

La identidad de la bGHR purificada fue confirmada mediante su inmunodetección específica en membranas de Western blot. Para ello se analizaron muestras representativas del proceso cromatográfico, tanto en geles de EGPA-SDS como en membranas de nitrocelulosa. La Figura 12 muestra la tinción de Coomassie del gel de EGPA-SDS de las muestras analizadas, donde el carril 3 presenta la composición del producto de fermentación de la cepa de *Pichia pastoris* pPic9-bGH, en el cual se aprecia una proteína de 22 kDa correspondiente a la bGH y más de 20 proteínas contaminantes. El carril 4 muestra el producto de la elución 0M de NaCl obtenido de la cromatografía de intercambio aniónico, en el cual se destaca la presencia de la bGHR con escasas proteínas contaminantes de alto peso molecular. En el carril 5 se observa la banda de la bGHR obtenida de la fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. En el carril 6 se aprecia un aumento en la intensidad de banda de la bGHR debido a la efecto de concentración de la muestra por parte de la cromatografía de exclusión molecular. El carril 8 presenta la composición del producto de fermentación de la cepa de *P. pastoris* pPic9, empleado como control negativo para el ensayo de Western Blot, en el cual se destaca la presencia de una banda a la altura de 22 kDa, similar a la presentada por la bGH, indicando con esto, que el vector de expresión produce una proteína de peso similar a la bGH y que la banda de 22 kDa no debe considerarse como 100% de bGHR en el carril 3.

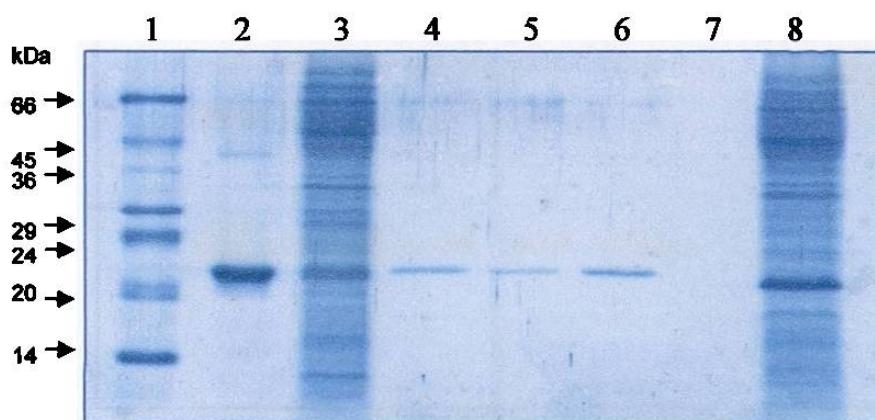


Figura 12. Gel de muestras procesadas en Western Blot: 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, Muestra de fermentación de bGH sin purificar; 4, fracción 0M de NaCl obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico; 5, fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtenida de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; 6, elución a los 18 minutos obtenida de la cromatografía de exclusión molecular; 7, carril vacío; 8, fermentado de pPic9 como control negativo.

La Figura 13 presenta la inmunodetección de la bGHR con anticuerpos policlonales anti-bGH, en el cual, el carril 2 muestra la reactividad de los anticuerpos frente a la bGH comercial. En el carril 3 se observa la presencia de la bGHR a la altura de 22 kDa, además de la presencia de posibles dímeros, trímeros y algunas bandas intermedias debido probablemente a la interacción de la bGHR con algunas proteínas de *Pichia pastoris*. El carril 4 muestra la presencia de la bGHR obtenida a partir de la elución con 0M de NaCl de la cromatografía de intercambio aniónico, demostrando la pureza y la integridad del producto obtenido. En el carril 5 se observa la presencia de la banda correspondiente al monómero de bGHR obtenida de la fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas. El carril 6 confirma el aumento en la intensidad de banda correspondiente a la bGHR como parte del proceso de la cromatografía de exclusión molecular. El carril 8 fue empleado como control negativo, en el cual se demuestra que la proteína de peso similar a la bGHR propia del vector de expresión no presenta reactividad frente a los anticuerpos anti-bGH, con lo que se descarta la posibilidad de que en el vector de expresión se encuentre la inserción del casete del gen de la bGH. Sin embargo, se muestra reacción frente a proteínas de alto peso molecular observadas también en la muestra de fermentación sin purificar (carril 3). Esto pudiera ser debido a reacciones inespecíficas del anticuerpo polyclonal.

