



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“METODO PARA MEJORAR ACTIVIDAD FERMENTATIVA
DE LACTATO DESHIDROGENASA (ldh)
UTILIZANDO LA CEPA VAL 23”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

GABRIELA ESPINOSA MOLINA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

TUTOR
DR. JOEL OSUNA QUINTERO

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

<p>1.- Datos del alumno: Espinosa Molina Gabriela 56656084 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias 402116505</p>
<p>2.- Datos del autor Dr. Osuna Quintero Joel</p>
<p>3.- Datos del sinodal 1 M. en C. Daniel Navarro Santillán</p>
<p>4.- Datos del sinodal 2 M. en Ing. Eduardo Rodríguez Bustamante</p>
<p>5.- Datos del sinodal 3 Dr. Luis José Delaye Arredondo</p>
<p>6.- Datos del sinodal 4 Dra. Isabel Gómez Gómez</p>
<p>7.- Datos del trabajo escrito Método para mejorar actividad fermentativa de lactato deshidrogenasa (ldh) utilizando la cepa Val 23 64 p 2007</p>

Agradecimientos

A Dios

*A mi papá por ser el más grande apoyo, darme la confianza, la motivación en mi vida y guiarme a través de ella con su infinita sabiduría, inculcándome y otorgándome valores invaluableles.
Por el amor auténtico e incondicional que me dan las ganas, el coraje y la fuerza para seguir adelante.
Mi vida no alcanzaría para agradecer tanto en todos los aspectos y por ello, este logro que representa toda una vida de esfuerzos y lucha es el mayor tributo que te puedo brindar, porque siempre será un logro de los dos!!*

A la memoria de mi mamá por ser mi ángel de la guarda, iluminar mi camino y cuidar mis pasos, pero sobre todo, por demostrarme que SI PUEDO lograr las cosas con esfuerzo y dedicación. Gracias por ser mi mejor amiga y enseñarme con amor y bondad lecciones maravillosas de vida que me acompañaran de por vida como mi gran tesoro.

*En memoria de mi abuelito Alfonso y mi papá Luis por su cariño
y todo lo que me dieron el tiempo que vivimos juntos .*

*A mi tía Irma por ser como mi madre, por quererme y
cuidarme, pues no hay palabras para agradecerlo
ni mucho menos poder retribuirlo.*

*A mis tías por todo su cariño y apoyo
y también por ser todas como mis mamás y por lo que
cada una de ellas ha aportado a mi formación.
A mis primos por todos los momentos y enseñanzas
que hemos vivido y compartido en todos estos años.
A Diego por ser energía y luz.*

*A todas mis amigas por su amistad incondicional,
el cariño que compartimos y las aventuras. Gracias por
ser en definitiva mi otra familia y ver más allá de todas las cosas.*

*A todas las personas que en su momento y que de alguna
manera me han enseñado cosas valiosas y brindado más
que palabras y que con acciones me han dado múltiples
lecciones y grandes aprendizajes.*

Beshert “destinado a ser...”

Quiero agradecer al laboratorio del Dr. Xavier Soberon y su persona por el tiempo que pase y aprendí en el laboratorio, a Fily por la ayuda en los aspectos técnicos y de laboratorio y por el apoyo, a Biviana por ser como una tutora para mí, Azucena y Etienne por el apoyo y la amistad y a Maricruz por la ayuda y guía brindada.

También quiero agradecer al laboratorio del Dr. Enrique Morett, en especial al Dr. Humberto Flores, Dr. Ricardo Grande, Mary, Lety y Gabriel por todo el apoyo y la ayuda recibidos.

Mis agradecimientos al Dr. Paul Gaytán y a toda la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la U.N.A.M., Cuernavaca, Morelos.

Otro agradecimiento a la Sra. Juanita y a Don Pancho por todo el cariño y la ayuda que fueron muy valiosos para mí.

En especial al Dr. Joel Osuna por la oportunidad que me brindo de aceptarme como su alumna, los conocimientos, la paciencia, la dedicación, el apoyo y el valioso tiempo que me dedico.

De igual manera, las gracias a la Dra. Isabel Gómez por toda la ayuda recibida, por la amistad y el tiempo que compartimos.

Gracias por todo!!!

“Nadie puede mantenerse con vida cubierto con un manto de ignorancia... El amor, la constancia, el esfuerzo, la claridad en pensamiento y la gratitud serán la luz contra ese manto, como la infinita luna en el firmamento. Sin alguno de estos elementos las cosas no tienen sentido hacerlas.”

Anónimo

INDICE
RESUMEN
INTRODUCCION
Enzimas
Evolución
Evolución Dirigida
ANTECEDENTES
Cepa Val 23
Lactato deshidrogenasa
Piruvato descarboxilasa
HIPOTESIS
OBJETIVOS
MATERIALES Y METODOS
Cepas bacterianas y plásmidos. Medios de Cultivo
Otros
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
Electroforesis en Gel
Purificación de DNA plasmídico
Purificación de banda
Transformación de bacterias mediante electroporación de DNA
Digestiones de DNA con enzimas de restricción
Ligaciones
Cultivos aerobios
Cultivos anaerobios
Determinación de proteína
Western blot
Secuenciación
Medición de actividad para lactato deshidrogenasa
Medición de tamaño de colonias lactato deshidrogenasa
RESULTADOS PDC
RESULTADOS LDH
DISCUSIONES
CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFIA

Palabras clave: enzimas, evolución dirigida, cepa Val 23, piruvato descarboxilasa, lactato deshidrogenasa, reacción en cadena de la polimerasa, plásmidos, colonias, cultivos anaerobios, actividad enzimática.

ABREVIATURAS

AA.- Aminoácido (aa)
Ala.- Alanina
Asp.- Aspártico
B. subtilis.- *Bacillus subtilis* (bacteria)
BSA.- Albúmina del suero vacuno (Bovine serum albumin)
DNA.- Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DNTP.- Nucleótidos
DTT.- Ditiotreitól (Dithiothreitol)
EDTA.- Ácido etilendiaminotetraacético
E. coli.- *Escherichia coli* (bacteria)
Gly.- Glicina
IPTG.- β - D - 1 - tiogalactopiranosido
KDa.- Kilodaltones
LDH.- Enzima Lactato deshidrogenasa
ldh.- Gen Lactato deshidrogenasa
Mg.- Magnesio
NAD.- Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH.- Nicotinamida adenina dinucleótido reducida
Ng.- Nanogramo
Pb.- Par de bases
PBS.- Buffer fosfatos salinos
PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
PDC.- Enzima Piruvato descarboxilasa
pfl.- Gen Piruvato formato liasa
Pyr.- Piruvato
SDS.- Dodecil sulfato sódico
TBE.- Buffer compuesto por Tris Borato y EDTA
TEMED.- N,N,N,N'-tetrametilnediamina (N,N,N,N'-Tetramethylethylenediamine)
ThDP.- Pirofosfato de tiamina
Wk.- Shine Delgarno débil

RESUMEN

La cepa de la doble mutante *Escherichia coli* Val 23 carece de los genes que codifican para las enzimas piruvato formato liasa (*pfl*) y lactato deshidrogenasa (*ldh*). Val23 es incapaz de crecer de manera anaeróbica debido a limitaciones de regeneración del cofactor NAD⁺. En el presente trabajo se construyó una variante inactiva (Asp52Gly) de la lactato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (LDH_{BS}) con el fin de demostrar que la cepa Val 23 puede ser utilizada como un sistema de selección de variantes eficientes de enzimas fermentativas. La mutagénesis a saturación de la posición Gly52 y la selección mediante crecimiento en condiciones anaeróbicas permitió identificar a la variante funcionalmente mejorada Gly52Ala. Diversas sustituciones en la posición Gly52 en los residuos hidrofóbicos no permiten la formación de colonias en crecimiento anaeróbico de cepas transformadas con los plásmidos respectivos. Los resultados nos indican que la cepa Val 23 puede ser útil en la identificación de enzimas fermentativas con propiedades funcionales mejoradas.

INTRODUCCIÓN

Enzimas

Gran parte de la historia de la bioquímica y la biología molecular también es la historia del curso que ha seguido la investigación de las enzimas. Las enzimas han sido utilizadas desde hace muchos años en procesos biotecnológicos tan rudimentarios y básicos para el desarrollo del hombre; por ejemplo, desde la prehistoria se ha utilizado el cuajo en la elaboración de quesos. Cerca de 500 productos con un sin fin de aplicaciones para el hombre se desarrollan gracias a ellas en procesos de fermentación, tales como la fabricación de detergentes para ropa, pan, quesos, vino, cerveza y textiles [1].

En la actualidad, el mercado que abarcan las enzimas es de aproximadamente \$1.5 billones de dólares [2], dividiéndose en 3 partes: 1) 65% para las enzimas “técnicas”, las cuáles se ocupan en la elaboración de detergentes, textiles, el tratamiento del cuero, papel y otros; 2) 25% las que se ocupan en alimentos y 3) 10% en las que se ocupan para la mejora del alimento para diversos animales [3].

Sin duda la fermentación alcohólica es la reacción enzimática más antigua conocida. Se creía que este fenómeno y otros similares eran reacciones espontáneas hasta que en 1857 el químico francés Louis Pasteur [4] comprobó que la fermentación sólo ocurre en presencia de células vivas. Sin embargo, el químico alemán Eduard Buchner [5] descubrió en 1897 que un extracto de levadura libre de células puede producir fermentación alcohólica. La antigua incógnita fue entonces resuelta: la levadura produce la enzima y ésta última lleva a cabo la fermentación. Ya en 1783 el biólogo italiano Lazzaro Spallanzani [6] había observado que la carne podía ser digerida por jugos gástricos extraídos de halcones. Éste fue el primer experimento en el que se llevó a cabo una reacción vital fuera de los organismos

vivos. Tras el descubrimiento de Buchner, los científicos asumieron que, en general, las fermentaciones y las reacciones vitales eran producidas por enzimas. Sin embargo, todos los intentos de aislar e identificar su naturaleza química fracasaron. Es hasta 1926, que el bioquímico estadounidense James B. Sumner [7] consiguió aislar y cristalizar la ureasa. Cuatro años después su colega John Howard Northrop [8] aisló y cristalizó la pepsina y la tripsina. Northrop demostró también la naturaleza proteica de las enzimas. A partir de este descubrimiento y de diversos sustratos se empezaron a extraer un gran número de enzimas y con destinos diferentes que hicieron que su empleo se extendiera a diversas ramas de la industria.

Actualmente, la definición dada a una enzima es: biomolécula, proteína o RNA, que cataliza una reacción química específica sin afectar el equilibrio de la misma, aumentando la velocidad de reacción con una energía de activación inferior [9]. Las enzimas pueden catalizar reacciones químicas con gran eficacia, las cuales son base del metabolismo de los organismos vivos y proveen de oportunidades para que las conversiones biocatalíticas sean más eficientes y prácticas [10]. Diversas enzimas que se encuentran en diferentes hábitats y bajo diferentes condiciones (temperatura, pH y presión), gracias a su química e interacciones, pueden desarrollarse de manera eficiente.

Con todos los estudios posteriores a su purificación y cristalización, se hizo evidente que las enzimas podían catalizar reacciones en una amplia variedad de sustratos, mostrando una especificidad a uno en particular y ciertas características selectivas dependiendo de la misma [11]. También se ha visto que pueden acelerar la rapidez de reacción bajo diversas condiciones, limitando su manipulación como pueden ser sustratos no naturales, una catálisis muy pobre, baja estabilidad o poca tolerancia por cambios en los parámetros y requerimientos de cofactores mayores [12].

Por otra parte, las limitantes previamente mencionadas se ven minimizadas gracias a la identificación de los aminoácidos involucrados en el sitio activo, ya que al llevarse a cabo sustituciones en los mismos o en residuos cercanos a la pared del sitio activo, en principio, se puede lograr que la enzima tenga los cambios apropiados para así, obtener la reacción y productos deseados [14]. El análisis de las secuencias de aminoácidos de familias de enzimas que derivan de un ancestro común, pudiera conducir al entendimiento y al mejor conocimiento de la estructura, función, dinámica y propiedades termodinámicas de cualquier enzima [14]. Para tratar de mimetizar de alguna manera el gran trabajo de la naturaleza sobre el desarrollo de la función y estructura de las enzimas, contamos con técnicas como la mutagénesis sitio específica, la mutagénesis de saturación, el DNA shuffling y la evolución dirigida, entre otras. [10 y 13].

La evolución dirigida en particular se ha revelado como un método eficaz que permite a los ingenieros de proteínas crear enzimas con propiedades deseadas para todo tipo de procesos. La evolución dirigida imita el proceso de evolución natural y permite la obtención de una colección de mutantes y la selección de las variantes que posean las propiedades deseadas.

A partir del uso de las técnicas de evolución dirigida podemos:

1. – Generar cambios funcionales en las enzimas,
2. – Generar los escenarios evolutivos necesarios para tener acceso a los intermediarios y,
3. – Aparte de obtener la expresión funcional de las enzimas en el organismo hospedero, también se desea lograr el acceso a todas las enzimas físicamente posibles [14].

Adicionalmente para poder obtener los mejores resultados catalíticos, se cuenta con la tecnología enzimática, con la cual se ha dilucidado mejor el desarrollo, purificación y la aplicación de biocatalizadores que maximizan el resultado de la actividad enzimática [10].

Evolución

En la historia de la vida, hay pocas cosas que llegan a permanecer intactas por mucho tiempo siendo un ejemplo muy claro de ello, lo que ocurre con las especies de organismos que habitan el planeta. Para poder entender como evolucionan dichos organismos debemos comprender que el término “Evolución” puede explicarse a partir de 5 puntos básicos para Darwin:

1. Origen Común
2. Diversificación
3. Gradualismo
4. Selección Natural
5. Evolución

Darwin, define a la evolución como la transformación de los organismos a lo largo del tiempo, a partir de un ancestro común; explicaba que cada grupo de organismos ha ido diversificándose por diferentes procesos los cuales le otorgan algunas características como la variación genética, que de manera gradual y acumulativa, darán paso a la siguiente generación de organismos que serán más aptos para adaptarse a diversas condiciones [15].

Darwin argumentó que la población de una especie en un momento determinado incluye individuos con características que varían entre si. La población

de la siguiente generación presentará una frecuencia mayor de aquellos tipos que sobreviven y se reproducen con más éxito bajo las condiciones existentes [17].

Ahora bien, existen 3 principios importantes en la Teoría de la Evolución de Darwin [18] que son:

- a) Principio de Variación
- b) Principio de Herencia
- c) Principio de Selección

Estos principios tienen base y son consecuencia de la herencia de la variación. La variación heredable suministra la materia prima para los continuos cambios dentro de una misma especie y para la multiplicación de nuevas especies. Los mecanismos de tales cambios son el origen de la nueva variación por medio de diversas categorías de mutaciones, modificaciones en las frecuencias alélicas mediante procesos selectivos y aleatorios, divergencia de poblaciones locales, entre otras [19].

Las novedades cualitativas que se dan en la evolución, surgen a nivel de genes y proteínas. Las funciones metabólicas más antiguas se han mantenido por necesidad, mientras que se desarrollaban otras nuevas, lo que significa que hay genes antiguos que se preservan, pero hay otros que han evolucionado para dar paso a nuevos genes y por ende, a nuevas funciones.

