

00551
8



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Programa de Maestría y Doctorado en
Ciencias Bioquímicas

Obtención y Caracterización de Genes que
Codifican para la enzima Alcohol
Deshidrogenasa a partir de la Microbiota del
Pulque

TESIS

que para obtener el título de:

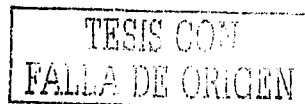
MAESTRA EN CIENCIAS

Presenta:

Georgina Estrada Tapia

Tutor: Dr. Agustín López-Munguía Canales

Cuernavaca, Morelos. Octubre 2003





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Autorizo a la Dirección General de Estudios de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Georgina Estrada

Tapia

FECHA: 10-10-03

FIRMA: C. Estrada

Este trabajo se realizó en el Departamento de Ingeniería Celular y Biotransformación del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección del Dr. Agustín López-Munguía, con la supervisión de la M. C. Ma. Elena Rodríguez y la asesoría de los Drs. Enrique Merino y Alfredo Martínez. El apoyo económico fue otorgado por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (163392).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

A mis padres, por el aprendizaje
en la vida y por todo el cariño.

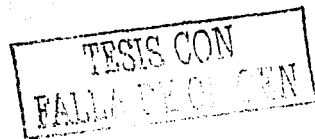
Al Chino, Jorge, Checo, Maggy y
Oscar por crecer a mi lado y
enseñarme tanto.

A mis abuelos por estar ahí
siempre.

A la familia Estrada Calderón, en
especial al Tonyto, con mucho
cariño.

A Alinka, porque te quiero y
extraño mucho.

C



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Agustín López-Munguía por darme la oportunidad de formar parte de su grupo, por la confianza, el apoyo y la disposición para aprender juntos en este proyecto. Fue una grata experiencia.

A los Drs. Enrique Merino, Alfredo Martínez y Adelfo Escalante y a la M. en C. Ma. Elena Rodríguez por sus aportaciones en el desarrollo del proyecto y por contribuir a mi formación.

Al jurado revisor de tesis, por sus críticas, comentarios y sugerencias:

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia
Dr. Agustín López Munguía Canales
Dr. Rafael Vázquez Duhalt
Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Dr. Sandino Estrada Mondaca

Al grupo de etanol (proyecto) por los comentarios y sugerencias para realizar los experimentos.

A los T.L. Fernando González y Aurelia Ocampo por el apoyo técnico durante mi estancia en el laboratorio.

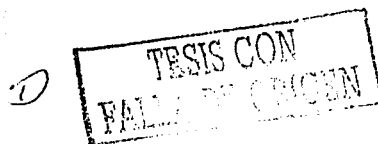
A la fuerza impulsora del laboratorio, mis compañeros: Edmundo, Clarita, Fer, Male, Chelo, Marce, Xoch, Patito, Sandrita, Sandra, Alina, María, Ángela, Rubén, Rebeca, Vero y Doña U. También a los ex: Vanesa, Lolita, Martha y José Luis. A Gus y a la Nuris. Por los consejos, la compañía y por hacer diferente cada día en esta etapa.

A Katya, Cony, Duvalier, Mary, Victor Antonio, Heber, Gaby, Alinita, Milena, los papás de Milena, Enrique y Rubén; a los de Veracruz: Edgar, Angie y Nancy; a Vane, Fer, Lolita y las brujas. Gracias por la amistad.

A mi tía Yola por el apoyo en todo momento.

A las Chus, porque a pesar del tiempo y la distancia siempre serán parte de mi vida.

Nuevamente a Mary, a Angie, a Gaby y a Alina (aunque no viva en la casa), por compartir tanto y por aguantarme cotidianamente.



ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. GENERALIDADES.....	5
2.1 Producción de etanol en <i>Z. mobilis</i> y <i>S. cerevisiae</i>	5
2.2 Cepas etanológicas.....	9
2.3 PDC	14
2.4 ADH	16
2.5 Pulque.....	18
OBJETIVOS.....	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1 Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante	21
3.1.1. Obtención del metagenoma del pulque.....	21
3.1.2. Mutagénesis sitio-dirigida.....	22
3.1.3. Purificación de ADN plasmídico.....	25
3.1.4. PCR.....	25
3.1.5. Transformación de <i>E. coli</i>	28
3.2 Cepas y medios de cultivo.....	28
3.3 Ensayo de actividad ADH.....	29
3.4 Método de screening en colonia.....	31
3.5 Electroforesis de proteínas.....	33
3.6 Análisis de secuencias.....	34
3.7 Purificación de la enzima ADH.....	34
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	35
Primera sección.	
4.1 Diseño y estrategia de clonación.....	36
4.1.1.Región interna del gen <i>adh</i>	36
4.1.2 Construcción del vector de clonación.....	39
4.1.3 Validación de la estrategia de clonación.....	42

Segunda sección.

4.2 Obtención del metagenoma bacteriano de bebidas fermentadas.....42
4.2.1 Adaptación de la técnica de purificación de ADN.....42
4.3 Obtención y clonación de los fragmentos internos del gen.....44
4.3.1 Obtención.....44
4.3.2 Clonación.....44
4.4 Obtención de una ADH en PQ 1.....46
4.4.1 Análisis cuantitativo de actividad ADH.....46
4.4.2 Análisis de las secuencias de los fragmentos clonados.....48

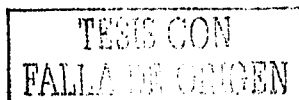
Tercera sección.

4.5 Caracterización cinética.....50
4.5.1 Km y Vmax.....51
4.6. Estudio comparativo de termoestabilidad.....54
4.7. Purificación de la enzima en PQ 1.....54
4.8. Modelamiento de la estructura tridimensional de la ADH en PQ 1.....58

5. CONCLUSIONES.....59

6. PERSPECTIVAS.....60

REFERENCIAS.....61



ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Fig.1 Reacciones que catalizan la PDC y la ADH.....	6
Fig.2 Rutas metabólicas para la producción de etanol en <i>Z. mobilis</i> y <i>S cerevisiae</i> .	6
Fig.3 Esquema de acoplamiento de reacciones para el método de screening.....	32
Fig.4 Representación esquemática del fragmento en pLOI284.....	37
Fig.5 Alineamiento de ADHs.....	38
Fig.6 Esquema para la obtención de pGET666.....	40
Fig.7 Esquema para la obtención del pGET665.....	41
Fig.8 Muestras del metagenoma del pulque.....	43
Fig.9 Fragmentos de 552 pb.....	45
Fig.10 Patrón de restricción de las clonas obtenidas.....	45
Fig.11 Método de screening.....	46
Fig.12 Alineamiento de la secuencia obtenida en PQ 1 y el gen <i>adh B</i>	49
Fig.13 Gráficas de Lineweaver-Burk.....	52
Fig.14 Gráficas de Termoestabilidad.....	54
Fig.15 Purificación de la ADH en PQ 1	56
Fig.16 Diferencias de expresión de ADH en pLOI284 y PQ 1.....	57
Fig.17 Estructura tridimensional de la ADH obtenida en PQ 1.....	58

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1. Condiciones de PCR para la amplificación del vector.....	23
Tabla 2. Oligonucleótidos usados para msd.....	24
Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de fragmentos.....	26
Tabla 4. Oligonucleótidos varios.....	27
Tabla 5. Actividad de las diferentes clonas obtenidas.....	47
Tabla 6. Mutaciones encontradas en el fragmento de PQ 1.....	50
Tabla 7. Concentraciones de los sustratos para la caracterización cinética....	51
Tabla 8. Km y Vmax de la ADH en PQ 1 y la ADH II.....	53
Tabla 9. Tabla de purificación con Sephacryl S-200.....	55

Resumen.

En el presente proyecto, se exploró la biodiversidad microbiológica del pulque, obteniendo genes que codifican para la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta enzima es una de las dos que permiten el flujo de carbono desde piruvato hasta etanol en los microorganismos etanológicos más eficientes que se conocen. Partimos de la enzima ADH II de *Z. mobilis*, ya que es la más eficiente reportada hasta el momento. Utilizando como templado el metagenoma del pulque, y oligonucleótidos específicos para el gen que codifica para la ADH II se amplificaron por PCR fragmentos internos del gen. Por otro lado, se construyó un vector para clonar y expresar los fragmentos amplificados completando un gen "híbrido" que codifica para enzimas funcionales. Para identificar las clonas con actividad ADH se utilizó una técnica colorida en colonia con nitroblue tetrazolium. Las clonas positivas se analizaron verificando el patrón de restricción, la actividad (cuantitativamente) y secuenciando los fragmentos de 552 pb. Se obtuvo una secuencia distinta a la de la ADH II en la clona PQ 1. Se caracterizó cinéticamente dicha enzima en un estudio comparativo con la ADH II, resultando muy similar en términos de su afinidad por los sustratos. Se purificó parcialmente a la enzima por filtración en gel sin embargo, es necesario continuar con otras técnicas de purificación y almacenamiento ya que la inestabilidad propia de la nueva enzima, así como de la ADH II, limitó esta etapa del proyecto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

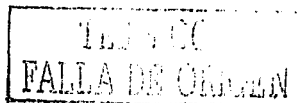
PAGINACION DISCONTINUA

1. - Introducción

Con el continuo agotamiento de las reservas energéticas fósiles conocidas, la investigación ha girado hacia la búsqueda de fuentes alternas de energía renovable.

La producción de etanol como combustible, a través de la biotransformación de residuos orgánicos ha sido una estrategia para reducir el uso de combustibles fósiles. Tradicionalmente el etanol es producido por fermentación de levadura con materiales orgánicos relativamente caros, como el almidón de maíz o el azúcar de caña. Cabe señalar que actualmente se cuenta con tecnologías desarrolladas en Brasil y Estados Unidos, entre otros, en los que se ha puesto en marcha la producción de etanol a gran escala a partir de sacarosa y glucosa con buenos resultados (Berg C., 1999). Sin embargo, el precio por litro de etanol no es aún competitivo con el de la gasolina ya sea por que se prefiere su uso en preparación de bebidas, el uso farmacéutico o industrial, o porque el petróleo está aún disponible. Es de esta manera como surge la necesidad de disminuir los costos de producción.

Por otro lado, con el uso de una tecnología eficiente que permita aprovechar carbohidratos alternativos para la producción de etanol, se contribuye a abatir los problemas de contaminación originados por la combustión de los residuos fósiles. El efecto invernadero es un fenómeno preocupante en la actualidad y evitarlo ha sido uno de los principales objetivos en el desarrollo de tecnologías modernas, debido a las condiciones ambientales lamentables en las que se encuentran sobre todo las grandes urbes del planeta.



Con los avances de la biotecnología, se han desarrollado nuevos sistemas para usar carbohidratos alternativos encontrados en las biomásas generadas por la actividad industrial o la agricultura tales como bagazo de caña, cascarilla de trigo, celulosa, entre otros. Ahora el reto es el diseño de biocatalizadores con los que se obtenga alta eficiencia y por lo tanto rendimientos óptimos en dicho proceso.

Hasta hace poco, la obtención de nuevas y mejores actividades enzimáticas se hacía buscando microorganismos, aislando los genes responsables de dichas actividades y después produciendo y aplicando dichas enzimas en los procesos de interés. Una tendencia emergente consiste en partir del ADN total (*metagenoma*) de un microambiente determinado, para aislar específicamente los genes que codifican para la enzima de interés (Rondon. *et al* 2000). Esta estrategia permite ampliar el universo explorado ya que incluye a los microorganismos que son incapaces de crecer en medios habituales de laboratorio, pero que sí lo hacen en las condiciones silvestres. Una vez obtenidos los genes y producidas las enzimas se prosigue con el uso de técnicas de ingeniería genética e ingeniería de vías metabólicas para la optimización de sus propiedades. En particular, las bebidas alcohólicas fermentadas que se producen en México son un universo explotado sólo de la manera tradicional. Específicamente al Pulque se le considera una bebida rica en biodiversidad con un potencial alto como fuente de nuevas enzimas.

En este contexto, y siendo el metabolismo de hidratos de carbono las vías metabólicas más estudiadas, recordaremos que la glucólisis es una ruta casi universal en las células vivas que convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato con la generación de dos moléculas de ATP. A partir del piruvato encontramos diferencias en el destino del carbono, dependiendo de las condiciones de aereación y del microorganismo del que se trate. La fermentación alcohólica genera etanol a partir de piruvato liberando CO₂. En algunos microorganismos etanológicos esta vía es catalizada por dos enzimas, piruvato descarboxilasa (PDC) (EC 4.1.1.1.) y alcohol deshidrogenasa (ADH) (EC 1.1.1.1.) (Ming-De Deng and Coleman, 1999).

En el presente trabajo se reporta la obtención de una nueva enzima ADH a partir del *metagenoma* bacteriano del pulque, así como su purificación parcial y un estudio comparativo de sus propiedades cinéticas con la ADH-II de *Zymomonas mobilis*.

Es importante visualizar este proyecto dentro de un contexto general, ya que se trata de una colaboración del grupo de Biocatálisis del IBt en un trabajo más amplio, en el que se tiene como objetivo fundamental construir cepas de *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Bacillus subtilis* que produzcan etanol con elevados rendimientos empleando para ello técnicas de Ingeniería de Vías Metabólicas. Se espera poder incorporar nuevas fuentes de carbono como son los hidrolizados ácidos de hemicelulosa. Específicamente, nos enfocamos a la búsqueda de genes y caracterización de las enzimas ADH obtenidas de bebidas tradicionales de México.

2. Generalidades.

La glucólisis (Embden-Meyerhof-Parnas) fue la primera ruta metabólica que se llegó a conocer con detalle y desempeña un papel central en la generación de energía y de intermediarios metabólicos para otras rutas. Los microorganismos fermentativos pueden obtener toda su energía metabólica por este proceso. En condiciones anaerobias la glucólisis ocurre sin oxidación neta de los azúcares sustrato, tal es el caso de los microorganismos que llevan a cabo la fermentación alcohólica. La ingeniería de vías metabólicas permite redirigir una vía determinada hacia la producción de los metabolitos de interés. Por lo anterior, es importante conocer el metabolismo de los microorganismos más eficientes para la transformación del piruvato en etanol.

2. 1.- Producción de etanol en *Zymomonas mobilis* y *Sacharomyces cerevisiae*.

Tanto *Z. mobilis* como *S. cerevisiae* tienen la capacidad de transformar hexosas a piruvato aunque lo hacen por vías distintas. *S. cerevisiae* lo hace a través de la vía Embden-Meyerhof-Parnas y *Z. mobilis* a través de la vía Entner-Doudoroff. El piruvato, tiene numerosos destinos alternativos en los microorganismos fermentativos. Las levaduras y *Z. mobilis*, convierten el piruvato en etanol en una ruta de dos pasos. La fermentación alcohólica comienza con la descarboxilación no oxidativa del piruvato a acetaldehído, catalizada por la PDC. Esta reacción va seguida de la reducción de acetaldehído a etanol, dependiente del NADH (nicotinaminadenin-dinucleótido), catalizada por la ADH. La primera reacción requiere de pirofosfato de tiamina (TPP) como coenzima (fig1).

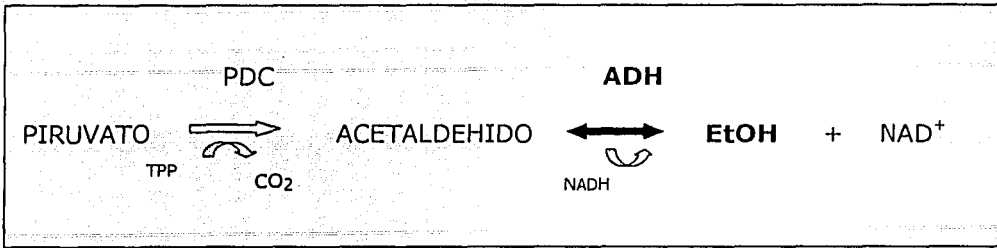


Fig 1.- Reacciones que catalizan la PDC y la ADH.

Zymomonas mobilis es una bacteria gram negativa fermentativa obligada, en la cual el nivel de la fosforilación de sustratos de la glucólisis es la única fuente de energía (Mackenzie, *et al.*, 1989). En este microorganismo, la producción de piruvato es la ruta dominante para la oxidación de NADH permitiendo la conversión del 95% del azúcar fermentado en etanol (Zhang *et al.* 1995). La vía etanológica en *Z. mobilis* es idéntica a la de *S. cerevisiae* y consiste en las dos actividades antes mencionadas (fig. 2).