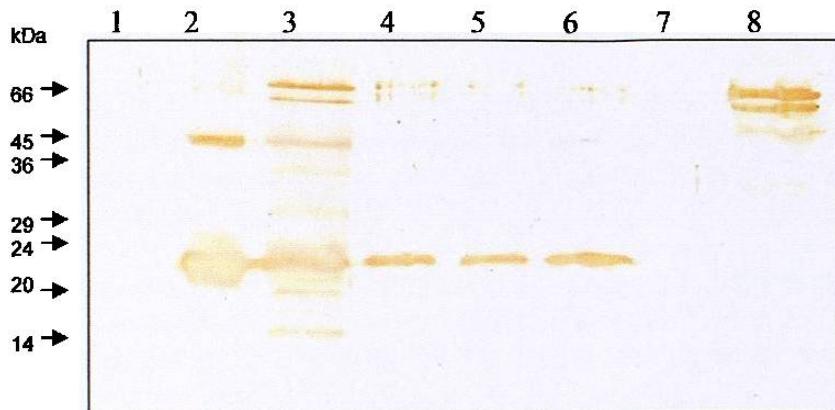


Figura 13. Western Blot de muestras representativas del proceso de purificación: 1, marcador de peso molecular; 2, estándar comercial de bGH; 3, Muestra de fermentación de bGH sin purificar; 4, fracción 0M de NaCl obtenida de la cromatografía de intercambio aniónico; 5, fracción 0M de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ obtenida de la cromatografía de interacciones hidrofóbicas; 6, elución a los 18 minutos obtenida de la cromatografía de exclusión molecular; 7, carril vacío; 8, fermentado de pPic9 como control negativo.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

De los resultados encontrados en el presente trabajo se puede concluir lo siguiente:

El esquema de purificación desarrollado confirmó ser muy efectivo al registrar una pureza relativa del 99.5% para la bGHR producida por *Pichia pastoris*, presentando una eficiencia de recuperación del 52%.

La cromatografía de intercambio aniónico resultó ser una técnica inicial adecuada para semi-purificar de manera rápida y sencilla a la bGHR.

La cromatografía de interacciones hidrofóbicas fue la fase cromatográfica que presentó menor rendimiento en recuperación.

La cromatografía de exclusión molecular confirmó ser una cromatografía eficaz para pulir la proteína recombinante en el proceso de purificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, H. (2005). *Principles and reactions of protein extraction, purification, and characterization*. CRC Press LCC. E.U.A.
- Amersham Biosciences. (2001). *Protein purification handbook*. Snits & design AB. Uppsala, Suecia.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., y Struhl, K. (1999). *Short Protocols in Molecular Biology*. Fourth ed., Wiley, Massacgussetts, USA.
- Barbier, G. G., Joshi, R. C., Campbell, E. R. y Campbell, W. H. (2004). *Purification and biochemical characterization of simplified eukaryotic nitrate reductase expressed in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:61–71.
- Barral, P., Batanero, E., Villalba, M. y Rodríguez, R. (2005). *Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast Pichia pastoris: Evidence of post-translational modifications*. Prot. Express. Purif. 44:147–154.
- Barrera-Saldafia, H. A. (1992). *Información genética: estructura, función y manipulación*. CONACYT, Colección Ciencia Básica. México.
- Barrera-Saldafia, H. A., Rodríguez, I. P., Sánchez, C. N., Pérez, A. A., Ascasio, J. A. y Padilla, G. (2004). *La producción de hormonas del crecimiento por técnicas de ingeniería genética; su utilización en los sectores de la salud y pecuaria*. En “Fundamentos y casos exitosos de la biotecnología moderna” (Francisco Bolívar Zapata, Editor). CONACYT. Pp. 373-390.
- Baumgartner, P., Harper, K., Raemaekers, R., Durieux, A., Gatehouse, A., Davies, H. y Taylor, M. A. (2003). *Large-scale production and purification of recombinant Galanthus nivalis agglutinin (GNA) expressed in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Biotechnology Letters 25:1281–1285.
- Beaulieu, L., Groleau, D., Miguez, C. B., Jetté, J. F., Aomari, H. y Subirade, M. (2005). *Production of pediocin PA-1 in the methylotrophic yeast Pichia pastoris reveals unexpected inhibition of its biological activity due to the presence of collagen-like material*. Prot. Express. Purif. 43:111–125.
- Bisht, H., Chugh, D. A., Swaminathan, S. y Khanna, N. (2001). *Expression and purification of Dengue Virus type 2 envelope protein as a fusion with Hepatitis B surface antigen in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 23:84–96.
- Bradford, M. M. (1976). *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal. Biochem. 72:248.