No existe una relación simple entre la rapidez de cambio que experimenta el DNA y la magnitud del cambio funcional que experimenta la proteína. Hay dos fenómenos importantes que se deben a la sustitución en una secuencia: es posible reemplazar casi en su totalidad la secuencia de aminoácidos de una proteína y mantener ésta la misma función. La explicación para esto, se debe al mantenimiento de la estructura tridimensional de la enzima. Por otro lado, es posible cambiar la

función de una enzima mediante una sola sustitución aminoacídica debido a que esta sustitución se da en el sitio catalítico, lo cual pudiera proporcionar una nueva conformación activa de la enzima [19].

Aunque es posible que solo una o varias mutaciones originen un cambio en la especificidad de una proteína, la situación más normal es que el DNA acumule sustituciones durante largos periodos de evolución sin haber un cambio cualitativo en las propiedades funcionales de la proteína. En la naturaleza, la evolución de la función ocurre por la combinación de las fuerzas de mutación, recombinación y selección [16 y 19].

Evolución Dirigida

La evolución dirigida incorpora los principios Darwinianos de mutación y selección en las estrategias para el mejoramiento de los procesos biocatalíticos o las propiedades celulares de un organismo.

La evolución dirigida difiere de la evolución natural en dos aspectos fundamentales:

1. – La evolución natural ocurre bajo presiones de selecciones variables y múltiples, mientras que la evolución dirigida trabaja bajo presiones de selección controladas para obtener funciones predeterminadas.
2. – En la evolución dirigida, las funciones no naturales de uso práctico, pueden ser obtenidas a través del diseño de esquemas de selección apropiados, mientras que la evolución natural favorece las funciones ventajosas para la supervivencia de los organismos [17, 34 y 35].

La evolución dirigida parte de la creación de una librería de genes mutados. Los genes producidos que muestran una mejora en las propiedades o caracteres

deseados, son identificados por selección y el gen o genes que codifican esas enzimas son procesados por diversos ciclos de mutación y selección para ordenar y acumular mutaciones benéficas.

Los principales requerimientos para lograr que la evolución dirigida sea satisfactoria son:

- a) la expresión funcional de la enzima en un hospedero,
- b) la habilidad de seleccionar las propiedades deseadas y
- c) la identificación de una estrategia evolutiva.

El reto estratégico de cualquier metodología o proceso evolutivo (*Figura 1*) es la de identificar un camino o ruta que nos lleve a obtener las características requeridas. El número de posibles variantes incrementa rápidamente dependiendo del tamaño de las enzimas y el número de aminoácidos que se van a sustituir [20].

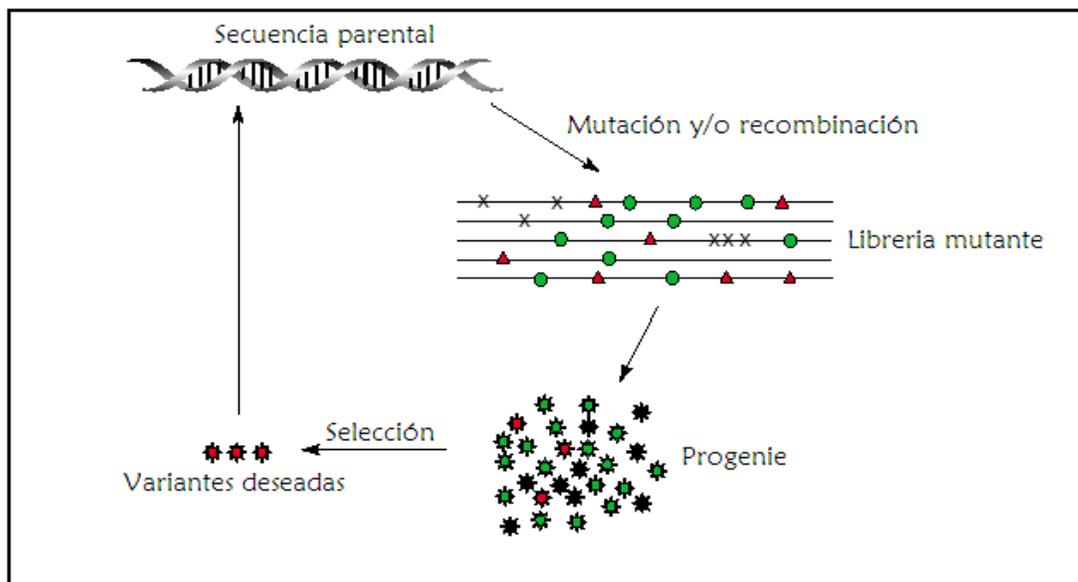


Figura 1. Evolución dirigida. Se parte de una secuencia parental que será mutada o recombinada por alguna de las técnicas de evolución dirigida la cuál nos dará una progenie de mutantes como pueden ser mutaciones funcionalmente neutras (verdes), progenie

mejorada (rojo) o delectreas (x) que será seleccionada por la función de interés. Las variantes esperadas serán utilizadas en los siguientes ciclos de evolución [17].

La importancia de la Evolución Dirigida se puede ver en distintos ámbitos en los cuales el ser humano se ve involucrado, permitiendo que a partir de ella se den rutas moleculares y el uso de moléculas para crear o dar paso a diversos productos como pigmentos, antibióticos, productos farmacéuticos.

Se puede ver también que en la agricultura ha tenido una gran importancia en cuanto a la mejora del procesamiento de granos, fibra y alimento de animales, dando una alternativa para poder degradar biomasa que puede ser aprovechada en combustibles o químicos; a la generación de plantas modificadas genéticamente que son utilizadas en la producción de polímeros y medicinas, así como también contribuir con la reducción de costos en cuanto a plaguicidas. Los costos de producción de materias primas y el uso de materiales tanto para la agricultura, industria textil, de papel y farmacéutica son una gran ventaja que ha aportado la Evolución Dirigida así pues como la reducción de tiempo en distintos procesos biotecnológicos y los resultados de los mismos [10].

Ahora bien, para poder llevar a cabo cualquier proceso de evolución *in vitro*, se necesita una diversidad genética, con la cual se va a trabajar y de la cual se desea obtener un beneficio. Esta diversidad puede ser obtenida por mutagénesis puntual, recombinación u otras técnicas [17].

Los métodos computacionales pueden combinar el diseño racional (la forma le seguirá a la función) con la evolución dirigida a través de la incorporación de elementos de estructuras de proteínas y la estabilidad en el diseño de la librería genética.

La selección de una técnica específica para la generación de la variabilidad está determinada por el tamaño y configuración de los elementos genéticos, la viabilidad de las secuencias nucleotídicas generadas, la disponibilidad de información

de la estructura tridimensional de la proteína de interés, y sobre todo de la disponibilidad de un organismo hospedero de fácil manipulación genética (*Tabla 1*) [16 y 17].

Tabla 1. Métodos de evolución dirigida [17]

<i>Método de evolución dirigida</i>	<i>Descripción</i>
“ <i>DNA-shuffling</i> ” (mezclado de DNA)	Recombina mutaciones exitosas obtenidas de una mutagénesis puntual a través de la fragmentación y el reensamblado mediante la PCR.
“ <i>Error prone PCR</i> ” (<i>PCR</i> con predisposición a errores)	El gen de interés es amplificado con una ADN polimerasa en condiciones donde la fidelidad transcripcional es baja y se introducen errores en las copias generadas.
“Mutagénesis a saturación”	Técnica en la cual se trata de generar todas o casi todas las posibles mutaciones en un gen.
“Mutagénesis sitio dirigida”	Se posee información precisa de la región a la cual se le quiere generar la mutación por cualquier aminoácido posible.

Entre estas técnicas podemos encontrar una especialmente utilizada para obtener una gran variabilidad: la PCR mutagénica o error-prone PCR. Esta técnica nos permite generar mutagénesis al azar a una tasa muy controlada gracias a errores forzados de la DNA polimerasa termoresistente, asociado a un conjunto de condiciones controladas de la reacción, como pueden ser un pH definido, temperatura, el número de ciclos, concentración de DNA, etc. [22].

Otra de las técnicas más importantes es la recombinación homóloga (mezclado de DNA) de genes o DNA shuffling. Con esta técnica se recombinan mutaciones favorables provenientes de la naturaleza o de experimentos previos de mutagénesis puntual. La técnica involucra etapas de fragmentación de los genes de interés y etapas posteriores de reensamblado específico [17, 20 y 21].

RESUMEN

La cepa de la doble mutante *Escherichia coli* Val 23 carece de los genes que codifican para las enzimas piruvato formato liasa (*pfl*) y lactato deshidrogenasa (*ldh*). Val23 es incapaz de crecer de manera anaeróbica debido a limitaciones de regeneración del cofactor NAD⁺. En el presente trabajo se construyó una variante inactiva (Asp52Gly) de la lactato deshidrogenasa de *Bacillus subtilis* (LDH_{Bs}) con el fin de demostrar que la cepa Val 23 puede ser utilizada como un sistema de selección de variantes eficientes de enzimas fermentativas. La mutagénesis a saturación de la posición Gly52 y la selección mediante crecimiento en condiciones anaeróbicas permitió identificar a la variante funcionalmente mejorada Gly52Ala. Diversas sustituciones en la posición Gly52 en los residuos hidrofóbicos no permiten la formación de colonias en crecimiento anaeróbico de cepas transformadas con los plásmidos respectivos. Los resultados nos indican que la cepa Val 23 puede ser útil en la identificación de enzimas fermentativas con propiedades funcionales mejoradas.

ANTECEDENTES

Cepa Val 23

Existen antecedentes experimentales de la utilización de la bacteria doble mutante *Escherichia coli* que presentan deleciones en los genes piruvato formato liasa (*pfl*) y lactato deshidrogenasa (*ldh*) [29]. Se ha visto que esta doble mutante en condiciones anaeróbicas tiene como alternativa para generar energía: 1) respirar mediante la utilización de aceptores de electrones y 2) en ausencia de los aceptores de electrones, entrar a una etapa fermentativa y por lo tanto, a la producción de compuestos orgánicos como son: etanol, ácidos como el acético, láctico, fórmico y succínico. Si se provoca una deleción en *pfl*, la cepa logra crecer en condiciones anaeróbicas suplementadas con acetato.

Las cepas doble mutantes carentes de *pfl* y *ldhA*, son incapaces de crecer en medios anaerobios, puesto que no pueden regenerar los nucleótidos de piridina oxidados (NAD⁺) debido al impedimento de reducción del piruvato a lactato u otros productos.

Así pues, Vázquez-Limón et al, construyeron una cepa no fermentativa doble mutante en *pfl* (que impide la formación de diversos ácidos) y *ldhA* (impidiendo la formación de lactato) llamada Val 23, la cual se empleará como sistema de selección de enzimas fermentativas mediante el efecto que la regeneración del cofactor NAD⁺ tiene sobre el metabolismo energético y por consiguiente en la velocidad de crecimiento de las bacterias en condiciones anaeróbicas [31].

Lactato deshidrogenasa

La enzima lactato deshidrogenasa (*ldh*) puede producirse de dos genes individuales distintos, que originan polipéptidos estructuralmente diferentes pero con la misma actividad catalítica (L-LDH, plegamiento tipo Rossmann y D-LDH;

plegamiento tipo flavodoxina). La *ldh* es una enzima oxidoreductasa cuya función es la de catalizar la conversión reversible del piruvato a lactato (*Figura 2*).

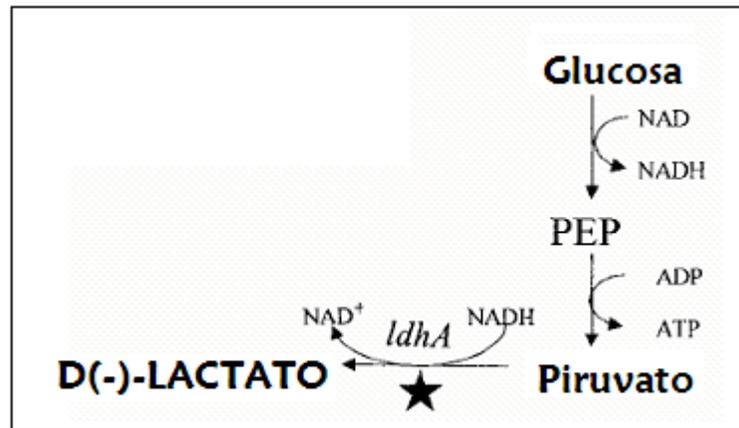


Figura 2.- Reacción que efectúa la *ldh* para el paso de piruvato a lactato [25].

Existen cinco formas isoenzimáticas codificadas por genes distintos. La *ldh* se encuentra en corazón, hígado, músculo, eritrocitos, plaquetas y nódulos linfáticos del cuerpo humano y en diversos organismos como *Escherichia coli*, bacterias ácido lácticas como *Lactobacillaceae sp*, *Bacillus sp*, *Aerobacter sp*, entre otras.

La L-LDH presenta un plegamiento tipo Rossmann (dominio de unión a mononucleótidos) y se encuentra normalmente como un homotetrámero; el peso molecular de cada subunidad es de aproximadamente 35 kDa (*Figura 3*). Su estructura se compone con un 38.8% de los residuos en la conformación hélice α y 18.7% de los residuos en conformación de hojas β .

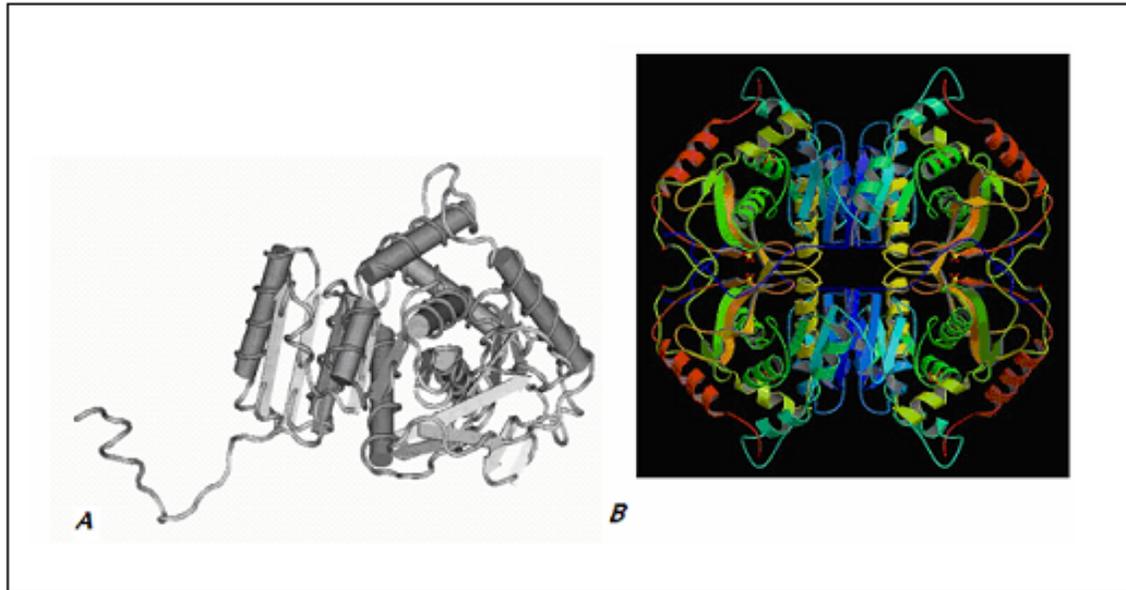


Figura 3. – Estructuras de lactato deshidrogenasa. A) Monómero compuesto de hélice α y hojas β . B) Estructura tridimensional con las 4 subunidades cada una de peso 35kDa [26].

