica del bioelectrodo por técnicas electroquímicas para establecer su funcionamiento como biosensor de lactato.
- V. Incorporar el bioelectrodo derivado de lactato oxidasa en un sistema nanofluídico autoalimentado para la cuantificación de lactato.

5. METODOLOGÍA

5.1. Análisis bioinformáticos para la selección del gen a clonar

5.1.1. Revisión bibliográfica de trabajos anteriores

Se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer qué investigaciones previas involucraban la clonación de la enzima lactato oxidasa, la bacteria de la que provenía el gen y qué metodología emplearon para realizar la clonación.

5.1.2. Búsqueda en bases de datos

La secuencia del gen que codifica para la enzima lactato oxidasa comercial proveniente de *Aerococcus viridans* se buscó en la base de datos de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

5.1.3. Alineamiento múltiple de secuencias

A partir de la secuencia D50611.1, se realizó un BlastP en Unitprot (www.uniprot.org) y se seleccionaron tres secuencias que corresponden a proteínas de tres especies bacterias (*Streptococcus iniae*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecium*) para llevar a cabo un alineamiento con ClustalW en Mega11 y determinar la similitud entre las secuencias y los motivos funcionales.

5.1.4. Filogenia

Se seleccionó la secuencia correspondiente al dominio que presentó conservación entre las cuatro secuencias alineadas y se realizó un nuevo BlastP en el que se eligieron los alineamientos que presentaban homología con la secuencia del dominio catalítico con una cobertura (*query coverage*) >70%, siendo elegidas 15 secuencias. Con estos datos se realizó un nuevo alineamiento múltiple de secuencias con ClustalW en Mega11, y se hizo un análisis filogenético en Mega11 (Kumar *et al*, 2016) por el método de Maximum Likelihood (ML, máxima verosimilitud) con bootstrapping de 1000.

5.2. Metodología para la obtención, purificación y caracterización de la enzima recombinante

Para la obtención, purificación y caracterización de la enzima se planteó la metodología siguiendo los protocolos establecidos por ThermoFisher, Promega y ZymoResearch.

5.3. Inmovilización de la enzima lactato oxidasa en el bioelectrodo.

La preparación de los bioelectrodos se realizó mediante la técnica de drop-casting en la cual mediante goteos y lavados sucesivos se genera una capa sobre superficie del electrodo. A partir de una solución de porfirinas (TMPyP), fueron depositados sobre la superficie de un electrodo pulido y lavado 3 μL , se esperó el secado y se enjuagó. Sobre el electrodo seco se depositaron 3 μL de cuántum dots (GSH-CdTeQD), se esperó secado y se enjuagó. Finalmente, 3 μL de enzima se depositaron sobre el electrodo y se esperó secado.

5.4. Evaluación de la actividad catalítica de los bioelectrodos por técnicas electroquímicas.

Los experimentos electroquímicos se realizaron sin agitación usando un potenciostato marca Gamry Reference 600 Potentiostat/Galvanostat/ZRA. Los electrodos de lactato oxidasa fueron evaluados en una solución de PBS pH 7.4 (0.1 mM) usando un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia y grafito como contraelectrodo, además de probar dos tipos de mediadores para las pruebas electroquímicas, ferroceno metanol y tetratiafulvaleno (TTF). Las voltamperometrías cíclicas (VC) se realizaron a una velocidad de barrido de 5 mV/s y un rango de potencial de 0.5 a -0.1 (vs Ag/AgCl) en dirección anódica, mientras que los experimentos de amperometría se llevaron a cabo aplicado un voltaje constante.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se muestran los resultados del análisis bioinformático que permitieron seleccionar el gen de la enzima lactato oxidasa para su clonación; de igual manera, se presentan los resultados de la evaluación del bioelectrodo en un ambiente controlado de pH, temperatura y concentración de lactato para obtener su actividad catalítica. Así como dos tipos de mediadores para evaluar el mejor rendimiento.

6.1. Procedimiento para la selección del gen

6.1.1. Revisión bibliográfica de investigaciones que clonaron lactato oxidasa

De acuerdo con la revisión bibliográfica, cinco grupos de trabajo (Tabla 1) han clonado genes que codifican para lactato oxidasa. Además, todos los genes clonados fueron obtenidos de microorganismos patógenos (Tabla 1, primera y segunda columna).

Tabla 1. Microorganismos fuente para la clonación de lactato oxidasa.

Microorganismo	Patógeno	Referencia
<i>Aerococcus viridians</i>	Si	Taurino (2013)
<i>Aerococcus viridians</i>	Si	Hiraka <i>et al</i> (2018)
<i>Enterococcus faecium</i>	Si	Shitanda <i>et al</i> (2019)
<i>Lactococcus lactis</i>	Si	Toda (1998)
<i>Streptococcus iniae</i>	Si	Gibello (1999)

Algunas investigaciones solo se enfocaron en la clonación de lactato oxidasa (Toda, 1998 y Gibello, 1999), mientras que Shitanda *et al.* (2019), Hiraka *et al.* (2018) y Taurino (2013) utilizaron además la proteína en un sistema microfluídico y realizaron algunas caracterizaciones para evaluar su comportamiento electroquímico.

Con la información anterior, se seleccionó el gen de lactato oxidasa proveniente de *Aerococcus viridans* para realizar los análisis bioinformáticos debido a que presentó un mayor número de investigaciones y la enzima comercial se obtiene a partir de este microorganismo.

6.1.2. Análisis de la secuencia de lactato oxidasa de *Aerococcus viridans*

La búsqueda de la proteína se hizo en NCBI y BRENDA para obtener la secuencia del gen de *A. viridans*, así como su cinética enzimática (BRENDA, 2022).



Figura 1. Secuencia de aminoácidos de la enzima lactato oxidasa de *A. viridans* con número de acceso Q44467. Los rectángulos indican residuos que forman el sitio de unión del lactato, los círculos son los residuos que participan en la unión del cofactor flavín mononucleótido (FMN), el triángulo es el residuo del sitio catalítico y el rectángulo verde representa el dominio catalítico de la proteína.

La secuencia de aminoácidos de la enzima lactato oxidasa de *A. viridans* presenta sitios de unión de lactato (Figura 1, guinda) y del cofactor flavin mononucleótido (FMN; Figura 1, amarillo) permitiendo asociarla con la familia de enzimas dependientes de FMN (Ellis, 2010). De igual manera, se encontró en la secuencia del dominio catalítico (Figura 1, verde), encargado de la oxidación de lactato (Leiros *et al*, 2006), el cuál confirma la actividad oxidasa.

Posteriormente, se efectuó un alineamiento de secuencias múltiple (Figura 3) de las enzimas reportadas (Tabla 1) utilizando la herramienta BlastP (NCBI, 2022), las cuatro pertenecen al orden Bacillales: *A. viridans*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecium*.

En el alineamiento (Figura 2) se observan los motivos conservados entre las diferentes proteínas, así como los sitios de unión del FMN, utilizado como cofactor, y catalítico. El sitio catalítico de la enzima comprende los residuos del 190 al 220, es variable y poco conservado (Leiros *et al*, 2006). Por otro lado, el dominio catalítico se encuentra entre los residuos 258-271, está altamente conservado y está asociado a la familia de enzimas alfa-hidroxiácido oxidasa dependientes de FMN (Umena *et al*, 2006; Furuichi *et al*, 2008). A partir de estas consideraciones, es necesario que la bacteria fuente exprese una proteína con el dominio catalítico conservado, así como presentar actividad catalítica.

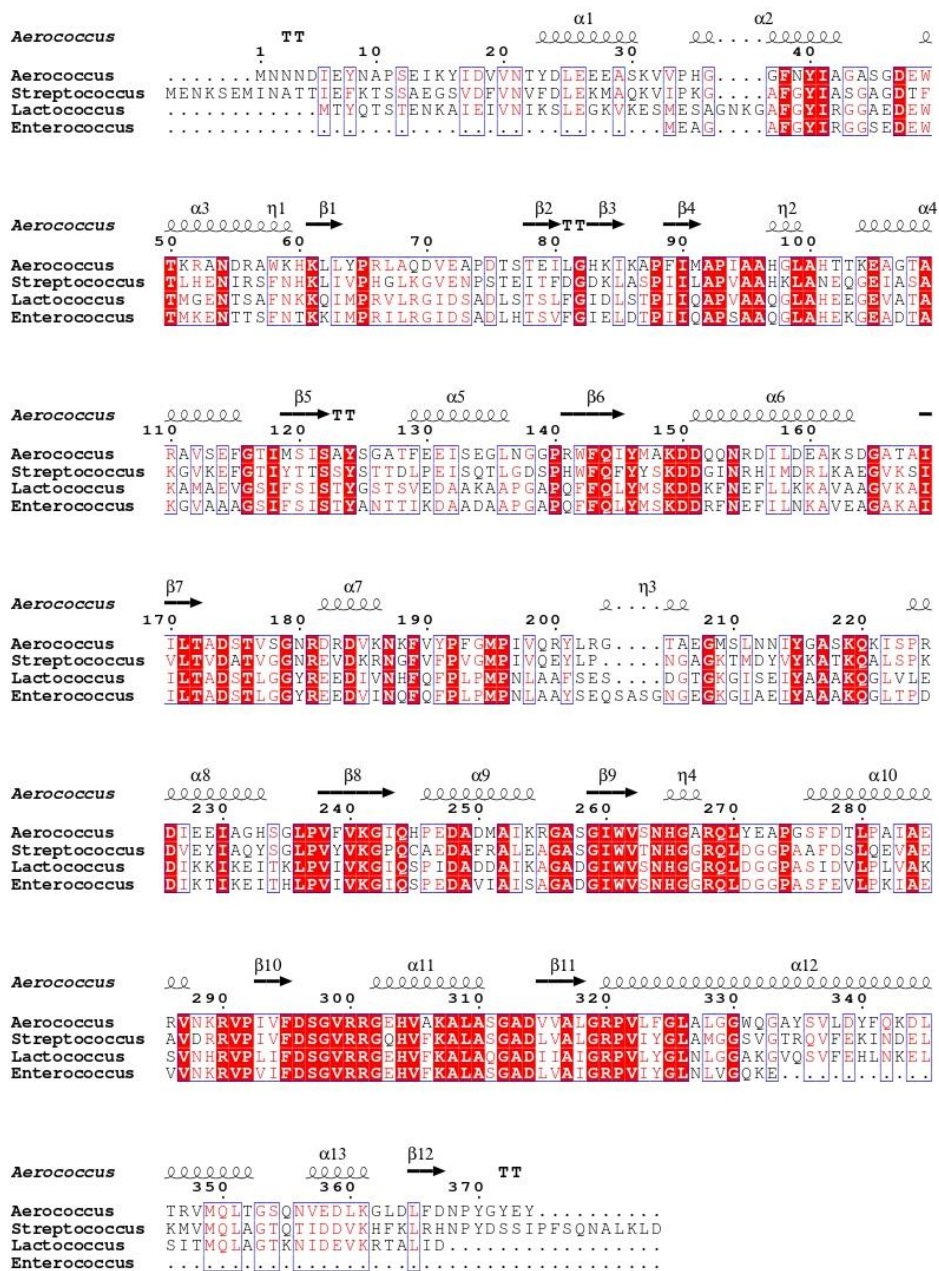


Figura 2. Alineamiento de secuencias de proteínas LOx de bacterias pertenecientes al orden Bacillales. Se comparan las secuencias de la enzima lactato oxidasa de cuatro bacterias distintas: *Aerococcus viridans*, *Streptococcus iniae*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus faecium*. Los residuos idénticos se muestran encuadrados en rojo y los residuos similares están en rojo. Los elementos de la estructura secundaria de LOx de *Aerococcus viridans* están indicados sobre el alineamiento.

Con esa información, el siguiente paso fue la búsqueda de la estructura terciaria de la proteína en la base de datos de Uniprot (Uniprot, 2022) y su modelado utilizando el programa PyMOL 2.5.4.

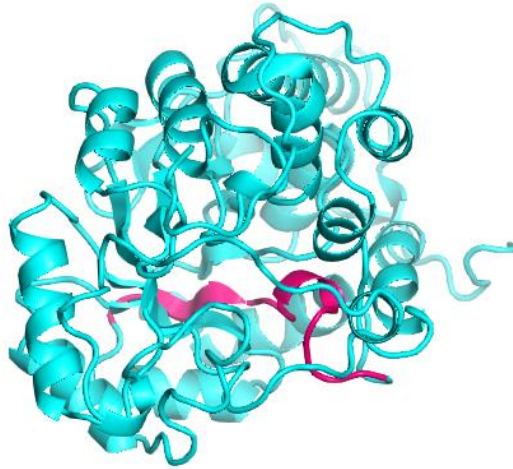


Figura 3. Estructura tridimensional del monómero de lactato oxidasa de *Aerococcus viridans*. La región coloreada de magenta es el sitio catalítico de la enzima. La imagen fue generada utilizando PyMOL 2.5.4.