- Chantasingh, D., Pootanakit, K., Champreda, V., Kanokratana, P. y Eurwilaichitr, L. (2005). *Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from Aspergillus terreus (BCC129) in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. (Aceptado para su publicación).
- Chen, Y. H., Chang, T. C. y Chang, G. G. (2004). *Functional expression, purification, and characterization of the extra stable human placental alkaline phosphatase in the Pichia pastoris system*. Prot. Express. Purif. 36:90–99.
- Damasceno, L. M., Pla, I., Chang, H. J., Cohen, L., Ritter, G., Old, L. J., y Batt, C. A. (2004). *An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:18–26.
- Damaso, M. C., Almeida, M. S., Kurtenbach, E., Martins, O. B., Pereira, N., Andrade, C. y Albano, R. (2003). *Optimized expression of a thermostable xylanase from Thermomyces lanuginosus in Pichia pastoris*. Appl. Environ. Micro. 69(10):6064–6072.
- De Oliveira, J. E., Soares, C. R. J., Peroni, C. N., Gimbo, E., Camargo, I. M. C., Morganti, L., Bellini, M. H., Affonso, R., Arkaten, R. R., Bartolini, P. y Ribela, M. T. (1999). *High-yield purification of biosynthetic human growth hormone secreted in Escherichia coli periplasmatic space*. J. of Chromatography A. 852(2):441–450.
- Fierens, K., Geudens, N., Brijs, K., Courtin, C. M., Gebruers, K., Robben, J., Campenhout, S., Volckaert, G. y Delcoura, J. A. (2004). *High-level expression, purification, and characterization of recombinant wheat xylanase inhibitor TAXI-I secreted by the yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 37:39–46.
- Flodh, H. (1986). *Human growth hormone produced with recombinant DNA technology: development and production*. Acta Paediatr. Scand. Suppl. 325:1–9.
- Gadkari, R., Deshpande, R. y Dighe, R. R. (2003). *Hyperexpression and purification of biologically active human luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin using the methylotropic yeast, Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 32:175–184.
- Gallardo-Blanco, H. L. (1999). *Construcción de cepas de Pichia pastoris portadoras del DNAc de la hormona de crecimiento bovino*. Tesis de Maestría, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Monterrey, N. L., México.
- Hu, Y., Meng, X. L., Xu, J. P., Lu, W. y Wang, J. (2005). *Cloning and expression of earthworm fibrinolytic enzyme PM₂₄₆ in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 43:18–25.
- Ito, K. y Matsudomi, N. (2005). *Structural characteristics of Hen egg ovalbumin expressed in yeast Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4):755–761.
- Jo, J. M., Lee, T. H., Jeong, H. H., Lee, Y. B., Lee, T. G., Park, Y. W. y Han, K. B. (1996). *Method for the production of porcine growth hormone using a synthetic gene in yeast cells*. United States patent 5,541,086.