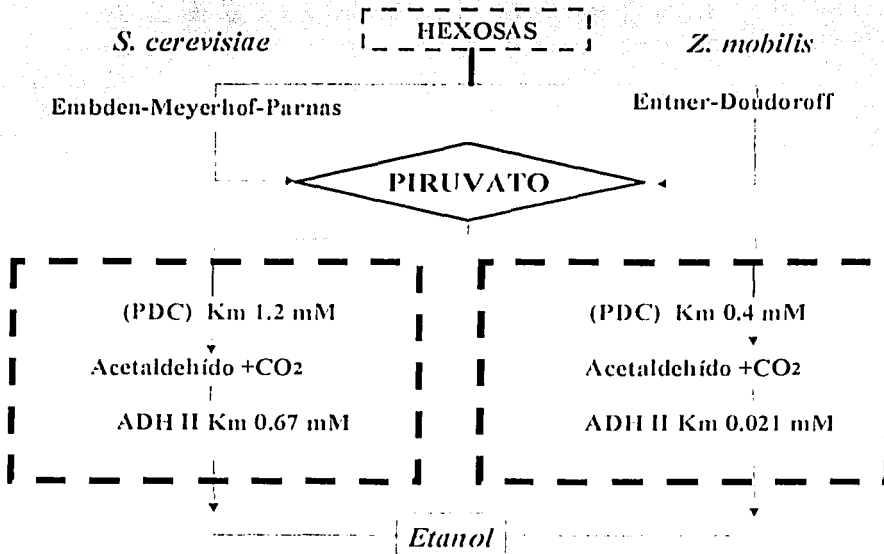


Fig. 2.- Rutas metabólicas para la producción de etanol de *S. cerevisiae* y *Z. mobilis*.

Z. mobilis requiere grandes cantidades de actividad ADH para la oxidación de NADH durante la reducción de acetaldehído a etanol (representando del 2-5% de la proteína soluble). La ADH está presente típicamente en procariotes y eucariotes como isoenzimas. En *Z. mobilis* se han identificado dos. La ADH I es una enzima dependiente de zinc y es similar en varios aspectos a las ADHs de *S. cerevisiae*, hongos y plantas mientras que la ADH II es inusual y es una enzima dependiente de hierro (Mackenzie, *et al.*1989).

Con base en la similitud de secuencia de aminoácidos, la ADH II de *Z. mobilis*, la ADH IV de *S. cerevisiae* y Fuc O de *E. coli* definen una nueva clase de ADHs. El gen para la ADH II se expresa por promotores en "tandem" durante el crecimiento en medio rico y contiene una larga secuencia no traducida la cual se puede plegar en estructuras de tallo y asa. Estas características son similares a las de los genes para las ferritinas eucariotas reguladas por hierro (Mackenzie, *et al.* 1989).

Si se compara con la ADH I la ADH II es la enzima más importante en producción de etanol durante el crecimiento en medios complejos. La síntesis de esta enzima en *Z. mobilis* es constitutiva aún con baja disponibilidad de hierro. Una vez plegada en forma activa esta enzima no es degradada por la célula y persiste casi en los mismos niveles que en condiciones de cultivo con suficiente hierro.

Bajo condiciones aeróbicas una parte del NADH, generado en la vía glicolítica Entner-Doudoroff, es oxidado por la respiración. La cadena respiratoria compete por el NADH con la reacción de ADH. Comparando con las condiciones anaeróbicas, lo anterior provoca un decremento en el rendimiento de etanol y la acumulación de acetaldehído.

Los cultivos anaeróbicos de *Z. mobilis* producen etanol a partir de glucosa con un alto rendimiento, cercano al valor teórico máximo de 0.51 g de etanol producido por g de glucosa consumido. Por el contrario, han sido reportados rendimientos

menores (0.13 g g^{-1}) en aerobiosis. El bajo rendimiento de etanol, así como la acumulación de subproductos más oxidados (acetaldehído, acetona y acetato) indican que en cultivos aerados la mayor parte del NADH está siendo oxidada en la cadena respiratoria (Kalnenieks, *et al.*, 2002).

En la naturaleza *Z. mobilis* se encuentra comúnmente en la savia de plantas donde las cantidades de sales metálicas de hierro y zinc son variables. La disponibilidad de dos isoenzimas (ADH I y ADH II) que utilizan metales diferentes provee una flexibilidad nutricional para el mantenimiento de esta actividad esencial en condiciones limitantes de metales (Mackenzie, *et al.* 1989).

Las bacterias entéricas y algunas levaduras son capaces de fermentar pentosas con rendimientos muy bajos de etanol. Las levaduras que fermentan xilosa (*Pachysolen tannophilus*, *Candida shehatae* y *Pichia stipitis*) no han sido utilizadas exitosamente en procesos a gran escala debido a su sensibilidad a altas concentraciones de etanol, su requerimiento de condiciones microaerófilas controladas, entre otras (Hahn-Hägerdal *et al.*, 1994).

Las vías bioquímicas involucradas en el metabolismo de xilosa son diferentes en las bacterias entéricas y en levaduras. En las bacterias la xilosa isomerasa (XI) convierte la xilosa en xilulosa, la cual después de ser fosforilada, es metabolizada por la vía de las pentosas fosfato (PPP). En levaduras, la xilosa es convertida en xilitol y enseguida en xilulosa en las reacciones catalizadas por la xilosa reductasa (XR) y la xilitol deshidrogenasa (XDH) con NAD(P)H y NAD⁺ respectivamente, actuando como cofactores.

En conclusión, a pesar de que hay microorganismos que han sido utilizados tradicionalmente para la producción de etanol, no existe en la naturaleza el que cumpla simultáneamente con las características indispensables para el aprovechamiento de carbohidratos alternativos como lo son los hidrolizados de

desechos agroindustriales como bagazo de caña, cascarilla de arroz, entre otros. Estos desechos están compuestos principalmente de lignocelulosa la cual al ser hidrolizada da tres fracciones principales: celulosa (~45% en peso seco), hemicelulosa (~30%) y lignina (~25%) (Wiselogel, *et al*,1996). La hidrólisis de la celulosa da glucosa y el disacárido celobiosa. La hemicelulosa es un heteropolímero que contiene residuos como: D-galactosa, L-galactosa, D-manosa, L-rhamnosa, L-fucosa, D-xilosa, L-arabinosa y ácidos urónicos. Por último, la lignina es una macromolécula fenólica producto de la deshidratación de alcoholes monoméricos derivados del ácido p-cinámico; su hidrólisis produce fenoles.

2. 2.-Cepas etanológicas.

Debido a la falta de un microorganismo natural para la fermentación eficiente de sustratos derivados de lignocelulosa, se ha puesto énfasis en la construcción de dicho microorganismo a través de la Ingeniería de Vías Metabólicas. La ingeniería de Vías Metabólicas se define como el mejoramiento de formación de un producto o de las propiedades celulares por medio de la modificación o introducción de nuevas reacciones bioquímicas específicas con tecnologías de ADN recombinante (Bailey 1991 ; Stephanopoulos *et al*. 1998). En este caso nos interesa la vía etanológica a partir del piruvato que llevan a cabo *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*, entre otros. La enzima objeto de nuestro estudio cataliza la reacción necesaria para la conversión de acetaldehído en etanol, después de la descarboxilación no oxidativa del piruvato, llevando el flujo de carbono en esa dirección.

S. cerevisiae y *Z. mobilis* pueden fermentar glucosa, fructosa y sacarosa, aunque no xilosa, arabinosa, manosa o galactosa que se encuentran en los hidrolizados de residuos orgánicos. *E. coli* utiliza los cinco azúcares, dando como productos acetato, formato, lactato, y etanol (Zaldivar J. *et al*. 2001).

La construcción de cepas capaces de producir etanol a partir de lignocelulosa está concentrada en tres microorganismos: *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* y *E. coli*. A

continuación se reportan algunos datos importantes sobre los trabajos realizados al respecto hasta este momento.

Saccharomyces cerevisiae

Puede considerarse a *S. cerevisiae* como el microorganismo etanológico por excelencia ya que cumple con varias de las características requeridas del biocatalizador ideal: una alta productividad y altos rendimientos de etanol, alta tolerancia al etanol y tolerancia a las condiciones del proceso y a pHs bajos. Para la producción a gran escala de etanol a partir de hidrolizados de desechos agroindustriales, las fermentaciones con *S. cerevisiae* se llevan a cabo a pH 5.0 y 30 ° C. Sin embargo, este organismo, no tiene la capacidad de metabolizar pentosas además de sintetizar múltiples productos en el metabolismo de hexosas y presentar menor tolerancia a altas concentraciones de etanol si se compara con *Z. mobilis* (Zaldivar, *et al.* 2001).

Para modificar *S. cerevisiae* con el fin de que pueda fermentar xilosa, la pentosa más abundante en la hemicelulosa, se han llevado a cabo tres estrategias principales: primero, la inserción de los genes bacterianos de xilosa isomerasa; después, la inserción de los genes para utilizar pentosas de *Pichia stipitis*, y por último, el mejoramiento en el consumo de xilulosa, promoviendo la fosforilación en el metabolismo de xilosa a través de la vía PPP.

La inserción de los genes bacterianos de la xilosa isomerasa (de *E. coli*, *B. subtilis* o *Thermus thermophilus*) no le dió a *S. cerevisiae* la capacidad de fermentar la xilosa. Esto se atribuyó a factores tales como: diferencias en el pH intracelular entre bacterias y levaduras, en la capacidad para plegarse de las enzimas, en la capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales, a diferencias en la

formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares y a la ausencia de cofactores o iones esenciales (Sarthy *et al*/1987, Amore *et al*/1989).

La inserción de los genes de XYL1 (xilosa reductasa) y de XYL2 (xilitol deshidrogenasa) de *P. stipitis* habilitan a *S. cerevisiae* para crecer en xilosa, pero produce bajos niveles de etanol; 1.6 g l⁻¹ de etanol a partir de una concentración de 21.7 g de xilosa l⁻¹ (Kötter y Ciriacy, 1993). El bajo rendimiento de etanol se atribuye a tres causas principales: 1) la acumulación de xilitol debido a que no hay un balance de cofactores (NADPH/NAD⁺), 2) la ineficiente vía PPP debido a la insuficiente actividad de enzimas como transaldolasas y transcetolasas y/o 3) la incapacidad de las pentosas para llegar hasta gliceraldehído- 3 fosfato vía PPP (deficiente) y proveer las últimas reacciones de la vía glicolítica reduciéndose así los niveles de etanol.

Deng y Ho (1990) reportan el mejoramiento en el consumo de xilulosa demostrando que la fosforilación es un paso vital para el metabolismo de xilosa a través de la vía PPP. El gen de XKS1 (xilulocinasa) de *S. cerevisiae* y los genes heterólogos de XYL1 y XYL2 (de *P. stipitis*) se insertaron en un huésped híbrido obtenido por la clásica cruce de *S. uvarum* y *S. diastaticus* generando una cepa capaz de crecer en xilosa como única fuente de carbono. Sin embargo, el rendimiento de xilitol es alto debido a que no hay balance entre los cofactores de Xilosa reductasa y Xilitol deshidrogenasa.

Zymomonas mobilis.

En *Z. mobilis* se han llevado a cabo intentos para aumentar su capacidad para asimilar un rango de sustratos mayor, en particular la utilización de pentosas. Al introducir los genes *xylA* (xilosa isomerasa) y *xylB* (xilulocinasa) de *Xanthomonas campestris* y *Klebsiella pneumoniae* en *Z. mobilis* no hubo crecimiento con xilosa como única fuente de carbono debido a la deficiencia de intermediarios para la vía PPP. Sin embargo, al introducir otros genes de la misma vía: *xylA* (xilosa isomerasa) *xylB* (xilulocinasa), *tal* (trasaldolasa) y *tktA* (transcetolasa) de *E. coli*, *Z. mobilis* fue capaz de crecer en xilosa como única fuente de carbono alcanzando el 86% del rendimiento teórico (Zhang *et al.* 1995). Además, se han construido otras cepas de *Z. mobilis* capaces de utilizar L- arabinosa (componente de los hidrolizados de lignocelulosa) con rendimientos hasta del 84% del teórico, no sólo con xilosa, sino con mezclas de azúcares (Deanda *et al.* 1996).

Se transformó una cepa de *Z. mobilis* con un plásmido que contiene los genes *araA* (L-arabinosa isomerasa), *araB* (L-ribulocinasa), *araD* (L-ribulosa-5fosfato-4-epimerasa) *talB* (trasaldolasa) y *tktA* (transcetolasa), de *E. coli*. Esta construcción permitió a la cepa de *Zymomonas* utilizar ambos azúcares a partir de una mezcla alcanzando hasta 84% del rendimiento teórico de etanol. En la actualidad se están haciendo esfuerzos por integrar al cromosoma de *Z. mobilis* los genes antes mencionados, para lograr la estabilidad necesaria de la cepa en los procesos a gran escala.

Escherichia coli.

Se han logrado altos rendimientos, utilizando azúcares provenientes de hidrolizados de hemicelulosa, tanto en *S. cerevisiae* como en *Z. mobilis*. Sin embargo, de igual importancia es la productividad, mejorada en *E. coli*, para procesos industriales. El rendimiento requerido para un proceso costeable es de 1.0 g de etanol/l por h; el cual se ha usado para evaluar las distintas cepas construidas. (Zaldivar *et al.* 2001)

El gen que codifica para la ADH II de *Z. mobilis* ha sido clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* como parte de una vía recombinante para la producción de alcohol, permitiéndole producir etanol y CO₂ a partir de hexosas y pentosas muy eficientemente (Olsson y Hahn-Hägerdal, 1996).

Los primeros estudios demostraron que *E. coli* es capaz de expresar los genes *pdc* y *adh B* (enzimas: PDC y ADH II) de *Z. mobilis* en plásmido, bajo el control de un solo promotor, creando el operón PET (producción de etanol) (Ingram *et al.* 1987) el cual fue introducido en múltiples huéspedes. Sin embargo, con el objetivo de obtener una cepa más estable se integró el operón PET al cromosoma del huésped. Después de un minucioso estudio, la cepa de *E. coli* ATCC 11303 (*E. coli* B) se eligió para la integración por ser la más resistente a condiciones ambientales adversas. En un primer intento, después de la integración, los niveles de *pdc* y *adhB* fueron mucho más bajos que aquellos observados en las construcciones hechas en pUC18 y la redirección del metabolismo del piruvato fue inadecuada (Ingram *et al.* 1987). La selección posterior de cepas de *E. coli* etanológicas por los métodos de genética clásicos indicaron una relación directa entre la expresión de los genes *pdc* y *adhB* y el gen *cat* el cual se encuentra en el extremo 3' en esa construcción (Ohta *et al.* 1991). Utilizando altas concentraciones de cloramfenicol en medio sólido, se obtuvieron colonias de gran tamaño, las cuales expresan los

genes etanológicos en *E. coli* en un alto nivel (Conway, *et al*, 1987). Aún más, cuando estas colonias se analizaron en placas especiales para detectar la actividad ADH presentaron un fenotipo color rojo intenso lo cual facilitó la identificación visual de las cepas que presentan dicha actividad. La clona KO4 fue obtenida de esta manera y fue modificada deletando el gen *frd* (fumarato reductasa) para evitar la producción de succinato.

Posteriormente se construyó una cepa denominada KO11 (proveniente de la KO4) a la cual se integró el operón PET en la región gen *pfl* que codifica para la piruvato formato liasa (PFL). La PFL representa un punto de competencia para la desviación del piruvato por lo que al bloquearla se aumentaría el flujo hacia la vía etanológica, sin embargo se comprobó que en la KO11 no se interrumpió. El gen *pfl* se expresa en altos niveles en *E. coli* por al menos seis promotores, durante el crecimiento anaeróbico. Además dicho gen está bien caracterizado y ha sido clonado y secuenciado. La KO11 tiene mutado *recA* para evitar la recombinación. Como resultado de lo anterior esta cepa tiene una estabilidad de 100% de retención para producción de etanol después de 68 generaciones. (Kazuyoshi, *et al*. 1991).