La subunidad L-LDH contiene 2 dominios: un dominio de unión a NADH, el cual está conservado en la mayoría de las enzimas deshidrogenasas y el dominio catalítico (*Figura 4*).

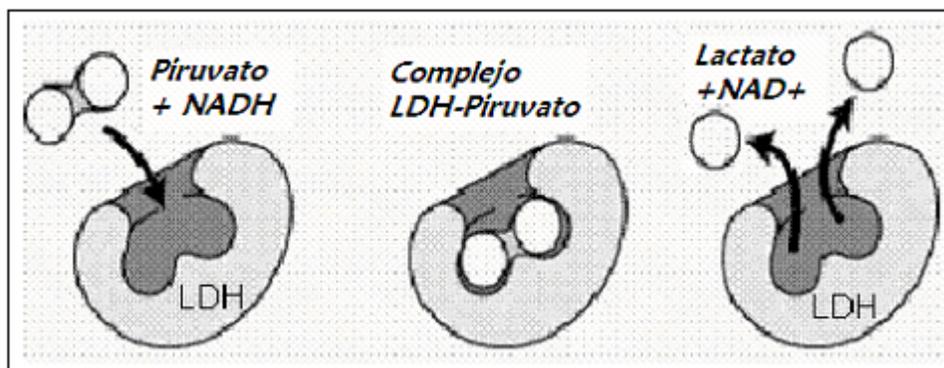


Figura 4. - Mecanismo enzimático del Complejo LDH-Piruvato [26].

Después de la unión del NADH con el piruvato, la LDH sufre un cambio conformacional llamado “**cierre de herradura**”. Esta herradura, que tiene dos aberturas, cubre el sitio activo y permite que se realice la reacción de reducción. Este cierre de herradura es un paso limitante en la reacción.

Los cambios conformacionales catalíticos que acompañan la unión del sustrato (piruvato) y el cofactor (NADH) ocurren gracias a las subunidades de *ldh*. Los elementos estructurales funcionan como puertas que se cierran con la unión del sustrato y el cofactor, estableciendo la vacuola catalítica en la cual la formación del producto se lleva a cabo. La velocidad de esta reacción covalente es siete veces mayor que la velocidad de los cambios conformacionales que establece el complejo enzima-sustrato-cofactor.

Como se mencionó anteriormente, la *ldh* cataliza la conversión del piruvato a lactato en la presencia de la coenzima (NADH), forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina. La reacción que lleva a cabo es reversible (*Figura 5*).

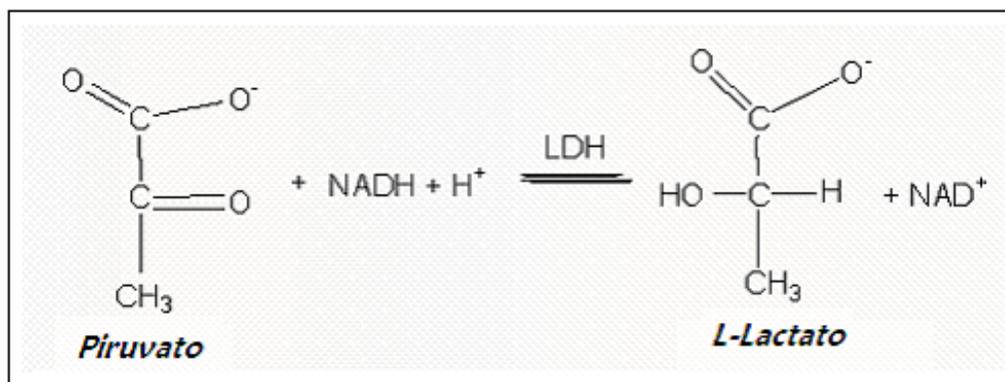


Figura 5. – Reacción que se lleva a cabo para convertir el piruvato en L-lactato [26].

Para la obtención del ácido láctico o lactato, se han desarrollado diversos métodos; uno de los más exitosos utiliza la bacteria *Escherichia coli* modificada con 5 deleciones cromosomales (*piruvato formato liasa (pflB)*, *acetato cinasa (ackA)*, *alcohol deshidrogenasa (adhE)*, *lactato deshidrogenasa (ldhA)* y *fumarato reductasa (frdBC)*) y un gen integrado L-(+) LDH de la bacteria *Pediococcus acidilactici* [16]. Al final, se obtuvo una cepa mutante (SZ85) que no contiene resistencia a antibióticos y produce grandes cantidades de ácido láctico L-(+) puro a partir de glucosa y xylosa en un medio mínimo de sales bajo condiciones anaeróbicas [28].

En otro estudio, se desarrollaron 3 nuevos biocatalizadores SZ58, SZ63 y SZ40 a partir de una cepa de *Escherichia coli* W3110 (*Florida Agricultural Experiment Journal Series no. R-08894*) que es capaz de convertir azúcares complejos a ácido láctico 99% puro. Se utilizaron sales minerales como nutrientes, se inactivaron 3 genes que codifican para *fumarato reductasa (frdBC)*, *piruvato formato liasa (pflB)* y la productividad de *lactato deshidrogenasa (ldh)* y se realizó la mutación de un gen acetato cintasa; se adicionó acetato para reducir los tiempos requeridos para fermentar la glucosa y se redujeron costos asociados a nutrientes, purificación, demanda de oxígeno y tratamientos [30].

Piruvato Descarboxilasa

La piruvato descarboxilasa (*pdh*) es una enzima clave en la fermentación alcohólica (**Figura 6**). Esta enzima cataliza la descarboxilación no oxidativa de piruvato a acetaldehído usando como cofactores al pirofosfato de tiamina y magnesio.

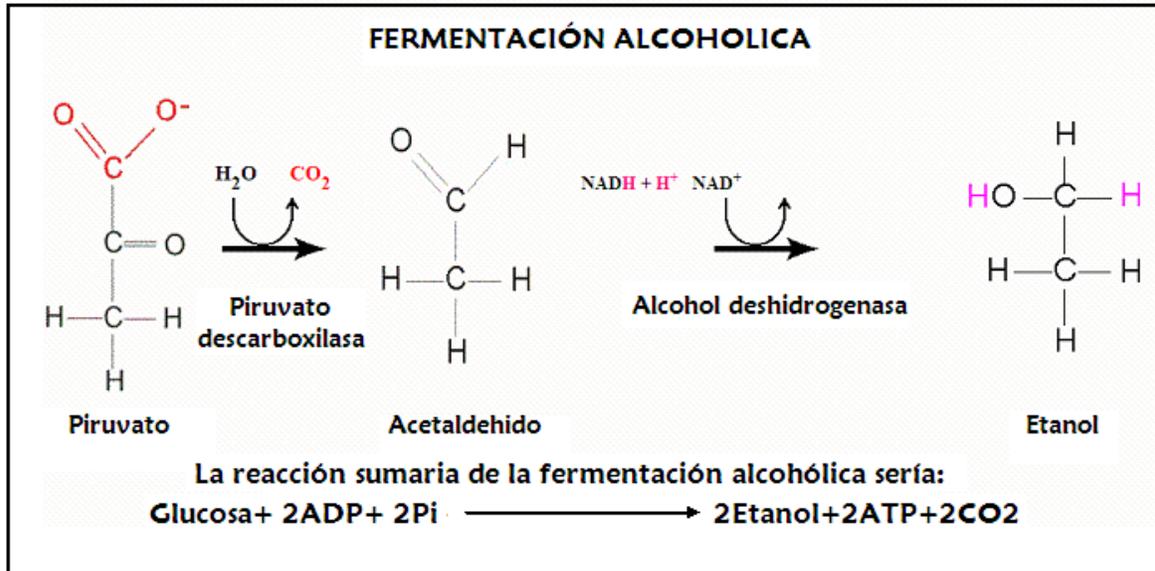


Figura 6.- Reacción que efectúa la *pdc* para el paso de piruvato a acetaldehído, con la restitución del cofactor NAD^+ [23].

La *pdc* es un homotetrámero y cada subunidad consiste de 568 aa con una masa molecular de 60 kDa (*Figura 7*). Las subunidades unen a una serie de cofactores: pirofosfato de tiamina e iones de Mg^{+2} (ThDP y Mg^{+2}). En la estructura cristalográfica se reconocen 4 moléculas ThDP, 4 iones Mg^{+2} II y 4 moléculas de citrato.

Los cofactores estabilizan la estructura cuaternaria en un rango de pH de 4.6 a 8.5, pero en condiciones más alcalinas se puede producir una pérdida completa de la actividad catalítica.

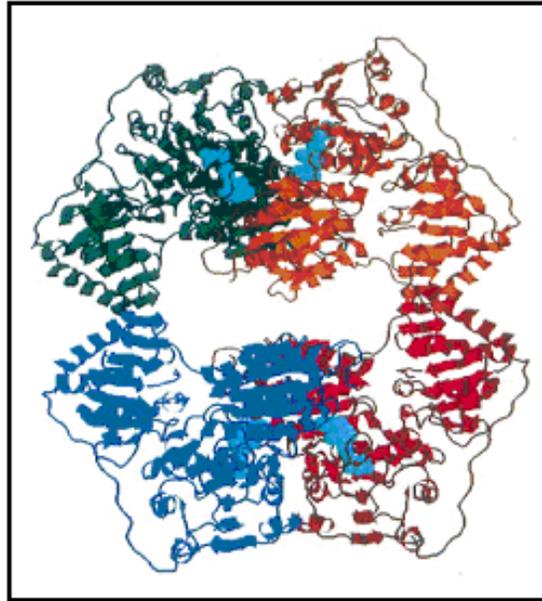


Figura 7.- Estructura de la piruvato descarboxilasa. Compuesta de 4 subunidades cada una de peso de 60 kDa [23].

Cada monómero (*Figura 8*) de la piruvato descarboxilasa puede ser dividido en 3 dominios cada uno de entre 6 o 7 hojas β flanqueadas por hélices α , denotados como PYR (residuos 1 - 88), R (residuos 189 - 354) y PP (residuos 355 - 568), cada uno con una topología de α/β .

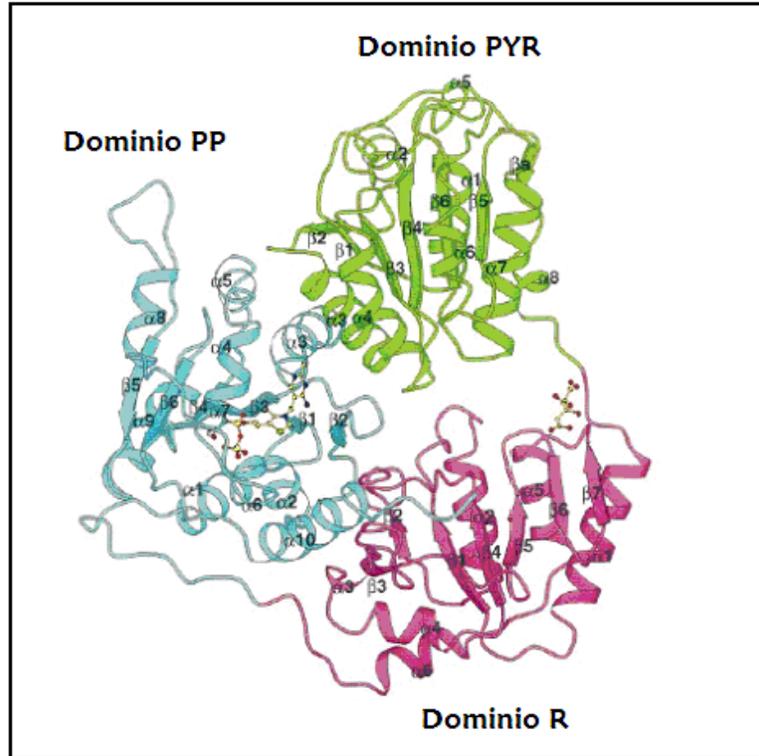


Figura 8.- Representación de un monómero de la piruvato descarboxilasa; cada uno compuesto de 3 dominios [24].

Esta enzima se encuentra en plantas, levaduras y hongos, pero no se encuentra en animales y es rara en procariontes. Se ha encontrado en 4 bacterias: *Zymomonas mobilis*, *Sarcina ventriculi*, *Acetobacter pasteurianus* y *Zymobacter palmae* [36].

La piruvato descarboxilasa se ve involucrada con la doble mutante de *E. coli* porque al ser esta incapaz de crecer en condiciones anaerobias y complementarse con la piruvato descarboxilasa, el piruvato es convertido en acetaldehído y este a su vez es transformado en etanol, regenerando el NADH y por ende, restableciendo su crecimiento.

HIPÓTESIS

El crecimiento anaeróbico de la cepa Val23 se reestablecerá si logramos recuperar la capacidad de regeneración del cofactor NAD⁺. Lo anterior se logrará mediante la introducción del operón *pet* (piruvato descarboxilasa/alcohol deshidrogenasa de *Zymomonas mobilis*) a la cepa Val 23 ó al mejoramiento de las propiedades catalíticas de una variante inactiva de la L-LDH_{B5} y el crecimiento anaeróbico de Val 23 transformada con el plásmido portador de la variante mejorada.

OBJETIVOS

a) General

Construir un banco de variantes a saturación en la posición Gly52 de la L-LDH_{B5} y restituir el crecimiento en condiciones anaeróbicas de la doble mutante *E. coli* Val 23 (*ldh*⁻ y *pfl*⁻) con aquellas variantes que recuperan la actividad enzimática y por lo tanto regeneran la producción del cofactor NAD⁺. Detectar a la enzima piruvato descarboxilasa producida por un vector que expresa muy pobremente la *pdc* mediante la colocación de una etiqueta de 10 aminoácidos en el extremo carboxilo terminal de la proteína y detección con anticuerpos específicos para la etiqueta.

b) Particulares

Piruvato descarboxilasa

- Añadir al extremo 3' del gen que codifica para la PDC una extensión de DNA que codifica para un segmento de 10 aminoácidos.

- Valorar el efecto que la etiqueta pudiera tener en la actividad de la PDC y por lo tanto, en el crecimiento anaeróbico de la cepa Val 23 transformada con el plásmido portador de la construcción apropiada.

Lactato deshidrogenasa

- Construir por PCR tipo extensión de megaprimer un banco de genes variantes en la posición que codifica para la Gly52.
- Identificar mediante secuenciación del DNA plasmídico purificado de varias colonias aquellas variantes que contienen un aminoácido diferente a la glicina en la posición 52.
- Valorar el crecimiento de estas colonias en condiciones anaeróbicas.
- Medir la actividad específica de la L-LDH_{B5} usando extractos de proteínas solubles totales de cultivo bacteriano

MATERIALES Y MÉTODOS

1) Cepas bacterianas y plásmidos. Medios de Cultivo

Cepas: La cepa para la propagación y mantenimiento de DNA plasmídico se utilizó la cepa *Escherichia coli* XL1 Blue. La cepa Val 23 doble mutante, se utilizó para experimentos de selección mediante el crecimiento en condiciones anaeróbicas. En el trabajo con Idh, la cepa Val 23 se utilizó también para la producción de la enzima silvestre o variante para la determinación posterior de su actividad específica.