- Juge, N., Williamson, G., Puigserver, A., Cummings, N. J., Connerton, I. F. y Faulds, C. B. (2001). *High-level production of recombinant Aspergillus niger cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. FEMS Yeast Research 1:127-132.
- Kataoka, K., Tanaka, K., Sakai, Y. y Sakurai, T. (2005). *High-level expression of Myrothecium verrucaria bilirubin oxidase in Pichia pastoris, and its facile purification and characterization*. Prot. Express. Purif. 41:77-83.
- Koganesawa, N., Aizawa, T., Shimojo, H., Miura, K., Ohnishi, A., Demura, M., Hayakawa, Y., Nitta, K. y Kawanob, K. (2002). *Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from armyworm Pseudaletia separata by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:416-425.
- Kooij, A., Middel, J., Jakab, F., Elfferich, P., Koedijk, D., Feijlbrief, M., Scheffer, A. J., Degener, J. E., The, T. H., Scheek, R. M., Welling, G. W. y Welling-Westera, S. (2002). *High level expression and secretion of truncated forms of herpes simplex virus type 1 and type 2 glycoprotein D by the methylotrophic yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:400-408.
- Kunes, Y. Z., Sanz, M. C., Tumanova, I., Birr, C. A., Shi, P. Q., Bruguera, P., Ruiz, J. A. y Sánchez-Martínez, D. (2002). *Expression and characterization of a synthetic protein C activator in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 26: 406-415.
- Lattard, V., Fondeur-Gelinotte, M., Gulberti, S., Jacquinet, J. C., Boudrant, J., Netter, P., Magdalou, J., Ouzzine, M. y Fournel-Gigleux, S. (2005). *Purification and characterization of a soluble form of the recombinant human galactose- β 1,3-glucuronosyltransferase I expressed in the yeast Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. (Aceptado para su publicación).
- Lefort, S. y Ferrara, P. (1986). *Hydrophobic adsorbants for the isolation and purification of biosynthetic human growth hormone from crude fermentation mixtures*. J. of Chromatography 361:209-216.
- Li, M., Hubálek, F., Newton-Vinson, P. y Edmondson, D. E. (2002). *High-level expression of human liver monoamine oxidase A in Pichia pastoris: comparison with the enzyme expressed in Saccharomyces cerevisiae*. Prot. Express. Purif. 24:152-162.
- Liu, P. T., Ta, T. V. y Villarete, L. H. (2001). *High-yield expression and purification of human interferon α -1 in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 22:381-387.
- Mizutani, K., Okamoto, I., Fujita, K., Yamamoto, K. y Hirose, M. (2004). *Structural and functional characterization of ovotransferrin produced by Pichia pastoris*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 68(2):376-383.
- Mukhopadhyay, U. K. y Sahni, G. (2002). *Production of recombinant buffalo and goat growth hormones from genetically modified E. coli strains*. J. of Biotech. 97:199-212.

- Olson, K. C., Fenno, J., Lin, M., Harkins, R. N., Snider, C., Kohr, W. H., Ross, M. J., Fudge, D., Prender, G. y Stebbing, N. (1981). *Purified human growth hormone from E. coli is biologically active.* Nature 293(5831):408-11.
- Outchkourov, N. S., Stiekema, W. J. y Jongsma, M. A. (2002). *Optimization of the expression of equistatin in Pichia pastoris.* Prot. Express. Purif. 24: 18–24.
- Ouyang, J., Wang, J., Deng, R., Long, Q. y Wang, X. (2003). *High-level expression, purification and characterization of porcine somatotropin in Pichia pastoris.* Prot. Express. Purif. 32:28-34.
- Paramasivam, M., Saravanan, K., Uma, K., Sharma, S., Singh, T. P. y Srinivasan, A. (2002). *Expression, purification, and characterization of equine lactoferrin in Pichia pastoris.* Prot. Express. Purif. 26:28–34.
- Paus, E. J., Willey, J., Ridge, R. J., Legg, C. R., Finkelman, M. A., Novitsky, T. J. y Ketchum, P. A. (2002). *Production of recombinant endotoxin neutralizing protein in Pichia pastoris and methods for its purification.* Prot. Express. Purif. 26:202–210.
- Ribela, M. T., Gout, P. W. y Bartolini, P. (2003). *Synthesis and chromatographic purification of recombinant human pituitary hormones.* J. of Chromatography B. 790:285-316.
- Rolland, D., Gauthier, M., Dugua, J. M., Fournier, C., Delpech, L., Watelet, B., Letourneur, O., Arnaud, M. y Jolivet, M. (2001). *Purification of recombinant HBc antigen expressed in Escherichia coli and Pichia pastoris: comparison of size-exclusion chromatography and ultracentrifugation* J. of Chromatography B 753:51–65.
- Rotticci-Mulder, J. C., Gustavsson, M., Holmquist, M., Hult, K. y Martinelle, M. (2001). *Expression in Pichia pastoris of Candida antarctica lipase B and Lipase B fused to a cellulose-binding domain.* Prot. Express. Purif. 21:386–392.
- Senerovic, L., Stankovic, N., Spizzo, P., Basso, A., Gardossi, L., Vasiljevic, B., Ljubijankic, G., Tisminetzky, S. y Degraissi, G. (2005). *High-level production and covalent immobilization of Providencia rettgeri penicillin G acylase (PAC) from recombinant Pichia pastoris for the development of a novel and stable biocatalyst of industrial applicability.* Biotech. and Bioeng.(Aceptado para su publicación).
- Ševo, M., Degraissi, G., Skoko, N., Ventura, V. y Ljubijankic, G. (2002). *Production of glycosylated thermostable Providencia rettgeri penicillin G amidase in Pichia pastoris.* FEMS Yeast Research 1:271-277.
- Skoog, D. A., West, D. M. y Holler, F. J. (1995). *Química Analítica.* 6^a Edición. McGraw-Hill/Interamericana de México, S.A. de C. V. Estado de México, México.
- Tiselius, A. (1948). *Adsorption separation by salting out.* Arkiv för Kemi, Mineralogi Geologi 26B 1-5.
- Vydac. (2000). *Principles and applications of high-performance ion-exchange chromatography for bioseparations.* The Separation Group, Hesperia, CA. EUA.