2.3 Piruvato Descarboxilasa.

La enzima PDC se detectó por primera vez en extractos de levadura en 1911 por Neuberg y Karczag. Esta enzima y su correspondiente secuencia de ADN se ha encontrado en hongos y plantas superiores, pero es relativamente rara en procariones y no se conoce alguna de origen animal. En hongos, se ha reportado en *S. cerevisiae*, *S. carlsbergensis* y *S. uvarum*; *Neurospora crassa* y en los géneros *Kluyveromyces* y *Aspergillus*; *Hanseniaspora uvarum* y *Schizosaccharomyces pombe*. También se ha encontrado en variedad de plantas como maíz, frijol, soya, arroz, entre otros; así como en muy pocos procariones

entre los que están: *Z. mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Clostridium botulinum*, *Zymobacter palmae* (Chandra Raj K, *et al.* 2002), especies de *Acetobacter* y *Erwinia amylovora* (Candy J.M. y Duggleby, 1998). La mejor estudiada de estas últimas y la cual es objeto de estudio en otros proyectos de nuestro grupo es la PDC de *Z. mobilis*, como ya se señaló, esta enzima es la responsable de dirigir el flujo de carbono de piruvato hacia la producción de etanol y es capaz de lograrlo en condiciones anaeróbicas en *E. coli* recombinante compitiendo con la piruvato formato liasa (PFL) y con la lactato deshidrogenasa (LDH) debido a sus propiedades cinéticas que no tienen competencia significativa con dichas enzimas.

La PDC de *Z. mobilis* sigue una cinética normal de Michaelis-Menten con una K_m para el piruvato de 4.4 mM. Es dependiente además de TPP de la presencia de Mg^{+2} lo cual está directamente relacionado con su estabilidad multimérica ya que para ser activa requiere estar en forma de homotetramero (Hoppner y Doelle, 1983).

El gen *pdc* de *Z. mobilis* ha sido aislado y clonado y, como ya se mencionó, la proteína ha sido expresada en *E. coli*. Se ha reportado la purificación de esta enzima, se sabe que es estable y ha sido cristalizada (Dobritzsch *et al.*, 1998), permitiendo el acceso a información importante a nivel molecular y estructural.

Se han llevado a cabo numerosos estudios aplicando la ingeniería genética para mejorar las propiedades de la PDC de *Z. mobilis*. En particular se ha usado la mutagénesis sitio-dirigida para cambiar algunos aminoácidos del sitio activo con el propósito de mejorar sus constantes cinéticas. Sin embargo, sólo se ha logrado estudiar a los aminoácidos importantes en la catálisis sin ventajas reales de las mutantes. También se ha logrado cambiar el rango de productos de esta enzima, lo cual no es relevante para la producción de etanol (Candy JM y Duggleby RG, 1998).

2.4 Alcohol Deshidrogenasa.

Las ADHs son un grupo de oxidoreductasas que requieren NAD(H) o NADP(H) como coenzimas y están presentes en prácticamente todas las formas de vida. A pesar de que estas proteínas tienen una función general similar, la interconversión reversible de alcoholes en aldehídos/cetonas, cada enzima presenta diferencias en cuanto a especificidad de sustratos, lo cual refleja su rol biológico.

La clasificación de las ADHs de acuerdo a su tamaño considera tres grupos: las de cadena corta con aprox. 250 residuos, que no unen iones metálicos y que han sido caracterizadas funcional y estructuralmente en la última década; las de cadena media con aprox. 350 residuos, que en su mayoría unen zinc y han sido caracterizadas a nivel de estructura tridimensional a partir de los 70s; y las de cadena larga que van desde 385 hasta algunos casos de 900 residuos las cuales aún no han sido bien caracterizadas. Las ADHs de cadena media están ampliamente distribuidas en la naturaleza y podemos encontrarlas en bacterias, hongos, plantas, cefalópodos y vertebrados. La ADH de hígado de caballo (HLADH) ha sido una de las más estudiadas por cristalografía de rayos-X, siendo la enzima representativa de esta clase. Esta enzima es un dímero, como todas las ADHs que unen zinc en plantas superiores y mamíferos; mientras que las bacterianas son tetrámeros. Existen varios reportes sobre estudios cristalográficos de las enzimas díméricas, contrastando con sólo tres estructuras resueltas de tetrámeros: la ADH hipertermofílica dependiente de NADP(H) de *Thermoanaerobacter brockii* (TbADH); su análoga mesofílica de *Clostridium beijerinckii* (CbADH) las cuales comparten un 75% de identidad en secuencia y por último la ADH termoacidofílica de *Sulfolobus solfataricus* (SsADH) (Esposito et al. 2002).

Otra clasificación considera dentro de las ADHs de cadena media a un grupo particular de enzimas que no unen zinc sino hierro, que contienen aproximadamente 385 residuos y son las llamadas "activadas por hierro" (Reid y Fewson 1994). Entre estas enzimas encontramos a la ADH de *Z. mobilis* y la ADH IV de *S. cerevisiae*. El tamaño promedio de la subunidad de las enzimas de este grupo es de 40 kDa. La ADH II de *Z. mobilis* tiene un peso molecular de 38 kDa y es un tetrámero. (Neale *et al.* 1986). El valor de K_m para etanol es alto, de 1×10^{-1} M, mientras que para acetaldehído es sólo de 1.5×10^{-3} M lo cual indica que el papel primario es fermentativo, y no oxidativo (Wills *et al.* 1981). La velocidad para la reducción del acetaldehído llevada a cabo por esta enzima es estimulada por la acumulación de etanol contrarrestando la inhibición por producto y la reversibilidad de la reacción (Neale *et al.*, 1986). La ADH II de *Z. mobilis* es muy específica en cuanto a sus sustratos, siendo activa únicamente con etanol, n-butanol y en menor grado con n-propanol y alcohol alílico (Wills *et al.* 1981).

Se han hecho grandes esfuerzos para mejorar tanto los niveles de expresión como las propiedades catalíticas de la PDC y de la ADH de *Z. mobilis* por medio de Ingeniería genética. La estrategia en la que se construyó un operón con ambas enzimas en *E. coli* ha funcionado eficientemente para la producción de etanol a partir de hidrolizados de lignocelulosa pero es importante enfatizar que esta tecnología fue desarrollada en E.E.U.U. y está patentada (patente # 5 000 000). Por lo anterior se considera una prioridad la búsqueda de nuevas enzimas, quizá más eficientes, estables y en general más apropiadas, para aplicarlas al proceso de producción de etanol a partir de azúcares obtenidos de diversas fuentes como lo son los hidrolizados de lignocelulosa.

Aunque la enzima que dirige el flujo de carbono hacia la producción de etanol es la PDC, nos interesa encontrar ADH distintas a las reportadas para desarrollar una tecnología propia en producción de etanol. La tecnología desarrollada en el grupo del Dr. Ingram está patentada y su utilización requiere del pago de regalías. Además, al explorar la biodiversidad de microambientes como lo son las bebidas fermentadas se podrían encontrar enzimas con propiedades biotecnológicamente interesantes.

2.5 Pulque.

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana que se produce por la fermentación de aguamiel obtenida de diferentes especies de maguey (*Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*). Esta bebida es consumida principalmente en los estados del centro del país.

La microbiología del pulque comenzó a estudiarse en los 80's. Los primeros estudios, se enfocaron en el aislamiento e identificación de microorganismos presentes en el aguamiel y en el pulque fermentado de acuerdo con las características fenotípicas y las propiedades celulares observables de dichos microorganismos (Chellapandian, *et al*, 1998; Estrada-Godina *et al*, 2001; Sánchez-Marroquín, 1967; Sánchez-Marroquín *et al*, 1967). Las especies bacterianas identificadas frecuentemente en diversas muestras de pulque comprenden bacterias ácido-lácticas homo- y hetero-fermentativas, una bacteria importante en producción de etanol, *Zymomonas mobilis*, (con al menos once cepas colectadas) y *Leuconostoc mesenteroides*.

El aislamiento e identificación tradicional de cepas bacterianas incluye el cultivo como prerequisite para examinar las comunidades presentes en los microambientes naturales, por lo que muchos microorganismos no pueden ser caracterizados siendo las técnicas de cultivo la limitante. Para contender con este

problema, se han desarrollado recientemente, técnicas moleculares basadas en el análisis de genes específicos con lo cual se han logrado nuevos hallazgos en la ecología microbiana de bebidas fermentadas tradicionales (Escalante *et al*, 2001).

Es importante señalar que debido a que *Z. mobilis* es una bacteria aislada del pulque, y este, a su vez, es una bebida tradicional fermentada de alta distribución en México; se optó por trabajar primeramente con el metagenoma obtenido de muestras de pulque de distintas regiones del país. Sin embargo, también se purificó el metagenoma de tuba y de tesgüino las cuales también son bebidas alcohólicas fermentadas preparadas con savia de palma y con maíz respectivamente pero con una distribución geográfica mucho más localizada; la tuba es originaria de Colima y el tesgüino de Chihuahua.

OBJETIVOS.

General.-

Buscar genes de ADH a partir de zonas homólogas con el gen *adhB* de *Zymomonas mobilis* aprovechando la biodiversidad microbiológica del pulque para obtener enzimas diferentes a las reportadas.

Particular.-

Obtener una ADH a partir del *metagenoma* del pulque para su aplicación en la construcción de cepas etanológicas.

3. Materiales y Métodos.

Todas las enzimas de restricción, DNA ligasa, DNA polimeasa, fosfatasa alcalina, y marcadores de peso molecular fueron de New England Biolabs (Beverly MA. USA), Boehringer Mannheim GmbH (Ohweiler, Germany) o Gibco-BRL (life technology, Rockville, MD. USA) y se utilizaron de acuerdo con las recomendaciones de los fabricantes. Todos los demás reactivos necesarios para el trabajo de microbiología y biología molecular fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Química (Steinheim, Germany), Research Organics Inc.(Cleveland OI. USA), Difco Laboratories (Droit, MI.USA). Todas las manipulaciones de ADN, en general, se realizaron como según describe Ausubel *et al.* (2001).

3.1 Procedimientos genéticos y técnicas de ADN recombinante

3.1.1 Obtención del metagenoma del Pulque.

La técnica para extracción del *metagenoma* de bebidas fermentadas se adaptó en el laboratorio y consiste en lo siguiente:

Soluciones.-

Buffer TE: TRIS-HCl 33 mM, EDTA 1 mM, pH 8.

Buffer TSE: TRIS-HCl 50 mM, sacarosa 0.75 M, EDTA 10 mM, pH 8.

NaCl 5M

Todos los anteriores deben esterilizarse.

SDS 20%

EtOH 70%

Preparados en recipientes estériles con agua estéril.

Se centrifugaron 1000 ml de Pulque a 1000 x g a 4°C por 15 min para separar las levaduras y otras partículas, recuperando el sobrenadante y centrifugando a 23 000 x g a 4° C por 20 min para obtener la fracción bacteriana. Se lavó el precipitado con TE 2 veces usando 100 ml cada vez. Se recuperó en 10 ml de TSE

y se transfirió a un tubo para centrifuga estéril de 50 ml. Se adicionaron 50 μ l de SDS al 20% incubando por 10 min a temperatura ambiente. Nuevamente se centrifugó a 23000 x g a 4°C por 20 min. Se recuperó el precipitado y se resuspendió en 3.5 ml de TSE. Se adicionó lisozima cristalina hasta una concentración de 5mg/ml. Se incubó a 37°C durante 1 h con agitación ocasional. Se adicionaron 0.5 ml de una solución de 10 mg/ml de proteinasa K, homogenizando con vórtex, se incubó a 37°C durante 1 h. Se calentó a 65°C en un baño con agua y se adicionaron 0.25 ml de SDS al 20% permaneciendo 10 min a dicha temperatura. Se refrigeró toda la noche. Se hicieron dos extracciones con un volumen de mezcla de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico (24:24:1) y una con cloroformo-álcohol isoamílico (24:1). Se precipitó con 1/25 de NaCl 5 M y 2.5 vol. de etanol absoluto. Se centrifugó por 15 min a 10 000 rpm y 4°C, se decantó el SN y se resuspendió la pastilla de ácidos nucleicos en 5 ml de agua estéril. Se adicionaron 50 μ l de RNAsa (10mg/ml) y se incubó por 1 h a 37°C. Se repitió el paso de extracciones fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. Se precipitó con 1/25 de NaCl 5M y 2.5 vol. de etanol absoluto. Se centrifugó por 15 min a 10 000 rpm y 4°C lavando con etanol al 70% 3 veces. Se secó la pastilla por evaporación y se resuspendió en agua estéril.

3.1.2 Mutagénesis sitio-dirigida.

En el procedimiento básico se utiliza un vector de ADN doble hebra superenrollado (dsDNA) con el inserto de interés y dos oligonucleótidos sintéticos que contienen la mutación deseada. Los oligonucleótidos inversos y complementarios se amplifican durante varios ciclos a temperatura controlada por medio de una DNA polimerasa de alta fidelidad (*Pfu*, *Vent*, etc.). Durante la incorporación de los oligonucleótidos se produce un plásmido mutado con dos nicks escalonados. Después de los ciclos de amplificación el producto se trata con *Dpn I*. La endonucleasa *Dpn I* tiene como secuencia blanco 5'-G^{m6}ATC-3' y es específica para ADN metilado y hemimetilado digiriendo solamente el ADN parental. Con lo anterior se selecciona

el ADN sintetizado que contiene la mutación. El vector con los dos nicks es introducido a *E. coli* la cual repara los nicks y se obtiene el vector con la modificación deseada.

Esta técnica se llevó a cabo para la modificación del vector pLOI284. El desarrollo de este protocolo se basa en el kit QuickChange™ de Stratagene y se montó la técnica de la siguiente manera:

Se diseñaron dos oligonucleótidos inversos y complementarios para cada mutación. Previamente se analizó la secuencia para determinar la posición a mutar. El objetivo fue crear o eliminar sitios de restricción con una mutación puntual y silenciosa preferentemente. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en la tabla 2.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo con la enzima Deep Vent DNA polymerase (New England Biolabs).

Tabla 1. Condiciones de PCR para la amplificación del vector.

No de ciclos	Etapa	Tiempo	Temperatura
1	desnaturalización	30 s	94°C
	desnaturalización	15 s	94°C
12	alineamiento	4 min	variable ^a
	extensión	4 min	72
1	extensión final	5 min	72

a: La temperatura de alineamiento depende de la T_m de los oligos utilizados. Las T_m de alineamiento variaron entre los 58 y los 68°C.

Tabla 2. Oligonucleótidos usados para msd.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Longitud
Para eliminar el sitio <i>Pst</i> I del pLOI284		
Pstf	CTCTAGAGTCGACCTTCAGGCATGCAAGCTTG	32amero
Pstr	CAAGCTTGCATGCCTGAAGGTCGACTCTAGAG	32amero
Para crear el sitio <i>Eco</i> RI en la región central del gen <i>adhB</i>		
6	CCATACCAGCGAGGAATTCGGCATAAGCCATAGC	34mero
msdeco-546	GCTATGGCTTATGCCGAATTCCTCGCTGGTATGG	34mero
Para crear el sitio <i>Pst</i> I en la región central del gen <i>adhB</i>		
msdspt-546	GGCCTTCCAGAACTGCAGTAACAGTCGGGTTCGG	34mero
5	CCGAACCCGACTGTTACTGCAGTTCTGGAAGGCC	34amero
Para recuperar Q247 eliminando el sitio <i>Eco</i> RI en la región central del gen <i>adhB</i>		
RecEF	CCATACCAGCGAGGAATTGGGCATAAGCCATAGC	34mero
RecER	GCTATGGCTTATGCCCAATTCCTCGCTGGTATGG	34mero
Para crear <i>Eco</i> RI en la construcción del pGET665		
EcocenF	CCAATGGTGGTGAATTCAAAGACTACGAAGG	31amero
EcocenR	CCTTCGTAGTCTTTGAATTCACCACCATGGG	31amero

TESIS CON
A DE C. GEN

3.1.3 Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico de *E. coli* se extrajo a partir de un cultivo de 5 ml que creció durante toda la noche a 37°C y 250 rpm en el medio LB adicionando antibiótico. Las células se colectaron por centrifugación 1 min. a 14000 rpm y se resuspendieron en 1 ml de buffer SET (sacarosa 20%, 50 mM de Tris-HCl pH 7.6 y 50 mM de EDTA) para lavar. Se centrifugaron y resuspendieron en 150 μ l del mismo buffer. Posteriormente se adicionaron 10 μ l de RNasa (10 mg/ml) agitando y 350 μ l de SDS (2 %)/NaOH (0.4 M) 50:50, se mezcló por inversión e incubó en un baño de hielo por 10 minutos. Se agregaron 250 μ l de 3 M de acetato de sodio pH 4.8 y se mezcló antes de incubar en hielo por 30 minutos. Se centrifugó 10 minutos y el SN se transfirió a un tubo limpio, para precipitar se agregó un volumen de isopropanol, se mezcló muy bien por inversión y se centrifugó por 5 minutos a 14000 rpm. La pastilla se lavó con etanol al 70 % y se resuspendió en 30 μ l de buffer TE o agua.