La enzima lactato oxidasa está compuesta por dos tetrámeros asimétricos y cada tetrámero forma una unidad con actividad (Leiros *et al*, 2006). Los monómeros (Figura 2) que componen a cada tetrámero están estructurados por hélices alfas y hoja plegadas beta que dan lugar al sitio catalítico con actividad oxidasa, al dominio catalítico y a los sitios de unión para el FMN y para ácido láctico.

Utilizando la secuencia del dominio catalítico se realizó un BlastP en el que se encontraron a todas las especies que presentaban homología, de entre ellas se seleccionaron aquellas con una cobertura (*query coverage*) $\geq 80\%$ para realizar un alineamiento en Mega11 (Anexo 1). El análisis bioinformático permitió generar un dendrograma por Maximum Likelihood (ML), ya que para taxones lejanamente relacionados es necesario utilizar un método de datos discretos (Zhang *et al*, 2018), con esto se observó en qué otras especies se encuentra presente el dominio y al mismo tiempo predecir actividad oxidasa en la proteína de las especies encontradas (Figura 4).

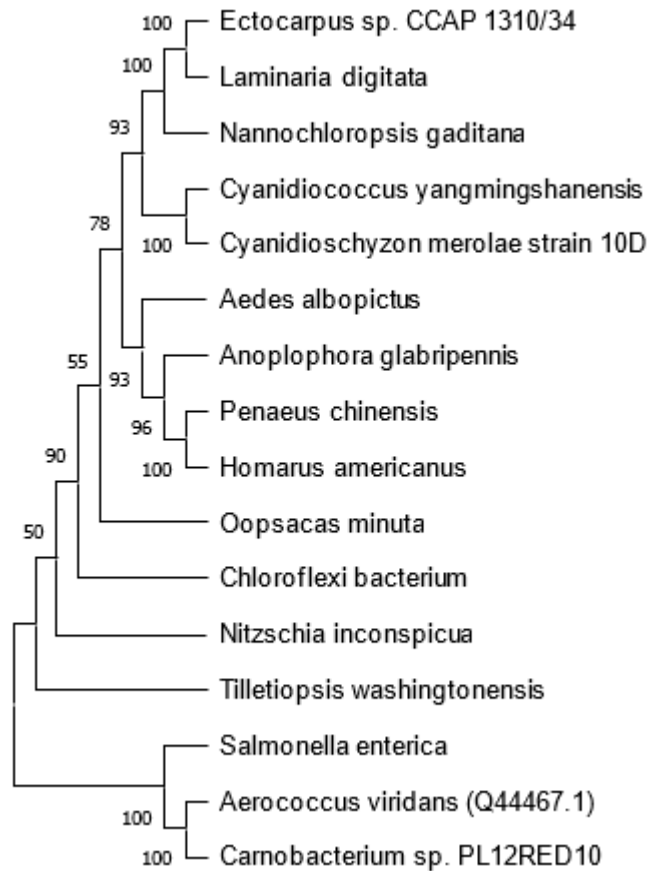


Figura 4. Árbol filogenético generado utilizando el método Maximum Likelihood usando el modelo de sustitución LG+G+I basado en el alineamiento de Q44467.1 y 15 homólogos identificados. Los valores de Bootstrapping (1000 remuestreos) > 70% fueron mostrados.

Se observó que las especies encontradas (Figura 4) presentan la secuencia del dominio catalítico en su genoma, lo cual sugiere que pueden llegar tener la actividad oxidasa. Sin embargo, pese a presentar el dominio conservado, será necesario realizar estudios posteriores para confirmar que la proteína sea activa y desarrolle la actividad catalítica.

Con esto en consideración, la selección de cualquier especie nos permitiría clonar a la enzima lactato oxidasa, siendo la elegida para este estudio *Enterococcus faecium*.

Asimismo, durante la revisión bibliográfica (Tabla 1) se encontró que se habían realizado algunas modificaciones a la enzima lactato oxidasa proveniente de *Aerococcus viridans* con el objetivo de mejorar su rendimiento.

Uno de esos estudios fue el realizado por Hiraka *et al* (2018), los cuales plantearon modificar la estructura de la enzima mediante mutagénesis sitio dirigida con la finalidad de reducir interferencia de oxígeno. La propuesta de modificar la estructura proteica permite ampliar el rango dinámico de un biosensor y las dos principales técnicas de ingeniería de proteínas son el diseño racional, que combina mutagénesis sitio-dirigidas con el conocimiento detallado de las estructuras enzimáticas y funciones o modelos computacionales, y la evolución directa (Campàs *et al.*, 2009).

Al hacer una revisión de la proteína reporta por Hiraka *et al* (2018) presentaba una modificación en el aminoácido 96, Alanina por una Leucina (Ala96Leu) que forma parte del túnel por el que accede el oxígeno al sitio catalítico con el propósito de bloquear su ingreso, reducir la interferencia de oxígeno y no influir en la reacción (Figura 5).

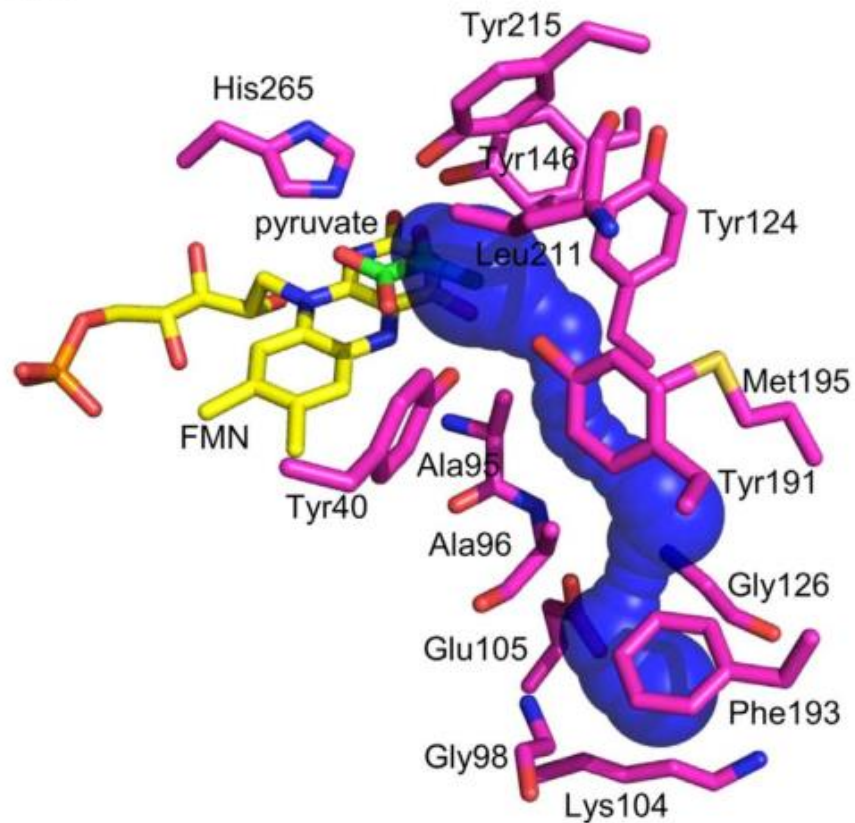


Figura 5. Estructura de lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* que rodea al FMN. La ruta de acceso del oxígeno al sitio catalítico está marcada en azul. Tomado de Hiraka *et al.* (2018).

A partir de estos datos, se propuso utilizar la enzima modificada por Hiraka *et al.* (2020) proveniente de *Aerococcus viridans* para ser clonada.

Dando como resultado final la propuesta de clonación de dos proteínas con actividad oxidasa reportada, una proveniente de *Enterococcus faecium* y la otra modificada por Hiraka *et al.* de *Aerococcus viridans*.

6.1.3. Clonación

Previo al proceso de clonación, es necesario realizar algunos procedimientos previos con la finalidad de obtener el gen de las dos bacterias fuente para su clonación posterior.

6.1.3.1. Obtención de las bacterias fuente

Las bacterias se obtendrán de ceparios y serán reactivadas en 3 mL de medio MRS líquido (De Man, Rogosa y Sharpe) durante 24 horas a 37°C. Posteriormente serán transferidas a 3 mL de medio MRS y se pondrán en agitación a 180 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.7.

6.1.3.2. Obtención del genoma bacteriano

La obtención del genoma de las bacterias se realizará siguiendo el protocolo ZR Plasmid Miniprep para la obtención de los plásmidos.

Para cada cultivo de bacteria se realizará lo siguiente:

Se transferirán alícuotas del medio de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugará a 16000 g durante 15 segundos hasta formar un pellet, descartando el sobrenadante entre cada centrifugación. Luego, se adicionarán 200 µL de Buffer P1 al pellet para resuspenderlo con ayuda de un vórtex. A continuación, 200 µL de Buffer P2 se adicionará en el tubo de microcentrífuga y se mezclará suavemente invirtiendo el tubo de 8-10 veces y se dejará a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente al tubo de reacción se adicionarán 400 µL de Buffer P3 y se mezclará mediante la rotación del tubo 5 veces hasta observar una coloración amarilla pasados 2 minutos. Después, se centrifugará el tubo durante 2 minutos a 16000 g. A un tubo de colección se le colocará una columna Zymo-Spin IIN al cual se le transferirá sobrenadante con precaución, se centrifugará durante 30 segundos a 16000 g y se desechará el flujo. Se le adicionarán 200 µL de Endo-Wash Buffer a la columna y se centrifugará por 30 segundos a 16000 g. Luego, se agregarán 400 µL de Plasmid Wash Buffer a la columna y se centrifugará durante 1 minuto a 16000 g. Finalmente, se cambiará la columna a un nuevo tubo de centrifugación de 1.5 mL y se adicionarán 30 µL de DNA Elution Buffer para su centrifugado durante 30 segundos a 16000 g.

6.1.3.3. Diseño de Primers

Para la amplificación de los genes se hizo un diseño de primers para utilizar en la reacción de PCR de acuerdo con el protocolo de la tecnología Gateway.

Los primers propuestos para cada bacteria son:

a) *Enterococcus faecium*

Forward: 5' – GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT
AGA ACC ATG GAA AAG ACA TAC CAA GCC – 3'

Reverse: 5' – GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA AAT AAA
CCT ATT TTC CCT – 3'

b) *Aerococcus viridans*

Forward: 5' – GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT
AGA ACC ATG AAT AAC AAT GAC ATT GAA – 3'

Reverse: 5' – GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA GTA TTC
ATA ACC GTA TGG – 3'

6.1.3.4. PCR

La reacción de PCR para la amplificación de ambos genes se realizará utilizando el protocolo de GoTaq Flexi (Promega).

En un tubo de PCR sumergido en hielo, se combinan los siguientes reactivos: 2 µL Buffer GoTaq Flexi, 0.8 µL de MgCl₂ (25mM), 0.2 µL de dNTPs, 0.5 µL primer forward, 0.5 µL primer reverse, 0.2 µL GoTaq DNA Polimerasa, 0.5 µL cDNA y 5.3 µL de agua libre de nucleasas. El tubo se cierra y se mezcla de forma homogénea.

La incubación se realizará siguiendo las indicaciones de la tabla 2.

Tabla 2. Programa de PCR.

PASO		TEMPERATURA	TIEMPO
Desnaturalización Inicial		95°C	1 minuto
30 ciclos	Desnaturalización	95°C	22 segundos
	Alineamiento	51°C	37 segundos
	Extensión	72°C	1 minuto/kilobase

Extensión Final	72°C	5 minutos
Almacenamiento	4°C	

El producto de la PCR se almacenará para su posterior uso en la clonación.

6.1.4. Metodología propuesta para la clonación, sobreexpresión y purificación de la enzima lactato oxidasa

6.1.4.1. Clonación

Una vez seleccionada la bacteria fuente, fue necesario plantear la estrategia de clonación a seguir.

El primer paso fue definir la técnica de clonación, la más común es la tradicional que implica el uso de enzimas de restricción para la inserción de la secuencia a clonar en el plásmido y su posterior sobreexpresión. Pero las principales limitaciones que esta técnica presenta incluyen el tiempo invertido en el proceso de clonación, se pueden generarse problemas con la orientación de la secuencia durante la inserción y la elección de las enzimas de restricción debe ser cuidadosa para evitar que corten a la secuencia o al plásmido durante el proceso (Nicholl, 2002).

Por lo que para la clonación de lactato oxidasa, se propuso el uso de la tecnología Gateway, la cual presenta las ventajas de ser reacciones rápidas, resultados con una precisión del 95%, un protocolo simplificado, la reducción en el error de inserción de la secuencia y la inserción de la secuencia se realiza mediante recombinación en lugar de utilizar enzimas de restricción (ThermoFisher, 2022).