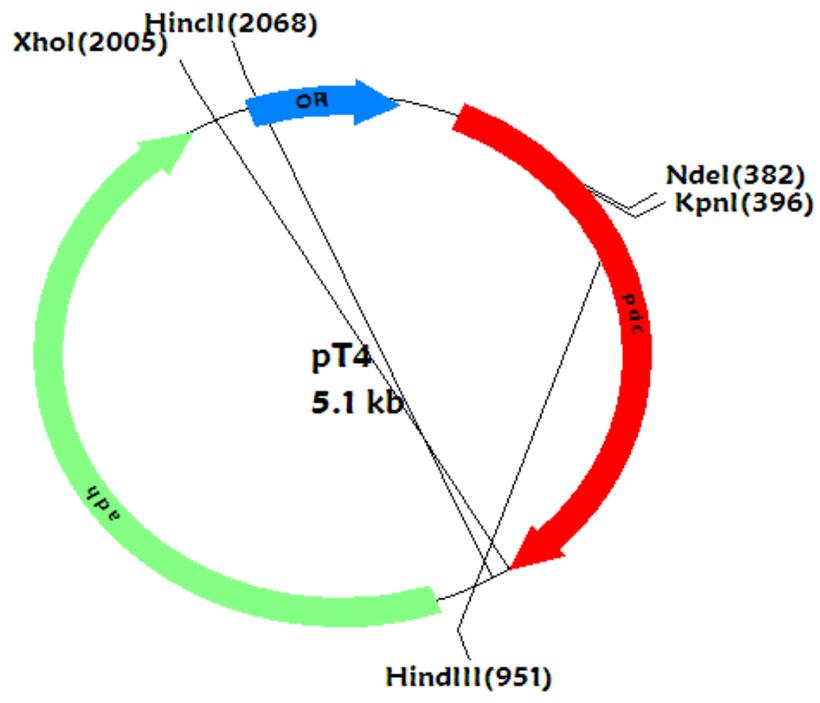
Plásmidos

Los plásmidos utilizados fueron los que se muestran en la **Tabla 2** y la **figura 9**.

Tabla 2.- Plásmidos

PLÁSMIDO	PROMOTOR	SITIOS DE RESTRICCIÓN	RESISTENCIA
pTrc99A	PTrc	BamHI,EcoRV, HindI,DpnI,NcoI, PstI, Sall, SmaI,XbaI	Ampicilina (amp)
pT4	Bla	NdeI, XhoI,HindIII, HincII, EcoRV	Kanamicina (km)
pT4wk* * Shine-Dalgarno débil (wk). Cambio de cola de histidinas por una etiqueta de 10 aminoácidos (tag)	Bla	NdeI, XhoI,HindIII, HincII, EcoRV	Kanamicina (km)

A.-



B.-

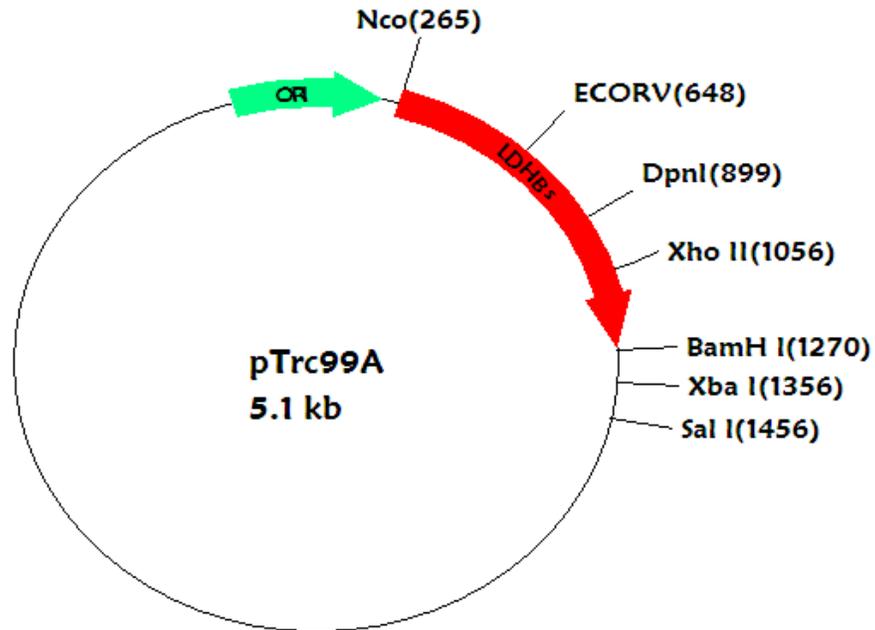


Figura 9.- Plásmidos utilizados. A.- pT4 y B.- pTrc99A.

Medio LB (Luria Bertani)

A 100 ml de agua desionizada agregar 3 gr de bactotripton (Becton-Dickinson), 1.5 gr de extracto de Levadura (Becton-Dickinson) y 1.5 gr de NaCl. Agitar hasta que los solutos queden disueltos. Ajustar pH a 7.0 con NaOH 1 N, agregar agar al 1.5% y llevar a un volumen final de 300 ml Esterilizar con autoclave durante 20 minutos a 15 libras/pulgada.

Medio LB modificado

Al medio LB anterior se le añadió 1.2 gr de Na_2CO_3 .

Otros

Antibióticos: Los antibióticos utilizados dependieron de los plásmidos presentes en las bacterias. Para el plásmido pTrc99A, se empleó ampicilina ($200\mu g/ml$) y para los plásmidos pT4 y pT4 wk se utilizó kanamicina ($25\mu g/ml$).

IPTG: Se preparó una solución 1M de IPTG, la cual se disolvió en agua y se esterilizó por filtración (0.22 μ m y se conservó a -20 C)

Acetato: Se adicionó en algunos medios de para incrementar el crecimiento en condiciones anaeróbicas gracias a la activación de otras rutas de producción de acetil-CoA.

Glucosa: Para los cultivos anaeróbicos en el trabajo con la ldh, se utilizó glucosa al 60% para lograr una concentración final de 1% de glucosa.

Amortiguador TBE: Stock 10X, se mezclaron 108 gr de Tris base, 55 gr de ácido bórico y 40 ml de EDTA 0.5 M (pH 8.0) en un litro de agua tridestilada (mili Q).

Preparación de glicerol de los diferentes cultivos bacterianos: Para mantener las células almacenadas durante periodos largos de tiempo, se prepararon glicerol al 20% final de los cultivos celulares. Se utilizó glicerol autoclaveado al 50% y 300 μ l del inóculo celular suplementado con kanamicina (pT4 y pT4 wk) o ampicilina (pTrc 99A).

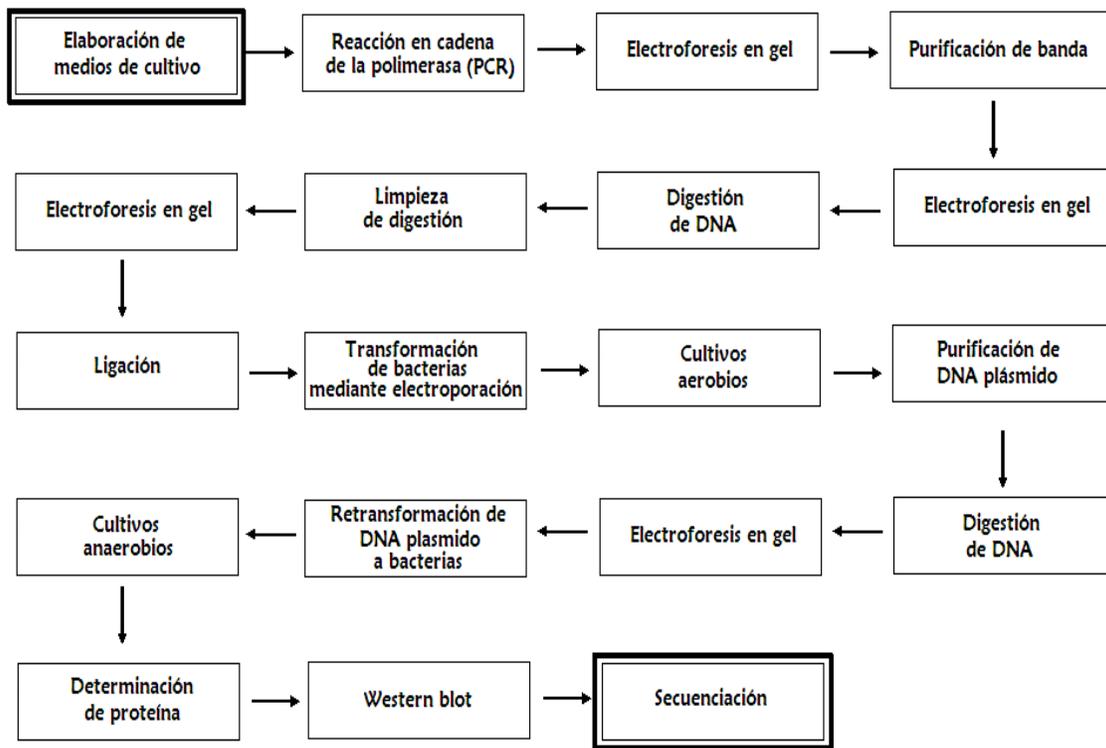


Figura 10.- Metodología para Piruvato Descarboxilasa (*pdc*)

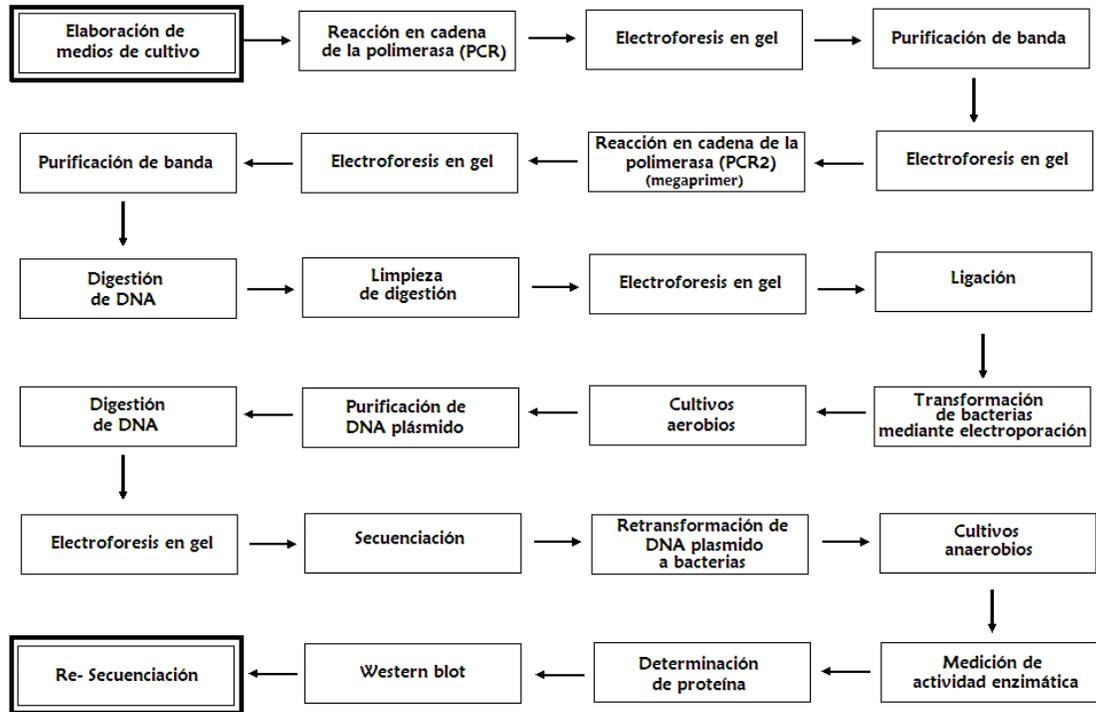


Figura 11.-Metodología para Lactato Deshidrogenasa (*Ldh*)

2) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los oligonucleótidos empleados en todas las reacciones, fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

a) Piruvato descarboxilasa

Para llevar a cabo la amplificación de la piruvato descarboxilasa (pdc), se realizó una PCR con las siguientes condiciones de reacción:

64 μ l de agua tridestilada

10 μ l de buffer Taq polimerasa 10X

10 μ l de DNTPs (25 mM)

5 μ l de Taq polimerasa

6 μ l de $MgCl_2$

2 μ l de oligonucleótido BpdcNde (30 pMol) (*Tabla 3*)

2 μ l de oligonucleótido PDC Tag (30 pMol) (*Tabla 3*)

1 μ l de Templado (alrededor de 100 ng de DNA plásmido)

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para la PCR pdc

Nombre	Longitud	Secuencia 5' - 3'
PDC Tag	69amero	gcccggctcgagtcattaagaagcgtagtcgggaacgtcgatcgggtagaggagcttgtaacaggctt
BpdcNde	30amero	atgtcatatgttgcggtacctatttagcg

Condiciones de PCR para el gen que codifica para la PDC:

5 Ciclos:

90 segundos a 94°C (desnaturalización del DNA doble cadena)
90 segundos a 45°C (reasociación de DNA molde y oligos)
2 minutos a 72°C (polimerización)

15 ciclos:

90 segundos a 94°C
90 segundos a 55°C
2 minutos a 72°C

Se obtuvo un producto de aproximadamente 1700 pb y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

b) Lactato Deshidrogenasa

En la reacción para amplificar un fragmento del gen *ldh*, las condiciones de reacción fueron las siguientes:

64.5 μ l de agua tridestilada
4 μ l de buffer Taq polimerasa 10X
10 μ l de DNTPs (25 mM)
4 μ l de Taq polimerasa
6 μ l de MgCl₂
1.5 μ l de oligonucleótido Tail 99 Nco (30 pMol) (*Tabla 4*)
2 μ l de oligonucleótido BSNNG/C (30 pMol) (*Tabla 4*)
2 μ l de Templado (alrededor de 100 ng de DNA plásmido)

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados para la PCR de la *ldh*

Nombre	Longitud	Secuencia 5'-3'
--------	----------	-----------------

Tail 99 Nco	40amero	<i>agccgtggatcgtggg</i> cgccgacatcataacggttctgg
BSNNG/C	42 amero	gcttttctttatttacNNSaatgaccacaagctcatctgtg

Ciclos de PCR:

1 ciclo de 3 minutos a 95°C

5 ciclos de 30 segundos a 3 temperaturas: 95°C, 45°C y 72°C

15 ciclos de 30 segundos a 3 temperaturas: 95°C, 50°C y 72°C

1 ciclo de 10 minutos a 72°C

1 ciclo final a 4°C

Se obtuvo un producto de aproximadamente 230 pb y se analizó en un gel de agarosa al 2%.

Con el producto de PCR purificado mediante extracción del DNA del gel de agarosa, se procede a realizar una segunda PCR tipo megaprimer para la amplificación del producto que codifica para el gen completo de ldh.