El ADN plasmídico de *E. coli* para secuenciación se extrajo con el Plasmid Mini Kit de QIAGEN siguiendo las indicaciones del proveedor a partir de cultivos de 5 ml crecidos en medio LB adicionados con el antibiótico requerido para cada plásmido.

3.1.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para obtener las amplificaciones por PCR durante el aislamiento de los fragmentos del gen y para la mutagénesis sitio dirigida se utilizó la enzima Deep Vent DNA polymerase (New England BioLabs). Las amplificaciones realizadas para clonar en los vectores TOPO fueron amplificadas con Elongase Enzyme Mix (Invitrogen) la cual deja una A necesaria para la reacción de topoisomerización.

De manera general, las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de reacción de 20 μ l con 100 μ M de dNTP's, 20 pM de oligonucleótidos y 1.5 mM de

Mg²⁺ en el caso de las reacciones realizadas con la enzima *Elongase*, para el caso de las realizadas con *Deep Vent* se utilizó una concentración de 2 mM de Mg²⁺, 1X del buffer indicado por el proveedor de la enzima y agua hasta el volumen deseado. Las reacciones se realizaron en un Termociclador *RoboCycler Gradient 96 Stratagene*.

Los ciclos de amplificación del DNA fueron diferentes de acuerdo con la enzima que se utilizó, la T_m de los oligonucleótidos utilizados en cada caso y el tamaño de los fragmentos a amplificar (tabla 3).

Tabla 3. Condiciones de PCR para la amplificación de los fragmentos de DNA.

No de ciclos	Etapas	Tiempo	Temperatura (°C)
1	Desnaturalización	30 s	94
	desnaturalización	15 s	94
30-35	alineamiento	1 min	variable ^a
	extensión	variable ^b	68 ó 72 ^c
1	extensión final	1 ó 2 min	68 ó 72 ^c

a: La temperatura de alineamiento depende de la T_m de los oligos utilizados. Las T_m de alineamiento variaron entre los 58 y los 68°C.

b: Los tiempos de extensión variaron según el tamaño del fragmento a amplificar. En general se consideró 1min/kb.

Para analizar los productos obtenidos en las PCRs, se corrieron 5 µl de cada uno en geles de agarosa al 0.8%. Los oligonucleótidos utilizados en el presente estudio fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Biotecnología de la UNAM y se listan en las tablas 2 y 4.

c: La temperatura de extensión para la enzima *Elongase* es de 68°C mientras que para *Deep Vent* es de 72°C.

Tabla 4. Subrayadas se muestran las secuencias que reconocen las enzimas de restricción *EcoR1* (GAATTC) y *Pst1* (CTGCAG).

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Longitud
Para el aislamiento los fragmentos del gen <i>adh B</i>		
5	CCGAACCCGACTGTTACTGCAGTTCTGGAAGGCC	34amero
6	CCATACCAGCGAGGAATTCGGCATAAGCCATAGC	34amero
Para amplificar del plásmido pLOI284 excluyendo el fragmento de 552 pb		
7	GGCCGAATTCAGAACTGCAGTAACAGTCGGGTTCGG	37amero
8	GAAGCTATGGCTTATGCCGAATTCCTCGCTGGTATGG	37amero
Para la secuenciación de los fragmentos de 552 pb una vez clonados		
FRPQ-1	CCGGTGTGTGAAGCAGGTTGCTG	24amero
FRPQ-2	GCAGGTTGTAGTAGCCGCCAAC	23amero
Para la clonación del gen híbrido PQ1 y <i>adhB</i> en el vector pBAD/TOPO		
adhPBADR	GAAAGCGCTCAGGAAGAGTTCTTCAAC	27amero

3.1.5 Transformación de *E. coli*.

La cepa *E. coli* DH5 α fue transformada por electroporación en un aparato Micropulser Bio-Rad (bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) en las siguientes condiciones: 2.5 kV, 25 μ F y 200 Ω .

De 2 a 5 μ l de ligación se pusieron en contacto con 100 μ l de células electrocompetentes en una celda de 0.2 mm, después de la electroporación la celda fue puesta en hielo y se agregó 1 ml de medio SOC, las células se transfirieron a un tubo eppendorf y fueron incubadas por 1 h a 37°C y 250 rpm para que se recuperaran. Posteriormente se plaquearon en cajas de LB con el antibiótico adecuado.

Las células químico-competentes de *E. coli* B se transformaron adicionando de 2 a 4 μ l de ADN plasmídico a un tubo con 200 μ l de células. Se incubó en hielo por 30 min, después en un baño a 37 °C sin agitación durante 2 min y por último a temperatura ambiente por 10 min. Se adicionó 1 ml de LB con glucosa al 10% y se incubó a 37°C con agitación por 1 h para que se recuperaran. Se plaquearon de 20 a 50 μ l de cada tubo en cajas de LB adicionado con antibiótico, incubando a 30 °C de 8 a 12 h.

3.2 Cepas y medios de cultivo.

La cepa *E. coli* DH5- α fue utilizada como huésped para las clonaciones realizadas en este estudio. El genotipo de esta cepa es: $\Delta(mcrA)183$, $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$, *endA1*, *supE44*, *tht-1*, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, [F' *proAB*, *lac^z* Δ M15,Tn10(*tet*)]. La cepa creció a 37°C y 250 rpm en medio Luria-Bertani (LB) (Ausubel y col. 2001). El medio se adicionó con 200 μ g/ml de ampicilina o 50 μ g/ml kanamicina cuando así se requirió para mantener los plásmidos, 1.5 % de agar fue adicionado al medio para la preparación de placas.

La cepa *E. coli B* fue utilizada como huésped para producción de las enzimas ADH con las que se trabajó en este estudio.

3.3 Medición de actividad ADH

Una vez transformada *E. coli B* se creció un cultivo de 50ml durante toda la noche a 37°C y 250 rpm en LB adicionando 200µg/ml de ampicilina e IPTG 0.1 mM. Se tomó una muestra y, usando el mismo medio de cultivo, se ajustó la densidad óptica (DO) a 1 medida a 550nm. Se colectó 1ml de dicha suspensión celular y se centrifugó a 10 000 x g por 2 min en tubos eppendorf de 1.5 ml. La DO se midió en un espectrofotómetro Beckman^R DU 650, usando el mismo medio como blanco.

Reactivos:

A.- Solución stock de MES-KOH pH 6.5

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad
3.901g	MES	195.24	20mM
0.407	MgCl ₂ .6H ₂ O	203.31	2mM
2.992	NaCl	58.44	50mM

Se disolvieron las sales en agua destilada, en un volumen cercano a 1 L, ajustando el pH a 6.5 con KOH al 45% y se aforó a 1 L con agua destilada.

B.- Buffer de cosecha.

Se preparó el día que se utilizó, por cada 100 ml de solución stock de MES-KOH se adicionó lo siguiente:

Cantidad	Compuesto	PM	Molaridad	Nombre
0.1762 g	C ₆ H ₈ O ₆	176.2	10mM	ácido L-ascórbico
0.0196 g	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂	392.1	0.5mM	sulfato ferroso de amonio

C. Buffer de permeabilización.

Se preparó adicionando 1 mg de lisozima por ml de buffer de cosecha (MES-KOH).

D. Cloroformo.

Permeabilización.

Se lavó el pellet con 1ml de buffer de cosecha. Se resuspendió en 0.2ml de buffer de permeabilización. Se adicionaron 25 μ l de cloroformo mezclando vigorosamente con vortex por 15s (tres ciclos de mezclado de 4s, descansando 1s). Después de 10min de incubación en hielo, se adicionaron 0.8 ml de buffer de cosecha enfriado en hielo, se midió actividad inmediatamente.

Ensayo de actividad ADH.

A. Buffer de enzima. TRIS-HCl 30 mM pH 8.5.

Cantidad	Compuesto	PM
3.63 g	Trizma base	121.15

Se disolvió la sal en agua destilada y se ajustó el pH a 8.5 con HCl. Se aforó a 1 L.

B. Etanol 1M

PM	Densidad
46	0.8

Se adicionaron 0.288 ml de etanol absoluto por cada 5 ml de buffer de enzima.

C. NAD⁺ 20mM.

Se adicionaron 0.01327 g de NAD⁺ por cada ml de buffer TRIS-HCl.

Los buffers B y C se prepararon el mismo día del ensayo. El NAD⁺ es muy inestable y se usó inmediatamente después de preparar la solución. Se mantuvo en hielo durante las mediciones.

La mezcla de ensayo se preparó en una celda de cuarzo de 1cm. Se adicionaron 850 μ l de la solución de etanol 1M, 50 μ l de buffer de enzima, 50 μ l de la solución de NAD⁺, y 50 μ l del extracto celular. Se mezcló por inversión cubriendo con

parafilm. Se midió absorbancia a 340nm durante 3 min en el espectrofotómetro Beckman^R DU640 usando el método para cinética. Se obtuvo la pendiente en delta A340/min.

Actividad volumétrica.

$$U_{\text{Enzima/ml}} = [(\text{delta}A_{340}/\text{min}) \times (1) / [(6.22) \times (0.1)]]$$

Dónde:

1 = vol. de reacción.

6.22= coeficiente de extinción milimolar del NADH a 340 nm.

0.1 = vol. en ml de extracto celular en la reacción.

Actividad Específica.

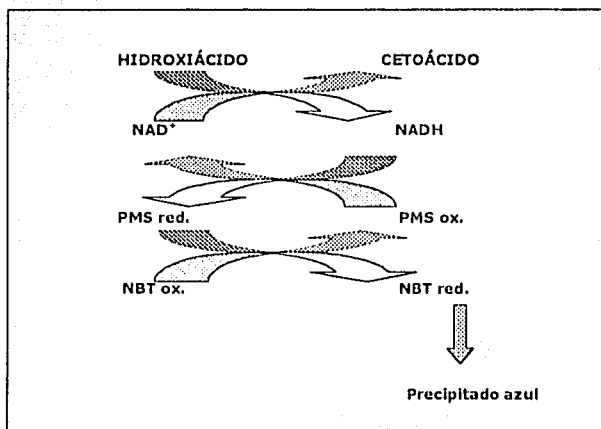
Para determinar la actividad específica, se dividió la actividad volumétrica entre la concentración de proteína, la que a su vez corresponde a $DO_{550} \times 0.23$. La determinación de la concentración de proteínas se realizó por el método de Bradford (1976), utilizando el kit Bio-Rad (Hércules, CA) y albúmina sérica bovina (fracción V, SIGMA), como estándar.

3.4 Método de *screening* en colonia para la actividad ADH.

Dentro de los antecedentes de este trabajo, existe un trabajo realizado por el grupo del Dr. L.O. Ingram en el cual se reporta un método de screening en placa para la actividad ADH (Conway *et al.* 1987). El fundamento de esta técnica es la reacción bien caracterizada del reactivo de Schiff (mezclas de para-rosanilina y bisulfito) par detectar aldehídos. En un principio comenzamos el screening con esta técnica, sin embargo, se presentaron problemas con los controles negativos ya que

todas las colonias desarrollaron la coloración de rosado a rojo en las placas de actividad. Por tal motivo se montó una técnica reportada por El Hawrani *et al* (1996) para identificar la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH). La técnica consiste en acoplar la transferencia de hidrógeno de un sistema NADH/NAD⁺ a otras reacciones redox con metasulfato de fenazina y nitroazul tetrazolio. Se fijan las colonias en una membrana, y se trabaja sobre bases húmedas de nitrocelulosa, las cuales contienen diferentes buffers que permiten lisar las células, lavar y llevar a cabo una reacción de actividad específica para la enzima (ADH en este caso), la producción de NADH reduce al metasulfato de fenazina (PMS) y este a su vez reduce al nitroazul-tetrazolio dando una coloración azul principalmente en los bordes de la colonia. En este caso se uso etanol y NAD⁺ como sustratos para dar especificidad al ensayo.

El esquema general es el siguiente:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3 Esquema de las reacciones de acoplamiento de electrones para detectar la actividad ADH en el screening en colonia con NBT.

Se crecieron en caja las colonias a analizar incubando a 37°C. Se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa la cual fue colocada sobre un papel Whatman 1,

con las colonias hacia arriba a temperatura ambiente. En cajas de petri se colocaron varios filtros de papel Whatman los cuales sirven de soporte para las soluciones a utilizar. El primer buffer (buffer de enzima) fue MES-KOH 20 mM, $\text{pMgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 2 mM, NaCl 50 mM, pH 6.5 adicionando 4mg/ml de lisozima. La membrana se colocó sobre el papel Whatman 1 empapado con el buffer y se incubó a 30°C por 30 min. La membrana se retiró del papel y se colocó sobre otro sin buffer para secarlo. Se lavó la membrana colocándola sobre otro papel mojado con el mismo buffer, esta vez sin lisozima por 5 min. Se secó nuevamente sobre papel Whatman. Finalmente la membrana se colocó sobre papel con el buffer de ensayo el cual contiene Tris 20 mM ajustado a pH de 8.5 con ácido clorhídrico, 1 mM de NAD^+ , 1 mg/ml de nitroblue tetrazolium, 0.5mg/ml de metasulfato de fenazina y etanol 1 M. La membrana en este buffer se incubó en obscuridad detectando el desarrollo de color, de violeta a azul, en presencia de actividad ADH mientras que las colonias sin actividad conservaron la coloración amarilla del buffer de ensayo.

3.5 Electroforesis de proteínas

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo con el método de Laemmli (1970). Se utilizó una cámara Mighty small II, con geles de 1mm de espesor. Un gel concentrador al 4 % precede al gel de separación al 10% y al 12%. Las muestras a analizar se incubaron durante 5 minutos a 95 °C en presencia de una solución de desnaturalización que contiene TRIS-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4 %, glicerol 20 %, β -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.05 %. La migración se efectuó a amperaje constante de entre 30 y 50 mA. Después de la migración el gel siguió el tratamiento de coloración.

El gel se incubó en una solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) y azul de Coomassie (0.2% v/v). Posteriormente se realizaron lavados del gel en una

solución de ácido acético (10% v/v), metanol (30% v/v) para quitar el exceso de colorante.

3.6 Análisis de las secuencias obtenidas

Los alineamientos entre secuencias de amino ácidos se realizaron con el programa Clustal W. Las comparaciones de las secuencias tanto nucleotídicas como de amino ácidos con las bases de datos se realizaron utilizando las distintas versiones Blast (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/).

3.7 Purificación de ADH.

Se purificó la ADH de PQ1 creciendo un cultivo de la cepa en 1 L de LB adicionado con 200 µg/ml de ampicilina e IPTG 0.1mM. Después de crecer toda la noche y alcanzando una DO entre de 3 y 4 medida a 550nm, se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min en tubos para centrifuga estériles de 50 ml. Se lavó con 30ml de buffer de enzima y se centrifugó nuevamente a 10 000 x g por 10 min. Se desechó el SN y las células fueron resuspendidas en 30ml del mismo buffer. Las células se lisaron en la prensa de French, obteniendo aprox. 25 ml de extracto concentrado. Se centrifugó a 10 000 x g por 15 min pasando el SN a un tubo limpio. Se aplicó el SN a una columna de Sephacryl S.200 (26/60), equilibrada con el mismo buffer y eluída con un flujo de 2ml/min. Se colectaron las fracciones con actividad ADH, las cuales fueron dializadas contra el buffer MES-KOH, 20mM, pH 6.6 y aplicadas a una columna de intercambio iónico de DEAE-sefarosa. Las proteínas fueron eluídas con un gradiente lineal de 0-0.15 M de NaCl en buffer MES. El flujo usado fue de 1ml/min. Las muestras con actividad fueron recuperadas y dializadas contra buffer MES adicionado con hierro.