- Weatherly, G. T., Bouvier, A., Lydiard, D. D., Chapline, J., Henderson, I., Schrimsher, J. L. y Shepard, S. R. (2002). *Initial purification of recombinant botulinum neurotoxin fragments for pharmaceutical production using hydrophobic charge induction chromatography*. J. of Chromatography A, 952:99–110.
- Yoshimasu, M. A., Ahn, J. K., Tanaka, T. y Yada, R. (2002). *Soluble expression and purification of porcine pepsinogen from Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 25:229–236.
- Zhang, L., Zhao, C., Zhu, D., Ohta, Y. y Wanga, Y. (2004). *Purification and characterization of inulinase from Aspergillus niger AF10 expressed in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 35:272–275.
- Zhang, Y. L., Chen, S. S., Yang, K. G., Su, L., Deng, Y. C. y Liu, C. Z. (2005). *Functional expression, purification, and characterization of human Flt3 ligand in the Pichia pastoris system*. Prot. Express. Purif. 42:246–254.
- Zhong, X., Peng, L., Zheng, S., Sun, Z., Ren, Y., Dong, M. y Xu, A. (2004). *Secretion, purification, and characterization of a recombinant Aspergillus oryzae tannase in Pichia pastoris*. Prot. Express. Purif. 36:165–169.

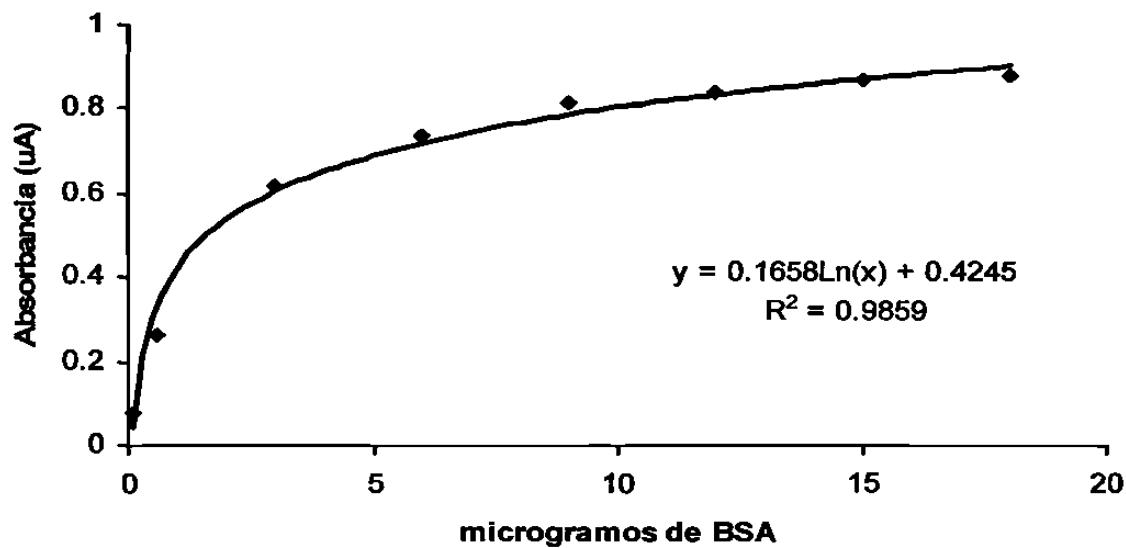
APÉNDICES

A. Datos obtenidos de la absorbancia de los estándares preparados para la curva de calibración empleada para la cuantificación de proteínas totales.