Las condiciones a las cuales se lleva a cabo la segunda reacción de PCR fueron las siguientes:

57 μ l de agua tridestilada

10 μ l de PCR 1 (megaprimer; entre 500 a 1000 ng del fragmento)

10 μ l de buffer Taq polimerasa 10X

10 μ l de DNTPs (25 mM)

- 4 μ l de Taq polimerasa
- 6 μ l de MgCl₂
- .5 μ l de oligonucleótido 99 Hind (30 pMol) (*Tabla 5*)
- .5 μ l de oligonucleótido Tail 20 (30 pMol) (*Tabla 5*)
- 2 μ l de Templado (alrededor de 100 ng de DNA plásmido)

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la PCR2 Idh o Megaprimer

Nombre	Longitud	Secuencia 5'-3'
Tail 20	20amero	ggaat <i>agccgtggatcgtgg</i> (en negrillas y cursiva se muestra la secuencia idéntica a los primeros 15 nucleótidos del gene Tail99Nco utilizado en la primera PCR)
99 Hind	25amero	ggaccaccgcgctactgccgccagg

Ciclos de la PCR:

1 ciclo de 3 minutos a 95°C

5 ciclos de 30 segundos a 3 temperaturas: 95°C, 40°C y 72°C

15 ciclos de 30 segundos a 3 temperaturas: 95°C, 50°C y 72°C

1 ciclo de 5 minutos a 72°C

1 ciclo a 4°C.

Se obtiene un producto de aproximadamente 1230 pb y se analizó en un gel de agarosa al 1%.

3) Electroforesis en Gel

La técnica para la preparación de los geles de agarosa que se siguió es la descrita por Sambrook et al [27]. Se utilizó agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X, a cada muestra de DNA se le agregó de 2 a 5 μ l de amortiguador de carga (azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25% y glicerol al 30%) dependiendo de la cantidad de DNA a cargar.

Los geles se corrieron a un voltaje de 90-100 volts en amortiguador TBE 1X. Para visualización del DNA en una fuente de luz UV, previamente se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) en agua tridestilada.

4) Purificación de DNA plasmídico

La purificación del DNA plasmídico se realizó a partir 5 ml de cultivo bacteriano en medio LB líquido suplementado con kanamicina o ampicilina según la resistencia del plásmido respectivo. Las células se colectan mediante centrifugación de los cultivos. Al término, se elimina el sobrenadante y la pastilla celular se procesa por el método de lisis alcalina según el manual del productor de los *Kit* de purificación de plásmido (*High Pure Plasmid Isolation por Roche*). El DNA plásmido obtenido se verifica por electroforesis en gel de agarosa 1%.

5) Purificación de banda

Después de la electroforesis en gel de agarosa al 1%, los productos de PCR se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga y las bandas de DNA se cortaron del gel con ayuda de una navaja. El fragmento de agarosa se pesó en una balanza granataria y se calculó la cantidad de solución desnaturizante que se utiliza para disolver la agarosa proveniente en los kit de purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa de *Roche* o *Qiagen*. Se continuó todo el proceso recomendado por los productores de los kit de purificación. Al finalizar, el producto purificado de PCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

6) Transformación de bacterias mediante electroporación de DNA

En el caso de una reacción de ligación de DNA, esta se procesa mediante tratamiento con un volumen de 500 μ l de butanol o se limpia mediante la utilización de los kit de limpieza de reacciones de PCR siguiendo el procedimiento descrito por los productores de los kit (*Roche*); para el caso de extracción por butanol, la mezcla: reacción de ligación + butanol se agitó vigorosamente y posteriormente se centrifugó por 10 minutos en microcentrifuga, se eliminó el sobrenadante y la pastilla de DNA se dejó secar 15 minutos en una centrifuga al vacío (*Savant*). La pastilla obtenida, se resuspendió en 10 μ l de agua tridestilada.

Las células electrocompetentes utilizadas se descongelaron en hielo. Se tomaron de 5 a 10 μ l de células y se transfirieron a tubos de 1.5 ml, se adicionó glicerol al 10% (50 μ l) y 1 a 2 μ l de DNA obtenido de la ligación o de DNA plásmido.

La mezcla anterior se traspasó, evitando formar burbujas de aire entre los electrodos, a una celda de electroporación previamente enfriada. La celda se colocó en la cámara de seguridad del electroporador para aplicar un pulso de 1.6 volts (en el caso de utilizar celdas con separación entre los electrodos de 0.1 cm).

Inmediatamente después del pulso, las células fueron removidas y adicionadas a 1 ml de LB líquido mantenido a temperatura ambiente en un tubo de cultivo; las células se dejaron recuperando aproximadamente 1 hora a 37°C con agitación.

Al término de la recuperación, dependiendo del DNA transformado, una parte del volumen de cultivo (de 1 a 5 µl para el caso de transformación con plásmidos; 100 a 300 µl para el caso de transformación con una ligación de DNA) se plateo en cajas con el antibiótico respectivo y se incubó en una estufa a 30°C.

7) Digestiones de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones se realizaron con el producto de la purificación de banda, BSA 1X, y el buffer recomendado por el distribuidor de las enzimas de restricción (*New England Biolabs*) que funcionara para las dos enzimas de restricción utilizadas y agua tridestilada.

Enzimas:

a) Piruvato descarboxilasa

- Nde I.- (*New England Biolabs*) 100 mM NaCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 1mM de EDTA, 1 mM de DTT, 200 µg/ml de BSA y glicerol 50%
- Xho I.- (*New England Biolabs*) 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1mM de EDTA, 1 mM de DTT, 200 µg/ml de BSA y glicerol 50%

b) Lactato deshidrogenasa

- Nco I.- (*New England Biolabs*) 250 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA y glicerol 50%
- Hind III.- (*New England Biolabs*) 50 mM de KCl, 10 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM de EDTA, 1 mM de DTT, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA y glicerol 50%

La temperatura de reacción para la reacción de digestión fue de 37°C. Los tiempos de digestión variaron entre 4-12 hrs. Los productos de digestión se analizaron en geles de agarosa al 1%

8) Ligaciones

Para llevar a cabo las reacciones de ligación, se utilizó el plásmido pT4 wk Tag para el gen de *pdh* y el pTrc 99A para el gen de *ldh*, buffer T4 DNA Ligasa (50 mM de Tris-HCl, 10 mM de MgCl_2 , 10 mM de Dithiothreitol, 1 mM de ATPm 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA a pH 7.5) (*New England Biolabs*), Ligasa T4 DNA (10 mM de Tris-HCl, 50 mM de KCl, 1 mM de Dithiothreitol, 0.1 mM de EDTA, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BSA y glicerol 50%) (*New England Biolabs*) y el producto de DNA proveniente de la purificación por columna y agua tridestilada.

Se centrifugó a 14,000 rpm por 30 segundos para lograr la incorporación de los componentes.

El tiempo para que se llevara a cabo la ligación fue entre 3-6 hrs a 16°C.

9) Cultivos aerobios

Cultivos convencionales en estufa de 30°C con medio LB suplementado con kanamicina para pT4 y pT4 wk o ampicilina para pTrc99A.

10) Cultivos anaerobios

Los cultivos anaerobios se realizaron en jarras anaeróbicas (*Becton-Dickinson*) con una atmósfera de CO_2 generada gracias al *kit Gas-Pak® (Becton-Dickinson)*. Brevemente, el procedimiento de generación de ambiente anaeróbico consiste en la producción de hidrógeno generado por una tableta de borohidruro de sodio activado por agua. El hidrógeno generado reacciona con el oxígeno de la jarra en presencia de un catalizador de paladio para la formación de agua. Una tableta de ácido cítrico más bicarbonato de sodio generan CO_2 en presencia de agua. Un sistema de filtros de papel disminuye la velocidad con la que el agua logra llegar a las tabletas de tal forma que da tiempo para introducir el kit dentro de la jarra y sellar la cámara antes de que las reacciones se inicien.

Las cajas de cultivo utilizadas para los cultivos anaerobios se colocan dentro de la jarra anaeróbica, la cual cuenta en la tapa con el dispositivo de paladio que necesita ser activado por medio del calor aproximadamente 1 hora antes de cerrar la jarra. Las cajas Petri se introducen a la jarra junto con el kit colocado en forma vertical.

Se cerró la jarra y se incubó por el tiempo necesario para observar la formación de colonias bacterianas a 30°C .

11) Determinación de proteína

Con el reactivo Bradford (*Biorad*) y seroalbumina bovina se realizó una curva patrón midiendo la absorbancia a 595 nm.

Bradford stock

100 ml de etanol al 95%

200 ml de ácido fosfórico al 88%

Con la enzima *pdh*, utilizamos 800 μ l PBS, 200 μ l Reactivo Bradford y PBS/BSA en diferentes cantidades.

Con las muestras a analizar, se tomó 5 μ l de ellas y se mezclaron con 200 μ l de reactivo Bradford y 795 μ l PBS.

Para la enzima *ldh*, se utilizó 800 μ l de Buffer fosfatos, 200 μ l Reactivo Bradford y BSA 10 μ g/ μ l en diferentes cantidades.

Se tomó 5 μ l de cada una de las muestra a analizar y se mezclaron con 200 μ l de reactivo Bradford y 795 μ l buffer fosfatos.

12) Western blot

a) Piruvato Descarboxilasa

Se prepararon dos geles de poliacrilamida: primero se preparó el gel separador al 12% final de poliacrilamida, y después el gel concentrador (stacking al 5% final de poliacrilamida). Cada uno de los geles se prepararon con agua, acrilamida/bisacrilamida 30% y SDS 10% (*Biorad*), tris 1M, persulfato de amonio 10% y al último el TEMED. El gel se corrió aproximadamente entre 100 - 120 volts durante dos o tres *horas* y al terminar de correr, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa siguiendo el procedimiento descrito por Towbin et al. [33]. Brevemente, el gel se colocó encima de una cama de papel filtro previamente empapado en buffer de transferencia (Tris base 5.8 gr, Glicina 2.9 gr, SDS 0.37 gr (*Biorad*), y metanol 200 ml) y posteriormente se colocó encima del gel un filtro de nitrocelulosa de tamaño apropiado empapado en buffer de transferencia. Finalmente el sandwich terminó con otra cama de papeles filtro empapados en buffer de transferencia. El sandwich anterior se colocó en una cámara de transferencia teniendo cuidado de colocar el gel hacia el polo negativo y la membrana de nitrocelulosa hacia el polo positivo. La transferencia se una hora.

Después de la transferencia, la membrana se bloqueó en BSA 3% en buffer fosfatos-salino (PBS) durante toda una noche. Posteriormente, la membrana se lavó con agua tridestilada y se le adicionó BSA 1% en PBS. Se agregó el primer anticuerpo que es específico para el tag de 10 aminoácidos agregados a la PDC. Los anticuerpos se agregaron en una disolución 1/1000 en BSA 1% en PBS. La reacción de reconocimiento del primer anticuerpo se incubó por varias horas con agitación suave. Posteriormente, el primer anticuerpo se eliminó por lavados secuenciales con PBS. Se puso nuevamente BSA 1% en PBS que contiene una dilución 1 a 1000 del segundo anticuerpo anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina [23].

Finalmente, se volvió a lavar la membrana con PBS para eliminar el exceso del segundo anticuerpo y el complejo de reconocimiento se reveló con una reacción colorida de la fosfatasa alcalina con sustratos especiales para Western suministrados por *Sigma*.

b) Lactato Deshidrogenasa

El procedimiento de transferencia de las proteínas a filtros de nitrocelulosa se realizó en forma similar a lo descrito para la PDC. En el caso de la LDH, se utilizó un segundo anticuerpo, diluido 1 a 5000, que está acoplado a peroxidasa (*Qiagen*) que es específico para reconocer una cola de histidinas presentes en la proteína.

El revelado se realizó mediante exposición a una placa fotográfica utilizando los reactivos de quimioluminiscencia (*Pierce*) como lo indican las recomendaciones del fabricante.

13) Secuenciación

Los oligonucleótidos empleados en la secuenciación, dependieron de la región a analizar y todos fueron construidos en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.

Para poder secuenciar las muestras deseadas, se entregó un volumen final de 16 μ l de oligonucleótido/DNA y agua en un tubo Eppendorf de 200 μ l para PCR.

a) Piruvato descarboxilasa

La mezcla se compone por:

5 μ l de DNA plasmídico proveniente de una purificación de 5 ml de cultivo.

2 μ l de oligonucleótido (*Tabla 6*)

9 μ l de agua tridestilada

Tabla 6. Oligos empleados para la secuenciación de la pdc

Nombre	Longitud	Secuencia 5' - 3'
Sec proBla	20amero	cggggaaatgtgcgcggaac
PDC falt	18amero	gcgcattgttcaatgacg
Adh 116R (antisentido)	19amero	gccgctgccgtaagatcc

b) Lactato deshidrogenasa

La mezcla se compone por:

8 μ l de DNA plasmídico

3 μ l de oligonucleótido (*Tabla 7*)

5 μ l de agua tridestilada

Tabla 7. Oligo empleado para la secuenciación Idh

Nombre	Longitud	Secuencia 5' - 3'
99 Nco	25amero	gcgccgacatcataacggttctggc

14) Medición de actividad para la lactato deshidrogenasa

Para realizar la medición de actividad, se utilizó NADH 3 mM, Piruvato 2 M (Pyr), proteínas totales provenientes de un extracto celular que se obtuvo por sonicación y buffer de fosfatos 100 mM pH 7.

El buffer fosfatos se preparó pesando 1.38 gr de NaH_2PO_4 monohidratado; se ajustó el pH con $NaOH$ 1N y se aforó a 100 ml con agua tridestilada.

En cada celda de reacción se colocaron:

800 μ l de Buffer fosfatos

100 μ l de Extracto celular

50 μ l de NADH

50 μ l de Pyr

Las condiciones a las que se ajustó el espectro para hacer las mediciones fueron: 340 nm y la reacción se siguió por 5 minutos con intervalos de 15 segundos entre cada lectura.

15) Medición de tamaño de colonias de lactato deshidrogenasa

Para poder medir el tamaño de las colonias que se obtuvieron a partir de las cepas mutantes, se utilizó un microscopio micrométrico con un aumento de 12x y reglilla de medición.

RESULTADOS DE LA PDC

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos PDCTag y BpdcNde del gen que codifica para la PDC se corrió en un gel de agarosa al 1% y se realizó purificación de banda para la clonación posterior del DNA al vector de expresión apropiado. Después de la purificación, se llevó a cabo la digestión con las enzimas de restricción Nde I y Xho I y una limpieza final de la digestión previa a la reacción de ligación siguiente. La ligación se realizó a partir de una muestra cuantificada en un gel de agarosa al 1%.

La ligación se transformó a bacterias *E. coli* XL1Blue mediante electroporación. Las bacterias electroporadas se platearon en cajas de cultivo en volúmenes de 200 y 400 μ l. Después del tiempo apropiado para observar el crecimiento de colonias en las cajas con el antibiótico respectivo, se inocularon seis colonias en medio LB y antibiótico kanamicina, tomando cuatro provenientes de las cajas donde se inocularon 200 μ l de células electroporadas y dos de las cajas donde se platearon 400 μ l de las células electroporadas.

Se realizó la purificación de los plásmidos de las colonias candidatas y se procedió a verificar la presencia de la construcción apropiada mediante la digestión del DNA con las enzimas de restricción utilizadas para la clonación del producto de PCR (*Figura 12*).