4. Resultados y Discusión

El aislamiento de nuevas o/y mejores enzimas se ha realizado tradicionalmente, obteniendo los microorganismos y posteriormente las enzimas directamente del ambiente. Para ello es necesario analizar y separar una gran cantidad de microorganismos los cuales se seleccionan de acuerdo con el medio de cultivo y las condiciones de este, con este método se excluye a los microorganismos incapaces de crecer en medios de cultivo habituales. Con dicha estrategia más del 99% de la diversidad microbiana no se explora debido a las dificultades para proporcionar las condiciones adecuadas para el crecimiento de muchas especies microbianas. La alternativa es explorar los genomas de la microbiota no cultivable de un ambiente determinado, es decir, aislar y caracterizar el metagenoma (Knietsch, *et al.* 2003) de ese ambiente. Esta alternativa permite la construcción de bibliotecas metagenómicas por extracción directa y clonación de fragmentos del ADN obtenido. Posteriormente los bancos son analizados para obtener los genes de interés. Mediante este procedimiento se han aislado genes que codifican para enzimas biotecnológicamente importantes como: lipasas, celulasas, amilasas, entre otras. Una modificación a dicha estrategia es la que se propone en este trabajo, la cual consiste en aislar fragmentos de los genes de interés y reconstruirlos completando el gen con secuencias conocidas para así obtener enzimas funcionales.

Los resultados se presentan en varias secciones:

En la primera sección se presenta el análisis de las secuencias de ADHs reportadas que se requirió para determinar la región a amplificar, así como el diseño del sistema de clonación y expresión para la reconstrucción de genes de ADHs a partir de los fragmentos obtenidos del metagenoma del pulque.

En la segunda sección, se presenta la purificación del metagenoma y la obtención por PCR de los fragmentos, su clonación y el análisis de las ADHs obtenidas.

En la tercera y última sección, se presenta la caracterización cinética, los trabajos de purificación realizados y el modelamiento de una ADH nueva obtenida con la estrategia desarrollada.

Primera sección.

4.1. Diseño y estrategia de clonación.

Dado que se han reportado varias secuencias de genes que codifican para ADHs, se diseñaron (a partir de estas) oligonucleótidos que permitieran obtener por PCR fragmentos internos de genes *adh* del mayor tamaño posible introduciendo sitios de restricción. Los fragmentos así obtenidos no codifican para proteínas funcionales, por lo que se propuso completar el gen con los extremos amino y carboxilo terminales del gen que codifica para la ADH II de *Z. mobilis*. Para ello se diseñó una estrategia propuesta por el Dr. Enrique Merino Pérez y la M.C. Ma. Elena Rodríguez Alegría y se presenta a continuación:

4.1.1. Región interna del gen *adh*.

Se hicieron alineamientos con las secuencias reportadas para ADHs bacterianas y la del gen *adh B* de *Z. mobilis* (fig 5). Esto permitió determinar la región más grande posible entre secuencias conservadas para obtener un fragmento interno y crear sitios de restricción con una mutación puntual y preferentemente silenciosa. Los sitios de restricción susceptibles de ser creados en las regiones conservadas y que permitieron el diseño para amplificar un fragmento de 552 pb fueron los que cortan las enzimas *Eco* RI y *Pst* I (fig. 4), es importante mencionar que estas enzimas son de uso común por lo que se tiene alta disponibilidad, son muy eficientes y de bajo costo relativo a otras enzimas de restricción. Para generar el sitio *Pst* I se realizó una mutación puntual y silenciosa, sin embargo para *Eco* RI fue necesario introducir la mutación sinónima Q247E (ver fig.5). Es importante

mencionar que la enzima ADH II tiene dos dominios denominados dominio catalítico y dominio de unión a coenzima y el fragmento comprende parte de ambos pero fuera del sitio catalítico y del sitio de unión al cofactor (fig.4).

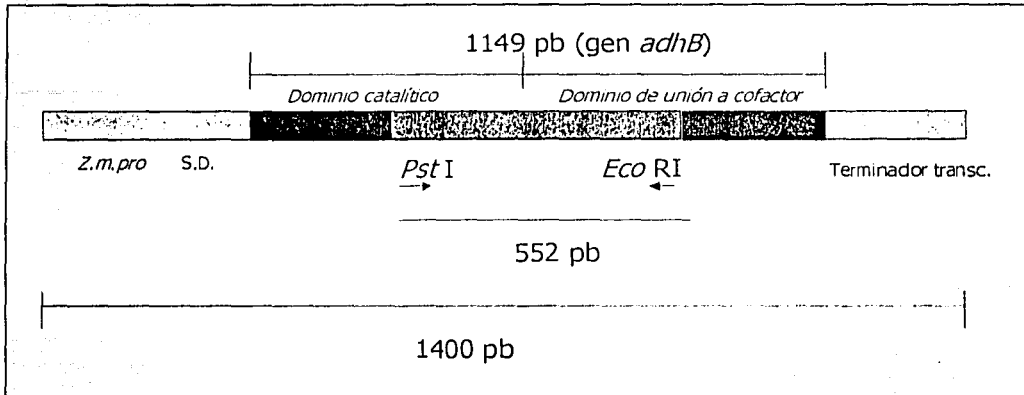


Fig. 4. Esquema del fragmento clonado en el pLOI284. Se señalan la región correspondiente al fragmento de 552 pb y los dominios en los que está dividido el gen *adhB*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

473540	100.0%
1 SW:ADH2 ZYMNO	100.0%
2 SW:ADH2 ECOLI	63.4%
3 SW:ADHF SCHPO	57.4%
4 SW:ADH4 YEAST	53.5%
5 SW:DHAT CITFR	47.8%
6 SW:DHAT KLEPN	47.3%
7 SW:HEDH BACHT	43.9%
8 SW:FUCO ECOLI	41.8%
9 SW:EUTG ECOLI	36.3%
10 SW:GBSB BACSU	36.8%
11 SW:ADH1 CLOAB	37.0%
12 SW:EUTG SALTY	33.2%
13 SW:ADHA CLOAB	27.2%
14 SW:ADHB BACSU	25.8%
15 SW:ADHB CLOAB	26.9%

1 [

NASTFYIFPVHENGESLEKAIKDLNGSFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

-ASSTFYIFPVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

HAASFTFYIFPVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

HPSVAFYIFPVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

MSSVAFYIFPVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

YHREYFLVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

YHREYFLVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

----YHFFIPPSVIFPVHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

MHANRMLLEHANTAYHENGESLEKAIKDLNUSGFKNALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

QIVVTFVUPPVILCOPGSVSOCQQAQITRLKHELVHADSLHQAGHTALRSLFUKGLRHLTLPQCPVPEPCLTDBVCAA

QKHFYFTEITVITRIGTGAENKTEGEEVAALGVSKALIVSDAFHNKSUVVKQVADLLKAQGINSAVYDUMHHPHTVAVLEG

---HHRFTLPRDIYYONGSLEQ-LKLNKKG---RMLVLLGLSHRKEGPEVDEVLGLKREAGIEVKLIEHVEVPEVPEVPEVPEV

QRVTFVUPPVILCOPGSVSOCQQAQITRLKHELVHADSLHQAGHTALRSLFUKGLRHLTLPQCPVPEPCLTDBVCAA

NLSFTXSEFTKVFYFKGKIKDYIGEELKRYGKRVLYVYGGSIKRGGIYDRAVILKREAGIYELSVENPPLIVTKVK

KENTYVTKPLIFGQGLEQLRKYTRRYGKRVLYVYGGSIKRGGIYDRAVILKREAGIYELSVENPPLIVTKVK

HVDFEYSIPTRIFFOKKIHVLQGLKKYGRVLYVYGGSIKRGGIYDRAVILKREAGIYELSVENPPLIVTKVK

01

473540	100.0%
1 SW:ADH2 ZYMNO	100.0%
2 SW:ADH2 ECOLI	63.4%
3 SW:ADHF SCHPO	57.4%
4 SW:ADH4 YEAST	53.5%
5 SW:DHAT CITFR	47.8%
6 SW:DHAT KLEPN	47.3%
7 SW:HEDH BACHT	43.9%
8 SW:FUCO ECOLI	41.8%
9 SW:EUTG ECOLI	36.3%
10 SW:GBSB BACSU	36.8%
11 SW:ADH1 CLOAB	37.0%
12 SW:EUTG SALTY	33.2%
13 SW:ADHA CLOAB	27.2%
14 SW:ADHB BACSU	25.8%
15 SW:ADHB CLOAB	26.9%

1

LKILKDNHSDPVISLGGGSPHD AKALALVATHNGEYKDYEGIDKSKRPAIPLHSINTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LKILKDNHSDPVISLGGGSPHD AKALALVATHNGEYKDYEGIDKSKRPAIPLHSINTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LKILKDNHSDPVISLGGGSPHD AKALALVATHNGEYKDYEGIDKSKRPAIPLHSINTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LKVLEKQNSEVIVS LGGGSAHDAKALALVATHNGEYKDYEGIDKSKRPAIPLHSINTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LAVFRKBCDITVTVGGGSPHD GKGITLAAATHEGDIYSYAGIETITRPLPVAVHTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LAVFRKBCDITVTVGGGSPHD GKGITLAAATHEGDIYSYAGIETITRPLPVAVHTTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

VDFVQKQNDALVS LGGGSPHD TAKAI GLVAAANGGIDBYGVHVEKIVVPPVVAITTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

LGVYQNSADYIYALGGGSPHD TAKAI GLVAAANGGIDBYGVHVEKIVVPPVVAITTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

VAQLRESOCGVYAFGGGSLDAAKAVILLVTRPDSYIAPISEVMEVQPRPLIJAIPPTIAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

SELVYKKEKICNLVAVGGGSPHD TAKAI GLVAAANGGIDBYGVHVEKIVVPPVVAITTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

AEHLRQEPFDYIYALGGGSPHD TAKAI GLVAAANGGIDBYGVHVEKIVVPPVVAITTAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

VAQLRESOCGVYAFGGGSLDAAKAVILLVTRPDSYIAPISEVMEVQPRPLIJAIPPTIAGTASEHTRE 1TDEVRHVK

IEICRENNYDVLVIAGGGSAD SKVIAAGVYEDGNDYMDPDPKSIKVLPEASTLTLASTGSENDQVAVISHMETHK

IEICRENNYDVLVIAGGGSAD SKVIAAGVYEDGNDYMDPDPKSIKVLPEASTLTLASTGSENDQVAVISHMETHK

VKICKENGVYVLAIGGGSAD SKVIAAGVYEDGNDYMDPDPKSIKVLPEASTLTLASTGSENDQVAVISHMETHK

161

473540	100.0%
1 SW:ADH2 ZYMNO	100.0%
2 SW:ADH2 ECOLI	63.4%
3 SW:ADHF SCHPO	57.4%
4 SW:ADH4 YEAST	53.5%
5 SW:DHAT CITFR	47.8%
6 SW:DHAT KLEPN	47.3%
7 SW:HEDH BACHT	43.9%
8 SW:FUCO ECOLI	41.8%
9 SW:EUTG ECOLI	36.3%
10 SW:GBSB BACSU	36.8%
11 SW:ADH1 CLOAB	37.0%
12 SW:EUTG SALTY	33.2%
13 SW:ADHA CLOAB	27.2%
14 SW:ADHB BACSU	25.8%
15 SW:ADHB CLOAB	26.9%

2

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

HAIVDRHVTPHVSVHDP LLMVHPKGLTAATGDALTHAFAYSSSTAATPITDA ALKAASHIAKILKTA DNGKDMAR

241

473540	100.0%
1 SW:ADH2 ZYMNO	100.0%
2 SW:ADH2 ECOLI	63.4%
3 SW:ADHF SCHPO	57.4%
4 SW:ADH4 YEAST	53.5%
5 SW:DHAT CITFR	47.8%
6 SW:DHAT KLEPN	47.3%
7 SW:HEDH BACHT	43.9%
8 SW:FUCO ECOLI	41.8%
9 SW:EUTG ECOLI	36.3%
10 SW:GBSB BACSU	36.8%
11 SW:ADH1 CLOAB	37.0%
12 SW:EUTG SALTY	33.2%
13 SW:ADHA CLOAB	27.2%
14 SW:ADHB BACSU	25.8%
15 SW:ADHB CLOAB	26.9%

3

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

EMAYAYQLFACHAFHNASLGVYHANAHLGUYYNLPHGV HAVLLPHVLAHYASVVAGRKDKGVVHGLDIALGDEKA

TESIS CON
FALLA DE COPIA

473540	100.0%	EATIQAVRDLAASIGIPANLTELGAKKEDVPLLADHALKDA	ALTNPRQGDQKEVEELFLSAF
1 SW: <u>ADH2_ZYMNO</u>	100.0%	EATIQAVRDLAASIGIPANLTELGAKKEDVPLLADHALKDA	ALTNPRQGDQKEVEELFLSAF
2 SW: <u>ADH2_ECOLI</u>	63.4%	EACINAIRLAKKVDYIPAGLRDLRVICEDFAVLATRALKDA	GYTHPIQATWEEIVAIYBAAM
3 SW: <u>ADH2_SCHPO</u>	57.4%	EAAALDRISQLVLEFKYIPHLVPLGVKEDFVBLVDHAMKDA	GATHPYQPTWBEVKAIFKSAH
4 SW: <u>ADH4_YEAST</u>	53.5%	EETIKALIVLNRITNIPANLRELGVKEDFELAEHAKDA	HLTHPVQPTBEQVVAIYKAY
5 SW: <u>DHAT_CITFR</u>	47.8%	ELAIHAIALRLSADIGIPQHLRDLGVKEDFVBLAEHALKDA	GRAFSHPREKHEKEIATIFRQAF
6 SW: <u>DHAT_KLEPN</u>	47.3%	EKATAAATRLSMDIGIPQHLRDLGVKEDFVBLAEHALKDA	GRAFSHPREKHEKEIATIFRQAF
7 SW: <u>MEDH_BACHT</u>	43.9%	ERATVALEUYHKDFGIPSGYAEKGVKEDFELAKNAFEDV	TQSHPRVATVQDIAQITSHAL
8 SW: <u>FUCO_ECOLI</u>	41.8%	RAAVVEAFALRDVVGIPHLRDVGVKEDFALAAQALDDV	TGDNPREATLEDFVELYRITAH
9 SW: <u>EUTG_ECOLI</u>	36.3%	RDAIHAIVSELIAEYVGIGKRLQDVCAFSARICAWAQAALDDY	LRSHPRVATVQDIAQITSHAL
10 SW: <u>GBSD_BACSU</u>	36.8%	KASVRYHDLVDELQVPT-LEEQVSPDHEERLSKRAMDPQTF	GHPRDLNEKAYWLYKRCF
11 SW: <u>ADH1_CLOAB</u>	37.0%	DSLINLVKELNKKMGIPTILKEVGIKEDFELAEHALKDA	TGSHPRVATVQDIAQITSHAL
12 SW: <u>EUTG_SALTY</u>	33.2%	DDAIAAVCELIAEYVQSKRLADGAKVDFHYSAAHAKD--	EXLSAQXPRTATQAGTIDLYBAAG
13 SW: <u>ADHA_CLOAB</u>	27.2%	REAIKPTREYFNSLGIPEKLRVYGIKEDFELAEHALKDA	QAPRHSQIQLSRPTHAEDVLEIFKRSY
14 SW: <u>ADHB_BACSU</u>	25.8%	LEGDKLSAFVTSIGAPSRILADYNECEKLELADIAAKMEH	EGGFNFQKLRKQVLAILEA
15 SW: <u>ADHE_CLOAB</u>	26.9%	HQAIXKTRDFFVREGLPSRLRDVGIKEDFELAEHALKDA	KESVRLGGTIGNLRPVKASEVLIQIFKRSV

Fig. 5. Alineamiento de secuencias protéicas de ADHs. En recuadro rosa, se muestran las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos 5 y 6. Los puntos rosas indican el aminoácido afectado al crear los sitios de restricción *Pst* I y *Eco* RI contemplados en el diseño.

4.1.2. Construcción del vector de clonación.

Para obtener genes funcionales los fragmentos se clonaron en un vector que permite completar el gen con los extremos amino terminal y carboxilo terminal del gen *adhB* de *Z. mobilis*. La fuente del gen *adhB* de *Z. mobilis* usado en este estudio fue el plásmido pLOI284. Este plásmido fue proporcionado por el grupo del Dr. L.O. Ingram y es un derivado del pUC18 que contiene un fragmento de 1.3 kb el cual comienza a 29 pb arriba del ATG y continúa hasta 119 pb después del codón de paro (incluyendo un terminador transcripcional). En el plásmido pLOI284 la expresión del gen esta bajo el control del promotor *lac* de *E. coli*. Dado que este plásmido tiene los sitios de restricción *Pst* I y *Eco* RI fuera del gen el primer paso fue eliminarlos.