Concentración final del estándar de BSA (μg)	Absorbancia (uA)
0.1	0.081
0.6	0.263
3.0	0.621
6.0	0.736
9.0	0.816
12.0	0.844
15.0	0.872
18.0	0.880

B. Curva de calibración para cuantificación de proteínas totales.

El análisis de la regresión logarítmica correspondiente a la absorbancia en relación con los microgramos teóricos de albúmina sérica bovina en los estándares fue obtenida a partir de los datos experimentales presentados en el Anexo A. Se empleó el programa computacional Microsoft® Office Excel 2003 para obtener la siguiente gráfica, junto con su ecuación de regresión logarítmica y coeficiente de correlación:



$$y = 0.1658\ln(x) + 0.4245$$

$$r^2 = 0.9859$$

C. Promedio de las absorbancias obtenidas en las 6 réplicas del esquema de purificación.

I. Muestra Inicial.

0.847 ± 0.037

II. Cromatografía de intercambio aniónico.

<i>Elución 0M</i>	0.448 ± 0.023
<i>Elución 0M</i>	0.145 ± 0.051
<i>Elución 0.4M</i>	0.621 ± 0.048
<i>Elución 0.6M</i>	0.299 ± 0.069
<i>Elución 0.8M</i>	0.054 ± 0.010
<i>Elución 1.0M</i>	0.006 ± 0.006

III. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.

<i>Elución 1.0M</i>	0.010 ± 0.010
<i>Elución 0.8M</i>	0.027 ± 0.026
<i>Elución 0.6M</i>	0.026 ± 0.028
<i>Elución 0.4M</i>	0.032 ± 0.027
<i>Elución 0.2M</i>	0.078 ± 0.036
<i>Elución 0M</i>	0.417 ± 0.081

IV. Cromatografía de exclusión molecular.

<i>Elución 14 min</i>	0.002 ± 0.004
<i>Elución 16 min</i>	0.067 ± 0.113
<i>Elución 18 min</i>	0.267 ± 0.112
<i>Elución 20 min</i>	0.307 ± 0.082
<i>Elución 22 min</i>	0.125 ± 0.106
<i>Elución 24 min</i>	0.028 ± 0.017
<i>Elución 26 min</i>	0.016 ± 0.009
<i>Elución 28 min</i>	0.008 ± 0.005
<i>Elución 30 min</i>	0.012 ± 0.017
<i>Elución 32 min</i>	0.006 ± 0.004
<i>Elución 34 min</i>	0.013 ± 0.011
<i>Elución 36 min</i>	0.006 ± 0.009

D. Promedio de los microgramos de las muestras analizadas en la 6 réplicas del esquema de purificación basados en la curva de calibración y las absorbancias obtenidas.

I. Muestra Inicial.

912.81 ± 182.82

II. Cromatografía de intercambio aniónico.

<i>Elución 0M</i>	116.27 ± 16.22
<i>Elución 0M</i>	19.28 ± 6.27
<i>Elución 0.4M</i>	338.36 ± 87.67
<i>Elución 0.6M</i>	50.19 ± 18.45
<i>Elución 0.8M</i>	10.73 ± 0.69
<i>Elución 1.0M</i>	8.04 ± 0.31

III. Cromatografía de interacciones hidrofóbicas.

<i>Elución 1.0M</i>	0.82 ± 0.05
<i>Elución 0.8M</i>	0.92 ± 0.15
<i>Elución 0.6M</i>	0.92 ± 0.16
<i>Elución 0.4M</i>	0.95 ± 0.15
<i>Elución 0.2M</i>	1.26 ± 0.30
<i>Elución 0M</i>	64.84 ± 17.89