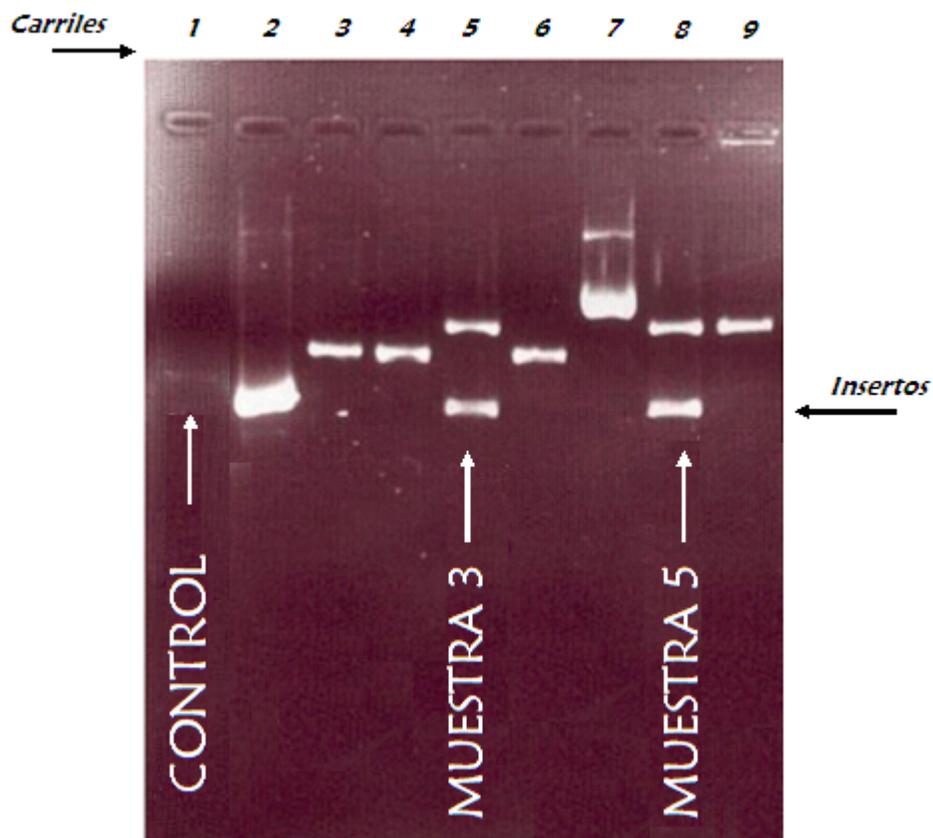


Figura 12.- Gel de agarosa al 1% en el cual podemos observar a dos muestras (carriles 5 y 8) que contienen el gen completo que codifica para la PDC. El primer carril muestra la PCR del gen de la pdc como control; en el carril dos y tres se tienen muestras de una misma colonia sin digestión y con digestión respectivamente; en el carril cuatro una muestra de una colonia digerida; en los carriles seis y nueve muestras de colonias digeridas y en el carril 7 la misma muestra del carril 8 sin digerir.

Al término de la digestión, se pudo observar que sólo dos muestras (carriles 5 y 8) de las seis inoculadas traen el inserto.

Con estas muestras, se realizó una retransformación del DNA plasmídico a bacterias de la cepa Val 23 y se platearon 1 ó 5 μ l de las células electroporadas a cajas de cultivo; de las colonias que crecieron, se inocularon diez en un medio LB líquido.

Se purificó de nuevo el DNA plasmídico de las clonas candidatas. Las pastillas celulares restantes se resuspendieron en 500 μ l de PBS y se lisaron mediante una sonicación en la cual la muestra se distribuye en tubos de 1.5 ml que se encuentran

en hielo; el sonicador se posiciona a velocidad de 2 y se dan cuatro pulsos de aproximadamente 15 segundos para darle un descanso a las células entre cada uno de los pulsos de 10 segundos para dar paso a la preparación de un extracto de proteínas solubles totales.

CUANTIFICACIÓN Y PRESENCIA DE PROTEÍNA

Con el fin de identificar si las clonas candidatas de PDC presentaban en el carboxilo terminal los diez aminoácidos que pensamos utilizar como etiqueta, se decidió llevar a cabo el reconocimiento de la misma mediante reacción con anticuerpos específicos en un ensayo tipo Western. Primero, se realizó la cuantificación de las proteínas totales presentes en los extractos celulares por el método de Bradford, utilizando BSA pura para construir la curva patrón (*Figura 13*).

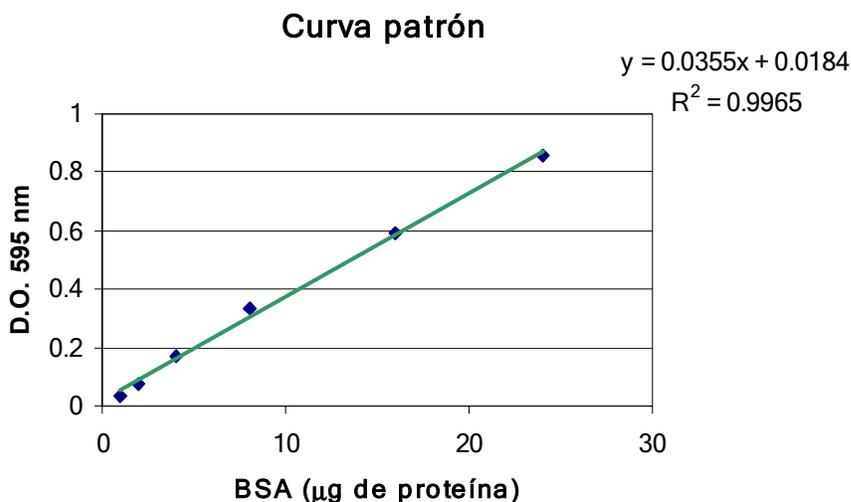


Figura 13.- Curva patrón de BSA calculada con el método de Bradford.

Finalmente, la identificación de las proteínas que contienen en el carboxilo terminal a la etiqueta de diez aminoácidos, se realizó por Western Blot (*Figura 14*). En la siguiente Figura 15 se puede observar la banda obtenida después de revelar la

reacción de reconocimiento del anticuerpo específico para la etiqueta de diez aminoácidos. Las dos clonas candidatas conteniendo el gen completo que codifica para la PDC dieron positivas con el anticuerpo específico para la etiqueta (proteínas de extractos solubles de las dos clonas se aplicaron al gel de proteínas por duplicado). El marcador molecular se encuentra en el extremo izquierdo de la Figura.

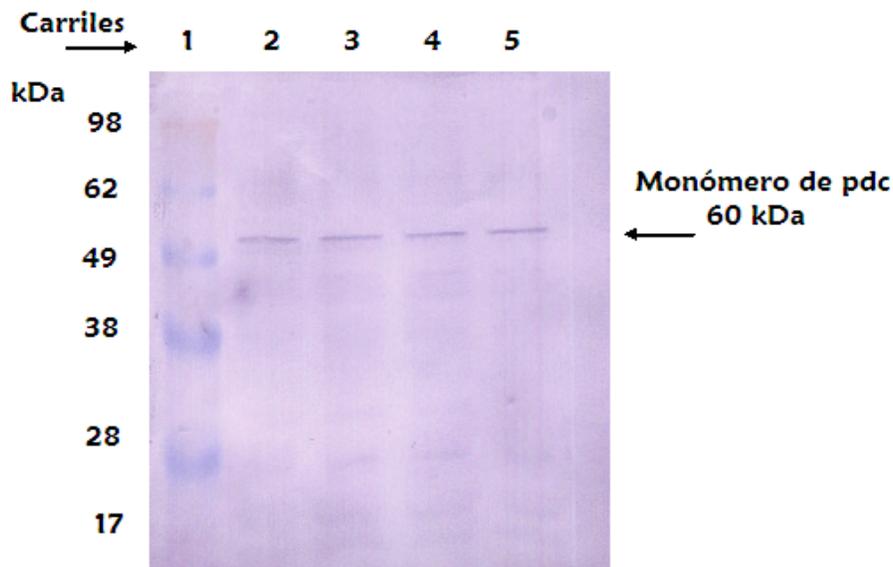


Figura 14.- Western blot de la PDC con el anticuerpo que reconoce a la etiqueta de 10 aminoácidos en sustitución de la cola de histidinas.

SECUENCIACION

Con la identificación de la etiqueta de diez aminoácidos presente en la PDC producida por las dos clonas candidatas según el resultado del Western blot, se procedió a la secuenciación con tres oligonucleótidos distintos que nos ayudan a ver la secuencia completa del gen que codifica para la PDC de las clonas candidatas:

colocada en lugar de la cola de histidinas crece bastante bien como la cepa transformada con el plásmido que contiene el gen silvestre.

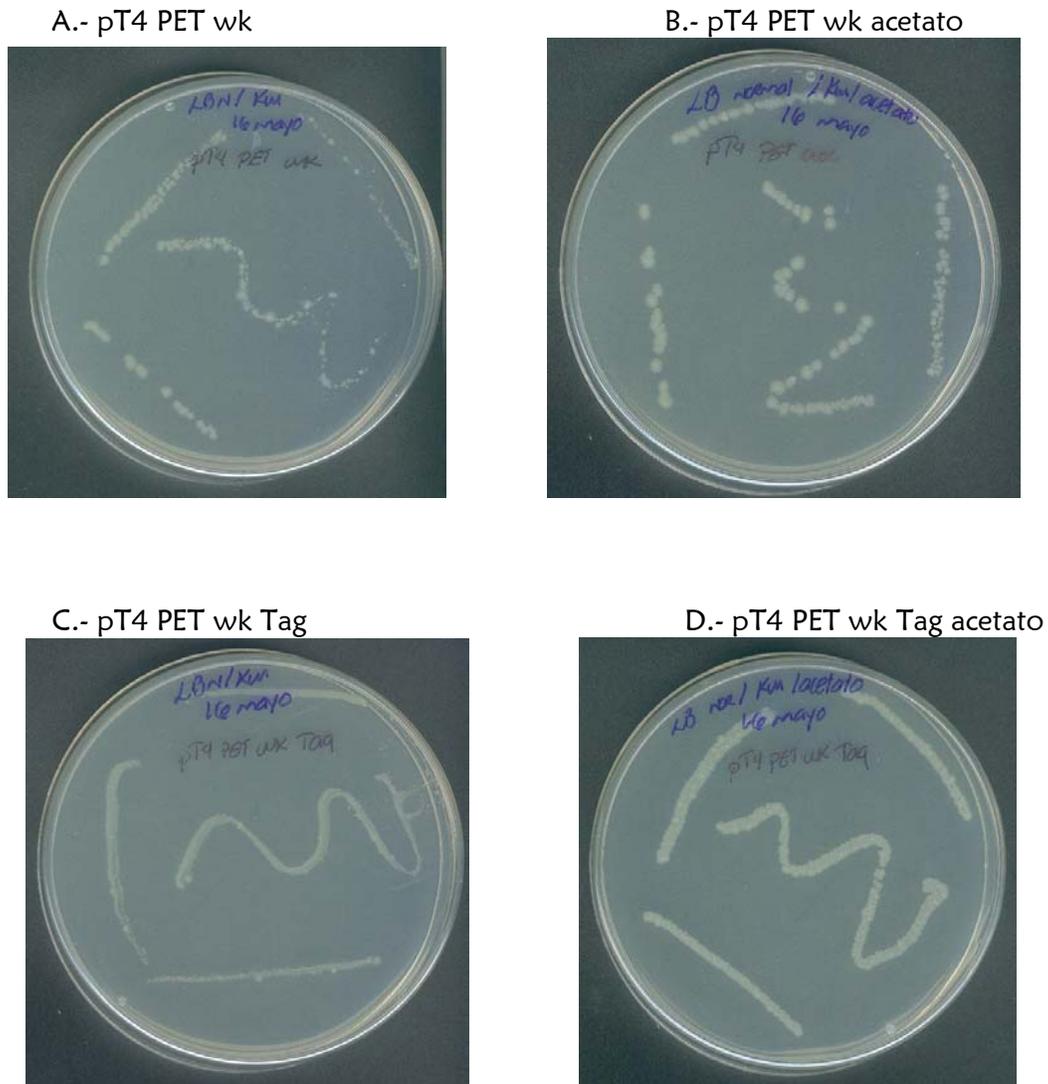


Figura 15.- Cultivos anaerobios de la cepa Val 23 transformada con construcciones que codifican para la PDC con diferentes extensiones en el carboxilo terminal de la proteína. A y B presentan el crecimiento de Val 23 transformada con el plásmido que contiene el gen silvestre de la PDC más una extensión en el extremo 3' que codifica para la cola de histidinas. C y D muestran a Val23 transformada con la construcción donde se reemplazó la cola de histidinas por la etiqueta de diez aminoácidos. En ambos casos, se observa un mejor crecimiento cuando las cajas de cultivo se suplementaron con acetato en el medio (B y D).

En resumen, se construyó con éxito una variante de PDC que tiene expresada en el carboxilo terminal una etiqueta de diez aminoácidos en lugar de una cola de histidinas. La variante aparentemente es tan funcional como la proteína silvestre de acuerdo a experimentos de complementación de anaerobiosis en la cepa Val 23.

RESULTADOS LDH

Utilizando los oligonucleótidos Tail 99 Nco y BSNNG/C, se logró amplificar un producto de 230 pb correspondiente a un fragmento del gen de *ldh* de *Bacillus subtilis*, el cual fue analizado en un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo su purificación de banda para la cuantificación del DNA y futuras reacciones de PCR.

Con ese producto, se realizó una segunda PCR tipo megaprimer para darnos un producto de amplificación de 1230 pb; este producto fue analizado en un gel de agarosa 1% (**Figura 16**) para después realizarse una purificación de banda.

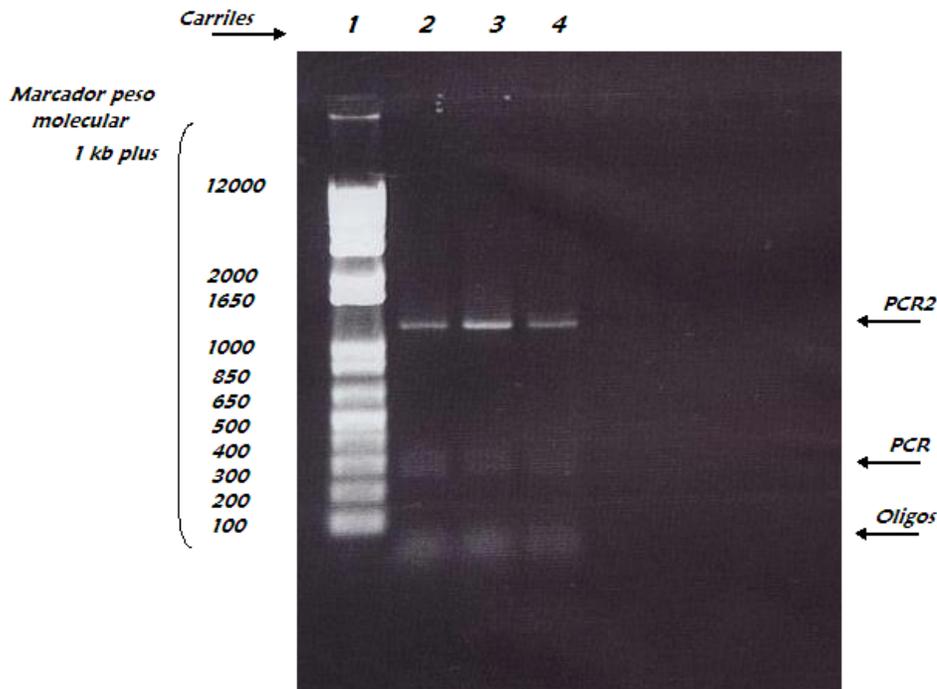


Figura 16.- Gel de agarosa al 1% que muestra el producto de la PCR2 tipo megaprimer.