Para la construcción del vector de clonación se propusieron dos etapas:

1.- Eliminación de sitios de restricción.

Se inició con una técnica que consiste en cortar, polimerizar y ligar en cada sitio de restricción. Sin embargo, sólo el sitio *Eco* RI se eliminó de esta manera del

pLOI284. Lo mismo se intentó varias veces para *Pst* I sin lograr resultados positivos. Se recurrió a la mutagénesis sitio dirigida (descrita en materiales y métodos) para eliminar dicho sitio. El plásmido así obtenido es el pGET.

2.- Amplificación por PCR.

Una vez eliminados los sitios de restricción *Eco* RI y *Pst* I que se encontraban flanqueando el fragmento de 1.3 kb, se amplificó el plásmido excepto en la región que corresponde al fragmento de 552 pb. Para ello se utilizaron un par de oligonucleótidos, el oligo 7 contiene un sitio *Eco* RI y un sitio *Pst* I y el oligo 8 sólo el sitio *Eco* RI. De esta manera el fragmento amplificado de aprox. 3.5 kb se digirió con *Eco* RI para circularizarlo en el mismo sitio ligando extremos cohesivos y así conservar un sitio *Eco* RI y un sitio *Pst* I, necesarios para la clonación. Este plásmido no contiene el gen completo (fig. 6).

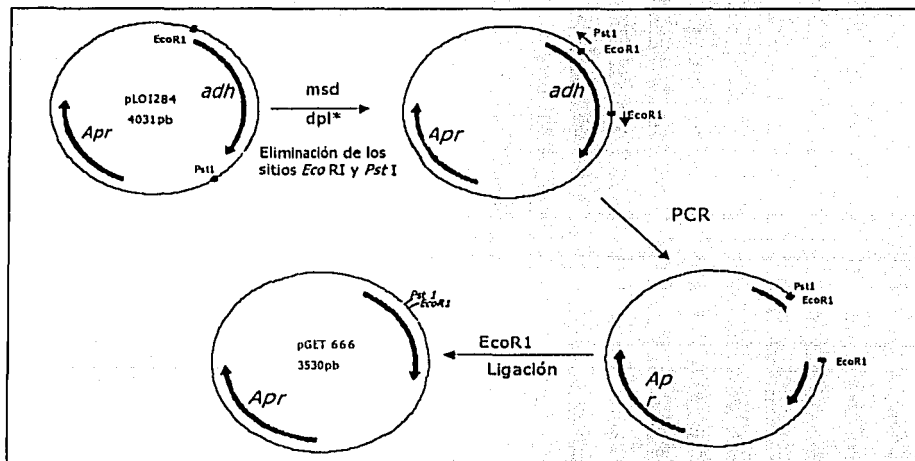


Fig. 6 Esquema que describe la estrategia intentada para la obtención del pGET666. La eliminación de los sitios de restricción se llevó a cabo por mutagénesis sitio-dirigida (*msd*) para *Pst*I y por digestión, polimerización y ligación* (*dpl*) para *Eco*RI.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Esta metodología se siguió con éxito hasta la amplificación por PCR, pero no se logró circularizar el plásmido (pGET666) ya que al transformar no crecieron colonias.

Después de varios intentos, se recurrió a la mutagénesis sitio dirigida. Se diseñaron un par de oligonucleótidos para crear cada uno de los sitios en las posiciones predeterminadas del gen (tabla 2). La creación de los sitios de restricción se corroboró por digestiones. Una vez creados ambos sitios de restricción se liberó el fragmento esperado de 552 pb al hacer una digestión doble con *Eco* RI y *Pst* I. Este plásmido es el pGET664 y es importante hacer énfasis en que contiene el gen completo y al transformar *E. coli* da positivo el ensayo de actividad ADH. Por este motivo se realizó otra ronda de mutagénesis sitio dirigida para crear otro sitio de restricción *Eco* RI dentro del fragmento de 552 pb que permite liberar un fragmento de aprox. 400 pb al digerir sólo con *Eco* RI. Después de digerir se ligó en este sitio para obtener el pGET665 que contiene el gen *adh* B truncado por lo cual no codifica para una ADH funcional evitando el fondo respecto a la actividad del plásmido anterior. La figura 7 muestra el esquema general para la construcción del vector desde el pLOI284.

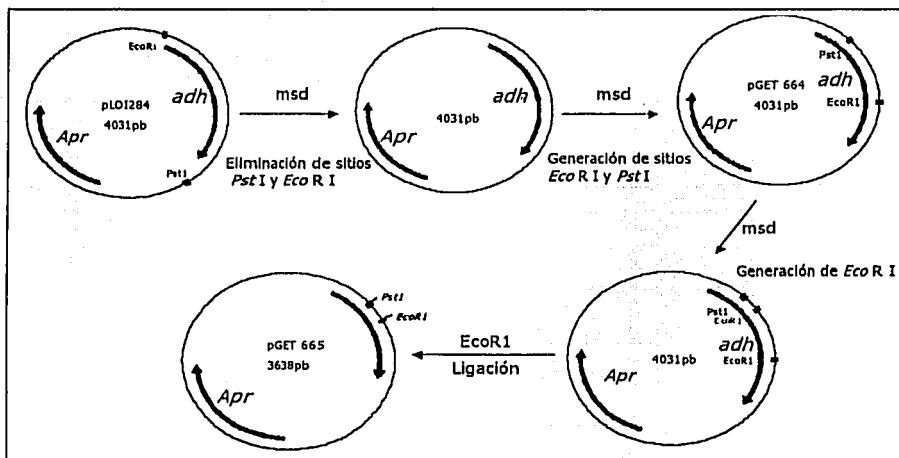


Fig. 7 Construcciones realizadas a partir del pLOI284 para obtener el vector de clonación pGET665 el cual contiene los extremos del gen *adhB* de *Z. mobilis*. Mutagénesis sitio-dirigida= msd

4.1.3. Validación de la estrategia de clonación.

Una vez obtenido el vector de clonación y los fragmentos internos del gen amplificados a partir del ADN cromosomal de *Z. mobilis* (ZM4) y del pLOI284, se clonaron dichos fragmentos para corroborar que se obtendría una proteína funcional después del proceso de obtención de fragmentos de estos templados y, por ende, del metagenoma del pulque lo cual valida la estrategia de clonación. Las clonas obtenidas con los fragmentos de ambos templados fueron sometidas al screening para actividad ADH y se verificó el patrón de restricción con *Eco* RI y *Pst* I en el que se obtienen un fragmento de 552 pb y uno de 3500 pb correspondientes al inserto y al vector respectivamente.

Segunda sección.

4.2. Obtención del metagenoma bacteriano de bebidas fermentadas.

4.2.1 Adaptación de la técnica para la obtención de ADN a partir de bebidas alcohólicas fermentadas.

El método utilizado para la extracción de ADN de muestras ambientales es crítico ya que se debe obtener un ADN representativo de la mayor cantidad de especies en la muestra. En la literatura se han reportado muchos métodos de purificación de ADN cromosomal y se han desarrollado kits comerciales que son rápidos y accesibles. Después de realizar una revisión de los métodos disponibles para fuentes ambientales, alimentos y bebidas fermentadas, se estableció la metodología reportada en materiales y métodos. Cabe mencionar que la separación de la "fracción pesada" (levaduras y restos orgánicos, entre otros) por

centrifugación diferencial se llevó a cabo con el objeto de obtener mayoritariamente ADN de bacterias. Consideramos que la homología que se pudiera encontrar entre bacterias para el fragmento intercambiable permitiría optimizar el ensamblaje en el vector diseñado para la clonación. En la fig. 8 se muestra el patrón electroforético del ADN obtenido de la muestra pulque de Zempoala; también se purificó de tuba, de pulque de Michoacán, Ocotepéc, Pachuca y Huitzilac. La utilizada en este estudio es la que corresponde a pulque de Zempoala.

La técnica utilizada permite obtener aproximadamente $1\mu\text{g/ml}$ de ADN.

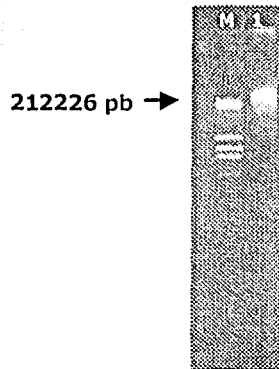


Fig. 8 Electroforesis en gel de agarosa donde podemos observar el metagenoma bacteriano obtenido de: 1.-Pulque de Zempoala 2A.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.3. Obtención y clonación de los fragmentos internos del gen *adh*.

4.3.1. Obtención de los fragmentos por PCR.

Para amplificar los fragmentos de 552 pb a partir del metagenoma bacteriano del pulque, se utilizaron los oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar el fragmento correspondiente al gen *adh B* de *Z. mobilis* (tabla4). El templado utilizado fue el metagenoma obtenido de la muestra 2A (pulque de Zempoala). También se verificó la amplificación con todos los metagenomas purificados en el paso anterior corroborando por lo menos la presencia del gen de *Zymomonas* en todos los casos. Se obtuvo además un fragmento de aprox. 700 pb que no se esperaba, lo cual podría representar la existencia de un gen de mayor tamaño. Tratamos de purificar dicho fragmento para clonarlo a la par del de 552 pb, pero por problemas con la purificación, se dejó como alternativa posterior. En la fig. 9 podemos observar los fragmentos amplificados con el metagenoma del pulque 2A y el control positivo amplificado a partir del ADN cromosomal de *Z. mobilis* (ZM4).

4.3.2. Clonación.

Se obtuvieron varias clonas al ligar los fragmentos de 552 pb (purificados) que se amplificaron a partir de metagenoma bacteriano del pulque y el vector pGET665. Para la reacción de ligación se usó una relación inserto-vector de 4:1. La reacción de ligación se incubó a 16 °C durante 16 horas. A pesar de que se intentaron varias condiciones alternas para llevar a cabo la reacción de ligación no se logró aumentar la eficiencia ya que el mayor número de clonas obtenido por reacción al transformar varió entre 5 y 7. Se verificó el patrón de restricción con *Eco*RI y *Pst*I de cada clona y del pGET664, los cuales se muestran en la fig. 10. Las clonas 14 y 23 no presentaron actividad. El PC3 es un plásmido control en el que se clonó el fragmento de 552 pb amplificado a partir del pLOI284.

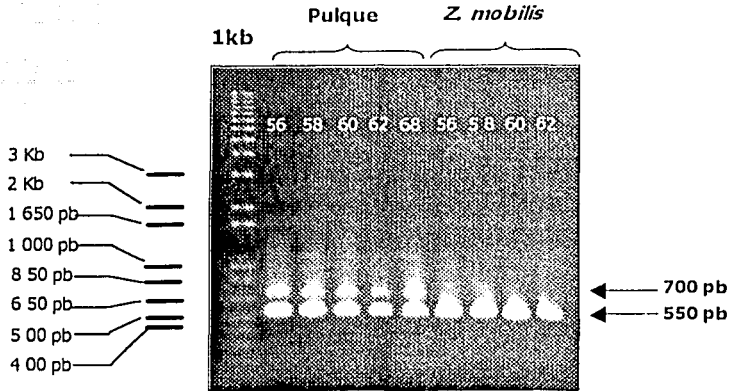


Fig. 9 Electroforesis en gel de agarosa donde se observan los fragmentos amplificados con oligos específicos para el gen *adhB*. La numeración corresponde a las diferentes temperaturas de alineamiento en °C. A la derecha las ampliaciones hechas a partir del ADN cromosomal de ZM4.

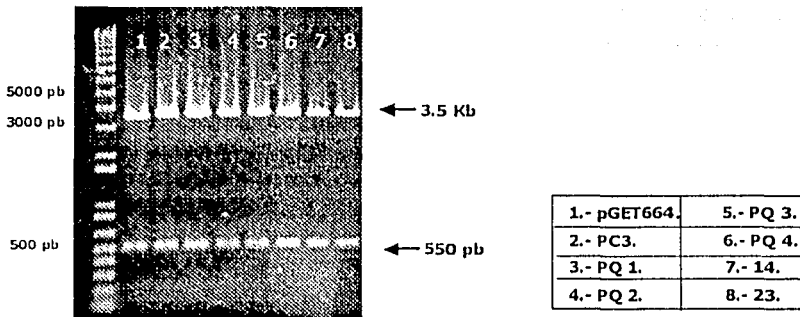


Fig. 10 Patrón de restricción de las clonas obtenidas con el vector de clonación. Las digestiones se hicieron con *Eco*RI y *Pst*I.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.4 Obtención de una nueva ADH en PQ1.

Las 4 clonas obtenidas con actividad ADH al ligar el vector pGET665 y los fragmentos de 552 pb amplificados del metagenoma del pulque fueron identificadas por el método de screening descrito en Materiales y Métodos. En la fig. 11 se muestran las clonas positivas en color azul y el control negativo (*E. coli*) en amarillo (ver controles en Materiales y Métodos).

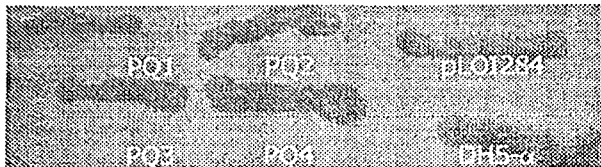


Fig. 11 Fotografía donde se observan las clonas sometidas al método de screening para actividad ADH con NBT (en colonia). La coloración entre azul y violeta indica la presencia de actividad ADH. El control negativo es *E. coli* DH5- α sin plásmido en color amarillo.

4.4.1 Análisis cuantitativo de actividad ADH.

Las clonas obtenidas y los controles fueron analizados cuantitativamente para la actividad ADH según la técnica reportada por Neale *et al* (1986). Cabe señalar que fue necesario transformar *E. coli B* con cada uno de los plásmidos, ya que la reproducibilidad de las mediciones era nula cuando se midió con DH5- α y XL1-blue como huéspedes. El control negativo es la cepa de *E. coli B* transformada con el pGET665. La tabla con las actividades medidas se muestra a continuación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Clona	Actividad específica (U/mg)
pLOI284	2.4 +/- 0.2
pGET665	0.0 +/- 0.01
pGET664	0.83 +/- 0.05
PQ1	0.89 +/- 0.05
PQ2	0.76 +/- 0.05
PQ3	0.73 +/- 0.05
PQ4	0.62 +/- 0.1

Tabla 5. Actividad de las diferentes clonas analizadas. La actividad específica fue calculada con base en la proteína total en el extracto medida por el método de Bradford.

En este punto es importante hacer énfasis en que al medir la actividad de la cepa que contiene el pLOI284 encontramos que ésta es mayor a la del control que contiene el gen *adhB* pero que fue modificado para la construcción del vector (pGET664). A pesar de que contamos con la secuencia del fragmento de 1.3 Kb del pGET664 y no se encontraron diferencias con el pLOI284 (excepto las mutaciones realizadas por mutagénesis sitio dirigida); la actividad cae de 2.4 U/mg a 0.8 U/mg (aprox. nos quedamos con el 30% verificado por experimentos posteriores) con pGET664 cuando la comparamos con la actividad medida en la cepa con el pLOI284 ambos en *E. coli* B. Tratamos de averiguar en que paso de la construcción del vector se perdió la actividad midiéndola en cada modificación y encontramos que sucedió en la última ronda de mutagénesis sitio-dirigida. Este último paso fue el necesario para crear el sitio *Eco* RI en la región interna del gen lo cual coincide con la mutación sinónima Q247E. Sin embargo, se considera que la mutación sinónima no es la responsable de la pérdida de actividad ya que es una mutación que se encuentra naturalmente en otras ADHs, es decir, es una mutación permitida en la naturaleza. Consideramos que pudo presentarse una mutación a nivel del promotor la cual provoca una disminución de la expresión del gen en las construcciones con el pGET665.

4.4.2 Análisis de las secuencias de los fragmentos clonados.

Sabiendo que las cuatro clonas antes analizadas presentaron actividad ADH, el siguiente paso fue secuenciar el fragmento clonado en cada una, para ello se diseñaron un par de oligonucleótidos con base en la secuencia fuera del fragmento. De las 4 clonas identificadas como PQ (1, 2, 3 y 4), se secuenciaron los insertos así como los extremos del gen *adh* del pGET664.

El análisis de las secuencias nucleotídicas muestra que el inserto de PQ 2, PQ 3 y PQ 4 es idéntico a la región correspondiente del gen de *Z. mobilis* (ZM4), mientras que en el inserto de la clona PQ 1 hay cambios en la secuencia de ADN y de proteína (identidad del 92% en ésta última). La comparación entre las secuencias protéicas de la ADH II de *Z. mobilis* y la correspondiente al fragmento clonado en PQ1 se presenta en la fig. 12.

