



UNAP



**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

TESIS

**“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA L-
GALACTOSA DESHIDROGENASA DE LA VÍA D-MANOSA/L-
GALACTOSA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIOLÓGO**

PRESENTADO POR:

JHON ANTONI VARGAS SANTILLAN

ASESORES

Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.

Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.

Blgo. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, M.Sc.

IQUITOS, PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN N°056



UNAP
Universidad Nacional de la Amazonía Peruana
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS N° 056

Iquitos, 17 de abril de 2019

En la ciudad de Iquitos, a los diecisiete días del mes de abril del 2019 y, siendo las 17:10 horas, se reunió en el auditorio de las Direcciones de Escuelas de la Facultad de Ciencias Biológicas – UNAP, el Jurado Calificador y Dictaminador de la tesis que suscribe, designado con Resolución Directoral N° 207-2017-DEFP-B-FCB-UNAP, de fecha 16 de octubre del 2017, presidida e integrada por: **Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra., (Presidenta)**, **Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, Mg.Sc. (Miembro)** y **Blgo. MARX PEÑA HIDALGO, M.Sc., (Miembro)**, para escuchar, examinar y calificar la sustentación de la tesis titulada: **“CLONACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA ENZIMA L-GALACTOSA DESHIDROGENASA DE LA VÍA D-MANOSAL-GALACTOSA DE *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh”**.

La Dirección Profesional de Ciencias Biológicas, mediante Resolución Directoral N° 020-2019-DEP-B-FCB-UNAP, de fecha 11 de abril del 2019, declara expedita para SUSTENTAR LA TESIS del Br. **JHON ANTONI VARGAS SANTILLAN** promoción 2017-1, graduado con R.R. N° 0050-2018-UNAP de fecha 11 de enero 2018; se reconoce como ASESORES de la tesis a los profesionales: **Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.**, **Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.** y **Blgo. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, M.Sc.**

Durante todo el desarrollo de la sustentación y defensa de la tesis, el Jurado Calificador y Dictaminador, considerando lo establecido en el nuevo Reglamento de Grados y Títulos, aprobado y puesto en vigencia mediante RESOLUCIÓN DECANAL N° 206-2012-FCB-UNAP; realizó la evaluación del desempeño del bachiller, teniendo en cuenta los criterios y el puntaje consignados en la tabla de valoración.

Culminado el acto, el Jurado Calificador y Dictaminador, con el puntaje alcanzado por el Bachiller y, aplicando los términos establecidos en la tabla de calificación; dió como veredicto; APROBADO LA SUSTENTACIÓN DE TESIS, CALIFICADA COMO Excelente; quedando en consecuencia el candidato **apto** para ejercer la profesión de Biólogo, previo otorgamiento del título profesional por la autoridad universitaria competente y, su correspondiente inscripción al Colegio de Biólogos del Perú.

Finalmente, la Presidenta del Jurado Calificador y Dictaminador levantó el acto académico siendo las 18:15 horas y en fe de lo cual, todas los integrantes suscriben el presente acta de sustentación por septuplicado.

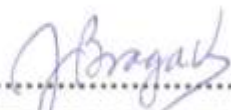
Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZEN JULCA, Mg.Sc.
MIEMBRO

Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.
PRESIDENTA

Blgo. MARX PEÑA HIDALGO, M.Sc.
MIEMBRO

Somos la Universidad licenciada más importante de la Amazonía del Perú, rumbo a la acreditación y la internacionalización

JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR



.....
Blga. JANETH BRAGA VELA, Dra.

PRESIDENTA



.....
Blgo. PEDRO MARCELINO ADRIANZÉN JULCA, Mg.Sc.

MIEMBRO



.....
Blgo. MARX PEÑA HIDALGO, M.Sc.

MIEMBRO

ASESORES



.....
Blgo. JUAN CARLOS CASTRO GÓMEZ, Dr.



.....
Blgo. JORGE LUIS MARAPARA DEL AGUILA, Dr.



.....
Blgo. DIEGO ANTONIO LEONARDO CABREJOS, M.Sc.

DEDICATORIA

A mi madre Pilar Santillan, por su amor infinito, paciencia, comprensión y apoyo incondicional, fundamental para lograr mis sueños y metas; mis hermanos: Miguel y Laura que me impulsan a seguir creciendo como profesional; mis abuelos: Amelia, Neptalí y Betty, por ese amor infinito que siempre me dan; mi gran amigo y primo: Oliver Tuanama, un ejemplo de hijo y persona, mis tíos(as) y primos (as): que siempre estuvieron y están para apoyarme en las buenas y las malas. A la memoria de mi padre Marlon Vargas.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, por ser la fuente de inspiración y fuerza para seguir por el buen camino.

A mis orientadores; Dr. Juan Carlos Castro Gómez, Dr. Jorge Marapara Del Águila y el Blgo. Diego Antonio Leonardo Cabrejos por la paciencia, oportunidad, enseñanzas y confianza brindada a mi persona. Asimismo, un agradecimiento al Dr. Richard Charles Garratt por brindarme la oportunidad de realizar una estancia científica en su Laboratorio (IFSC-USP).

Al Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía, Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología (CIRNA-UELIB) y el Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, por brindarme las instalaciones de sus laboratorios.

Al Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA) contrato N° 188-2018-PNIA-PASANTIA y FONDECYT contrato 069-2019-FONDECYT por el financiamiento de la pasantía de investigación realizada en IFSC-USP.

A mis profesores y amigos de la UELIB-CIRNA: Pedro Adriánzén, Napoleón Rodríguez (Doctor), Jhoao Fasabi (Patita), Andry Mercedes (China), Richard Orbe (Torbe) y Stalin Vásquez (Cachin), a cada uno de ellos un especial y sincero agradecimiento, por formar y ser parte de todo lo aprendido hasta el momento, mil gracias por esos momentos inolvidables compartidos dentro y fuera de la UELIB.