IV. Cromatografía de exclusión molecular.

<i>Elución 14 min</i>	0.00 ± 0.00
<i>Elución 16 min</i>	0.68 ± 1.33
<i>Elución 18 min</i>	3.93 ± 3.59
<i>Elución 20 min</i>	4.67 ± 2.86
<i>Elución 22 min</i>	1.21 ± 1.57
<i>Elución 24 min</i>	0.14 ± 0.08
<i>Elución 26 min</i>	0.07 ± 0.02
<i>Elución 28 min</i>	0.03 ± 0.01
<i>Elución 30 min</i>	0.05 ± 0.07
<i>Elución 32 min</i>	0.02 ± 0.00
<i>Elución 34 min</i>	0.06 ± 0.04
<i>Elución 36 min</i>	0.02 ± 0.03

Juan Francisco Villarreal Chiu, L.Q.I.

Plutarco E. Calles #345, Res. Periférico, Monterrey, México 66420
Teléfono: (0152) 8352-9447 • Fax: (0152) 8376-5753
E-mail: lqi_juan_chiu@yahoo.com

Educación

Maestro en Ciencias, Biología Molecular e Ingeniería Genética, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.), Monterrey, México, 2006.

Licenciatura, Licenciado en Química Industrial, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L., 2002.

Experiencia Profesional

- **Tesista Investigador, M.C.,** “Desarrollo de un esquema de purificación para la hormona de crecimiento bovina producida por *Pichia pastoris*”. Laboratorio de Biotecnología, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2004-2006.
- **Colaborador,** “Determinación de la repetición CAG en el receptor de andrógenos en pacientes con cáncer de próstata”. Laboratorio de Diagnóstico Molecular, Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2004.
- **Tesista Investigador,** “Obtención de constantes cinéticas de biodegradación de BTEoX y EMTB por un consorcio mixto aclimatado a BTEX”. Laboratorio de Biorremediación Ambiental. Facultad de Medicina, U.A.N.L. 2003.
- **Colaborador,** “Producción, caracterización y determinación de enzimas lignolíticas”. Laboratorio de Enzimología, Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. 2001-2002.
- **Analista Estadístico,** “Programa Ganado Mejor 1999 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1999.
- **Analista Estadístico,** “Programa Mejoramiento Genético 1998 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1998.
- **Analista Estadístico,** “Programa Ganado Mejor 1998 de Alianza para el Campo en Nuevo León”. SAGAR (Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural) y FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la Alimentación). 1998.

Publicaciones

Área de Biorremediación Ambiental

- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Marmolejo, J.G., Garza-Gonzalez, M.T. y Chavez-Gomez, B.: "Effect of soil and a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE biodegradation kinetics," *Water Science and Technology*. 2005: 52(8):107-115. IWA Publishing, Londres, Reino Unido. ISSN: 0273-1223.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P., Barrera-Saldana, H.A. y Chavez-Gomez, B. (2005). *The effect of a nonionic surfactant on BTEOX and MTBE solubility in soil slurries*. En: CONSOIL 2005, Site Characterisation and Risk Assessment. O. Uhlmann, G.J. Annokkée and F. Arendt (Eds.). Forschungszentrum Karlsruhe GmbH, Publishers. Alemania. pp. 1268-1273. ISBN: 3-923704-50-X. Copyright 2005.
- Acuna-Askar, K., Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "BTEoX biodegradation kinetics with MTBE through bioaugmentation," *Water Science and Technology*. 2004: 50(5):75-92. IWA Publishing, Londres, Reino Unido. ISSN: 0273-1223.

Desarrollo Profesional

Trabajos Exuestos en Congresos

- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Acuna-Askar, K., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "Bioremediation of BTEoX and MTBE in soil slurries by a biomass grown in a BTEX-fed batch-reactor," 105th General Meeting of American Society for Microbiology. Atlanta, E.U.A.. Jun. 5-9, 2005.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "The role of a nonionic surfactant on biodegradation efficiency kinetics models of BTEoX and MTBE," 4th World Water Congress and Exhibition. Marrakech, Marruecos. Sep. 19-24, 2004.
- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Acuna-Askar, K., Rodriguez-Sanchez, I.P. and Barrera-Saldana, H.A.: "Aerobic bioremediation of BTEX with MTBE in soil samples," XXXVIII Congreso Mexicano de Química. Ixtapa, México. Sep. 21-25, 2003.
- Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Acuna-Askar, K., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "Aerobic bioremediation of BTEX with MTBE in soil samples," 4^o Congreso Regional Química Industrial. Mayo 27, 2003. Monterrey, México.