Se puede observar que hay específicamente una región distinta en la proteína ya que cambian varios de los aminoácidos respecto a la ADH II de *Z. mobilis*. Además se analizaron los cambios de la secuencia nucleotídica. El análisis se presenta en la tabla 6. La mayoría de las mutaciones encontradas en el fragmento clonado en PQ1 son silenciosas, por lo que consideramos que el microorganismo al cual pertenece el gen del cual se amplificó este fragmento tiene el mismo uso de codones que *Z. mobilis*. Dentro de la región diferente de la secuencia protéica hay 4 cambios de tipo sinónimo y mutaciones que tienen como consecuencia el cambio de cuatro aminoácidos por otros totalmente distintos. Sin embargo, después de revisar las tablas reportadas de uso de codones de 3 especies de *Zymomonas*, se especula respecto a la procedencia de este fragmento pues lo más probable es que

se trate de un microorganismo del mismo género. Las mutaciones enlistadas en la tabla 6 como "otras" se separaron del resto ya que no se encuentran en la región en la que están la mayoría de las mutaciones en PQ 1. Es importante observar que el efecto de las mutaciones aparentemente no es trascendente ya que conserva la actividad del control y como veremos más adelante los aminoácidos diferentes no afectan el plegamiento, es decir, se conserva la estructura de la enzima ADH II de *Z. mobilis*.

```

PQ1 : KAQGINSAVYDGVMPNPTV TAVLEGLKILKDNNDFV VSLGGGSPHDCAKAIALVAANGG
      KAQGINSAVYDGVMPNPTVT AVLEGLKILKDNNDFV+SLGGGSPHDCAKAIALVA NGG
ZM   KAQGINS AVYDGVMPNPTV TAVLEGLKILKDNNDFVI SLGGGSPHDCAKAIALVATNGG

PQ1 : EVKDYEGIDKSKKPALPLMSINTTAGTASEMTRFCITDEVHRHVKMAIVDRHVTPMVS VNDPLL
      EVKDYEGIDKSKKPALPLMSINTTAGTASEMTRFCITDEVHRHVKMAIVDRHVTPMVS VNDPLL
ZM   EVKDYEGIDKSKKPALPLMSINTTAGTASEMTRFCITDEVHRHVKMAIVDRHVTPMVS VNDPLL

PQ1 : MVGMPKGLTAATGMDALTHAFEAYSSTAATPITDACALKAA ELISKS LKAAC Y NGK NMA
      MVGMPKGLTAATGMDALTHAFEAYSSTAATPITDACALKAA +I+K+LK AC NGK + M
ZM   MVGMPKGLTAATGMDALTHAFEAYSSTAATPITDACALKAA SMIAKNLK.TAC D NGK D MP

PQ1 : AREAMAYA EFLAGMAFNNASLGYV
      AREAMAYA +FLAGMAFNNASLGYV
ZM   AREAMAYA QFLAGMAFNNASLGYV
  
```

Fig. 12 Alineamiento de secuencias protéicas (BLAST) que corresponden al fragmento de 552 pb clonado en PQ 1 y la región correspondiente de la ADH de *Z. mobilis*. En azul los 10 aminoácidos distintos encontrados.

En rojo y con recuadro el inicio y fin de la región correspondiente al fragmento de 552 pb.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Análisis de la región variable de PQ1

Secuencia de ADN: de 1080-1145 (65pb)

Secuencia de proteína: 217-238 (22aa)

Mutaciones silenciosas	Mutaciones sinónimas	Mutaciones (cambio de aa)
217 (L) TTG por TTA	222 (M) ATG por TTG (L)	221 (S) por (E)
218 (K) AAG AAA	224 (A) GCT TCG(S)	229 (T) (A)
219 (A) GCT GCA	226 (N) AAT AGC(S)	232 (D) (Y)
220 (A) GCG GCT	236 (D) GAT AAT(N)	238 (P) (A)
225 (K) AAG AAA		
233 (N) AAC AAT		
234 (G) GGT GGC		
237 (M) TGC TGG		
Se conservan:	Otras :	
	Sinónima	No sin.
223 (I) 230 (A)	93 (I) por (V)	112 (T) por (A)
227 (L) 231 (C)		
228 (K) 235 (K)		

Tabla 6. Mutaciones encontradas en el fragmento de 550 pb. amplificado a partir del metagenoma del pulque y clonado en la cepa PQ1.

Tercera sección.

4.5. Caracterización cinética de la ADH en PQ 1.

La caracterización cinética de la nueva enzima se realizó en extractos celulares de la cepa de *E. coli* B transformada con los plásmidos correspondientes. Las constantes cinéticas se determinaron para las enzimas codificadas en el pLOI284 (ADH II) y en PQ1. Esta enzima lleva a cabo la reacción con dos sustratos y en el

sentido de derecha a izquierda, que corresponde a la oxidación de etanol a acetaldehído, se sabe que tiene un mecanismo bi bi ordenado. Por lo anterior, para las reacciones en las que se midieron velocidades iniciales se mantuvo constante la concentración de NAD^+ variando la concentración de etanol y *viceversa*. Se determinaron las constantes cinéticas para ambos sustratos.

4.5.1. Determinación de K_m y V_{max} .

Las mediciones de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato para cada enzima se realizaron durante 2min, monitoreando cada 10 seg de acuerdo con lo reportado en Materiales y Métodos. Todas las mediciones se llevaron a cabo por duplicado, los promedios de las mismas se muestran en la tabla 7.

Concentración de NAD^+ constante a 1 mM.		
Conc. Etanol. (M)	Actividad PQ 1 ($\mu\text{mol}/\text{min ml}$)	Actividad ADH II ($\mu\text{mol}/\text{min ml}$)
0.85	4.78	9.35
0.425	3.46	6.45
0.3	3.11	5.84
0.085	1.76	2.88
Concentración de Etanol constante a 1 M.		
Conc. de NAD^+ (mM)	Actividad PQ 1 ($\mu\text{mol}/\text{min ml}$)	Actividad ADH II ($\mu\text{mol}/\text{min ml}$)
1	1.85*	9.35
0.5	1.69*	6.37
0.25	1.46*	4.2
0.1	0.77*	2.2

TRABAJADO CON
FALLA DE EQUIPO

Tabla 7. Concentraciones de sustrato utilizadas para determinar las constantes cinéticas de las enzimas producidas en PQ 1 y pLOI284. * Experimento llevado a cabo con un lote distinto de enzima.

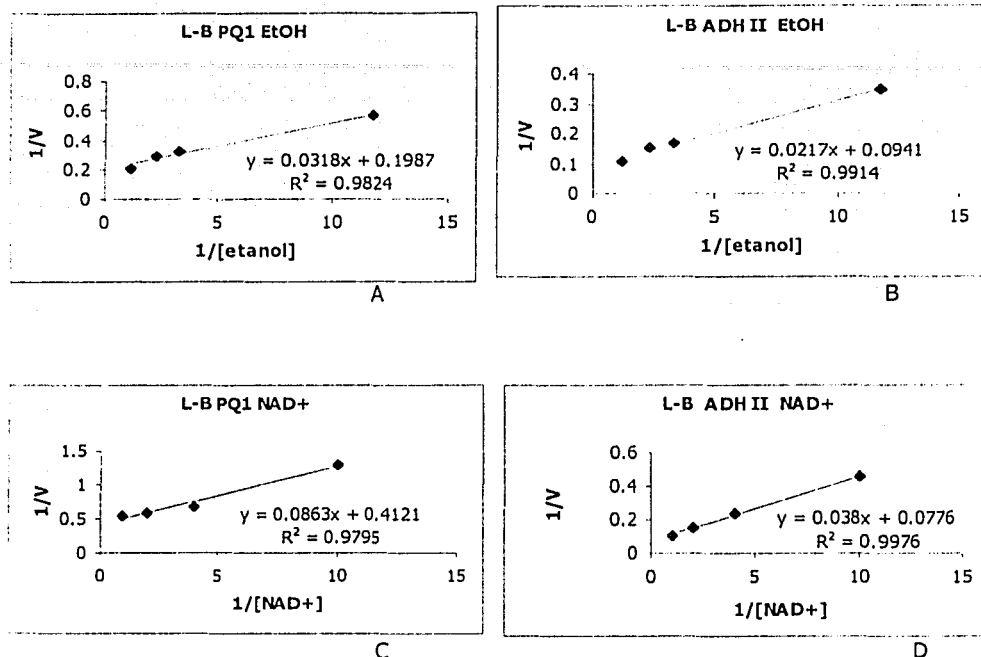


Fig. 13 Gráficas de Lineweaver-Burk para determinar K_m y V_{max} de ambas enzimas con los dos sustratos a 30°C. A y B muestran los datos correspondientes a la enzima de PQ 1 y pLOI284, respectivamente, variando las concentraciones de etanol cuando la concentración de NAD^+ se mantiene constante a 1mM. C y D muestran los datos obtenidos para la enzima de PQ 1 y pLOI284, respectivamente, variando las concentraciones de NAD^+ cuando se mantiene constante la concentración de etanol a 1 M. El valor de b corresponde a $1/V_{max}$ y la pendiente a K_m/V_{max} .

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los valores de K_m y V_{max} procedentes de una regresión lineal de los datos de la fig. 13 se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Constantes cinéticas de las enzimas producidas por las cepas PQ 1 y pLOI284 medidas a 30°C en extractos celulares. Huésped: *E. coli* B. *Experimento llevado a cabo con un lote distinto de enzima.

Cepa	EtOH		NAD ⁺	
	K_m (M)	V_{max} (U/ml)	K_m (M)	V_{max} (U/ml)
pLOI284	2.3×10^{-1}	10.62	4.3×10^{-4}	12.8
PQ 1	1.6×10^{-1}	5.03	2.2×10^{-4}	2.5*

Al comparar los valores obtenidos de K_m para etanol y NAD⁺ en ambas enzimas se encuentran en el mismo orden de magnitud, por lo que se pueden considerar iguales. En cuanto a los valores de V_{max} , también las consideramos equivalentes. Las cinéticas con PQ 1 se llevaron a cabo con diferentes extractos enzimáticos para cada sustrato, en los cuales la concentración de enzima fue distinta por lo que el valor de V_{max} varía. Sin embargo, en ensayos posteriores se corroboró la misma V_{max} con ambos sustratos si la concentración de enzima es la misma.

Los valores de K_m reportados para etanol y NAD⁺ de la ADH II de *Z. mobilis* son de 1×10^{-1} M y 1.44×10^{-4} M respectivamente los cuales se encuentran dentro del mismo orden de magnitud que los valores obtenidos en este estudio para ambas enzimas.

4.5 Estudio comparativo de termoestabilidad.

Se midió la estabilidad a temperatura en extractos enzimáticos a partir de *E. coli B* para la ADH II de *Z. mobilis* y la enzima en PQ1. Encontrando que son idénticas.

La fig.14 muestra el perfil de inactivación de ambas enzimas a 30°C.

Se obtuvo el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) calculado por la ecuación de Arrhenius: $K = A_0 e^{-E_a/RT}$ de la cual $t_{1/2} = \ln 2/K$ fue de 115 min. K es la pendiente cuando se grafican los inversos de la actividad y el tiempo.

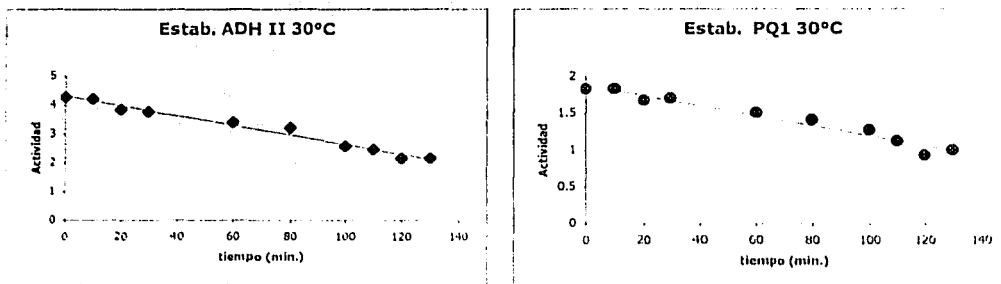


Fig. 14 Inactivación de la ADH II y la enzima obtenida en PQ1 a 30°C.

4.6 Purificación de la enzima en PQ1.

Con la finalidad de purificar la ADH II de *Z. mobilis* y la ADH obtenida en PQ1 en una sola etapa de purificación, se clonaron ambos genes en el pBAD, el cual es un vector de expresión en el cual se lleva a cabo una topoisomerización del fragmento a clonar y pueden fusionarse a tiorredoxina y hexa-histidinas. La tiorredoxina

permite el transporte de la proteína a espacio periplásmico, siendo fácilmente liberada por choque osmótico y la poli histidina permite la purificación en un sólo paso por cromatografía de afinidad. En pBAD la expresión esta regulada por el promotor *araB* el cual es inducible por arabinosa. Al inducir este plásmido de expresión con arabinosa se observó en SDS-PAGE un incremento considerable en la proteína expresada. Sin embargo, al medir actividad, el ensayo dió negativo. Se atribuye la pérdida total de la actividad a la imposibilidad de multimerizarse de la enzima cuando se fusiona a tiorredoxina. Por lo anterior continuamos con los métodos de purificación reportados para la ADH II de *Z. mobilis*.

La purificación de la nueva enzima ADH y de la ADH II de *Z. mobilis* se realizó según el protocolo reportado por Cabiscol y colaboradores (1994). En la primera etapa de purificación (filtración en gel), se obtuvo un factor entre 3 y 4 y una recuperación de la actividad entre 80 y 95% de la inicial. Tales resultados se observan en la tabla 9. Al terminar la segunda etapa de purificación por intercambio aniónico con DEAE se detectó una pérdida casi total de la actividad. No se recuperó adicionando directamente el buffer con Fe ni por diálisis con el mismo buffer. El grado de purificación de la proteína se puede apreciar en la fig. 15.

Tabla 9. Fracciones obtenidas de la columna Sephacryl S200. De las fracciones 20 a 23 se recupera el mayor porcentaje de actividad y las veces de purificación(V.P.).

Fracción	Prot. (mg/ml)	Prot. Tot.(mg)	Actividad (U/ml)	Act. Tot. (U)	Actividad Esp. (U/mg)	Actividad Rec.(%)	V.P.
Extracto	17.7408	35.481	210.102	378.184	11.57	100	1
17	0.0818	0.613	0.003	0.022	0.05	0.005	0.004
18	0.1311	0.983	0.076	0.570	0.93	0.15	0.08
19	0.1846	1.384	1.300	9.750	7.83	2.57	0.66
20	0.2026	1.520	6.770	50.770	36.68	13.42	3.10
21	0.2094	1.570	7.780	58.340	38.40	15.42	3.24
22	0.2183	1.637	6.950	52.130	33.18	13.78	2.80
23	0.2221	1.666	6.650	49.880	30.50	13.20	2.60
24	0.1918	1.438	4.290	32.250	19.30	8.53	1.63
25	0.1797	1.347	2.600	19.500	13.56	5.16	1.15
26	0.1380	1.035	1.400	10.500	7.80	2.80	0.66
27	0.1093	0.819	0.874	6.555	6.33	1.73	0.54
28	0.0899	0.674	0.453	3.397	4.15	0.90	0.35
29	0.0701	0.525	0.234	1.755	2.60	0.46	0.22
Total	-	-	-	-	-	80.53	-

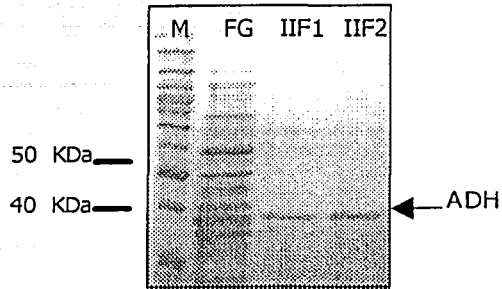


Fig.15 SDS-PAGE donde se observa la banda que corresponde a la ADH de PQ1. El carril señalado como FG corresponde a una fracción obtenida de la columna de filtración en gel. IIF1 y IIF2 son dos fracciones obtenidas de la columna de DEAE-sefarosa.