Terminada la purificación del producto, se llevó a cabo la digestión del mismo con las enzimas Nco I y Hind III. La reacción de digestión se limpió por columnas de purificación y se procedió a su cuantificación para realizar una reacción de ligación con el vector de clonación pTrc99A previamente digerido con las enzimas de restricción apropiadas y purificado de gel. Después de la ligación, se procedió a la transformación de bacterias *E. coli* XL1 Blue mediante electroporación. Las bacterias transformadas se platearon en cajas de cultivo con el antibiótico respectivo.

Después de aproximadamente 72 hr de crecimiento a 30°C, las colonias fueron visibles y se decidió inocular 30 colonias sin selección de ningún tipo (medio LB y ampicilina); después de 12 a 16 hrs de cultivo con agitación se procedió a la formación de pastillas celulares mediante centrifugación de los cultivos bacterianos.

De las 30 plásmidos purificados, se escogieron algunos de manera azarosa para análisis y digestión con las enzimas Nco I y Hind III.

Las muestras digeridas con las enzimas de restricción se analizaron en gel de agarosa al 1% (*Figura 17*). La mayoría de las muestras aparentemente traían clonado un fragmento de DNA de alrededor del tamaño esperado, por lo que el restante de muestras que no habían sido analizadas, se sometieron al mismo proceso.

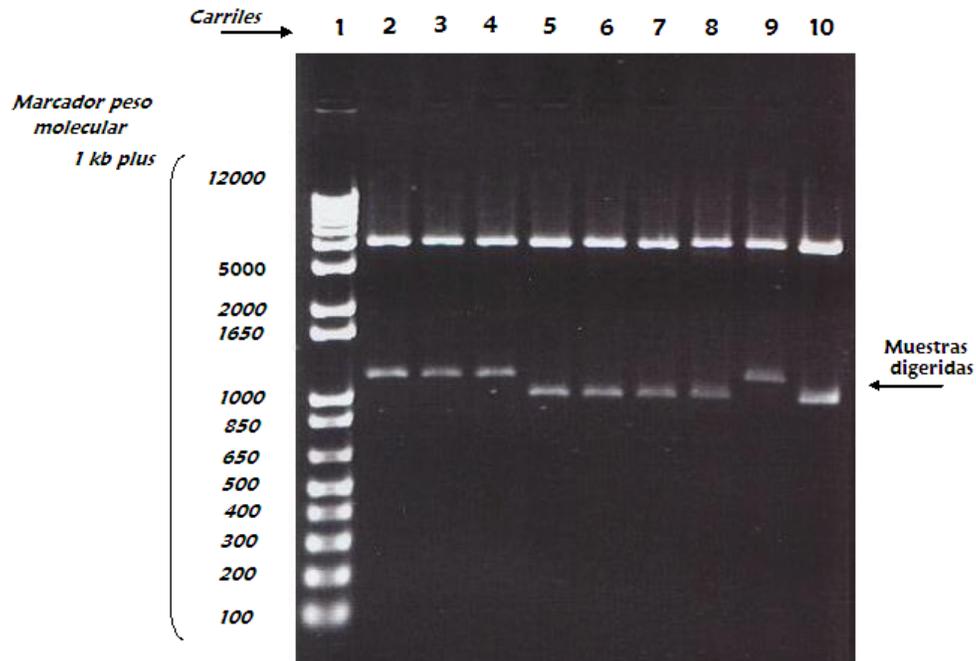


Figura 17.- Gel de agarosa al 1% en el cual observamos las muestras digeridas que se mandaron a secuenciar para el análisis de las mutaciones por saturación NNC/C.

Al comprobarse que las 30 muestras eran apropiadas, se llevó a cabo la secuenciación de las mismas, arrojando como resultados que de las 30 clonas secuenciadas, solo 15 resultaron con mutaciones en la zona de interés (*Tabla 8*). De las 15 clonas rescatadas, solo 7 traían mutaciones diferentes. La retransformación en la cepa Val 23 de los plásmidos conteniendo las diferentes variantes nos mostró que sólo la variante con Ala52 fue capaz de permitir el crecimiento anaeróbico, por lo que sólo con ella se trabajó de aquí en adelante.

Tabla 8. Mutaciones obtenidas. Solo con la mutación marcada * (Alanina) se pudo trabajar.

Codón	Aminoácido
ggt	Glicina
ctg	Leucina
ttg	Leucina
gcc	Alanina*
gtc	Valina
ccg	Prolina
atc	Isoleucina

Aparte de Alanina, se utilizaron como controles experimentales los plásmidos portadores del gen que codifica para la enzima silvestre (Asp52) y del gen que codifica para la variante inactiva (Gly52) previamente construida. Así pues, con el fin de caracterizar más detalladamente a las diferentes variantes, los diferentes plásmidos descritos se electroporaron en la cepa Val 23.

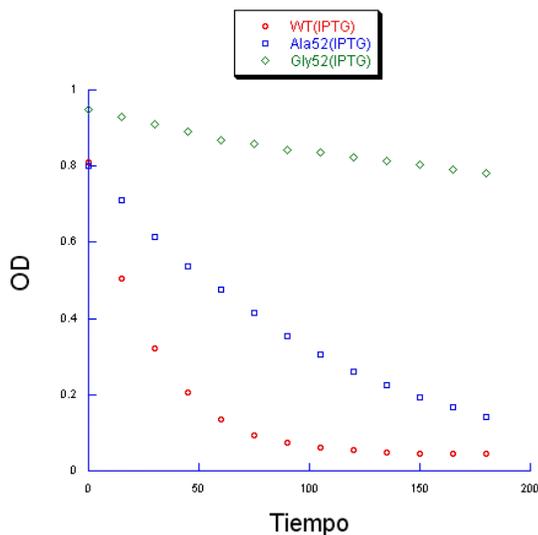
Se seleccionaron de forma azarosa colonias aisladas de las diferentes clonas y se inocularon en medio de crecimiento sin selección. Los cultivos finales se dividieron en dos partes: una parte se utilizó para medir la actividad enzimática y la otra parte se utilizó para detectar la presencia de la proteína.

MEDICIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Con el fin de observar propiedades catalíticas en las enzimas variantes con respecto a la proteína silvestre realizamos una caracterización preliminar de la actividad enzimática de LDH. A una parte de los cultivos bacterianos se les cuantificó su densidad óptica a 550 nm y se normalizaron a 2 OD por variante. La determinación de actividad enzimática de las diferentes clonas se realizó mediante la cuantificación de la desaparición de NADH en espectrofotómetro a una longitud de onda de 340 nm. Las reacciones se siguieron por 3 min y con lecturas en intervalos de 15 sg. Las

mediciones se realizaron al menos por duplicado y utilizando extractos bacterianos de cultivos con inducción y sin inducción con IPTG (*Figura 18*).

A.-



B.-

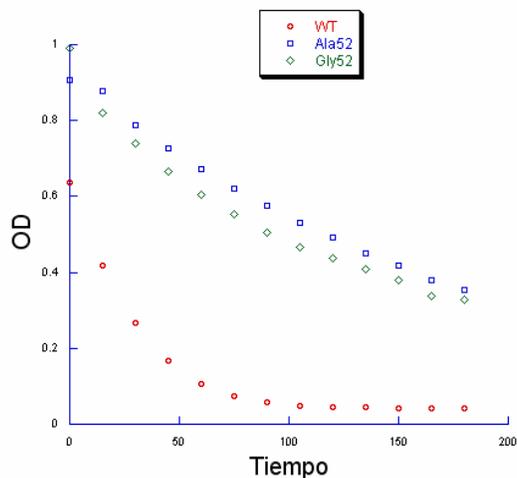


Figura 18.- Ensayo de actividad de lactato deshidrogenasa (desaparición de NADH). Las reacciones se realizaron al menos por duplicado, utilizando extractos de proteína soluble de los cultivos bacterianos inducidos con IPTG (A) o sin inducción con IPTG (B) de las clonas respectivas. En el experimento se utilizó una sola condición de concentración de sustrato y cofactores, así como de cantidad de extracto de proteínas.

CUANTIFICACIÓN Y PRESENCIA DE PROTEÍNA

La otra parte reservada de los cultivos se sometieron a preparación de un extracto de proteínas totales mediante sonicación. Se cuantificó la cantidad de proteína en los diferentes extractos por el método de Bradford, utilizando BSA de concentración conocida para realizar la curva patrón (*Figura 19*).

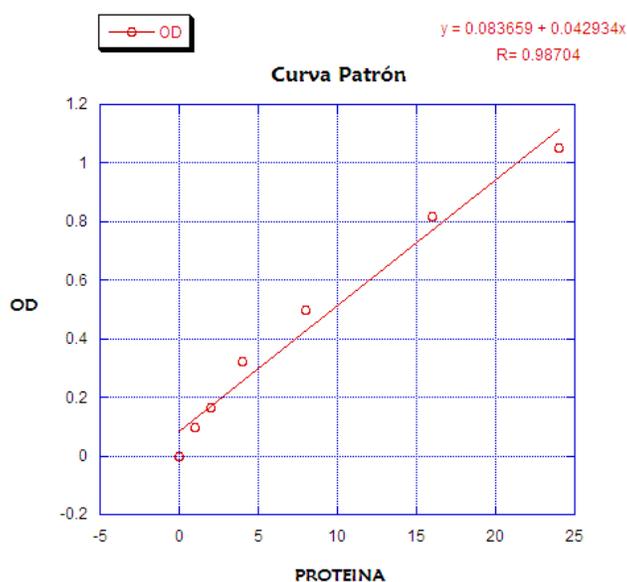
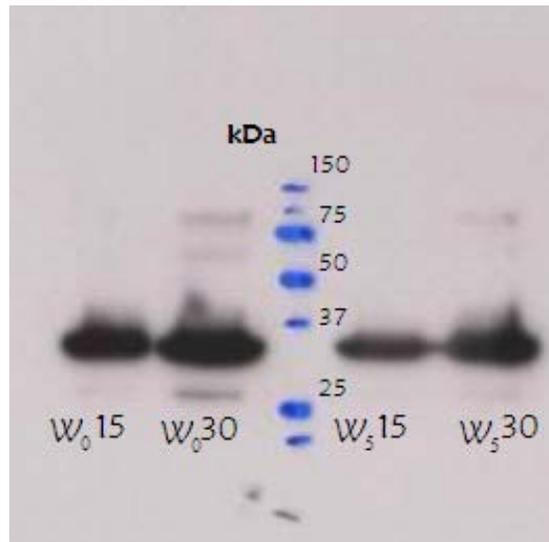


Figura 19.- Curva patrón de BSA calculada por el método de Bradford.

La identificación de las diferentes proteínas se realizó mediante un experimento tipo Western Blot (*Figuras 20*). Es claro de los resultados obtenidos, que la enzima silvestre se expresa mejor que las dos variantes y que a su vez, la variante Gly52 se expresa mejor que la variante con Ala52.

A.-



B.-

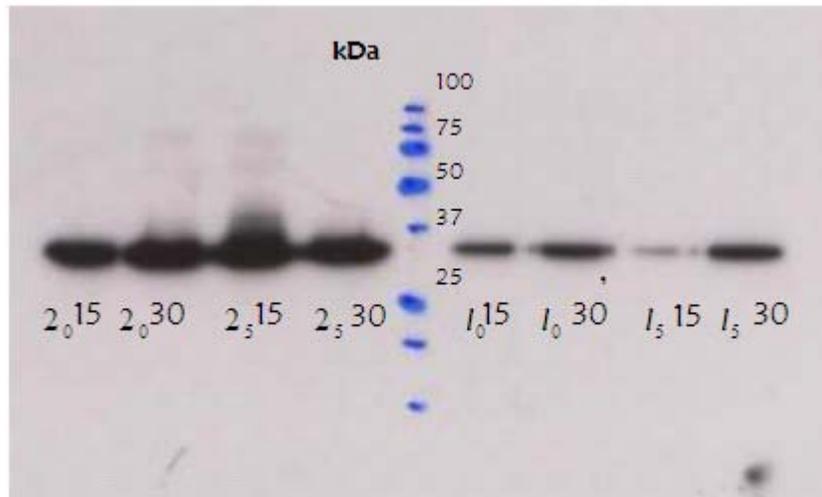
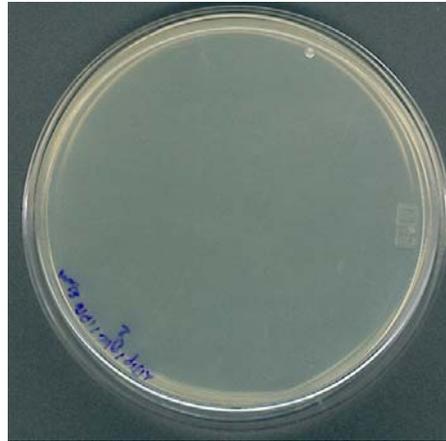


Figura 20.- Western blot de las proteínas de las diferentes mutantes (15 y 30 indican la cantidad de proteína en microgramos que se añadió al carril respectivo). A.- Resultado del Western con la enzima silvestre sin (W₀) y con (W₅) IPTG (0 ó 50 μ M); B.- Resultado del Western con las variantes Glicina (2) y Alanina (I), ambas sin y con IPTG.

CULTIVOS ANAERÓBIOS

Los cultivos anaeróbicos mostraron diferencias en cuanto al crecimiento y el tamaño de las colonias formadas por Val 23 transformada con las diferentes clonas mutantes (*Figuras 21 y 22*).

A.- pTrc99A silvestre/gluc/IPTG 50 μM B.- pTrc99A 2(Glicina)/gluc/IPTG 50 μM

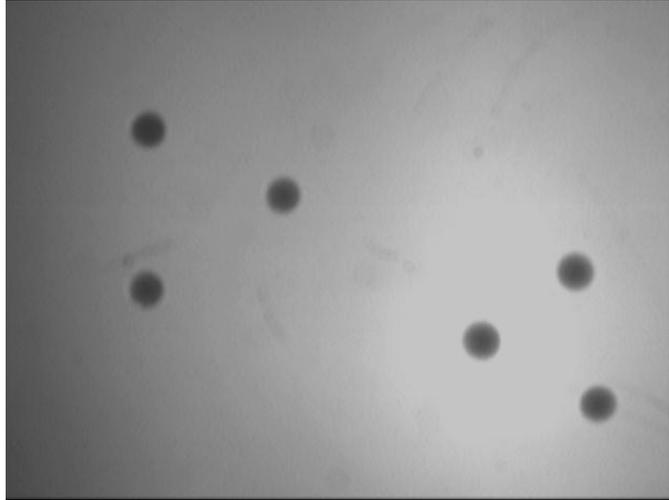


C.- pTrc99A 1 (Alanina)/gluc/IPTG 50 μM

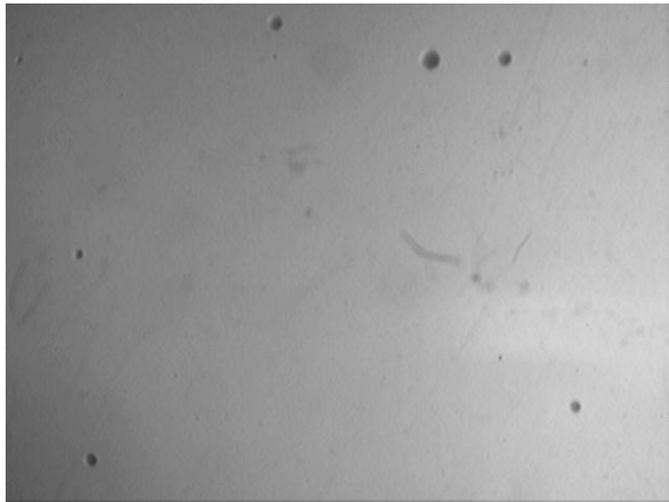


Figura 21.- Crecimiento anaeróbico de las cepas Val 23 transformada con A.- la clona silvestre, B.- con la clona 2 (Glicina) y C.- con la mutante (Alanina), respectivamente. Las condiciones de crecimiento se realizaron en medio LB modificado y adicionado con glucosa 1% final e IPTG 50 μM final. El crecimiento con la clona 2 (glicina) no se observa ya que el tamaño de las colonias es muy pequeño.

A.- pTrc99A silvestre/gluc/IPTG 50 μM Aumento:12X



B.- pTrc99A 2 (Glicina)/gluc/IPTG 50 μM Aumento: 12X



C.- pTrc99A I (Alanina)/gluc/IPTG 50 μ M Aumento: 12X

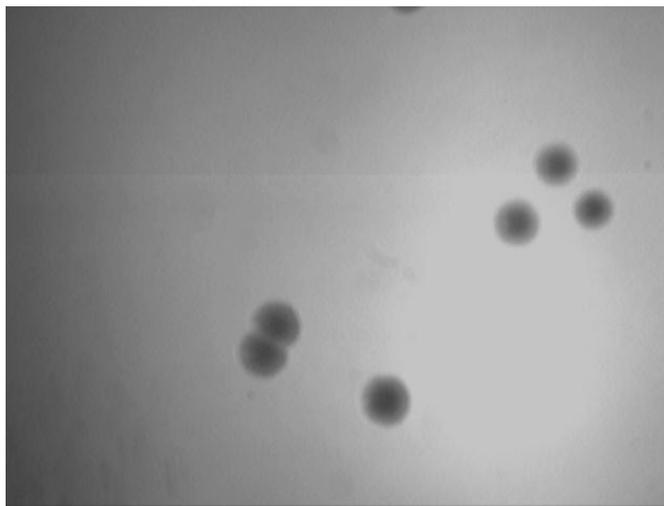


Figura 22.- Observación al microscopio micrométrico de las colonias anteriores a diferentes aumentos. A.- cepa Val 23 transformada con la clona silvestre, B.- transformada con la clona 2 (Gly52) y C.- transformada con la clona mutante (Ala52), respectivamente.

Para poder diferenciar mejor los tamaños de las colonias de las muestras, se sacó un promedio de las observadas en el microscopio (*Tabla 9*).

Tabla 9. Tamaño de las colonias

Muestra	Número de Rayas *	Milímetros
Wild Type	80-86	2.087
Alanina	118-125	3.031
Glicina	12-20	0.40

* Se considera que cuarenta rayas equivalen a 1 mm.

RE-SECUENCIACIÓN

Para re-secuenciar las clonas finales utilizadas se empleó el oligonucleótido 99 Nco anteriormente descrito. La secuencia nucleotídica sirvió para confirmar los cambios ya encontrados en análisis previos.

DISCUSION

Para el desarrollo de este trabajo, se siguieron dos estrategias importantes: mutagénesis sitio dirigida (inserción de la etiqueta de diez aminoácidos en el carboxilo terminal de la PDC) y mutagénesis a saturación (sustitución del residuo Gly52 por los diecinueve posibles aminoácidos).

La mutagénesis sitio dirigida, es una técnica que nos permite cambiar uno o más aminoácidos en la secuencia de DNA que codifica la enzima con la cual se va a trabajar. Esta técnica nos otorga una gran ventaja: es muy específica; esto se debe a que se conoce el sitio de la secuencia a modificar y así, podemos controlar las demás variantes del experimento.

Para llevar a cabo esta estrategia, se requiere de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con lo cuál se obtiene un DNA mutado en el lugar deseado y del diseño de un oligonucleótido (ya sea específico o con variabilidad tipo NNG/C), el cuál dirigirá el cambio en el sitio elegido.

Así, con esta estrategia llevamos a cabo el trabajo con ambas enzimas modelo trabajadas. En el caso de la lactato deshidrogenasa, obtuvimos después de diversas técnicas bioquímicas, treinta muestras de DNA que fueron secuenciadas, de las cuales solo quince contenían una mutación útil para nuestro objetivo; dichas mutaciones eran Glicina, Alanina, Valina, Prolina, Leucina (dos variantes con diferente codón) e Isoleucina.

Estas muestras se retransformaron en la cepa no fermentativa Val 23, y se llevó a cabo el crecimiento en anaerobiosis que arrojó que solo la Alanina, presentó formación de colonias.

La ausencia de formación de colonias en anaerobiosis y la inactividad mostrada por las demás variantes obtenidas nos permitieron descartarlas como variantes funcionales en la posición 52 de la enzima.

La actividad enzimática mostrada por las variantes Gly52 y Ala52 (Figura 16) explica su capacidad para complementar el crecimiento anaeróbico de la cepa Val23. Ambas variantes presentan una pobre actividad comparada con la actividad observada por la enzima silvestre. La enzima silvestre presenta una actividad robusta a pesar de utilizarse en cantidades de extracto celular mucho menores que las utilizadas por las variantes Gly52 y Ala52. Las diferencias de actividad observada por la variante Gly52 en la figura 16 se pueden explicar por una menor cantidad de extracto celular utilizada para el experimento mostrado en la figura 16A.

Los resultados del experimento tipo Western indican unos niveles de expresión similares para la enzima silvestre y la variante Gly52 independientemente del nivel de inducción. Sin embargo, la variante Ala52 presenta unos niveles de expresión hasta 3 veces menores que los observados por la enzima silvestre o la variante Gly52. Este hecho nos permite suponer unos mejores parámetros catalíticos para esta variante con respecto a la variante Gly52.

La mejora potencial en parámetros cinéticos de la variante Ala52 así como su menor demanda metabólica para la bacteria debido a su disminuido nivel de expresión pudieran explicar el mejor crecimiento en anaerobiosis de la cepa Val23 transformada con el plásmido que produce a esta variante (Figuras 19 y 20).

Con respecto al grupo de sustituciones hidrofóbicas no funcionales en la posición 52, no fue posible una caracterización más amplia debido a su incapacidad para reemplazar al residuo silvestre (aspártico) presente en esa posición.

Finalmente, aunque no se pudo explorar a los diecinueve aminoácidos en la posición Gly52, es claro de los resultados obtenidos que la cepa Val23 puede ser utilizada como una alternativa para seleccionar variantes activas de enzimas fermentativas como la lactato deshidrogenasa.

Con respecto a los resultados obtenidos con la piruvato descarboxilasa (PDC) se cumplió con los objetivos de remover la cola de histidinas presente en el carboxilo terminal de la proteína y agregar en su lugar una etiqueta de 10 aminoácidos que puede ser utilizada con mejor eficiencia para explorar la expresión de la enzima en experimentos futuros de evolución dirigida y selección para mejorar sus parámetros cinéticos.

Los experimentos de crecimiento anaeróbico de la cepa Val23 transformada con la construcción de la PDC que contiene la etiqueta en el carboxilo terminal, nos indicaron que la enzima variante es tan buena como la enzima silvestre para permitir el crecimiento bacteriano en esas condiciones.

Observamos un mejor crecimiento anaeróbico en cajas suplementadas con acetato gracias a la activación de una ruta alternativa para la producción de acetil CoA y por consiguiente, una mejora adicional en el crecimiento bacteriano.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró demostrar que la cepa Val 23 puede ser utilizada como medio de selección para el mejoramiento de enzimas fermentativas. Logramos identificar que la mutación Gly52Ala permite la producción de una variante de la lactato deshidrogenasa con propiedades catalíticas aparentemente mejoradas y por lo tanto a la formación de colonias en cultivos anaeróbicos de un tamaño similar al obtenido cuando la cepa es transformada con el plásmido portador del gene que codifica para la enzima silvestre. También se reemplazó una cola de histidinas en el carboxilo de la enzima piruvato descarboxilasa por una etiqueta de diez aminoácidos que puede utilizarse con mayor eficiencia para reconocimiento de la enzima en experimentos futuros de evolución dirigida de la enzima con el fin de mejorar sus parámetros cinéticos utilizando el sistema de selección aquí descrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. - <http://milksci.unizar.es/adit/enzimas.htm>
2. – McCoy, M. (2000)
Novozymes emerges
Chemical & Engineering News 19:23-25
3. – Cherry, J.R. & Fidantsef, A.L. (2003)
Directed evolution of industrial enzymes: an update.
Current Opinion in Biotechnology 14:438-443
4. – Pasteur, L. (1857)
Mémoire sur la fermentation appelée lactique.
Compt. Rend. 45: 913-916
5. – Buchner, E., (1897)
Alkoholische Gahrung ohne Hefezellen
Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 30:117-124.
6. – Spallanzani, L. (1783)
Expériences sur la Digestion de l'Homme et de différentes espèces d'animaux. Avec des considérations sur sa méthode de faire des expériences, & les conséquences pratiques qu'on peut tirer en médecine de ses découvertes; par Jean Senebier.
Geneva: Barthelemy Chirol.
7. – Sumner , J. B. (1926)
The isolation and crystallization of the enzyme of the urease.
Preliminary paper
The Journal of Biological Chemistry 69: 435-441.
8. – Northrop, J.H. (1930)
Cristalline pepsin
The Journal of General Physiology 13: 739-766
9. – Lehninger, A., Nelson, D. & Cox, M. (1995)

Principios de Bioquímica.
Ediciones Omega. Barcelona, 1012 pg.

10. – Van Beilen, J.B. & Li, Z. (2002)
Enzyme technology: an overview.
Current Opinion in Biotechnology 13:338-344

11. – Karl-Erich, Jaeger (2004)
Protein technologies & commercial enzymes white is the type-biocatalysts on the move.
Current Opinion in Biotechnology 15:269-271

12. – Farinas, E.T., Bulter, T. & Arnold, F.H. (2001)
Directed enzyme evolution.
Current Opinion in Biotechnology 12:545-551

13. – Hibbert, E.G. & Dalby, P.A. (2005)
Directed evolution strategies for improved enzymatic performance.
Microbial Cell Factories 4:29

14. – Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. & Gershenson, A. (2001)
How enzymes adapt: lessons from directed evolution.
Trends in Biochemistry Science 26:100-106

15. – Mayr, Ernest (1992)
Una larga controversia: Darwin y el darwinismo.
Ed. Crítica, Barcelona, España. 209 pps.

16. – Tobin, M.B., Gustafsson, C. & Huisman, G.W. (2000)
Directed evolution: the "rational" basis for "irrational" design.
Current Opinion in Biotechnology 10:421-427

17. -Chatterjee, R. & Yuan, L. (2006)
Directed evolution of metabolic pathways.
Trends in Biotechnology 24:28-38

18. – Darwin, C. (1859).
The Origin of Species by Means of Natural Selection.
First Edition, London: Murray.
Reedited by E Mayr,
Harvard University Press, Cambridge Massachusetts (1964), p. 5
19. – Griffiths, A., Miller, J., Suzuki, D., Lewontin, R. & Gelbart, W. (2000)
Genética.
7a. Ed. Mc. Graw Hill Interamericana. 860 pps.
- 20.– Kuchner, O. & Arnold, F.H. (1997)
Directed evolution of enzyme catalyst.
Trends in Biotechnology 15:323-330
21. – Neylon, C. (2004)
Chemical and biochemical strategies for the randomization of protein encoding DNA sequences: library construction methods for directed evolution.
Nucleic Acids Research 32:1448-1489
- 22.– Tao, H. & Cornish, V.W. (2002)
Milestones in directed enzyme evolution.
Current Opinion in Chemical Biology 6:858-864
- 23.– Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002)
Molecular Biology of the Cell 4th ed.
New York and London: [Garland Science](#).
- 24.– Dobritzsch, D., K ning, S., Schneider, G. & Gouguang, W. (1998)
High resolution crystal structure of pyruvate decarboxylase from Zymomonas mobilis.
The Journal of Biological Chemistry 273:20196-20204
- 25.– Zhou, S., Shanmugam, K.T. & Ingram, L.O. (2003)
Functional replacement of the Escherichia coli D-(+)-Lactate dehydrogenase gene (ldhL) from Pediococcus acidilactici.
Applied & Environmental Microbiology 69:2237-2244

- 26.– [Mi, Yanli](#) (2002)
Protection mechanisms of excipients on lactate dehydrogenase during freeze-thawing and lyophilization.
University of Tennessee Health Science Center ETDs
- 27.– Sambrook, J. & Russel, D. (2001)
Molecular Cloning: A laboratory manual.
3a. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 28.- Ingram, L.O. & Conway, T (1998)
Expression of different levels of ethanologenic enzymes from Zymomonas mobilis in recombinant strains of Escherichia coli
Applied & Environmental Microbiology 171:342-348
- 29.– Fairoz, M., Alan, K. & Clarck, D. (1989)
Mutants of Escherichia coli deficient in the fermentative lactate dehydrogenase
Journal of Bacteriology 69:399-407
- 30.– Zhou, S., Causey TB., Hascua, A., Shanmugam, KT. & Ingram, L.O. (2003)
Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered Escherichia coli W3110
Applied & Environmental Microbiology
31. –Vázquez-Limón, C., Martínez, A., Gosset, G., López-Munguía, A. y Osuna, J.
Growth rate is controlled by enzymatic levels that allow NAD+ regeneration in a non-fermentative Escherichia coli strain
(En Preparación)
- 32.- Monroy-Lagos, O. Soberon, X. Gaytan, P. Osuna, J. (2006).
Improvement of an unusual twin-arginine transporter leader Peptide by a codon-based randomization approach.
Applied & Environmental Microbiology 72:3797-3801.
- 33.– Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979)
Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.
Biotechnology 24:145-149

- 34.– Schmidt-Dannert, C. (2001)
Directed evolution of single proteins, metabolic pathways, and viruses.
Biochemistry 40: 13125–13136
- 35.– [Williams](#), G.J., [Nelson](#), A.S. & [Berry](#), A. (2004)
Directed evolution of enzymes for biocatalysis and the life sciences.
Cell. Mol. Life Sci. 61:3034–3046
- 36.– Chandra Raj, K., Ingram, O. & Maupin-Furlow, J.A. (2001)
Pyruvate decarboxylase: a key enzyme for the oxidative metabolism of lactic acid by Acetobacter pasteurianus
[Archives of Microbiology](#), 176:443-51.