La tecnología Gateway requiere el uso de plásmidos con características particulares que permiten obtener a la enzima modificada en grandes cantidades, por lo que la selección de éstos es importante. Para la primera parte de la reacción se propuso el uso del plásmido pDONR221, el cual contiene los sitios de recombinación para poder insertar la secuencia de las enzimas obtenidas de la PCR. Este plásmido también tiene en su secuencia un sitio que permitirán obtener una mayor cantidad

de plásmido que será utilizado en la segunda reacción. En el caso de la segunda reacción, se han propuesto dos plásmidos con etiquetas que permitirán que la purificación sea más eficiente y a su vez pueda tener un uso en la inmovilización posterior; los plásmidos propuestos son el pDEST15 y pDEST17, que tienen como etiquetas una proteína llamada glutatión-s-transferasa y una cola de seis histidinas, respectivamente.

Ya que para la clonación en Gateway es necesario buscar y cultivar a las bacterias fuente, extraer su genoma, amplificar la secuencia perteneciente a lactato oxidasa, realizar la mutagénesis sitio dirigida para obtener la modificación en el aminoácido y volver a amplificar la secuencia con la modificación se sugirió una estrategia en la que se ahorre tiempo en el proceso de obtención y crecimiento y se evite trabajar con bacterias patógenas y pueden generar algún riesgo a la salud, así como evitar los ensayos para lograr la mutagénesis; todo esto mediante la solicitud de un plásmido que contenga la secuencia ya modificada y esté listo para ser utilizado en la tecnología Gateway, ahorrando incluso la primera reacción de recombinación, permitiendo que el proceso se lleve a cabo con mayor velocidad.

Con todo esto en cuenta, se planteó la metodología a seguir una vez obtenido el plásmido liofilizado iniciaría en la Reacción LR.

6.1.4.1.1. Reacción BP

Para la reacción BP se debe considerar para cada producto de PCR purificado. En un tubo de reacción de 1.5 mL se adicionarán 1 μ L de vector pDONR221, 8 μ L de buffer TE y 1 μ L de producto de PCR a temperatura ambiente y se mezclarán. 2 μ L de BP clonasa II se adicionarán posteriormente al tubo de reacción y se homogenizará mediante 2 agitaciones breves. La reacción se dejará incubando durante 1 hora a 25°C y al término se le adicionará 1 μ L de proteinasa K en el tubo de reacción y se dejará incubando durante 10 minutos a 37°C.

6.1.4.1.2. Trasformación y selección de células competentes de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico

50 μ L de células de *E. coli* DH5 α competentes previamente descongeladas se agregarán a un tubo de transformación y se dejarán en hielo, 1 μ L de cada plásmido pDONR221 se agregará a la mezcla de células. Al tubo se le darán entre 4-5 golpecitos rápidos para mezclar el DNA con las células y se dejará en hielo durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se pondrán en el agua a 42°C para el choque térmico durante 45 segundos sin agitar y posteriormente en hielo durante 5 minutos sin mezclar. Para finalizar, 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente se añadirán al tubo de reacción y se colocará a 210 rpm a 37°C durante 1 hora.

Una vez transcurrido el tiempo, sobre cajas Petri con medio LB adicionado con kanamicina (50 μ g/ μ L) precalentadas a 37°C se esparcirán 2 volúmenes diferentes (20 y 200 μ L) del tubo de reacción para la selección de bacterias transformadas. Las cajas de Petri se incubarán toda la noche a 37°C.

6.1.4.1.3. Cultivo de colonias transformadas.

De las bacterias crecidas sobre la placa Petri, con ayuda de un asa de platino se resembrarán en 3 mL de medio líquido LB adicionado con kanamicina (50 μ g/ μ L) durante 24 horas a 37°C.

6.1.4.1.4. Extracción del plásmido pDONR221 de las células transformadas

La extracción de los plásmidos de las bacterias transformadas se realizará siguiendo el protocolo ZR Plasmid Miniprep para cada bacteria respectivamente.

Del medio de cultivo se agregarán alícuotas a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se centrifugará por 15 segundos a 16000 g hasta formar un pellet, desechando el sobrenadante por centrifugación. A continuación, 200 μ L de Buffer P1 se añadirán al pellet para resuspenderlo con ayuda de un vórtex. Después, se adicionarán 200 μ L de Buffer P2 en el tubo, se mezclará suavemente girando el tubo de 8 a 10 veces y se dejará durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego, se agregarán al tubo

de reacción 400 μ L de Buffer P3, se mezclará mediante la rotación del tubo 5 veces y se dejará en reposo 2 minutos hasta observar una coloración amarilla. A continuación, se centrifugará el tubo durante 2 minutos a 16000 g. En un tubo de colección se colocará una columna Zymo-Spin IIN a la que transferirá el sobrenadante con precaución, se centrifugará a 16000 g por 30 segundos y se desechará el flujo. Se agregarán 200 μ L de Endo-Wash Buffer a la columna y se centrifugará por 30 segundos a 16000 g. Luego, a la columna se adicionarán 400 μ L de Plasmid Wash Buffer y se centrifugará a 16000 g por 1 minuto. Para finalizar, se cambiará la columna a un nuevo tubo de 1.5 mL y se añadirán 30 μ L de DNA Elution Buffer para su centrifugado durante 30 segundos a 16000 g.

6.1.4.1.5. Reacción LR

La reacción LR deberá realizarse por cada plásmido propuesto para cada bacteria. Se adicionarán 1 μ L del plásmido, 1 μ L de vector de destino respectivamente (pDEST17 y pDEST15) y 8 μ L de buffer TE pH 8 a temperatura ambiente en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL y se mezclará brevemente; 2 μ L de LR clonasa II, previamente agitada, se agregarán al tubo de reacción y se homogenizarán agitando dos veces brevemente. La reacción se incubará a 25°C durante 1 hora. Posteriormente, se adicionará 1 μ L de proteinasa K al tubo de reacción y se incubará a 37°C durante 10 minutos.

6.1.4.1.6. Trasformación de *E. coli* BL21(DE3) mediante choque térmico

50 μ L de células de *E. coli* BL21(DE3) competentes se agregarán a un tubo de transformación y se dejarán en hielo, 1 μ L de cada plásmido pDEST se agregará a la mezcla de células. Al tubo se le darán entre 4-5 golpecitos rápidos para mezclar el DNA con las células y se dejará reposando en hielo durante 30 minutos. Una vez pasado el tiempo, se pondrán en el agua a 42°C para el choque térmico durante 10 segundos sin agitar y posteriormente en hielo durante 5 minutos sin mezclar. Finalmente, se adicionarán 250 μ L de medio SOC a temperatura ambiente al tubo de reacción y se colocará en rotación a 37°C durante 1 hora.

6.1.4.1.7. Siembra de bacterias para aislar colonias transformadas

Se precalentarán a 37°C las cajas de Petri con medio LB y ampicilina (50 µg/µL) para la selección. Una vez transcurrido el tiempo de incubación en medio SOC, se esparcirán 2 volúmenes diferentes (20 y 200 µL) de cada tubo de reacción en las cajas de Petri para la selección de bacterias transformadas. Las cajas de Petri se incubarán toda la noche a 37°C.

6.1.4.2. Sobreexpresión de la proteína

La sobreexpresión de la proteína utilizando *E. coli* BL21(DE) se propone sea realizada mediante la inducción con IPTG (isopropil-beta-d-1-tiogalactopiranosido) el cuál es un análogo sintético de la alolactosa y que interactuará con la zona de los plásmidos relacionada con la actividad beta-galactosidasa para promover la producción de proteína (ThermoFisher, 2022).

La sobreexpresión se realizará de la siguiente manera: para la producción de la enzima, *E. coli* BL21 (DE3) transformada se inoculará en 5 mL de medio LB con ampicilina (50 µg/µL) a 37°C y a 180 rpm durante la noche hasta que alcance una densidad óptica (OD) mayor a 2. Se inoculará medio LB con ampicilina (50 µg/µL) tomando la muestra del cultivo previo hasta alcanzar una densidad óptica cercana a 0.1. Posteriormente, se incubarán los medios de cultivo con el antibiótico y el inóculo durante 3 horas hasta que alcancen la fase media-log (OD ~0.4) y luego se adicionará el inductor IPTG para tener una concentración final de 0.5 mM y se dejarán incubando los medios durante 3 horas más.

6.1.4.3. Extracción y purificación de la enzima lactato oxidasa

Para la purificación de la enzima, como se mencionó previamente, se plantearon dos etiquetas para realizar la purificación con mayor facilidad, la cola de seis histidinas y la proteína glutatión-s-transferasa. Para la cola de polihistidinas, se propone usar níquel y glutatión reducido para la proteína glutatión-s-transferasa (ThermoFisher, 2022).

La extracción de la enzima se realizará mediante la centrifugación de las células lisadas a 4°C durante 30 minutos a 4495 rpm, se lavará en buffer de fosfatos 20 mM pH 7. Posteriormente, se centrifugará y se almacenará a -20°C.

La purificación de la enzima lactato oxidasa se realizará utilizando columnas de centrifugación con matrices adecuadas para cada etiqueta (la cola de histidinas y la glutatión-s-transferasa), se centrifugará y se desechará el sobrenadante y finalmente la proteína se eluirá utilizando un gradiente escalonado de imidazol o glutatión, según corresponda, con concentraciones 0, 0,175, 0.5 y 1 M y se almacenará.

6.1.4.4. Evaluación de la actividad catalítica y parámetros cinéticos de la enzima lactato oxidasa extraída

Para la caracterización de la enzima se propuso utilizar un método espectrofotométrico debido a su practicidad y rapidez.

6.1.4.4.1. Caracterización de la enzima obtenida

La concentración total de proteína se determinará mediante absorbancia UV-Vis con un Espectrofotómetro usando un coeficiente de extinción 51.340 1/(M cm). La actividad lactato oxidasa se medirá a través de la cuantificación de peróxido de hidrógeno, utilizando la reacción de acoplamiento con la peroxidasa de rábano (HRP) (0.5 mg/ml) y 0.6 mM de ABTS. Los ensayos de actividad de lactato oxidasa se realizarán a 35°C con 40 mM de l-lactato en un buffer de fosfatos de 0.1 M a pH 7.4.

6.1.5. Evaluación electroquímica en la inmovilización de la enzima lactato oxidasa comercial

6.1.5.1. Espectroscopía de impedancia electroquímica de porifinas, cuántum dots y lactato sobre carbón vítreo

La espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) es una técnica que permite evaluar la resistencia de una superficie, en este caso nos permitirá comparar la

inmovilización sobre un electrodo de carbón vítreo utilizando la matriz y en ausencia de esta, con el objetivo de asociar la resistencia con un aumento de proteína en la superficie del electrodo.

En la figura 6, se compara en electrodo de carbón vítreo sin enzima (azul) con una resistencia de 11.6 k Ω y 16.1 k Ω con enzima inmovilizada (naranja) dando como resultado un aumento aproximado del 38% en la resistencia del electrodo. Estos ensayos se realizaron por triplicado para poder determinar una tendencia en el incremento.

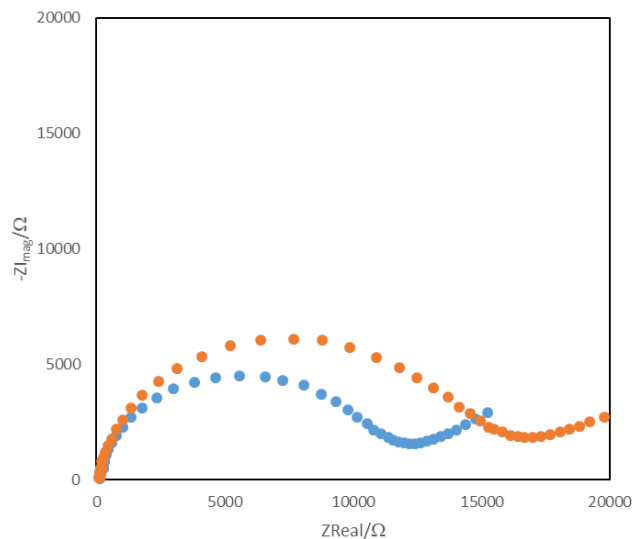


Figura 6. Evaluación por espectroscopía de impedancia electroquímica a electrodos de carbón vítreo sin modificar (azul) y modificado con lactato oxidasa (naranja).

Para la segunda evaluación, se probó una matriz compuesta por Porfirinas y Quántum dots. Esta matriz fue evaluada previamente con glucosa oxidasa por Lozano López *et al.* (2019) y comprobó que la porfirina posee una alta afinidad por las superficies de carbono, así como por los quántum dots, que son partículas cristalinas semiconductoras (Farré & Jha, 2020). En esta ocasión, se evaluó la matriz para la inmovilización de lactato oxidasa.

En la figura 7, se compara el cambio en la resistencia entre el electrodo con la matriz de Porfirinas/GSH-CdTeQD (azul) con una resistencia de 337 Ω , mientras el

electrodo con Porfirinas/GSH-CdTeQD/LOx presentó una resistencia de 1859 Ω , presentando un aumento en la resistencia del 451.6%. Permitiendo atribuir este aumento en la resistencia del electrodo al aumento de proteína en la superficie, que permite inferir en la presencia de más proteína en la superficie gracias a la matriz de soporte, en comparación con el electrodo sin matriz y enzima inmovilizada (Figura 6, naranja).

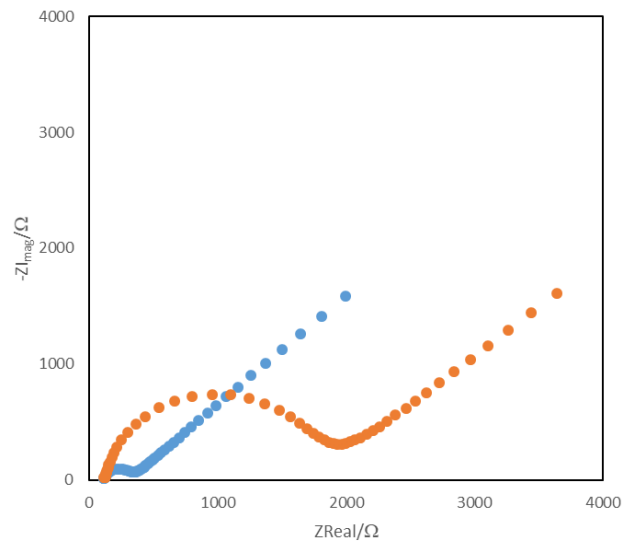


Figura 7. Evaluación por espectroscopía de impedancia electroquímica a electrodos de carbón modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD (azul) y Porfirinas/GSH-CdTeQD/LOx (naranja).

6.1.5.2. Respuesta amperométrica del electrodo a lactato

La caracterización del bioelectrodo se realizó en pH 7.4 en buffer de fosfatos salino (PBS) y en principio se probaron mediadores electroquímicos para evaluar la respuesta amperométrica, uno fue el tetratrafalvaleno (TTF) y por otro lado estuvo el ferroceno metanol.

Ambos ensayos se realizaron por triplicado, y en condiciones similares de inmovilización y reacción. Para el caso del TTF (Figura 8), no se obtuvo una señal atribuible a la oxidación del ácido láctico, pese a que existen estudios en donde se

ha probado la función del TTF como mediador electroquímico en algunas reacciones de oxidación (Murthy & Anita, 1996).

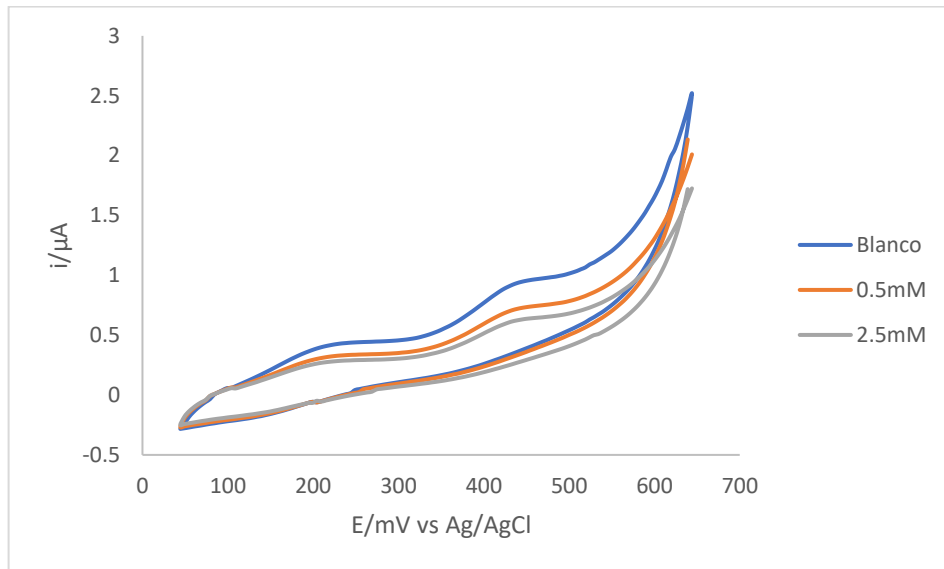


Figura 8. VC de grafito usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de TTF con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

El siguiente ensayo se realizó con ferroceno metanol como mediador electroquímico (Figura 9), en este pudo apreciar los picos de oxidación y reducción del ferroceno ubicados entre 250 y 200 mV, respectivamente. Por lo que se decidió continuar con este mediador para los siguientes experimentos.

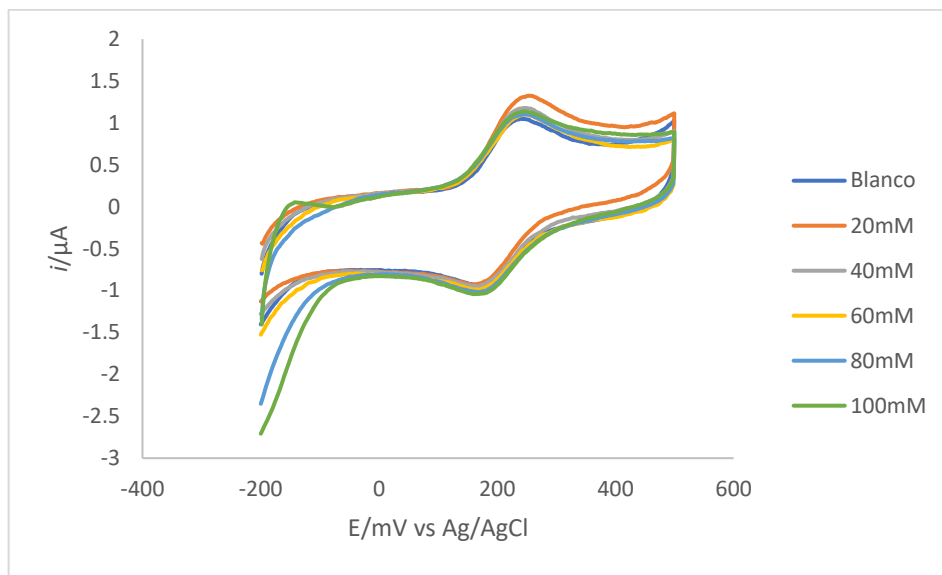


Figura 9. VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/TTF/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Aunque se decidió modificar la concentración final de ácido láctico en la solución para obtener una señal óptima. Por lo que el nuevo rango de concentraciones pasó a ser de 0 a 10 mM para los siguientes experimentos.

Con lo anterior, la primera prueba que se realizó fue verificar si el electrodo de grafito generaba una señal en presencia del ácido láctico. Por lo que se evaluó la actividad por triplicado del electrodo sumergido en una solución de PBS 0.1 M pH 7.4 con adiciones de lactato para descartar la posible contribución del grafito a la señal obtenida (Figura 10).

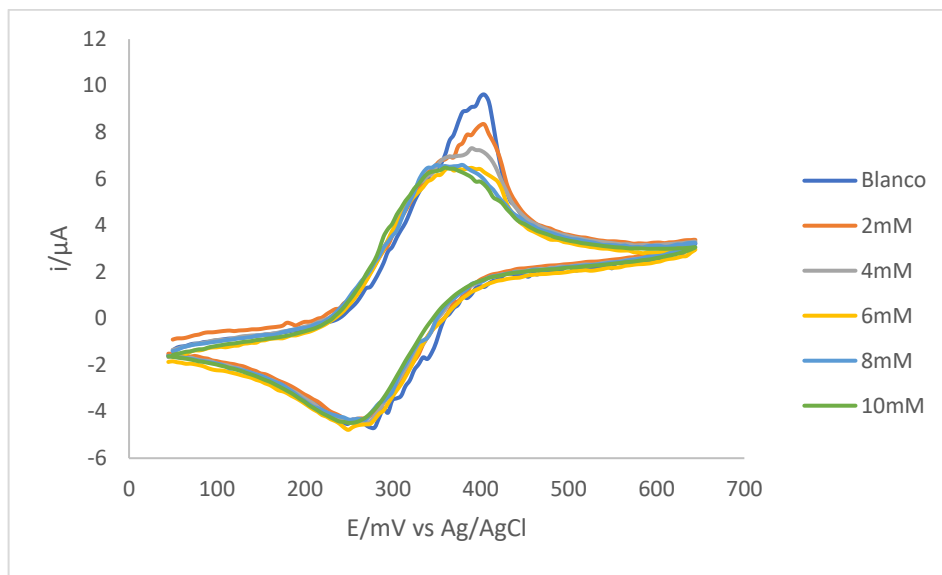


Figura 10. VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Como se aprecia en la figura 10, no se obtuvo una señal generada por la interacción entre el ácido láctico y la superficie de grafito del electrodo, por lo que es posible utilizarlo sin esperar interferencia generada por la superficie.

A continuación, fue necesario evaluar si la matriz de soporte propuesta para la enzima puede influir en la señal obtenida en la reacción con lactato. Por lo que se evaluaron tres electrodos de grafito modificados con Porfirinas/GSH-CdTeQD en solución PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol y con adiciones de ácido láctico para determinar su respuesta (Figura 11).

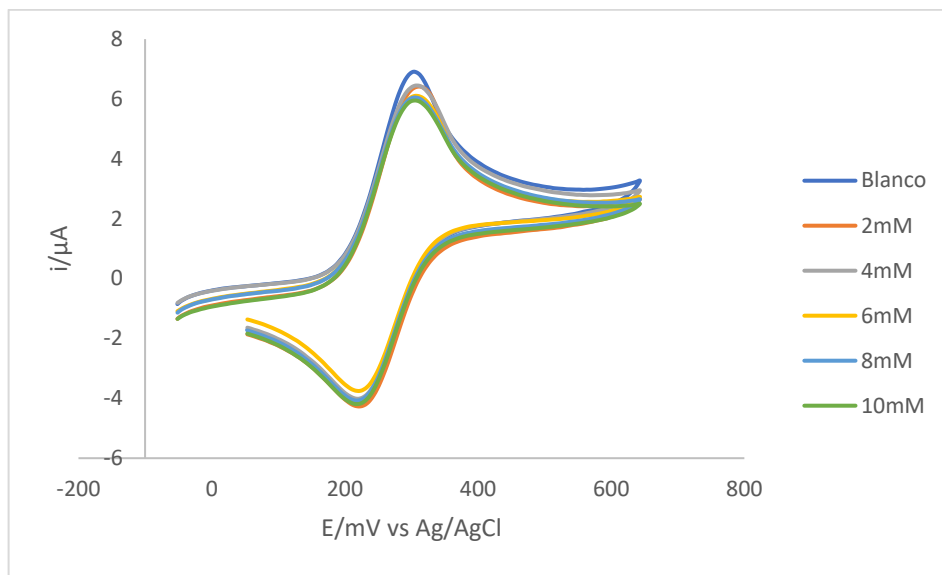


Figura 11. VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Los resultados obtenidos permiten corroborar que la matriz de soporte no interferirá en la reacción de oxidación del lactato ya que no interactúan con este y, por lo tanto, se espera que únicamente se genere una señal debida a la reacción entre la enzima y el sustrato.

Otro de los análisis que se realizaron, fue el de evaluar la importancia de la matriz de soporte en la reacción con la enzima. Como se mencionó anteriormente, si bien la matriz favorece a que exista mayor enzima presente en la superficie, era necesario comparar la respuesta amperométrica de la enzima inmovilizada en grafito y utilizando la matriz de soporte Porfirinas/GHS-CdTeQD.

La primera evaluación fue del electrodo de grafito con enzima inmovilizada sumergido en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol y con adiciones sucesivas de ácido láctico en el que no se aprecia una señal debida a la oxidación del ácido láctico (Figura 12).

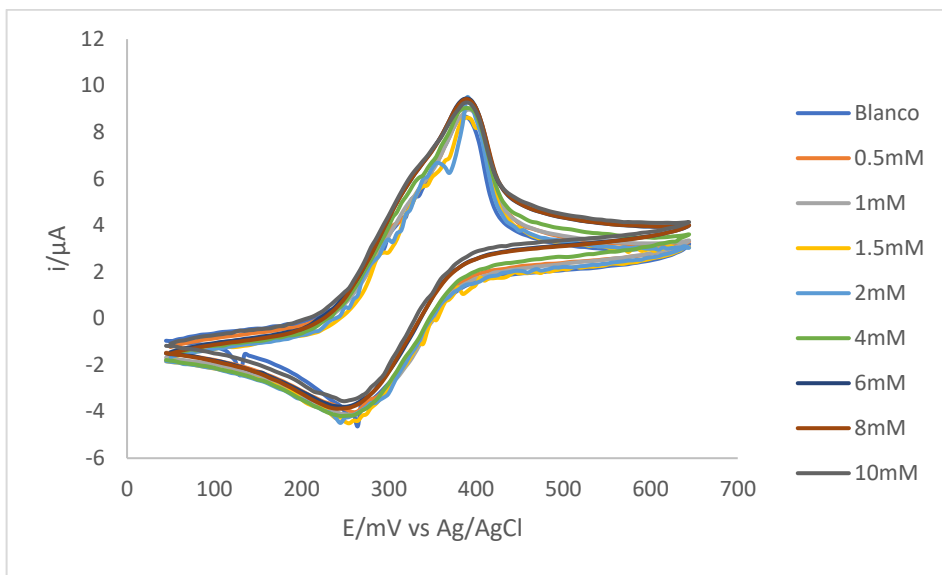


Figura 12. VC de grafito modificado con LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Finalmente, el segundo experimento se realizó en PBS 0.1 M pH 7.4 con la matriz depositada sobre grafito y con enzima inmovilizada, en presencia de ferroceno metanol con lactato añadiéndose. La señal obtenida describe un patrón de aumentos graduales (Figura 13) que se atribuyen a la matriz debido a que sin soporte el electrodo no genera una señal (Figura 12).

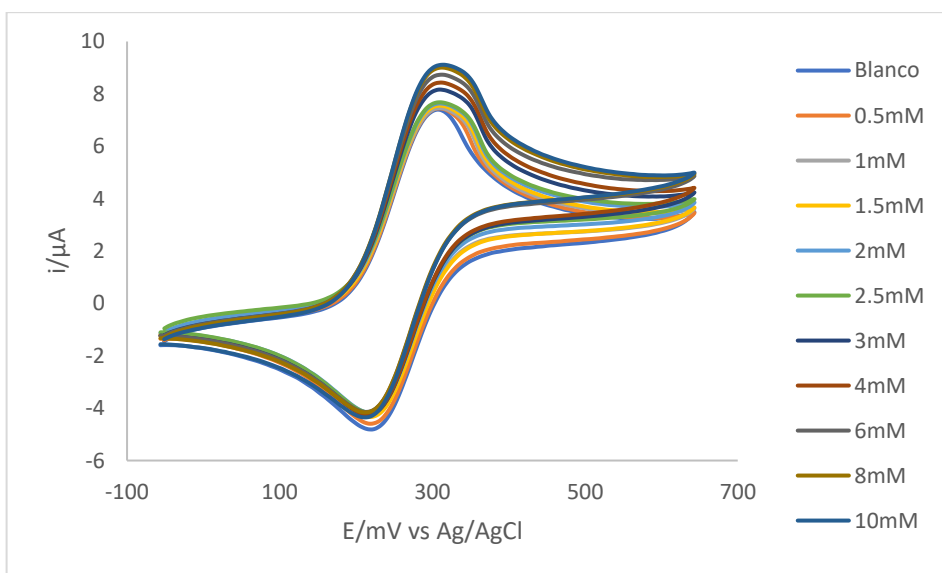


Figura 13. VC de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx usando PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Con los datos obtenidos se generaron dos gráficos (Fig. 14 y 15) con la finalidad de analizar el desempeño del bioelectrodo de Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx. En la primera gráfica (Figura 14) se observa que conforme la concentración de lactato en la solución de PBS hay un aumento la densidad corriente, demostrando que no existe saturación en el electrodo empleado en el experimento.

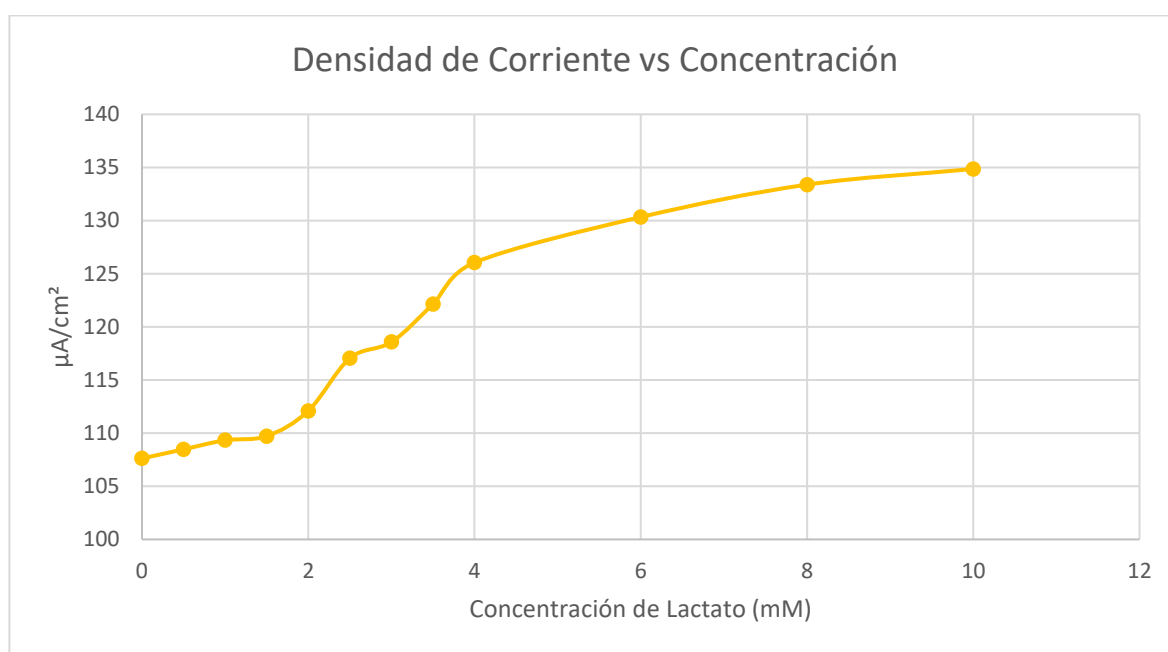


Figura 14. Densidad de corriente contra concentración de ácido láctico del electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx sumergido en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de lactato (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

Por otro lado, para conocer la variación del potencial a lo largo del experimento se realizó una gráfica de la relación entre la diferencia de potencial del electrodo conforme se realizaban las adiciones de lactato en la celda de reacción (Figura 15), en la cual se observó oscilaciones al inicio, pero conforme la concentración aumentó

el la diferencia de potencial se volvió constante, dentro del rango de 105 a 100 mV, atribuido a sistemas cuasi reversibles.

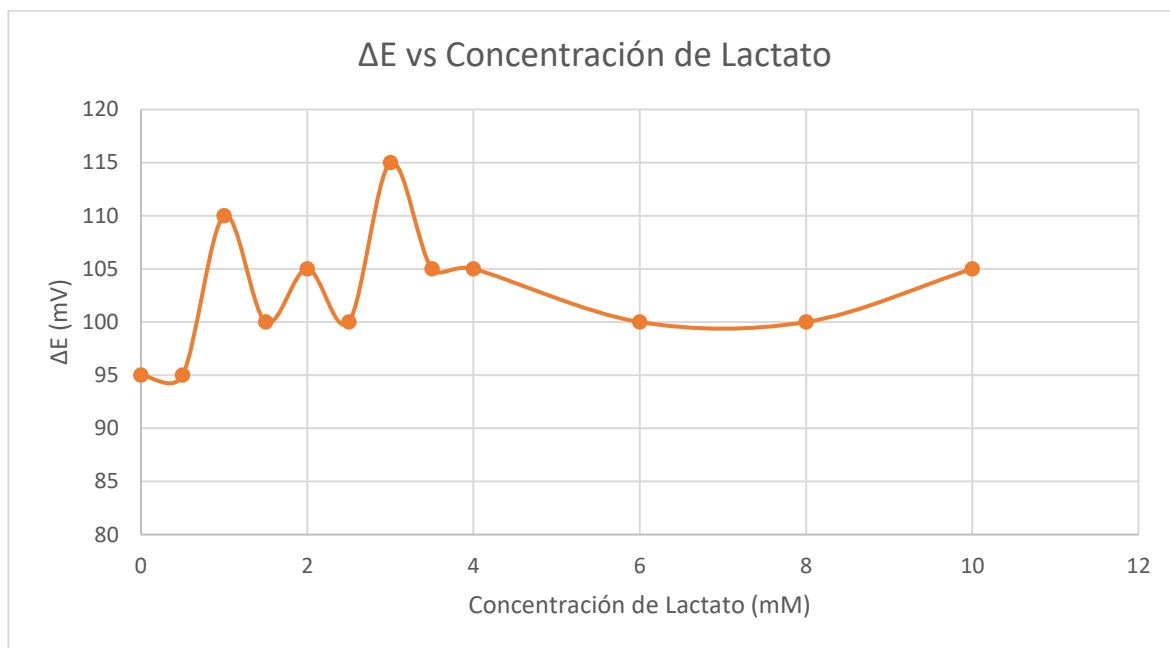


Figura 15. Relación de la diferencia de potencial con respecto a la concentración de lactato generado a partir de las voltamperometrías del electrodo de grafito modificado con Porfirina/GSH-CdTeQD/LOx sumergido en PBS 0.1 M pH 7.4 en presencia de ferroceno metanol 0.5 mM con adiciones sucesivas de ácido láctico (0.5 mM) y a una velocidad de barrido de 5 mV/s.

7. CONCLUSIONES

Derivado del análisis bioinformático, se planteó la estrategia para la obtención de dos proteínas lactato oxidasa mediante clonación: una proveniente de *Enterococcus faecium* y la otra de *Aerococcus viridans*, la cual presenta modificaciones estructurales con la finalidad de reducir la interferencia de oxígeno en el proceso de catálisis.

El análisis bioinformático que permitió conocer en qué especies se encuentra el sitio catalítico perteneciente a la familia alfa-hidroxiácido oxidasa y que está altamente conservado.

Se generó una propuesta para la clonación de ambas enzimas utilizando la tecnología Gateway con dos plásmidos (pDEST15 y pDEST17) diferentes para la expresión del gen los cuales contienen etiquetas (Glutación-s-transferasa y cola de Histidinas) que permitirán facilitar su purificación en una columna de centrifugación, así como la inmovilización en la matriz de Porfirinas/GSH-CdTeQD.

La matriz de Porfirinas/GSH-CdTeQD propuesta para la inmovilización de la enzima conservó la actividad catalítica y los ensayos de impedancia demostraron la presencia de proteína inmovilizada en la superficie del electrodo a través de la correlación con el aumento en la resistencia.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abinaya, R. V., & Viswanathan, P. (2021). Biotechnology-based therapeutics. En Y. Hasija, *Translationa Biotechnology* (págs. 27-52). Academic Press.
- Abreu, C., Nedellec, Y., Ondel, O., Buret, F., Cosnier, S., Le Goff, A., & Holzinger, M. (2018). Towards eco-friendly power sources: In series connected glucose biofuel cells power a disposable ovulation test. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 360-363.
- Alvear-Ordenes, I., Gracia-Lopez, D., De Paz, J. A., & Gonzales-Gallego, J. (2005). Sweat lactate, ammonia, and urea in rugby players. *Int. J Sports Med.*, 632-637.
- Arechederra, R. L., & Minter, S. D. (2011). Self-powered sensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 1605–1611.

- Arsalan, A., & Younus, H. (2018). Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1833-1847.
- Aslan, K., Lakowicz, J. R., & Geddes, C. D. (2005). Plasmon light scattering in biology and medicine: New sensing approaches, visions and perspectives. *Current Opinion In Chemical Biology*, 538-544.
- Baker, L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature*, 211-259.
- Bałczewski, P., Kudelska, W., & Bodzioch, A. (2008). 1,3-Dithioles. En *Comprehensive Heterocyclic Chemistry III* (págs. 955–1090). Elsevier Science.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 489-501.
- Batra, B., Narwal, V., & Pundir, C. S. (2016). An amperometric lactate biosensor based on lactate dehydrogenase immobilized onto graphene oxide nanoparticles-modified pencil graphite electrode. *Eng. Life Sci.*, 786-794.
- Bravo, I., Gutiérrez-Sánchez, C., García-Mendiola, T., Revenga-Parra, M., Pariente, F., & Lorenzo, E. (2019). Enhanced Performance of Reagent-Less Carbon Nanodots Based Enzyme Electrochemical Biosensors. *Sensors*, 5576.
- BRENDA. (Junio de 2022). *BRENDA The Comprehensive Enzyme Information System*. Obtenido de <https://www.brenda-enzymes.org>
- Calabrese Barton, S., Gallaway, J., & Atanassov, P. (2004). Enzymatic Biofuel Cells for Implantable and Microscale Devices. *Chemical Reviews*, 4867–4886.
- Cammann, K. (1977). Bio-Sensors Based on Ion-Selective Electrodes. *Ferrius Z. Anal. Chem.*, 1-9.

- Campàs, M., Prieto-Simón, B., & Marty, J.-L. (2009). A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical biosensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 3-9.
- Cano Luna, M. (2009). *Diseño y aplicación de sensores electroquímicos basados en moléculas orgánicas conductoras*. Córdoba: Servicio de Publicaciones.
- Cao, L. (2006). *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, applications and design*. John Wiley & Sons.
- Cass, A. G., Davis, G., Francis, G. D., Hill, H. A., Aston, W. J., Higgins, I. J., . . . Turner, A. P. (1984). Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem*, 667-671.
- Cavalcante, F. T., Neto, F. S., Rafael de Aguiar Falcão, I., Erick da Silva Souza, J., de Moura Junior, L. S., da Silva Sousa, P., . . . dos Santos, J. C. (2020). Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. *Fuel*, 119577.
- Cavalcante, F., de A. Falcão, I., da S. Souza, J., Rocha, T., de Sousa, I., Cavalcante, A., . . . dos Santos, J. (2021). Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. *Electrochem(2)*, 149-184.
- Chapman, J., Ismail, A. E., & Dinu, C. Z. (2018). Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*, 238.
- Choi, D.-H., Kim, J. S., Cutting, G. R., & Searson, P. C. (2016). Wearable Potentiometric Chloride Sweat Sensor: The Critical Role of the Salt Bridge. *Analytical Chemistry*, 12241–12247.
- Choi, J. M., Han, S. S., & Kim, H. S. (2015). Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. *Biotechnol. Adv.*, 1443-1454.

- Choudhary, Y. S., Jothi, L., & Nageswaran, G. (2017). Electrochemical Characterization. En *Spectroscopic Methods for Nanomaterials Characterization* (págs. 19–54). Elsevier.
- Chu, Z., Peng, J., & Jin, W. (2017). Advanced nanomaterial inks for screen-printed chemical sensors. *Sens. Actuators B Chem.*, 919-926.
- Cinti, S., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G., Gonzalez-Macia, L., & Killard, A. J. (2015). Cholesterol biosensor based on inkjet-printed Prussian blue nanoparticle-modified screen-printed electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 187-190.
- Clark, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 29-45.
- Conix, S. (2020). Enzyme classification and the entanglement of values and epistemic standards. *Studies in History and Philosophy of Science Part A*, 37-45.
- Dam, V. A., Zevenbergen, M. A., & van Schaijk, R. (2015). Flexible Chloride Sensor for Sweat Analysis. *Procedia Engineering*, 237-240.
- Dervisevic, M., Çevik, E., Senel, M., Nergiz, C., & Abasiyanik, M. F. (2016). Amperometric cholesterol biosensor based on reconstituted cholesterol oxidase on boronic acid functional conducting polymers. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 18-24.
- Devi, S., & Kanwar, S. S. (2018). Cholesterol Oxidase: Source, Properties and Applications. *Insights Enzym. Res.*, 1.
- Do, H. D., Vandermies, M., Fickers, P., & Theron, C. W. (2019). Non-Conventional Yeast Species for Recombinant Protein and Metabolite Production. *Reference Module in Life Sciences*.

- Dos Santos, J. C., Bonazza, H. L., de Matos, L. J., Carneiro, E. A., Barbosa, O., Fernandez-Lafuente, R., . . . Santiago-Aguiar, R. S. (2017). Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. *Biotechnol.*, 16-26.
- Drout, R. J., Robison, L., & Farha, O. K. (2019). Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. *Coord. Chem. Rev.*, 151-160.
- Dungchai, W., Chailapakul, O., & Henry, C. S. (2009). Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.*, 5821–5826.
- Durst, R. A., Bäumner, A. J., Murray, R. W., Buck, R. P., & Andrieux, C. P. (1997). *Pure Appl. Chem*, 1317.
- Ellis, H. (2010). The FMN-dependent two-component monooxygenase systems. *Arch Biochem Biophys*, 1-12.
- Eş, I., Vieira, J. D., & Amaral, A. C. (2015). Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2065–2082.
- Farré, M., & Jha, A. N. (2020). Metabolomics effects of nanomaterials: an ecotoxicological perspective. En D. Álvarez-Muñoz, & M. Farré, *Environmental Metabolomics* (págs. 259-281). Elsevier.
- Fathi, M., Karim, M., Khoigani, S., & Mosayebi, V. (2019). Use of Nanotechnology for Immobilization and Entrapment of Food Applicable Enzymes. En *Bioactive Molecules in Food* (págs. 2037-2061). Cham, Switzerland: Springer.
- Furuichi, M., Suzuki, N., Dhakshnamoorthy, B., Minagawa, H., Yamagishi, R., Watanabe, Y., . . . & Mizuno, H. (2008). X-ray structures of *Aerococcus viridans* lactate oxidase and its complex with d-lactate at pH 4.5 show an α -hydroxyacid oxidation mechanism. *Journal of Molecular Biology*, 436-446.

- Gamella, M., Koushanpour, A., & Katz, E. (2018). Biofuel cells – Activation of micro- and macro-electronic devices. *Bioelectrochemistry*, 33–42.
- Garske, A. L., Kapp, G., & Mcauliffe, J. C. (2017). *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology*. Cham: Springer.
- Ghindilis, A. L., Atanasov, P., & Wilkins, E. (1997). Enzyme-catalyzed direct electron transfer: Fundamentals and analytical applications. *Electroanalysis*, 661–674.
- Ghosh, S., Ahmad, R., Gautam, V., & Khare, S. K. (2018). Cholesterol-oxidase-magnetic nanobioconjugates for the production of 4-cholesten-3-one and 4-cholesten-3, 7-dione. *Bioresour. Technol.*, 91-96.
- Gonzalo-Ruiz, J., Mas, R., de Haro, C., Cabruja, E., Camero, R., Alonso-Lomillo, M. A., & Muñoz, F. J. (2009). Early determination of cystic fibrosis by electrochemical chloride quantification in sweat. *Bios. and Bioelec.*, 1788-1791.
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the Production of Recombinant Protein in Escherichia coli. *The Protein Journal*, 419-425.
- Grattieri, M., & Minteer, S. D. (2017). Self-Powered Biosensors. *ACS Sensors*, 44–53.
- Green, J. M., Pritchett, R. C., Crews, T. R., McLester, J. R., & Tucker, D. C. (2004). Sweat lactate response between males with high and low aerobic fitness. *Eur. J. App. Phys.*, 1-6.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, 1400-1458.
- Guy, O. J., & Walker, K.-A. D. (2016). Graphene Functionalization for Biosensor Applications. En *Silicon Carbide Biotechnology* (págs. 85–141). Elsevier.

- Habermüller, K., Mosbach, M., & Schuhmann, W. (2000). Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 560-568.
- Han, J., Fan, F., X. C., Lin, S., Wei, M., Duan, X., & Wang, Z. L. (2010). *Nanotechnology*, 405203-405207.
- Hao, S., Sun, X., Zhang, H., Zhai, J., & Dong, S. (2020). Recent development of biofuel cell based self-powered biosensors. *Journal of Materials Chemistry B*.
- Hiraka, K., Kojima, K., Lin, C.-E., Tsugawa, W., Asano, R., La Belle, J. T., & Sode, K. (2018). Minimizing the effects of oxygen interference on l-lactate sensors by a single amino acid mutation in *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase. *Biosensors and bioelectronics*, 163-170.
- Hiraka, K., Kojima, K., Tsugawa, W., Asano, R., Ikebukuro, K., & Sode, K. (2020). Rational engineering of *Aerococcus viridans* l-lactate oxidase for the mediator modification to achieve quasi-direct electron transfer type lactate sensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 111974.
- Huang, Y., Cui, L., Xue, Y., Zhang, S., Zhu, N., Liang, J., & Li, G. (2017). Ultrasensitive cholesterol biosensor based on enzymatic silver deposition on gold nanoparticles modified screen-printed carbon electrode. *Mater. Sci. Eng.*, 1-8.
- Jiang, L., & Korivi, N. S. (2014). Microfluidics: technologies and applications. 424-443.
- Jiménez C., C., & León P., D. E. (2009). Biosensores: aplicaciones y perspectivas en el control y calidad de procesos y productos alimenticios. *Vitae*, 144-154.
- Katz, E., Willner, I., & Kotlyar, A. B. (1999). A non-compartmentalized glucose|O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 64–68.

- Kornecki, J. F., Carballares, D., Tardioli, P. W., Rodrigues, R. C., Berenguer-Murcia, Á., Alcántara, A. R., & Fernandez-Lafuente, R. (2020). Enzyme production of D-gluconic acid and glucose oxidase: Successful tales of cascade reactions. *Catal. Sci. Technol.*, 5740-5771.
- Kuah, E., Toh, S., Yee, J., Ma, Q., & Gao, Z. (2016). Enzyme Mimics: Advances and Applications. *Chemistry A European Journal*, 8404-8430.
- Kulkarni, G. (2002). *Biotechnology and its application in pharmacy*. Jaypee Brothers Publ.
- Kulys, J. J., Samalius, A. S., & Svirnickas, G. J. (1980). Electron exchange between the enzyme active center and organic metal. *FEBS Letters*, 7-10.
- Kurbanoglu, S., Ozkan, S. A., & Merkoçi, A. (2017). Nanomaterials-based enzyme electrochemical biosensors operating through inhibition for biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.*, 886-898.
- Kutner, W., Wang, J., L'Her, M., & Buck, R. P. (1998). *Pure Appl. Chem.*, 1301.
- LaFleur, L., & Yager, P. (2013). Medical Biosensors. *Biomaterials Science*, 996-1006.
- Lal, A., Duggirala, R., & Chandrasekhar, M. (2010). *USA Patente n° 0213379*.
- Lata, K., Dhull, V., & Hooda, V. (2016). Fabrication and Optimization of ChE/ChO/HRP-AuNPs/c-MWCNTs Based Silver Electrode for Determining Total Cholesterol in Serum. *Biochem. Res. Int.*, 1-11.
- Lazcka, O., Del Campo, F. J., & Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 1205-1217.
- Leiros, I., Wang, E., Rasmussen, T., Oksanen, E., Repo, H., Petersen, S., . . . & Hough, E. (2006). The 2.1 Å structure of *Aerococcus viridans* L-lactate oxidase (LOX). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun*, 1185-90.

- Li, Y. C., & Lee, I. C. (2020). The Current Trends of Biosensors in Tissue Engineering. *Biosensors*, 88.
- Liu, A. H. (2008). Towards development of chemosensors and biosensors with metal-oxide-based nanowires or nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 167-177.
- Liu, D. M., Chen, J., & Shi, Y. P. (2018). Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. *Trends Anal. Chem.*, 332-342.
- Logan, B. E. (2009). Scaling up microbial fuel cells and other bioelectrochemical systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1665–1671.
- Lozano López, J. D. (2019). Estudio de inmovilización enzimática, sobre sustratos de carbono modificados con Porfirina y Quantum dots para su empleo en celdas de combustible de carbohidratos. [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas.
- Luong, J. H., Male, K. B., & Glennon, J. D. (2008). Biosensor technology: Technology push versus market pull. *Biotechnology Advances*, 492-500.
- Metkar, S., & Girigoswami, K. (2019). Diagnostic biosensors in medicine: A review. *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, 271-283.
- Milton, R. D., Giroud, F., Thumser, A. E., Minter, S. D., & Slade, R. C. (2013). Hydrogen peroxide produced by glucose oxidase affects the performance of laccase cathodes in glucose/oxygen fuel cells: FAD-dependent glucose dehydrogenase as a replacement. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 19371.
- Mishra, R. K., & Rajakumari, R. (2019). Nanobiosensors for Biomedical Application: Present and Future Prospects. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery*, 1-23.

- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). n overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 205-220.
- Mohankumar, P., Ajayan, J., Mohanraj, T., & Yasodharan, R. (2021). Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. *Measurement*, 108293.
- Monteiro, R. R., Neto, D. M., Fachine, P. B., Lopes, A. A., Gonçalves, L. R., dos Santos, J. C., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2019). Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. *Int. J. Mol. Sci.*, 5807.
- Monteiro, R., Lima, P., Pinheiro, B., Freire, T., Dutra, L., Fachine, P., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2019). Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 20, 4018.
- Murthy, A. S., & Anita. (1996). Tetrathiafulvalene as a mediator for the electrocatalytic oxidation of L-ascorbic acid. *Biosensors and Bioelectronics*, 191–193.
- Muzammil, I., Aqib, A. I., Tanveer, Q., Muzmmal, S., Naseer, M. A., & Tahir, M. (2022). *Data Science for COVID-19*. Academic Press.
- Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Appl. Sci. Converg. Technol.*, 26, 157-163.
- Nguyen, H., Lee, S., Lee, U., Fermin, C., & Kim, M. (2019). Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*(12), 121.
- Nicholl, D. S. (2002). *An introduction to genetic engineering*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Pandey, P. C., & Mishra, A. P. (1988). Conducting polymer-coated enzyme microsensor for urea. *The Analyst*, 329.
- Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: principle, architecture and applications. *J. Appl. Biomed.*, 1-15.
- Phypers, B., & Pierce, J. M. (2006). Lactate physiology in health and disease. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*, 128-132.
- Poorakbar, E., Shafiee, A., Saboury, A. A., Rad, B., Khoshnevisan, K., Ma'mani, L., . . . Hosseini, M. (2018). Synthesis of magnetic gold mesoporous silica nanoparticles core shell for cellulase enzyme immobilization: Improvement of enzymatic activity and thermal stability. *Process. Biochem.*, 92-100.
- Porter, J. L., Rusli, R. A., & Ollis, D. L. (2016). Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem*, 197-203.
- Rasmussen, M., Abdellaoui, S., & Minteer, S. D. (2016). Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements. *Biosensors and Bioelectronics*, 91–102.
- Rathee, K., Dhull, V., Dhull, R., & Singh, S. (2016). Biosensors based on electrochemical lactate detection: A comprehensive review. *Biochem. Biophys. Rep.*, 35-54.
- Ricci, F., & Palleschi, G. (2005). Sensor and biosensor preparation, optimisation and applications of Prussian Blue modified electrodes. *Biosens. Bioelectron.*, 389-407.
- Rocha, T., Pedro, P., de Souza, M., Monteiro, R., & dos Santos, J. (2020). Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. *Catal. Lett.*
- Ronkainen, N., Halsall, H., & Heineman, W. (2010). Electrochemical biosensors. *Chem. Soc. Rev.*, 39, 1747-1763.

- Rueda, N., dos Santos, J. C., Ortiz, C., Torres, R., Barbosa, O., Rodrigues, R. C., . . . Fernandez-Lafuente, R. (2016). Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. *Chem. Rec.*, 1436–1455.
- Shafiee, A., Ghadiri, E., Kassis, J., Pourhabibi Zarandi, N., & Atala, A. (2018). Biosensing Technologies for Medical Applications, Manufacturing, and Regenerative Medicine. *Current Stem Cell Reports*, 105-115.
- Shanmugam, S., & Sathishkumar, T. (2009). *Enzyme technology*. I. K. Int. Pvt. Ltd.
- Shukla, S. K., Turner, A. P., & Tiwari, A. (2015). Cholesterol Oxidase Functionalised Polyaniline/Carbon Nanotube Hybrids for an Amperometric Biosensor. *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 3373-3377.
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2016). Microbial enzymes: Industrial progress in 21st century. *3 Biotech*.
- Singh, R., Oh, B.-K., & Choi, J.-W. (2010). Application of peptide nucleic acid towards development of nanobiosensor arrays. *Bioelectrochemistry*, 153-161.
- Singhania, R. R., Patel, A. K., Thomas, L., Goswami, M., Giri, B. S., & Pandey, A. (2015). *Industrial Enzymes*. Amsterdam: Elsevier.
- Sun, H., Zhou, Y., Ren, J., & Qu, X. (2018). Carbon Nanozymes: Enzymatic Properties, Catalytic Mechanism, and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 9224-9237.
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Analytical Letters*, 635-659.
- Turner, A. P., Karube, I., & Wilson, G. S. (1987). *Biosensors, fundamentals and applications*. Oxford: University Press.

- Umar, A., Rahman, M. M., Al-Hajry, A., & Hahn, Y. B. (2009). Highly-sensitive cholesterol biosensor based on well-crystallized flower-shaped ZnO nanostructures. *Talanta*, 284–289.
- Umena, Y., Yorita, K., Matsuoka, T., Kita, A., Fukui, K., & Morimoto, Y. (2006). The crystal structure of L-lactate oxidase from *Aerococcus viridans* at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. *Biochem Biophys Res Commun*, 249-56.
- Wang, C.-M., Chen, C.-Y., & Liao, W.-S. (2020). Enclosed Paper-Based Analytical Devices: Concept, Variety, and Outlook. *Analytica Chimica Acta*(20), 31011-4.
- Wang, H., Park, J.-D., & Ren, Z. J. (2015). Practical Energy Harvesting for Microbial Fuel Cells: A Review. *Environmental Science & Technology*, 3267–3277.
- Wang, J. (1999). Amperometric biosensors for clinical and therapeutic drug monitoring: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47-53.
- Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. *Sensors*, 2043-2081.
- Witkowska Nery, E., Kundys, M., Jeleń, P., & Jönsson-Niedziółka, M. (2016). Electrochemical Glucose Sensing: Is There Still Room for Improvement? *Anal. Chem.*, 11271-11282.
- Wong, T. S., & Schwaneberg, U. (2003). Protein engineering methods in bioelectrocatalysis. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 590-596.
- Yoo, E. H., & Lee, S. Y. (2010). Glucose biosensors: An overview of use in clinical practice. *Sensors*, 4558-4576.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Aerococcus TT 00000...00

1 10 20

AerococcusMNNNDIEYNAPSEIKYIDVVFYDLE...EA
Penaeus MQSQIRCELTAGOSGLTQFPRSLAHCKOEDSNLSELDYNOIAMSSFLVCFVODYEE...QA
EctocarpusMNDPMTAPVGPADTSKAPFAAGNEFVNVREFFER...HA
CyanidiococcusMVEKPAVNPAQFLLNLAEYHL...LA
CarnobacteriumMNNNDIEYNAPSEIKYIDVVFYDLE...EA
OopsacasMSYNQIVCLGDLK...HA
AedesMALASVKDYER...HA
ChloroflexiMRLEPMNLFLE...HA
Laminaria
CyanidioschyzonMVEKPAVNPAQFLLNLAEYHL...FA
NitzschiaMIFNPHKLGIIHKVVKHPLNVAFPDAPYKRALKKAVNIADLRL...IA
SalmonellaMKTHHLIRVVVASLAMLATSGLAYAEYKASTDEKATKMTNVASLEA...RV
NannochloropsisMDFVNHFMGAAEETVRTPTGAGPEFVNIREFEA...YA
TilletiopsisMSVPKSSWMREIYVNLGGTFLASTTYELLRAKA...EA
HomarusMKSLSLVCSDEYA...EA
AnoplophoraMSDNLVCLKDFEV...HA

Aerococcus α2 α3 η1 β1 β2 β3

30 40 50 60 70 80

Aerococcus SKVVPHGCFNYIAGASGDEWTKRANDRKWKHLVYFRLAQDVEAP...DTSSTELGCHKTKA
Penaeus TRILPERSALDYYSRGAETREITLQENKDAIKRWYIRPFRFLRDVSNR...SMQTTVLGQKVVNV
Ectocarpus QLMLSKNAFDYYASGANDMVTLRNRAAFNRRLRFRPRLIRDVSKV...DSTTVLGGQKISS
Cyanidiococcus KAKLPAMVYGYASGADDEQTLRDNEEAFRRRLRFRPRLIRDVSRV...DMTKQVMGIDLFS
Carnobacterium SKVVPHGCFNYIAGASGDEWTKRANDRKWKHLVYFRLAQDVEAP...DTSSTELGCHKTKA
Oopsacas SRVLPKMAWDYYSRGADEEVLTEENTNAFQTYQIYFHLIRSVGTP...SLFTSQVGHISIM
Aedes AEIIFRNALDYYSRGADEELSLRLNRVCFDRLRIRPRLKSGAKR...DLSVNLFGDRYSM
Chloroflexi SRFISPHAWAFIDGGAQDEVTVKRNRSAIDAITLRPRLQDVS...DLSSTTVLGEKISF
Laminaria
Cyanidioschyzon KARLPAMVYGYASGADDEQTLRDNEEAFRRRLRFRPRLIRDVSRV...DITKQVMGIDLFS
Nitzschia KSRRAHKMVPDYLDAGADDEISLRRGKDAYTELEMHYKILSGIKPP...LDLSTKIFGMDVNL
Salmonella QAKMEKGAFGYTRGGAEDENNLRSNTESFDKKYTMPRVLQGTLEKEID...LSTQLLGGIPLKT
Nannochloropsis KATLPKNAFDYYASGANDMITLRNRAAFERLRMRPRLIRDVSHV...DTRTTVLGDPVAF
Tilletiopsis QEVLEPKAYAYVAGSAGEETEASNSALRDWQIVPRMLAGVDLAQF...DSVSTLFGRRRFT
Homarus HKSIFRNALDYYSRGADEETLHENKEAISRWYIRPFRFLRDMSIR...SLATTILGHRVKV
Anoplophora HEVLSRNAIDYYSRGAQDEETLQNNRAFSRYKIRPRLRNVANR...DLSSTTVLGEKIVSM

Aerococcus β4 η2 α4 β5 TT α5

90 100 110 120 130 140

Aerococcus PFIIMAFIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTMSISAYS...GATFEEISEGL...NGGP
Penaeus PFGVAPAMQRMATPEGENANARAAGKIGTVFTLSTIS...ITSEEIASEA...PDTL
Ectocarpus PICIAFATAMQRMADSGECATAGAAAKAGALMTLSSWS...ITALEDVAKAGG...PAGA
Cyanidiococcus PLMVAFAMQRMMAPEGELATARAVARIGTVMGLSSWAT...TSLLEDVAHV...PGLP
Carnobacterium PFIIMAFIAAHGLAHTTKEAGTARAVSEFGTMSISAYS...GATFEEISEGL...NGGP
Oopsacas PICIAFATAMQRMMAPEGELATARAASAQICMCLSTLS...NTALEDVAAIG...NGL
Aedes PITGISFATAMQRMMAPEGEVANAKAASRQVGFVTLSTIS...SSMEQVAAGT...LGAP
Chloroflexi PVMVAFAGGHQMAPEGELATARGAGAGTLMTLATGSHF...SMEQVADAA...SGP
Laminaria
Cyanidioschyzon PLMVAFAMQRMMAPEGELATARAVARIGTVMGLSSWAT...TSLLEDVAHV...PGLP
Nitzschia PFFGCFATAGNRMFHWEGETAAKASEKFGTLYGLSSLAT...TGITEIGAIH...SGP
Salmonella PIIQAPMAAQGLAHSAGELATAKGMAQVGSIFSLSTYGNK...TIEEVANVS...GKNP
Nannochloropsis PICVAFAMQRMMAPEGELATARACARQQLMTLSSWS...ITSVEDVAAAA...PIP
Tilletiopsis PLVVSFIVQQAQLKDCDVATASAARELGFPTLSSAT...STPMEQVITGAGYDEEGDEGQE
Homarus PYGIAFATAMQRMMAPEGEVANARAAGRIGTAFVTLSTIAT...SVEEIAEHA...SDTL
Anoplophora PITGIAFAMQRMMAPEGECANARAAGALTVFTLSTIAT...SSEVETKSA...PNVL

Aerococcus β6 α6 β7 α7

150 160 170 180 190

Aerococcus RWFQIYMAKDDQQRDIDDEAKSDGATAIILTADSTVSGNRRDVKNK...
Penaeus RFFQLYIYKDRVETASLVKREAAAGSALVLTVDAPHF...GIRLADLRNK...
Ectocarpus RWFQLYIYKDRKITEQLVKKALAAGYTALAVTVDTPV...GLRREADMRNRF...
Cyanidiococcus KFFQLYIYKDRAITERLVRRAERAGRAIALTVDTP...QLGRREADIRN...
Carnobacterium RWFQIYMAKDDQQRDIDDEAKSDGATAIILTADSTVSGNRRDVKNK...
Oopsacas RWFQLYIYKDRQATLQLVRRAEKCGYKAIALTVDAP...LLGNRYADEK...
Aedes RWFQLYIYKDRKLTESLVRRAEKAGYKAIALTVDAP...GLRRADMRNRF...
Chloroflexi LWFQLYIYKDRQETASMLVKKREKAGYKAIALTVDTP...INSPIERSIRH...
LaminariaYKDRVITIAQLVKKALAAGYTALAVTVDTP...GLRREADMRNRF...
Cyanidioschyzon KFFQLYIYKDRAITERLVRRAERAGRAIALTVDTP...QLGRREADIRN...
Nitzschia KVFQLYIYKDRRELKVEVIAKKEGGF...GALALTVDFTWY...GNRDIRN...
Salmonella FFFQLYIYKDRRELKVEVIAKKEGGF...GALALTVDFTWY...GNRDIRN...
Nannochloropsis KWFQLYIYKDRRELKVEVIAKKEGGF...GALALTVDFTWY...GNRDIRN...
Tilletiopsis AWFQLYIYKDRRELKVEVIAKKEGGF...GALALTVDFTWY...GNRDIRN...
Homarus RFFQLYIYKDRVETANLVRRAEAAAGSALVLTVDAPHF...GIRLADLRNK...
Anoplophora RWFQLYIYKDRKVTITSLVRRAEQAAGSALVLTVDAPHF...GLRREADMRNRF...

η₃
200 210 220

Aerococcus
 Aerococcus .Y[F]G[M]P[V]QRY.....LRGTAEG...MS...LNNIYGA[S].KQK[IS
 Penaeus .LPPHLLGMANFQTGDDEKSN.....RVNISSG...GS.GIN[EY]VK[SL]FDPS[LT
 Ectocarpus .LPEHLTMGNFV.SAGGAH.....ASGTKDG...GND[SG]LAAYVASLIDRTLD
 Cyanidiococcus .LPPHLLSLANF[SDM].KD.....FAEVKGG...AGASGLASYVASLIDASLN
 Carnobacterium .Y[F]G[M]P[V]QRY.....LRGTAEG...MS...LNNIYGS[S].KQK[IS
 Oospasas .I[PSH]L[KC]PHLV.NL..D.....KIKVKTG...SK...LSM[MY]FATLLENNSS
 Aedes .LPPHLLVLANFE.GRLATG.....V..QSOQ...GS.GIN[EY]IT[RE]QLDQTLS
 Chloroflexi .RPRCFN[F]GNFV.....GEEAGLGLVADTLEALYYQRPWNIPLT
 Laminaria .LPEHLTMGNFV.SAGGAH.....ASGTKDG...GND[SG]LAAYVASLIDRTLD
 Cyanidioschyzon .LPPHLLSLANF[SDM].KD.....FAEVKGG...AGASGLASYVASLIDASLN
 Nitzschia .I[PPKY]SV[PM]IEALRKPAWTYDFLSHEPHYTYACINTD...VPADS[LAA]FVNS[QIA]E[FN
 Salmonella .FPLGFANLEMF.....ARKNDDGSKTGGKAGIS[EI]YAQA.KQA[FT
 Nannochloropsis .LPAHLTMANFA.GAGGSH.....AEGTKDG...GKDSGLAAYVASLIDRTLQ
 Tilletioipsis CFS[DP]V[FW]EKYCEGKSPLR.....KDSADD...TQAAS[LAA]I[GL]LTPGISRA
 Homarus .LPPNLRMANFQTDDEKSS.....LLNNTSAE...GS.GIT[EY]VK[SL]FDPS[LS
 Anoplophora .LPPHLKLANFD.GTRKSTD.....INKNNE...GS.GLNA[V]N[SL]FDAS[VT

α8 β8 α9 β9 η4 α10
230 240 250 260 270 280

Aerococcus
 Aerococcus FRDTE[EA]AHS.GLPV[V]K[ET]QHP[ED]A[DM]A[TKA]G[S]T[WS]N[HG]R[OLY]EAPG[SFDT]LPA
 Penaeus WDDVAWLKRLT.NLP[V]L[KG]ILTAE.DALLG[LKA]AMG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Ectocarpus WNDIAWLKRLT.ICGSMK[VV]K[VMTAED]AAES[VRO]GDG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Cyanidiococcus WNDIAWLKRLT.NLP[V]L[KG]ILTAE.DALLG[LKA]AMG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Carnobacterium FRDTE[EA]AHS.GLPV[V]K[ET]QHP[ED]A[DM]A[TKA]G[S]T[WS]N[HG]R[OLY]EAPG[SFDT]LPA
 Oospasas WEVVH[LK]SIT.SLPT[II]K[IRH]G[E]DALLA[V]EHCADG[TV]S[NHG]R[OLY]D[S]VPA[S]IDM[L]YE
 Aedes WDDV[KW]LVNFT.KLP[V]I[V]K[ILT]Q[ED]AVLAAD[MC]Q[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Chloroflexi WAEELG[WR]QQT.SL[P]I[V]L[KG]IRTAED[AY]QAV[Q]NVE[Q]TVS[NHG]R[OLY]D[GT]LGT[IE]M[L]PE
 Laminaria WNDIAWLKRLT.ICGSMK[VV]K[VMTAED]AAES[VRO]GDG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Cyanidioschyzon WNDIAWLKRLT.NLP[V]L[KG]ILTAE.DALLG[LKA]AMG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Nitzschia WSDA[E]WLLGEW.NGPAAP[KC]VVRP[D]AKRA[IE]ICFSS[TV]S[NHG]R[OLY]TSPAT[IV]L[L]PE
 Salmonella PEDIA[VY]VHRIS.GLPV[V]K[ET]QSP[ED]A[B]IA[Q]A[AG]I[TV]S[NHG]R[OLY]D[S]VPA[S]IDM[L]YE
 Nannochloropsis WKD[VQ]WLRIS.T.NLP[V]V[KC]VMTPE.DALV[M]Q[C]G[VDA]I[TV]S[NHG]R[OLY]D[S]VPA[S]IDM[L]YE
 Tilletioipsis WADL[L]LRELWGDAP[II]L[KG]I[QAL]S[D]A[Q]R[V]EACMDG[TV]S[NHG]R[OLY]GVGGAG[AL]Q[L]PE
 Homarus WDDVAWLTRIT.KMP[V]L[KG]ILTAE.DALLG[LKA]AMG[TV]S[NHG]R[OLY]GVPP[S]EIALSE
 Anoplophora WEDE[EW]LKSIS.TL[P]I[V]L[KG]ILTAE.DALLG[LKA]AMG[TV]S[NHG]R[OLY]D[S]VPA[S]IDM[L]YE

β10 α11 β11 α12
290 300 310 320 330 340

Aerococcus
 Aerococcus [IA]E[RVN].K[R]V[P]V[F]D[GG]V[R]R[GE]H[VAK]A[LAS]GAD[V]V[AL]G[R]P[V]L[F]G[L]A[LG]G[W]Q[G]A[Y]S[V]L[D]Y[F
 Penaeus [IV]K[V]D.G[R]C[E]V[V]D[GG]F[S]R[GT]D[IF]K[A]L[A]G[A]R[V]F[L]G[R]P[V]L[W]G[L]A[CG]E[G]E[AL]N[L]N[L]I
 Ectocarpus VV[Q]AAR.G[R]I[P]V[F]D[GG]V[R]R[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[D]V[L]I[G]R[P]I[V]W[G]L[A]V[D]G[E]E[G]V[Y]R[L]S[L]L
 Cyanidiococcus [IA]E[RVN].K[R]V[P]V[F]D[GG]V[R]R[GE]H[VAK]A[LAS]GAD[V]V[AL]G[R]P[V]L[F]G[L]A[LG]G[W]Q[G]A[Y]S[V]L[D]Y[F
 Carnobacterium [IV]Q[V]D[P]D[K]V[E]I[V]D[GG]V[V]Y[GT]D[V]L[A]L[A]G[A]R[S]V[V]F[V]G[R]P[A]I[W]G[L]S[Y]G[E]E[G]V[L]M[L]E[L]L
 Oospasas [IV]K[V]G.D[R]T[T]I[V]D[GG]V[V]T[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[V]L[F]G[R]P[V]L[W]G[L]A[V]N[G]Q[G]V[E]H[L]D[L]L
 Aedes [IV]Q[V]Q[V]G.R[A]E[I]Y[L]D[GG]I[R]R[G]S[D]A[K]A[L]S[G]A[R]V[L]V[G]R[P]L[F]W[G]L[A]W[N]G[S]D[G]E[G]V[R]L[M]E[L]L
 Chloroflexi VV[Q]AAR.G[R]C[E]V[V]D[GG]I[C]R[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[V]F[L]G[R]P[V]L[W]G[L]A[G]H[S]G[E]E[G]V[S]K[V]I[K]L[L]
 Laminaria VA[Q]S[V]R.G[R]I[P]V[F]D[GG]V[R]R[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[V]L[I]G[R]P[I]V[W]G[L]A[V]D[G]E[E]G[V]Y[R]L[S]L[L]
 Cyanidioschyzon [IR]E[V]G.PD[V]E[I]I[M]D[GG]V[V]Q[GT]D[IA]K[A]L[A]G[A]D[S]V[G]V[K]P[V]Y[W]G[L]A[G]E[A]G[V]S[R]A[Y]E[I]L
 Nitzschia [IA]K[V]N.K[R]V[P]V[F]D[GG]V[R]R[GS]H[V]F[K]A[L]A[G]A[V]A[V]G[R]P[V]L[Y]G[L]N[L]G[CA]G[V]S[V]A[S]I[E]Q[L]
 Salmonella [IV]K[V]N.G[R]C[E]V[V]D[GG]V[V]C[RT]D[A]F[K]A[L]A[G]A[V]F[L]G[R]P[V]L[W]G[L]A[HS]G[E]D[G]V[Y]Q[V]L[E]L
 Nannochloropsis [IA]Q[Y]A[R]S[Q]K[V]I[F]D[GG]V[R]T[G]A[D]V[I]K[A]L[A]G[A]H[V]G[V]G[R]P[V]A[W]G[L]A[V]G[E]E[G]V[A]E[V]L[K]G[L]
 Tilletioipsis VV[Q]AAR.G[R]C[E]V[V]D[GG]F[S]R[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[V]F[L]G[R]P[V]L[W]G[L]A[CG]E[E]G[V]S[V]L[D]I[L]
 Homarus [IV]K[V]G.N[V]E[I]Y[L]D[GG]I[R]D[GT]D[V]F[K]A[L]A[G]A[R]V[F]M[G]R[P]A[L]W[G]L[A]HS[E]E[G]V[K]K[L]T[I]
 Anoplophora

α13 β12 TT
350 360 370

Aerococcus
 Aerococcus QK[Q]L[TR]V[M]Q[DT]E[S]Q[N]V[E]D[L]K...GLD[F]D[N].....PYGYE[V].
 Penaeus KGE[LD]S[T]M[ALS]G[E]A[I]N[D]I[T]...KDM[V]I[R]K.....DHYS[CL].
 Ectocarpus HDE[V]M[A]Q[L]T[C]T[R]V[S]S[AS]...RSM[V]T[H]Q.....T.SYF[SK]L.
 Cyanidiococcus KDF[KL]A[M]Q[L]C[C]Q[K]V[S]D[R]...REL[V]V[R]D[A]FAPYDVRQMLSV.KMP[SK]L.
 Carnobacterium QK[Q]L[TR]V[M]Q[DT]E[S]Q[N]V[E]D[L]K...GLD[F]D[N].....PHGYE[V].
 Oospasas RKEL[L]A[L]I[L]S[E]C[K]D[V]H[S]L[P]...KGI[V]K[R]K.....SYLS[KL].
 Aedes RKE[LD]V[A]M[A]L[A]C[C]K[V]E[D]I[T]...PNH[V]V[H]E.....SLYAK[L].
 Chloroflexi ROE[MD]L[V]L[G]H[C]H[S]S[V]H[T]L[N]...PDV[V]N[N]P.....H.PYHT[P]AV
 Laminaria NDE[L]I[M]A[L]Q[L]T[C]T[R]I[S]A[A]T...RAM[V]T[H]O.....I.SYYS[KL].
 Cyanidioschyzon KDF[KL]A[M]Q[L]C[C]Q[K]V[S]D[R]...RDL[V]V[R]D[A]FAPYDVRQMLSV.KMQ[SK]L.
 Nitzschia KVE[L]D[R]A[M]G[L]L[C]T[F]T[V]A[D]L[K]R[E]G[P]S[L]I[K]R[G]S[S]I[R]D[Y]PDRNAHLRGGGG[V]
 Salmonella NKE[L]T[I]N[M]L[G]C[A]R[N]I[E]Q[V]K...TTR[L]L[T]E.....KDL[P]Q..L
 Nannochloropsis KKE[F]E[M]A[M]Q[L]T[C]T[K]L[S]D[I]Q...RSM[V]T[H]V.....V.SYQ[S]KI.
 Tilletioipsis LAD[F]E[L]T[A]G[L]S[H]R[S]L[A]D[I]G...AHS[L]T[R]R.....GEEAR[L].
 Homarus KTE[L]D[S]V[M]A[L]S[E]C[A]T[I]K[D]I[T]...KEM[V]I[R]K.....EYYAR[L].
 Anoplophora KTE[F]D[Y]A[L]A[S]E[C]A[N]I[S]D[L]K...PSM[V]V[H]E.....SYYSR[L].

Alineamiento de secuencias de proteínas LOx de especies con homología. Se comparan las secuencias de la enzima lactato oxidasa de *Aerococcus viridans* con 15 homólogos identificados. Los residuos idénticos se muestran encuadrados en rojo y los residuos similares están en rojo. Los elementos de la estructura secundaria de LOx de *Aerococcus viridans* están indicados sobre el alineamiento.