Para aplicar la muestra a la columna de intercambio aniónico, se requiere dializarla. Para recuperar la actividad, es necesario reincorporar el Fe y ajustar el pH con el buffer de enzima, sin embargo, no se logró recuperar la actividad pero como muestra la figura 15, en este paso se eliminan muchas proteínas del extracto.

Consideramos que la inactivación irreversible se debe a la oxidación de la enzima, a efectos de la carencia de Fe y a la deficiente recuperación del mismo, a nivel molecular, cuando se adiciona buffer con Fe.

Debido a la significativa pérdida de actividad se midió proteína por densidad en gel (píxeles) a muestras recuperadas de la columna sephacryl S-200 (filtración en gel), donde no hay pérdida de actividad, para hacer una estimación de la actividad específica de ambas enzimas. En dicho gel, con muestras tratadas en las mismas condiciones, se observa una diferencia significativa de la cantidad de proteína en las bandas que corresponden a la ADH II de *Z. mobilis* (pLOI284) y la ADH obtenida en PQ1. Esto es interesante porque representa una expresión deficiente del gen *adh* en el vector de clonación (plásmidos pGET664 y pGET665), lo que

explica la actividad menor medida en PQ 1 a pesar de que las propiedades cinéticas de ambas enzimas sean iguales. Las diferencias en la cantidad de enzima expresada en las diferentes cepas se observa en la fig. 16. Los valores de actividad específica midiendo proteína por densitometría en gel son de 109 U/mg para la enzima de PQ 1 y de 313 U/mg para la ADH II a partir de pLOI284. Se considera que los valores de proteína medidos en gel no son reales ya que al comparar las bandas correspondientes a la enzima con las del estándar se aprecia una considerable diferencia que no concuerda con los valores obtenidos. El valor de proteína para la enzima de PQ 1 es de 2.54 μg y para la ADH II (pLOI284) de 3.83 μg .

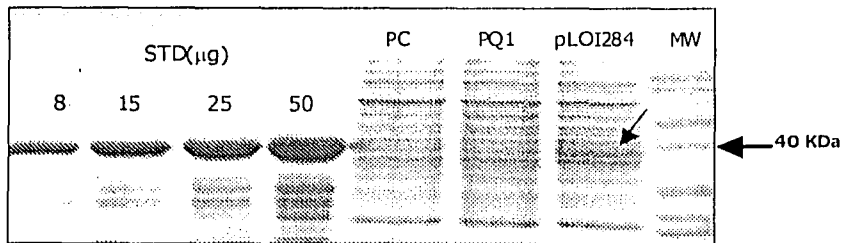


Fig. 16 SDS-PAGE para medir proteína por pixeles. Se corrió como estándar una ADH de levadura con un 90% de pureza. En el carril de la pLOI284 se observa la banda (señalada con la flecha) que corresponde a la ADH de *Z. mobilis* notablemente más intensa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

4.6 Modelamiento de la estructura tridimensional de ADH en PQ 1.

Una vez obtenida la secuencia del fragmento clonado en PQ1 se integró a la de los extremos de la ADH II de *Z. mobilis* y se mandó al servidor SWISS MODEL para encontrar el templado estructural más cercano y hacer un modelamiento entre ambas estructuras. Se encontró que la mayor similitud se presenta con la ADH de *Thermotoga maritima* con la cual se llevó a cabo el modelamiento. En la fig. 17 se muestra el monómero plegado con base en la estructura de la ADH de *Thermotoga maritima*. La región en la que se encuentran la mayoría de los cambios (fig. 17 en gris) se ubica en una α -hélice y un loop de la enzima. Es importante señalar que en realidad la enzima es activa como tetrámero, y que con este modelamiento no podríamos conocer las interacciones de las cadenas laterales de los aminoácidos que cambian cuando se trata de un tetrámero, es decir, si se llevan a cabo de la misma forma que en la ADH II de *Z. mobilis*. En el modelamiento se hace evidente que la región distinta de PQ 1 no es parte del sitio activo.

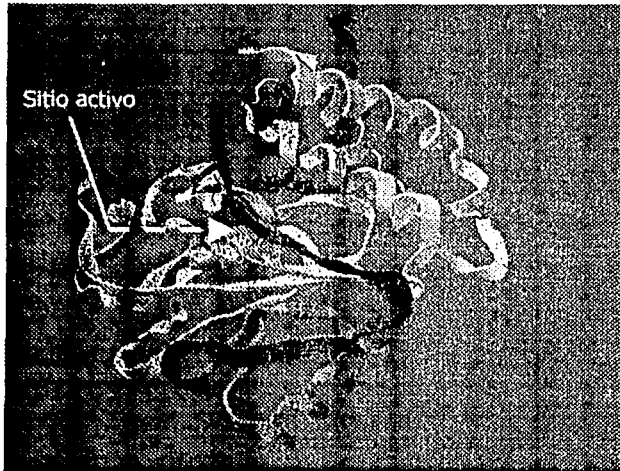


Fig. 17 Plegamiento encontrado para el monómero de la ADH en PQ1 modelado con la estructura de la ADH de *Thermotoga maritima*. En color gris está la parte de la hélice y el loop en los que caen las mutaciones. En rojo tenemos el resto que corresponde al fragmento de 552 pb y en azul los extremos que se conservan de la enzima de *Z. mobilis*.

Conclusiones.

Empleando una estrategia que consiste en explorar el *metagenoma* bacteriano de bebidas alcohólicas fermentadas con base en la ADH II de *Zymomonas mobilis* se obtuvo una nueva enzima que difiere en 65 nucleótidos y 10 aminoácidos respecto a la ADH II con parámetros cinéticos semejantes según quedó demostrado con el estudio realizado con la enzima purificada parcialmente. Con esta estrategia se aislaron 4 clonas de *E. coli* B con actividad ADH después de someterlas al escrutinio de las cuales la denominada PQ1 contiene la enzima antes mencionada.

El modelamiento realizado con la secuencia de la nueva enzima muestra que se conserva la estructura de la ADH II de *Zymomonas mobilis* lo cual concuerda con los resultados obtenidos en el estudio cinético y de termoestabilidad ya que como se señaló sus propiedades son semejantes.

Para lograr este objetivo fue necesario desarrollar una metodología para el escrutinio de las clonas obtenidas que presentaron actividad ADH basado en un método colorimétrico con NBT. De igual forma, se adaptó una metodología para la purificación de ADN cromosomal bacteriano a la microflora de bebidas alcohólicas fermentadas.

Para la obtención de los genes, se amplificaron a partir del metagenoma obtenido, fragmentos internos de 552 pb con oligonucleótidos específicos para el gen *adhB* de *Zymomonas mobilis* los cuales fueron clonados en el vector derivado del pLOI284 denominado pGET665 y expresados en *E. coli* B. Además del fragmento de 552 pb se amplificó un fragmento de aprox. 700 pb el cual queda por estudiar. Dicho fragmento podría pertenecer a una enzima de mayor tamaño, por lo que podría ser incluida como una perspectiva derivada de este proyecto.

6.- Perspectivas.

Con el antecedente de que la estrategia de búsqueda de genes y de clonación funciona, se podría continuar explorando la biodiversidad que se encuentra en las bebidas fermentadas tradicionales de México. Primero, tratando de hacer eficiente la clonación, en particular probando más condiciones de ligación. Después amplificando los fragmentos de 552 pb con oligonucleótidos degenerados.

El fragmento de 700 pb que se logró amplificar es una opción interesante, ya que podría representar una ADH diferente, de mayor tamaño.

Los avances logrados para la purificación de las ADHs nos permiten continuar hacia la búsqueda de alternativas como último paso de purificación particularmente se propone la cromatografía de afinidad. Aunque la prioridad es evitar la inactivación de la enzima. Una opción muy atractiva es la clonación en pBAD sin tiorredoxina, sólo con poli-histidina, ya que al clonar los genes que codifican para ambas enzimas se pierde totalmente la actividad considerando que esto se debe a imposibilidad de multimerizarse. La poli-histidina permitirían la purificación en una sola etapa. Otra ventaja sería la cantidad de enzima que se produce al inducir el pBAD con arabinosa.

Considerando que la cantidad de proteína que se expresa en PQ 1 es considerablemente menor a la que se expresa con el pLOI284 la clonación de ambos genes en un plásmido de expresión (para asegurar la misma cantidad de proteína expresada) permitiría una comparación más real de sus propiedades.

La enzima obtenida podría aplicarse para la construcción de cepas etanológicas, sin pagar regalías, en *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces cerevisiae* sustituyendo a la ADH II de *Z. mobilis*.

Referencias.

- Amore R., Wilhelm M., Hollenberg C.P. (1989) The fermentation of Xylose- an analysis of the expression of *Bacillus* and *Actinoplanes* xylose isomerase genes in yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol. **30**: 351-357.
- Ausubel, F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G., Smith J.A. and Struhl. (2001). Current protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, Inc. USA
- Bailey J.E., (1991). Towards a science of metabolic engineering. Science. **252**:1668-1674.
- Bradford M., (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. **72**:248-284.
- Berg C. (1999). World ethanol production and trade to 2000 and beyond. <http://www.distill.com/berg/>
- Cabiscol E., Aguilar J., Ros J. (1994). Metal-catalyzed oxidation of Fe²⁺ Dehydrogenases. J. Biol. Chem. **269**:6592-6597.
- Candy J.M., Duggleby R.G., (1998). Structure and Properties of pyruvate decarboxylase and site-directed mutagenesis of the *Zymomonas mobilis* enzyme. Biochimica et Biophysica Acta. **1385**:323-338.
- Chandra Raj K., Talarico L.A., Ingram L.O., Maupin-Furlow J.A., (2002). Cloning and characterization of the *Zymobacter palmae* pyruvate decarboxylase gene and comparison to bacterial homologues. Appl, Environ. Microbiol. **68**:2869-2876.
- Chellapandian M., C. Larios, M. Sánchez-González and Agustín López-Munguía. (1988). Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from 'pulque' a traditional Aztec alcoholic beverage. J. Indus. Microbiol. **21**:51-56.
- Claasen P.A.M., van Lier J.B., Lopez-Contreras A.M., van Niel E.W.J., Sijtsma L., Stams A.J.M., de Vries S.S., Weusthuis R.A., (1999). Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. Appl. Microbiol. Biotechnol. **52**:741-745.
- Conway T.C., Sewell G.W., Osman Y.A., Ingram L.O., (1987). Cloning and nucleotide sequencing of the alcohol dehydrogenase II gene from *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. **169**:2591-2597.
- Deanda K., Zhang M., Eddy M., Picataggio S., (1996). Development of an arabinose-fermenting *Zymomonas mobilis* strain by metabolic pathway engineering. Appl. Environ. Microbiol. **62**:4465-4470.
- Deng X.X., Ho N.W.Y., (1990). Xylulokinase activity in various yeasts including *Saccharomyces cerevisiae* containing the cloned xylulokinase gene. Appl. Biochem. Biotechnol. **24/25**:193-199.

- Dobritzsch D., König S., Scheneider G., Lu G.,** (1998). High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from *Zymomonas mobilis*. *J. Biol. Chem.* **273** (32):20196-20204.
- EI Hawrani A.S., Sessions R.B., Moreton K.M. and Holbrook J.J.** (1996). Guided evolution of enzymes with new substrate specificities. *J. Mol. Biol.* **264**:97-110.
- Esposito L., Sica F., Raia C.A., Girdano A., Rossi M., Mozzarella L., Zagari A.,** (2002). Crystal structure of the alcohol dehydrogenase from hypertermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus* at 1.85 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **318**:463-477.
- Escalante A., C. Wachter, and A. Farrés.** (2001). Lactic acid bacterial diversity in the tradicional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *Internat. J. of Food Microbiol.* **64**:21-31.
- Estrada-Godina A.R., A.E. Cruz-Guerrero, P. Lappe, M. Ulloa, M. García-Garibay and L. Gómez-Ruíz.** (2001). Isolation and identification of killer yeast from *Agave* sap (aguamiel) and pulque. *J. of Indust. Microbiol. Biotech.* **17**:557-560.
- Hahn-Hägerdal B., Jeppsson H., Skoog K., Prior B.A.** (1994). Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeast. *Enzyme Microb. Technol.* **16**:933-943.
- Hoppner T.C., Doelle H.W.,** (1983). Purification and kinetic Characteristics of pyruvate decarboxylase and ethanol dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in relation to ethanol production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **17**:152-157.
- Ingram L.O., Conway T.,** (1988). Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:397-404.
- Ingram L.O., Conway T., Clark D.P., Sewell G.W., Preston J.F.,** (1987). Genetic engineering of ethanol production in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2420-2425.
- Kalnenieks U., Galinina N., Toma N.N., Marjutina U.,** (2002). Ethanol cycle in an ethanologenic bacterium. *FEBS* **522**:6-8.
- Kazuyoshi O., Beall D.S., Mejia J.P., Shanmugam K.T., Ingram L.O.,** (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:893-900.
- Kinoshita S., T. Kakizono, K. Kodota, K. Das and H. Taguchi.** (1985) Purification of two dehydrogenases from *Zymomonas mobilis* and their properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**:249-254.
- Knietsch A., Waschowitz T., Bowien S., Henne A., Daniel R.** (2003). Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:1408-1416.

- Kötter P., Ciriacy M.,** (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. **38**:776-783.
- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**:680-685.
- Mackenzie K.F., Eddy C.K., Ingram L.O.,** (1989). Modulation of Alcohol dehydrogenase isoenzyme levels in *Zymomonas mobilis* by iron and zinc. J. Bacteriol. **171**:1063-1067.
- Ming-de Deng and Coleman J.R.,** (1999). Ethanol synthesis by genetic engineering in cyanobacteria. Appl. Environ. Microbiol. **65**:523-528.
- Neale A.D., Scopes R.K., Kelly M.J., Wettenhall R.E.H.,** (1986). The two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Purification by differential dye ligand chromatography, molecular characterisation and physiological roles. Eur. J. Biochem. **154**:119-124.
- Olsson L., Hanh-Hägerdahl B.,** (1996). Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme Microb. Technol. **18**:312-331.
- Ohta K., Beall D.S., Mejia J.P., Shanmugam K.T., Ingram L.O.,** (1991). Genetic improvement of *Escherichia coli* for ethanol production: chromosomal integration of *Zymomonas mobilis* genes encoding for pyruvate decarboxylase and alcohol dehydrogenase II. Appl. Environ. Microbiol. **57**:893-900.
- Rondon, M.R., P.R. August, A. D. Bettrmann, S. F. Brady, T.H. Grossman, M.R. Liles, K. A. Loiacono, B.A. Lynch, L.A. MacNeil, C. Minor, C.L. Tiong, M. Gilman, M. S. Osburne, J. Clardy, J. Handelsman, and R. M. Goodman.** (2000). Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetical and functional diversity of uncultured microorganisms. Appl. Environ. Microbiol. **66**:2541-2547.
- Reid M.F., Fewson A.C.,** (1994). Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. Critical Reviews in Microbiology. **20**(1):13-56.
- Sánchez-Marroquín A.** (1967). Estudios sobre la microbiología del pulque XX. Proceso industrial para la elaboración técnica de la bebida. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. **9**:87-90.
- Sánchez-Marroquín A., C. Larios and L. Vierna.** (1967). Estudios sobre la microbiología del pulque XIX. Elaboración de la bebida mediante cultivos puros. Revista Latinoamericana de Microbiología y Parasitología. **9**:83-85.
- Sarthy A.V., Mc Conanughty B. Sundstrom J. A., Furlong C.E., Hall B.D.** (1987). Expression of the *Escherichia coli* xylose isomerase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. **153**:1996-2000.
- Stephanopoulos G., Aristidou A., Nielsen J.** (1998). Metabolic Engineering- Principles and Methodologies. Academic, San Diego.

- Wills, C., Kraofil, P., Londo, D., and Martin, T.,**(1981). Characterization of the two alcohol dehydrogenases of *Zymomonas mobilis*. Arch. Biochem.Biophys. **210**:775-785.
- Wiselogel A., Tyson J., Johnsson D.** (1996). Biomass feedstock resources and composition. In: Wyman C.E. (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Washington, DC, pp 105-118
- Wyman C.E.,** (1996). Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. In: Wyman C.E. (ed) Handbook on bioethanol: production and utilization. Taylor and Francis, Washington DC, pp 1-18.
- Zaldivar J., J. Nielsen and L. Olsson.** (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl. Microbiol. Biotechnol. **56**:17-34.
- Zhang M., Eddy C., Deanda K., Finkelstein M., Picataggio S.,** (1995). Metabolic engineering of pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. Science. **267**:240-243.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN