

Identificación y caracterización de las enzimas CLD1 y PPH para la producción de fitol como antioxidante para biodiésel

Jair Caleb Jiménez Solís *, Zaida Nelly Juárez y Elie Girgis El Kassis

Decanato de Ciencias de la Vida y de la Salud, Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla, Puebla, Puebla, México.

* Autor de correspondencia: jaircaleb.jimenez@upaep.edu.mx; Tel.: +52 222 841 58 69

Desarrollo Sustentable (Bioprocesos). **Ponencia Virtual.**

Recibido: 16 de agosto de 2023

Aceptado: 19 de septiembre de 2023

Publicado: 23 de noviembre de 2023

Palabras clave: Clorofilasa; Diseño de primers; Feofitinas; Fitol; *Porophyllum linaria*

Introducción. El biodiésel tiende a oxidarse por factores como la presencia de aire, temperatura, luz y metales pesados, reduciendo su vida de anaquel (Dunn, 2005). Los antioxidantes comerciales afectan las propiedades fisicoquímicas de este. El fitol, alcohol isoprenoide constituyente de la clorofila, al poseer una estructura similar a los ácidos grasos, tiene una alta probabilidad de ser un antioxidante adecuado para el biodiésel, sin embargo, la obtención de este metabolito a partir de plantas resulta costosa y poco eficiente, debido a que se encuentra en la mayoría de plantas en pequeñas cantidades en su forma libre. A pesar de esto, *Porophyllum linaria* lo acumula en un 25.5% en su aceite esencial (Juárez *et al.*, 2015). Las enzimas responsables de la formación del fitol por degradación de clorofila (Gutbrod, 2019) CLD1 y PPH (Figura 1), respectivamente, representan una vía que permite sentar las bases de un bioproceso para la producción de fitol como aditivo antioxidante del biodiésel. El objetivo de este estudio es identificar y caracterizar dichas enzimas para evaluar su adecuación para su uso en un bioproceso.

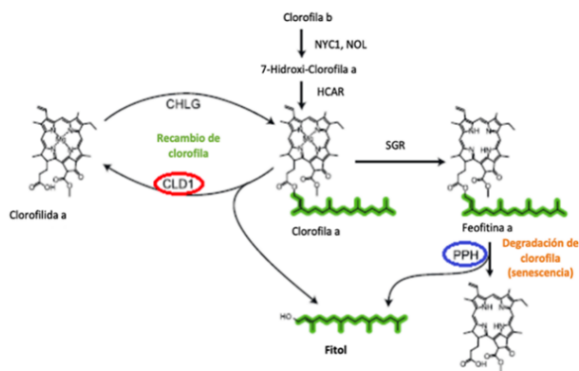


Figura 1. Síntesis de fitol por recambio y degradación de clorofila (Gutbrod, 2019)

Materiales y Métodos. La extracción de ADN genómico de *Porophyllum linaria* se realizó mediante el Dneasy Plant Pro Kit de QIAGEN y se purificó por el kit One Step Inhibitor Removal de ZYMO Research. Se cuantificó la concentración de ADN por espectrofotometría en un Nanodrop One Thermo Scientific.

Para el diseño de primers se obtuvieron las secuencias aminoácídicas de CLD1 y PPH para 40 especies de plantas partiendo de las secuencias de *Arabidopsis thaliana* y se alinearon mediante *Clustal Omega*. Se identificaron regiones conservadas mediante el software Jalview, a partir de las cuales se diseñaron primers degenerados.

Se realizaron PCRs punto final de las combinaciones de los primers degenerados diseñados. Se purificaron aquellas amplificaciones que mostraban el tamaño esperado por medio del PureLink Quick Gel Extraction Kit de Invitrogen.

Resultados. Se obtuvo un valor de 27.6 ng/μl en la cuantificación del ADN de *Porophyllum linaria*; la pureza con la relación A_{260}/A_{280} fue de 1.79.

En la figura 2 se muestra la evaluación de la integridad del ADN extraído mediante una PCR del área ITS 4 5.

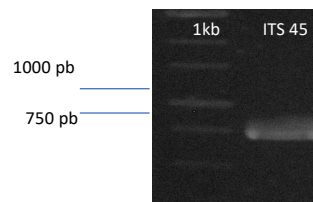


Figura 2. Integridad del ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto amplificado por PCR del área ITS 4 5 para evaluar la integridad. Producto esperado de tamaño de 750pb. 1kb: Marcador de peso molecular.

En la figura 3 se muestra a) la amplificación parcial del gen de CLD1 con un tamaño de 1400 pb y b) la amplificación parcial del gen PPH, con una migración a la distancia de 450 pb.

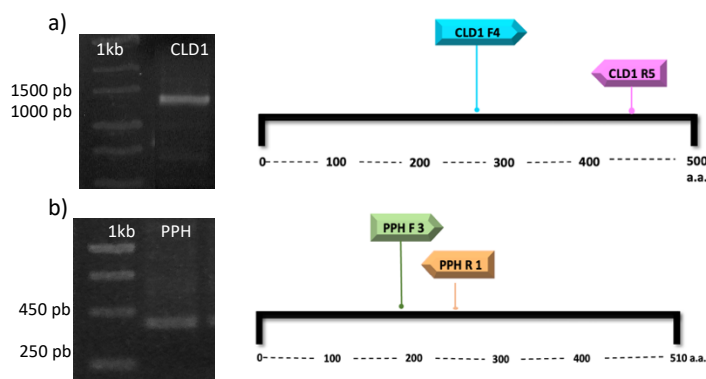


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto amplificado por PCR de los primers diseñados para las enzimas a) CLD1 y b) PPH.

Conclusiones. La secuencia parcial obtenida de CLD1 y PPH permite validar el enfoque por primers degenerados para la identificación de la secuencia completa de los genes.

Con lo cual, se continúa trabajando en la obtención de la secuencia completa de dichos genes mediante la técnica RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) y la expresión heteróloga de estos en *Escherichia coli*.

Bibliografía.

- Dunn R O. "Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel)". Fuel processing technology. 2005, Vol. 86, p. 1071-1085.
- Gutbrod, K., Romer, J., & Dörmann, P. (2019). Phytol metabolism in plants. Progress in Lipid Research, 74, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2019.01.002>
- Juárez, Z. N., Hernández, L. R., Bach, H., Sánchez-Arreola, E., & Bach, H. (2015). Antifungal activity of essential oils extracted from *Agastache mexicana* ssp. *Xolocotziana* and *Porophyllum linaria* against post-harvest pathogens. Industrial Crops and Products, 74, 178–182. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.058>