Participación en Trabajos Presentados en Congresos

- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Rodriguez-Sanchez, I.P., Barrera-Saldana, H.A. y Chavez-Gomez, B.: "The effect of a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE solubility in soil slurries," 9th International FZK/TNO Conference on Soil-Water Systems (ConSoil 2005). Bordeaux, Francia. Oct. 3-7, 2005.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Marmolejo, J.G., Garza-Gonzalez, M.T. y Chavez-Gomez, B. (2004). "Effect of soil and a nonionic surfactant on BTEoX and MTBE biodegradation kinetics". Proceedings of the 4th International Water Association World Water Congress. Marrakech, Marruecos. Septiembre 19-24, 2004. IWA Publishing, Londres, Reino Unido.
- Acuna-Askar, K., Gracia-Lozano, M.V., Villarreal-Chiu, J.F., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A. (2004). "The role of a nonionic surfactant on biodegradation efficiency kinetic models of BTE-oX and MTBE". Proceedings of the 4th International Water Association World Water Congress. Marrakech, Marruecos. Septiembre 19-24, 2004. IWA Publishing, Londres, Reino Unido.
- Acuna-Askar, K., Villarreal-Chiu, J.F., Gracia-Lozano, M.V., Garza-Gonzalez, M.T., Chavez-Gomez, B., Rodriguez-Sanchez, I.P. y Barrera-Saldana, H.A.: "BTEoX biodegradation kinetics with MTBE trough bioaugmentation," 4th Specialized International Water Association Conference on Assessment and Control of Hazardous Substances in Water (ECOHAZARD 2003). Aachen, Alemania. Sep. 14-17, 2003.

Asistencia a Talleres y Congresos Relevantes

- "Avances recientes en la biología molecular de *Pichia pastoris*", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Abril 4-5, 2006.
- "Bioinformática estructural de las proteínas", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Dic. 12-15, 2005.
- "Estabilidad estructural y espectroscopia de las proteínas", Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Dic. 9-12, 2005.
- "XVII Curso internacional: RNA de interferencia y PCR en tiempo real", Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.A.N.L. Nov. 8-13, 2004.
- "2nd Pan-American Symposium on Neurovirology and AIDS", Pan-American Society for Neurovirology y U.A.N.L. Facultad de Medicina. Mayo 5-7, 2004.
- "Workshop on Scientific Writing: Proposal Application", National Institutes of Health, Harvard Medical School y U.A.N.L. Facultad de Medicina. Mayo 5, 2004.
- "XXV Congreso Latinoamericano de Química", Federación Latinoamericana de Asociaciones Químicas y Sociedad Química de México. Cancún, México. Sep. 22-26, 2002.
- "XXXVI Congreso Mexicano de Química", Sociedad Química de México. Ixtapa, México. Sep. 9-13, 2001.
- "XXXIV Congreso Mexicano de Química", Sociedad Química de México. Monterrey, México. Oct. 17-21, 1999.

Seminarios Impartidos

- *Desarrollo de un esquema de purificación para la hormona de crecimiento bovina producida por Pichia pastoris*, XXIII Congreso Nacional de Investigación Bioquímica, Oct. 29, 2005.
- *Obtención de constantes cinéticas de biodegradación de BTEX y EMTB por un consorcio mixto aclimatado a BTEX*, Escuela de Graduados, Facultad de Ciencias Químicas, U.A.N.L., Oct. 29, 2004.
- *Panel de Investigación*, 5º Congreso Regional de Química Industrial, Mayo 13, 2004.

Experiencia Académica

- **Colaborador del taller**, “Técnicas de Biorremediación”, Laboratorio de Biorremediación Ambiental y Facultad de Agronomía, U.A.N.L., 2003 – 2004.

Premios Recibidos

- **Licenciatura**, Premio a la mejor tesis de investigación en el área de Ciencias Naturales, U.A.N.L., Monterrey, México, 2004.
- Premio Estatal de la Juventud en el área de Protección al Ambiente, otorgado por el Instituto Estatal de la Juventud y el gobernador del Estado de Nuevo León. Monterrey, México, 2004.