A mi familia y amigos que de alguna manera u otra contribuyeron en la culminación del presente trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ACTA DE SUSTENTACIÓN N°056	ii
JURADO CALIFICADOR Y DICTAMINADOR	iii
ASESORES	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO	vii
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: MARCO TEORICO	3
1.1. Aspectos generales de <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh	3
1.1.1. Distribución geográfica.....	3
1.1.2. Taxonomía	4
1.1.3. Característica botánica.	5
1.1.4. Ecología	5
1.1.5. Importancia y usos	6
1.2. Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico (AA, vitamina C)	6

1.2.1. L-galactosa deshidrogenasa (GDH).....	7
1.3. Herramientas bioinformáticas.....	8
1.4. Clonación del ADN mediante métodos de ADN recombinante.....	9
1.4.1. Proteína Recombinante	11
CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES.....	13
2.1. Formulación de la hipótesis.....	13
2.2. Variables y su operacionalización	13
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	14
3.1. TIPO Y DISEÑO.....	14
3.2. DISEÑO MUESTRAL	14
3.2.1. Población	14
3.2.2. Muestra.....	14
3.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES.....	14
3.3.1. Reactivos	14
3.3.2. Equipos.....	15
3.3.3. Materiales varios.....	16
3.4. PRECEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	17
3.4.1. Lugar de ejecución.....	17
3.4.2. Identificación en el transcriptoma de <i>Myrciaria dubia</i> del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa	17
3.4.3. Caracterización <i>in silico</i> de la enzima L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>Myrciaria dubia</i> ...	18

3.4.4. Clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>Myrciaria dubia</i>	19
3.4.4.1. Test de expresión y solubilidad de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de <i>Myrciaria dubia</i>	21
3.4.4.2. Purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de <i>Myrciaria dubia</i>	22
3.4.5. Caracterización funcional de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de <i>Myrciaria dubia</i>	23
3.4.5.1. Caracterización biofísica.....	23
3.4.5.1.1. Cromatografía de exclusión molecular acoplada al difractor de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS).....	23
3.4.5.1.2. Análisis del plegamiento de la proteína <i>MdGDH</i> y su estabilidad térmica con espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD).	24
3.4.5.2. Caracterización bioquímica.....	25
3.4.5.2.1. Cuantificación de la <i>MdGDH</i>	25
3.4.5.2.2. Actividad enzimática de la <i>MdGDH</i>	26
3.4.5.2.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la <i>MdGDH</i>	26
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	29
4.1 Identificación en el transcriptoma de <i>Myrciaria dubia</i> del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa.	29

4.2 Caracterización <i>in silico</i> de la enzima L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>Myrciaria dubia</i>	30
4.3. Clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>Myrciaria dubia</i>	36
4.4. Caracterización estructural de la enzima <i>MdGDH</i>	38
4.4.1. Caracterización biofísica	38
4.4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular acoplada al esparcimiento de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS).....	38
4.4.1.2. Análisis del plegamiento de la enzima <i>MdGDH</i> y su estabilidad térmica con espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD) ..	40
4.5. Caracterización funcional de la enzima <i>MdGDH</i>	43
4.5.1. Actividad enzimática	43
4.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos de <i>MdGDH</i>	43
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	45
CAPITULO VI: CONCLUSIONES	51
CAPITULO VII: RECOMENDACIONES.....	52
CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN.....	53
ANEXOS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de <i>Myrciaria dubia</i>	3
Figura 2. Diagrama de flujo para la clonación de un fragmento de ADN (gen) de interés.	10
Figura 3. Mapa del vector de expresión Pet151/D-TOPO-GDH (6,747 pb) .	20
Figura 4. Flujograma de la clonación y caracterización de la enzima <i>MdGDH</i>	
28	
Figura 5. Mapa de secuencias del gen que codifica la enzima <i>MdGDH</i> en la base de datos de transcritos ensamblados del transcriptoma de frutos de <i>M. dubia</i>	29
Figura 6. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la enzima <i>MdGDH</i> ..	32
Figura 7. Comparación de las secuencias de aminoácidos de <i>M. dubia</i> (Md) y de sus homólogos presentes en otras especies Eg: <i>Eucalyptus grandis</i> (GenBank: XP_010065820.1), Rc: <i>Ricinus communis</i> (GenBank: XP_002518304.1), Cs: <i>Camellia sinensis</i> (GenBank: AGI78461.1), Ad: <i>Actidinia deliciosa</i> (GenBank: AAO18639.1), At: <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank: ADJ21815.1) y So: <i>Spinacea oleracea</i> (GenBank: XP_021848337.1). Los residuos de aminoácidos conservados en más de tres secuencias están sombreados. Los asteriscos muestran el consenso de residuos de aminoácidos en las siete especies.	34
Figura 8. Árbol filogenético que muestra la relación filogenética de <i>MdGDH</i> con las correspondientes enzimas de otras especies.	35
Figura 9. Cromatografía del test de solubilidad de la enzima <i>MdGDH</i> expresada en dos temperaturas. M: marcador de masa molecular, P: fracción	

insoluble, S: fracción soluble, realizada en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%).36

Figura 10. Cromatografía de afinidad de la enzima *MdGDH*. M: marcador de masa molecular, NI: Proteína no expresada con el agente inductor, P: fracción insoluble, S: fracción soluble, NL: Proteínas que no interactúan con el Ni²⁺ inmovilizado en la resina, L1: Lavado, L2: Lavado con 25 mM de imidazol, E1: elución con 100 mM de imidazol, E2: elución con 250 mM de imidazol, E3: elución con 500 mM de imidazol. Electroforesis realizada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%.37

Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular con la matriz HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade. (A). SDS-PAGE al 10% de las eluciones 85 a 93 (1 mL de cada elución) obtenidas en la purificación por exclusión molecular de la enzima *MdGDH*. M: marcador de peso molecular (B). Perfil de absorbancia a 280 nm de las eluciones 20 a 140 en el proceso de purificación de la enzima *MdGDH* por cromatografía de exclusión molecular.38

Figura 12. Cromatograma de SEC-MALS de la enzima *MdGDH*. El índice de refracción de la muestra (dRI), la cual eluye en un tiempo determinado, es usado para calcular el peso molecular del pico observado. La línea horizontal, muestra la homogeneidad de la muestra, el cuadro nos muestra los datos calculados por el SEC-MALS.....39

Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de la enzima *MdGDH* con los cofactores enzimáticos NAD⁺ y NADH empleando la matriz Superdex 200 10/300 GL.40

Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de la enzima monomérica <i>MdGDH</i> . Los espectros muestran mínimos entre 208 y 222 nm, compatibles con proteínas de tipo $\alpha\beta$.	41
Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de la enzima <i>MdGDH</i> en un rango de temperaturas de 20 a 80°C.	42
Figura 16. Isotherma de desnaturalización térmica de la enzima <i>MdGDH</i> , medida por la señal de dicroísmo circular a 222 nm. El T_m fue de 48°C.	42
Figura 17. Actividad catalítica de la enzima <i>MdGDH</i> recombinante. Evidencia de la formación de los productos de la reacción L-galactono-1,4-lactona y $\text{NADH} + \text{H}^+$.	43
Figura 18. Efecto de la concentración del sustrato L-galactosa sobre la actividad catalítica de la enzima <i>MdGDH</i> recombinante.	44

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Matriz del porcentaje de identidad de la enzima L-galactosa deshidrogenasa (GDH) de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank: ADJ21815.1) con secuencias de transcritos ensamblados del transcriptoma de frutos de <i>M. dubia</i>	30
Tabla 2. Composición de aminoácidos de la enzima <i>MdGDH</i>	31
Tabla 3. Características físico-químicas de la enzima <i>MdGDH</i>	31
Tabla 4. Porcentaje de Identidad de la enzima <i>MdGDH</i> con sus homólogos de otras especies de plantas depositadas en el GenBank.	33

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Vías metabólicas para la biosíntesis y reciclaje de vitamina C reconstruídas en base al metaensamblado y anotación del transcriptoma de frutos de <i>M. dubia</i> . Las reacciones de la vía D-manosa/L-galactosa son representadas por las flechas de color verde... ..	61
Anexo 2. Preparación de células competentes para transformación por shock térmico.	62
Anexo 3. Soluciones para la preparación de geles separadores para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida con tris-glicina.....	64

RESUMEN

En la amazonía peruana los frutos de *Myrciaria dubia*, se caracterizan principalmente por su alto contenido de AA, lo cual representa una alternativa para el desarrollo de procesos biotecnológicos de producción de AA. En camu-camu, para la biosíntesis de AA existen 5 vías metabólicas, sin embargo, ninguna de estas vías ha sido caracterizada, ni siquiera parcialmente. Es por ello que se clono y caracterizo funcionalmente a la enzima L- galactosa deshidrogenasa (GDH) de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*. Para esto se identificó en el transcriptoma de *M. dubia* la secuencia del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa, la secuencia fue optimizada y ligada al vector de expresión (pET-TOPO), esta se expresó en *Escherichia coli* Rosetta BL21 (DE3). La enzima fue purificada por cromatografía de Afinidad y Exclusión Molecular, eluyendo una molécula con una masa molecular calculada de 38,6 kDa (masa teórica 39,3 kDa), demostrando que la enzima es un monómero en solución. La enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de *M. dubia* (*MdGDH*) mostro actividad frente a L-galactosa en presencia de NAD⁺, así mismo, presento un $K_m = 0.3533$ efecto de una cinética de Michaelis-Menten. Los resultados obtenidos sugieren que L-galactosa deshidrogenasa estaría relacionada con el alto contenido de AA en camu-camu, así mismo, este trabajo proporciona el modelo para realizar los estudios de las otras enzimas que están involucradas en la biosíntesis de AA.

Palabras clave: camu-camu, *MdGDH*, cinética enzimática, L-galactosa deshidrogenasa.

ABSTRACT

In the Peruvian Amazon, the fruits of *Myrciaria dubia* are mainly characterized by their high content of ascorbic acid (AA), which represents an alternative for the development of biotechnological processes of AA production. In camu-camu, for the biosynthesis of AA there are 5 metabolic pathways, however, none of these pathways has been characterized. Here, we report the study of the enzyme L-galactose dehydrogenase (GDH) of the D-mannose / L-galactose pathway of *M. dubia*, that was cloned and functionally characterized. For this, the sequence of the gene encoding the enzyme L-galactose dehydrogenase was identified in the *M. dubia* transcriptome, the sequence was optimized and insert into the expression vector (pET-TOPO), this was expressed in *Escherichia coli* Rosetta BL21 (DE3). The enzyme was purified by affinity and molecular exclusion chromatography, eluting a molecule with a calculated molecular mass of 38.6 kDa (theoretical mass 39.3 kDa), demonstrating that the enzyme is a monomer in solution. The recombinant enzyme L-galactose dehydrogenase of *M. dubia* (*MdGDH*) showed activity against L-galactose in the presence of NAD⁺, likewise, it showed a $K_m = 0.3533$ effect of a Michaelis-Menten kinetics. The results obtained suggest that L-galactose dehydrogenase would be related to the high content of AA in camu-camu, likewise, this work provides the model to perform studies of the other enzymes that are involved in the biosynthesis of AA.

Keywords: camu-camu, *MdGDH*, enzymatic kinetics, L-galactose dehydrogenase.

INTRODUCCIÓN

El Ácido L-Ascórbico (AA) o vitamina C es una molécula multifuncional importante para las plantas, animales y para el hombre por sus múltiples funciones. Dentro de ellas, por ejemplo, por su acción antioxidante que minimiza los daños causados por los radicales libres, estimula el crecimiento, participa en la reparación de tejidos, etc. Sin embargo, debido a que el hombre y otras especies de animales han perdido la capacidad de sintetizarlo se tiene que obtenerlo principalmente de las plantas (1–4). Es por ello que, para satisfacer la creciente demanda de AA, en las últimas décadas se han desarrollado procesos de producción industrial (producción mundial de ~80 000 toneladas anuales) que generan ingresos superiores a los 600 millones de dólares (5–7). Estos procesos de producción industrial generan diversos problemas ambientales, legislativos y costos capital (5). Para tratar de minimizar estos problemas, se han desarrollado alternativas para la producción biotecnológica de AA empleando biotransformaciones microbianas en ciertas etapas del proceso productivo (5,6,8), pero aún no han resuelto los grandes daños ambientales.

Recientemente se han descubierto varias vías metabólicas que sintetizan AA en las plantas, entre estas figuran la vía del myo-inositol, vía del ácido galacturónico, vía de la L-gulosa y la vía de D-manosa/L-galactosa (8–11). De estas, la vía de D-manosa/L-galactosa, también conocida como la vía de Smirnoff-Wheeler, es considerada la más importante para la biosíntesis de AA porque conserva los 4 pasos químicos mínimamente requeridos para la conversión de glucosa a AA (2,10,12,13). En esta vía la D-manosa-1-fosfato

es convertida en AA mediante seis enzimas, una de estas enzimas claves es la L-galactosa deshidrogenasa (3,13).

La GDH cataliza la oxidación de L-galactosa a L-galactono-1,4-lactona (GalDH), como penúltima etapa en la síntesis de AA en plantas y las evidencias indican que es la enzima reguladora de la vía (6,13,15–17). La caracterización bioquímica y molecular de esta enzima ha sido realizada para especies de plantas como *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) (3,13), *Actinidia deliciosa* (Kiwi) (17), *Pisum sativum* (guisante) (13), *Spinacia oleracea* (espinaca)(15) y *Oryza sativa* (arroz) (18). Sin embargo, aún no hay reportes para *Myrciaria dubia* (camu-camu), un frutal arbustivo nativo de la Amazonía con gran demanda por mercados locales, nacionales e internacionales debido a su capacidad de producir diversos compuestos bioactivos y sustancias con potencial uso farmacológico, además de ser más conocido por su alto contenido de AA, el cual puede llegar hasta los 2 a 3 g por cada 100 g de pulpa (19,20).

La elucidación de esta vía biosintética en particular representa nuevas oportunidades para el desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción de AA. (5,6,8). Sin embargo, para poder desarrollar estos procesos biotecnológicos ecoamigables para la biosíntesis de AA es preciso caracterizar funcionalmente a las enzimas involucradas. Por tanto, el objetivo principal de esta investigación fue clonar y caracterizar la enzima L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*.

CAPÍTULO I: MARCO TEORICO

1.1. Aspectos generales de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh

1.1.1. Distribución geográfica

El camu-camu es un frutal arbustivo nativo de la amazonia peruana y el cerrado (ecoregión) brasileño (4). En el Perú, la región de Loreto es la que tiene mayor población natural de camu-camu (Figura 1), superando a las regiones Ucayali, San Martín y Madre de Dios, (21). No obstante, existe rodales naturales en Bolivia, Colombia, Ecuador y Venezuela. (22).

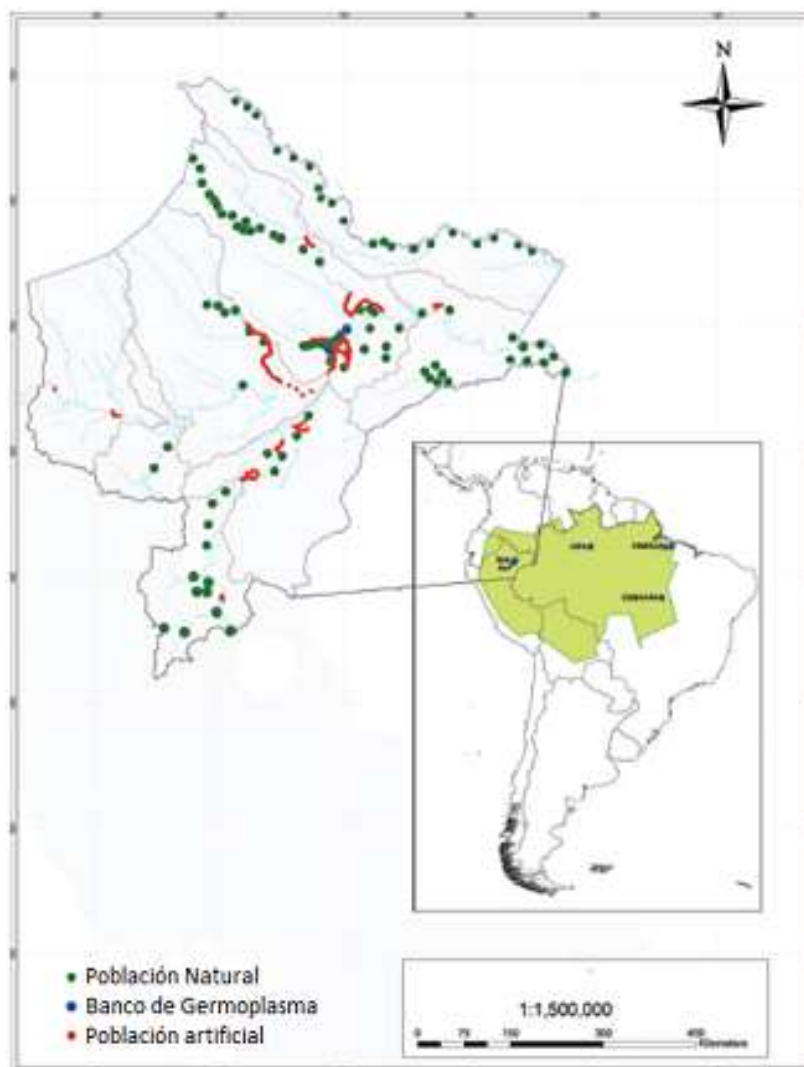


Figura 1. Distribución geográfica de *Myrciaria dubia*. Fuente: Castro et al, 2018 (21).

1.1.2. Taxonomía

Los estudios taxonómicos actuales del APG III y APG IV (23,24), clasifican a la especie estudiada de la siguiente manera:

Dominio : Eukaryota

Reino : Plantae

Clado : Angiosperms

Clado : Eudicots

Clado : Core eudicots

Clado : Rosids

Clado : Malvids

Orden : Myrtales

Familia : Myrtaceae

Subfamilia : Myrtoideae

Género : Myrciaria

Especie : dubia

Nombre científico : *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh

Nombre común : “camu-camu” (Perú), “Cacari” (Brasil)

1.1.3. Característica botánica.

El camu-camu puede llegar a medir entre 4 a 8 m de altura y puede presentar tres morfologías: tipo columnar (poca o nula ramificación), tipo intermedio (ramificación que empieza a una altura de 50 a 70 cm del suelo) y el tipo abierta o cónica, (ramificaciones desde el suelo), este último desde el punto de vista agronómico es ideal para las plantaciones, debido a las múltiples ramificaciones que presenta para el soporte de los frutos (21,22,25). Por lo general, el tallo y las ramas son flexibles, corteza ritidoma (desprendimiento fácil de corteza), las hojas son simples de borde liso, elípticas-lanceoladas y con el ápice acuminado. La especie inicia la floración cuando alcanzan un diámetro bAAI de 2,0 cm, que corresponde a los arbustos que tienen entre dos y tres años aproximadamente. Las yemas florales emergen desde las ramas superiores, hacia las ramas inferiores. Por lo tanto, un individuo puede presentar yemas florales, flores y frutos en varios estados de desarrollo al mismo tiempo (26). Los frutos son globulares de superficie lisa y brillante, color rojo oscuro hasta negro púrpura al madurar, miden de 2 a 4 cm de diámetro, con 1 a 4 semillas por fruto. Las semillas son reniformes, aplanadas, cubiertas por una vellosidad blanca con menos de 1 mm de longitud (20–22,25,27–29).

1.1.4. Ecología

El camu-camu crece y se desarrolla bien en ambientes tropicales. En Loreto, donde están bien marcadas las épocas de vaciante y creciente (periodo seco e inundación, respectivamente), los rodales naturales de camu-camu permanecen sumergidos por 4 a 5 meses, debido a que crece

comúnmente a orillas de quebradas y cochas de la cuenca amazónica (22,26). En el Perú, durante los últimos 15 años, se ha realizado un gran esfuerzo de investigación en la especie, lo que ha permitido tener avances en su adaptación a suelos inundables y suelos de tierra firme o altura con excelentes resultados (20).

1.1.5. Importancia y usos

Camu-camu es una fuente importante de AA, siendo la cascara el tejido con mayor concentración de esta vitamina, tanto en estado maduro y sobremaduro. Al compararlo con otras especies (limón, naranja, toronja, etc.), camu-camu presenta mayor concentración de AA que cualquier otra fruta o vegetal. La pulpa de camu-camu y otros tejidos han mostrado potenciales aplicaciones en la industria alimentaria (20,30) y farmacéutica por ser un poderoso antioxidante (22,31,32).

Por otro lado los extractos del camu-camu estimulan el crecimiento y la respuesta inmune (33), disminuye el daño oxidativo en tejidos hepáticos y cerebrales de los peces, gracias a las altas concentraciones de AA (34).

1.2. Biosíntesis de Ácido L-Ascórbico (AA, vitamina C)

El AA es una molécula ubicua en eucariotas, funciona como un antioxidante, cofactor enzimático y precursor de la síntesis de oxalato y tartrato. También participa en procesos como la fotosíntesis, fotoprotección, crecimiento de la pared celular y expansión celular, resistencia a tensiones ambientales y síntesis de etileno, giberelina, antocianinas e hidroxiprolina (2,10).

Hasta la fecha se han propuesto varias vías metabólicas para la biosíntesis de AA en plantas (2,14). Entre ellas están: la vía del myo-inositol, la vía del

ácido galacturónico, la vía de la L-gulosa y la vía de la D-manosa/L-galactosa (2,5,9,10,14). Esta última ha sido mejor estudiada porque es considerada la más importante para la biosíntesis de AA (5,6,9,32). En esta vía, la D-manosa-1-fosfato es convertida en AA mediante seis enzimas: GDP-manosa pirofosforilasa (E.C. 2.7.7.13), GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C.5.1.3.18), L-galactosa guaniltransferasa (E.C. 2.7.7.69), L-galactosa-1-fosfato fosfatasa (E.C. 3.1.3.25), L-galactosa deshidrogenasa (E.C.1.1.1.3.16) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) (6,9,35,36), tal como se muestra en el Anexo 1.

1.2.1. L-galactosa deshidrogenasa (GDH)

El descubrimiento de L-galactosa deshidrogenasa (GDH), una enzima nueva y única en plantas que oxida L-galactosa (L-Gal) para formar L-galactono-1,4-lactona (37,38), fue clave para la propuesta de la vía D-manosa/L-galactosa (14). Debido a que el único destino metabólico conocido de L-Gal es la oxidación en AA, la deshidrogenación de L-Gal por GDH puede considerarse como el primer paso comprometido en la vía D-manosa/L-galactosa (3,13).

Los estudios relacionados a GDH recién se llevaron a cabo a partir del 2002, con el esclarecimiento de las vías biosintéticas de vitamina C en plantas, específicamente con la vía D-manosa/L-galactosa. Respecto al peso molecular de esta enzima, los estudios indican que presenta variaciones entre las especies de plantas analizadas. Así, la enzima purificada a partir de embriones de *Pisum sativum* (guisantes) es un homotetrámero de 156 kDa (13). En tanto, la enzima recombinante obtenida de *Arabidopsis thaliana* tiene 42,2 kDa. Por su parte, Mieda et

al. (15) reportan que en *Spinacia oleracea* la proteína tiene 75 kDa . También, Laing *et al.* (17) indican que la enzima purificada de *Actinidia deliciosa* (Kiwi) tiene 37,2 kDa. Finalmente, Momma & Fujimoto (18), muestran que la enzima GDH recombinante de *Oryza sativa* (Arroz) tiene 35 kDa, además, cristalizaron la enzima, pero no resolvieron su estructura.

1.3. Herramientas bioinformáticas

La bioinformática es un campo interdisciplinario, el cual involucra: biología o ciencias de la vida, computación y tecnología de la información. Es un área nueva y creciente para la ciencia, la cual utiliza recursos computacionales para responder problemas biológicos (39). Esta definición procede del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) la cual tiene como objetivo distribuir información biológica, elaborar métodos informáticos para el análisis biológico y la creación de bases de datos de libre acceso (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (39). Tal es así que, diferentes grupos de investigación han desarrollado programas y algoritmos bioinformáticos para resolver diferentes problemas, como es el caso del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (40).

BLAST, es un programa bioinformático de alineamiento de secuencias de tipo local (alineamiento de secuencias de ADN, ARN o proteínas). BLAST compara una secuencia problema (nucleótidos o aminoácidos) con todas las secuencias de una base de datos para encontrar regiones de similitud local. Además, calcula la significación estadística de los resultados. Estos resultados permiten inferir relaciones funcionales, estructurales o evolutivas entre dos secuencias de modo que se pueden identificar nuevos miembros de

una familia de genes o de proteínas. El algoritmo encuentra un homólogo en la base de datos, que tiene mayor identidad de secuencia con la secuencia problema. BLAST usa un algoritmo heurístico por lo que no nos puede garantizar que ha encontrado la solución correcta, sin embargo, es capaz de calcular la significancia de sus resultados, por lo que nos provee de un parámetro para juzgar los resultados que se obtienen (40). BLAST tiene cinco módulos de búsqueda que amplían las posibilidades de éxito: Blastp: compara una secuencia problema de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas. Blastn: compara una secuencia problema de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos. GenBank es una base de datos pública que contiene secuencias de ADN y tiene a disposición más de 205000 organismos anotados, obtenidos principalmente a través de las presentaciones de los laboratorios individuales y presentaciones de lotes de proyectos de secuenciación a gran escala. El intercambio de datos a diario con la Biblioteca de Datos EMBL en Europa y en el Banco de Datos de ADN de Japón asegura la cobertura en todo el mundo. GenBank es accesible a través del NCBI (41).

1.4. Clonación del ADN mediante métodos de ADN recombinante

El término clonación deriva de la Genética bacteriana, que considera una colonia de bacterias como un clon ya que todos los individuos son genéticamente idénticos a la bacteria inicial. La tecnología del ADN recombinante, utiliza la clonación molecular como técnica central, permitiendo preparar grandes cantidades de moléculas de ADN idénticas y usualmente compuesta de secuencias derivadas de diferentes fuentes.(42–44)

La clave para clonar un fragmento de ADN de interés comprende lo siguiente: Un vector más un fragmento de ADN inserto, introducido en una célula huésped, el ADN insertado se replica junto con el vector y genera un gran número de moléculas de ADN idénticas (ADN recombinante). El esquema básico se resume en la Figura 2.

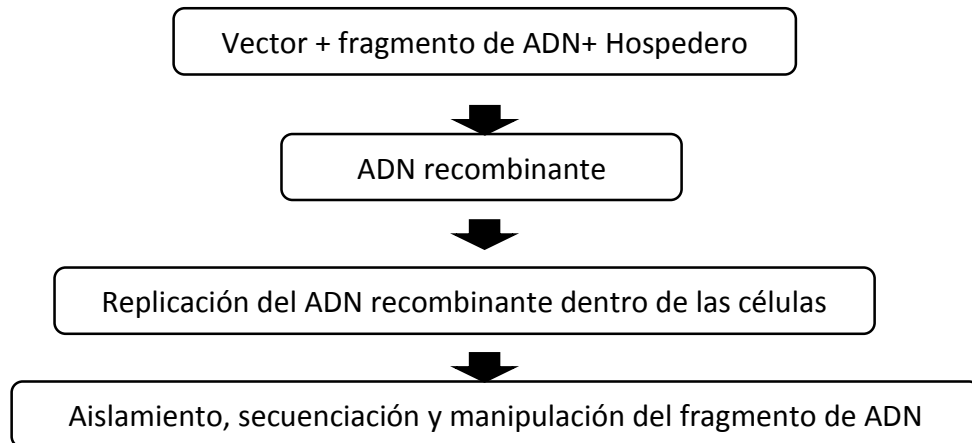


Figura 2. Diagrama de flujo para la clonación de un fragmento de ADN (gen) de interés. Fuente: Lodish *et al*, 2005 (42).

El principal objetivo de la clonación de ADN es obtener regiones separadas del ADN y la limitante es que solo se pueden clonar pequeñas moléculas de ADN en cualquier vector. Por tanto, moléculas que componen un genoma de un organismo deben ser cortados en fragmentos que puedan ser insertados en un vector de ADN. Esto será facilitado por las enzimas de restricción y las ADN ligasa que harán posible la manipulación del ADN con extrema precisión. Las enzimas de restricción o endonucleasas de restricción son proteínas bacterianas que reconocen secuencias nucleotídicas específicas de 4 a 8 pares de base (pb) en una molécula de ADN, la secuencia de reconocimiento es llamada sitio de restricción (42). Mientras que las ADN ligasas son moléculas capaces unir fragmentos de ADN conteniendo extremidades

abruptas o cohesivas, esta enzima cataliza la ligación entre el grupo fosfato ligado al carbono 5' y al grupo hidroxilo, OH libre ligado al carbono 3' de las moléculas de desoxirribosa presentes en los nucleótidos que constituyen estas moléculas (42,44).

Después del aislamiento de la información genética, los fragmentos de ADN obtenidos deben ser insertados en otra molécula de ADN, capaz de amplificar esta información genética en muchas copias (Vector de clonación). Los vectores de clonación son pequeñas moléculas de ADN, que contiene los elementos necesarios para su replicación y por lo menos un gen que le confiere resistencia a un antibiótico. Los plásmidos son vectores apropiados de clonación, poseen un origen de replicación (ORI), secuencia de ADN que permite que el vector sea replicado en una célula hospedera, presenta sitios de cortes para endonucleasas de restricción, etc.

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN bicatenario (dADN) que están separadas del ADN cromosómico de una célula. Los plásmidos más utilizados en la tecnología del ADN recombinante son los que se replican en *E. coli*. Los investigadores diseñaron estos plásmidos para optimizar su uso como vectores en la clonación del ADN (42). Uno de los primeros plásmidos utilizados en la clonación fue el pBR322, que contiene genes de resistencia a tetraciclina y a la ampicilina (un antibiótico análogo a la penicilina). Diversas endonucleasas de restricción pueden escindir este plásmido en una serie de lugares únicos, en las cuales es posible insertar fragmentos de ADN (43,44).

1.4.1. Proteína Recombinante

Las técnicas empleadas para el ADN recombinante da lugar a la proteína recombinante la cual en la actualidad se volvieron clave para las industrias

farmacéuticas, tanto para el desarrollo de fármacos como para la determinación estructural de objetivos farmacológicos y proteínas de importancia en la salud mundial (45). Un gran ejemplo de proteína recombinante requerida y utilizada a nivel mundial es la insulina humana generada in vivo, a partir de cultivos de la bacteria *E. coli* (44). Sin embargo, la ingeniería Genética ha abierto la posibilidad de emplear otros microorganismos aparte de bacterias para la producción de proteínas recombinantes de importancia médica, económica e industrial, generándose nuevos campos de investigación en el mundo de la Biología Molecular.

CAPITULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

2.1. Formulación de la hipótesis

Las características moleculares y funcionales de la enzima L- galactosa deshidrogenasa de *Myrciaria dubia* son similares a las de otras especies de plantas.

2.2. Variables y su operacionalización

Variable	Indicador	Índice
Independiente -Especies de plantas	Códigos de identificación en bases de datos	1-10
Dependiente -Características moleculares	Dominios anotados de la enzima	1 -2
	Porcentaje de identidad	35 a 100%
	Peso molecular	30 -50 kDa
	pI	4 – 8
	Contenido de alfa hélices	25 a 75%
	pH óptimo	6-9
-Características funcionales	temperatura óptima	30 -50 °C
	Km	100– 180

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. TIPO Y DISEÑO

Investigación Descriptiva: Porque la caracterización bioquímica y biofísica de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa implica la descripción de estas características.

No Experimental-Transversal: Porque la caracterización molecular y purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa no implica la manipulación de las variables. Además, es transversal porque se han registrado los datos en un solo momento del cultivo bacteriano.

3.2. DISEÑO MUESTRAL

3.2.1. Población

Estuvo constituida por todas las unidades formadoras de colonia de *E. coli* que han sido expuestas al vector de expresión recombinante portador del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa del camu-camu.

3.2.2. Muestra

La muestra estuvo representada por una colonia (tomada al azar) de *E. coli* transformada genéticamente con el vector de expresión recombinante portador del gen que codifica y expresa la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa del camu-camu.

3.3. INSTRUMENTOS Y MATERIALES

3.3.1. Reactivos

- Ácido clorhídrico (HCl)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Extracto de levadura

- Triptona
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de Calcio (CaCl₂)
- Cloruro de Magnesio (MgCl₂)
- Tris base
- Etanol 100% de pureza
- Agar-agar
- Caldo Luria Bertani (LB)
- 2-Mercaptoetanol
- Glicerol 87%
- Tetrametiletilendiamina (TEMED)
- Ácido acético glacial
- Acrilamida
- Persulfato de Amonio
- *Comassie brilliant blue* G-250 y R-250,
- Dodecil sulfato sódico (SDS)
- Resina de Níquel
- Ampicilina
- Cloranfenicol
- Imidazol
- Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido (IPTG)
- L-galactosa (L-gal)
- Nicotinamida adenina dinucleótido (NAD)

3.3.2. Equipos

- Agitador magnético digital (Thermo Scientific)

- Autoclave vertical (Phoenix)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Baño maría (Labnet),
- Centrífuga 5418 R (Eppendorf)
- Centrífuga Legend micro (Thermo Scientific)
- Centrífuga sorvall RC 3BP+ (Thermo Scientific)
- Máquina de hielo (HexiCryo)
- Sistema de Purificación de Proteínas Äkta (General Electric)
- Congeladora Cryocube F570 (Eppendorf)
- Congeladora (FerroBras)
- Destilador de agua (Barnstead Fistreem III Glass Still)
- Ultrapure Type I (Direct-Q)
- Espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (Thermo Cientific)
- Espectrofotómetro Ultrospec 10 (Amershan Biociences)
- Estufa (Thermo scientific),
- SpectraMax Plus 384 Microplate Spectrophotemter (Device LCC)
- Mini Centrífuga (Mini Mouse, Spectrafuge Labnet),
- Sonicador con Sonda (Fisher scientific)
- pH metro (Thermo Scientific),
- Vortex (Labnet)

3.3.3. Materiales varios

- Micro pipetas con rangos de 0,5-10 µL, 10-100 µL y 100-1000 µL
- Micro tubos de 200 µL, 1,5 mL, y 2 mL
- Parafilm
- Pastillas magnéticas

- Pizetas de 500 mL
- Probetas graduadas de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 500 mL, y 1000 mL
- Puntas de plástico de 0,5-10 µL, 1-20 µL, 1-200 µL, y 100-1000 µL
- Vasos precipitados de 10 mL, 50 mL, 250 mL, 500 mL, y 1000 µL.

3.4. PRECEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

3.4.1. Lugar de ejecución

Se realizó en la Unidad Especializada de Biotecnología (UEB) del Centro de Investigación de Recursos Naturales de la Amazonia (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP); localizado en el distrito de San Juan Bautista de la provincia de Maynas, departamento de Loreto-Perú y en el Laboratorio de Biología Estructural, del Instituto de Física de São Carlos (IFSC), de la Universidad de São Paulo (USP), localizado en la ciudad de São Carlos, estado de São Paulo-Brasil.

3.4.2. Identificación en el transcriptoma de *Myrciaria dubia* del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la enzima L-galactosa deshidrogenasa (GDH) de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: ADJ21815.1) del GenBank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/genank/>). Con esta secuencia se realizó un Blast local con la base de datos del transcriptoma de *M. dubia* empleando el programa Geneious Prime® 2019.1.1 (www.geneious.com). La secuencia nucleotídica identificada fue traducida a secuencia de aminoácidos empleando el programa EMBOSS (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/) y ExPASy (<https://web.expasy.org/translate/>).

3.4.3. Caracterización *in silico* de la enzima L- galactosa

deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de *Myrciaria dubia*

Una vez identificada el gen que codifica la enzima GDH de *M. dubia* (*MdGDH*), esta fue caracterizada *in silico* empleando los siguientes softwares: La herramienta de traducción **ExpASY** (<https://web.expasy.org/translate/>) se usó para determinar la secuencia aminoacídica de la *MdGDH*. El **ProtParam tool** (<https://web.expasy.org/protparam/>) se usó para calcular propiedades físico-químicas a partir de la secuencia aminoacídica, tales como peso molecular, punto isoelectrico (pI) teórico, composición de aminoácidos y coeficiente de extinción molar. También, se utilizaron **Plant-mPLoc** (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>) y **TargetP** (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) para predecir la localización subcelular de la enzima. Adicionalmente, se utilizó **InterPro** (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>), **Pfam** (<http://pfam.xfam.org/>), **CD-search** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y **PredictProtein** (<https://www.predictprotein.org/home>), para la anotación estructural y funcional (identificación de dominios, estructura secundaria, localización subcelular, etc.).

Finalmente, las secuencias de proteínas homólogas se buscaron en el GenBank utilizando el algoritmo **protein-BLAST** y estas fueron descargadas en formato fasta. Las alineaciones múltiples de las secuencias de proteínas se hicieron con **Clustal Omega**, (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>); estas se editaron con **BioEdit**

v7,2 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), posteriormente estas secuencias editadas se emplearon para la construcción del árbol filogenético con el software **MEGA v7,0**, utilizando el método de Neighbor-Joining con distancias derivadas del modelo de Jones-Taylor-Thornton como el mejor modelo evolutivo determinado con **ProTest3** y 1000 réplicas con el bootstrap para obtener el árbol consenso.

3.4.4. Clonación, expresión y purificación de la enzima

recombinante L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de *Myrciaria dubia*

Para la clonación, la secuencia codante del gen GDH fue optimizada con el software **GeneOptimizer** para ser expresada en *E. coli*. La secuencia optimizada fue sintetizada y ligada al vector de expresión pET151/D-TOPO-GDH por el servicio de GeneArt Gene Synthesis de la empresa Thermo Fisher Scientific (<http://www.thermofisher.com/pe/en/home.html>). (Figura 3). El vector de expresión recombinante presenta los siguientes componentes: una región promotora derivada del bacteriófago T7, codón de inicio ATG, una región de polihistidinas (6xHis), una región correspondiente al epítipo V5 (derivada de la subunidad alfa de la ARN polimerasa del virus de la influenza tipo 5 de simios), un sitio de corte de la proteasa TEV (del inglés *Tobacco Etch Virus*), una región de terminación de la transcripción derivada del bacteriófago T7, un origen de replicación derivado del plásmido pBR322, el gen que codifica la proteína ROB y un gen que confiere resistencia a la ampicilina (Amp^R). El tamaño del vector de expresión recombinante es de 6,747 pb (Figura 3).

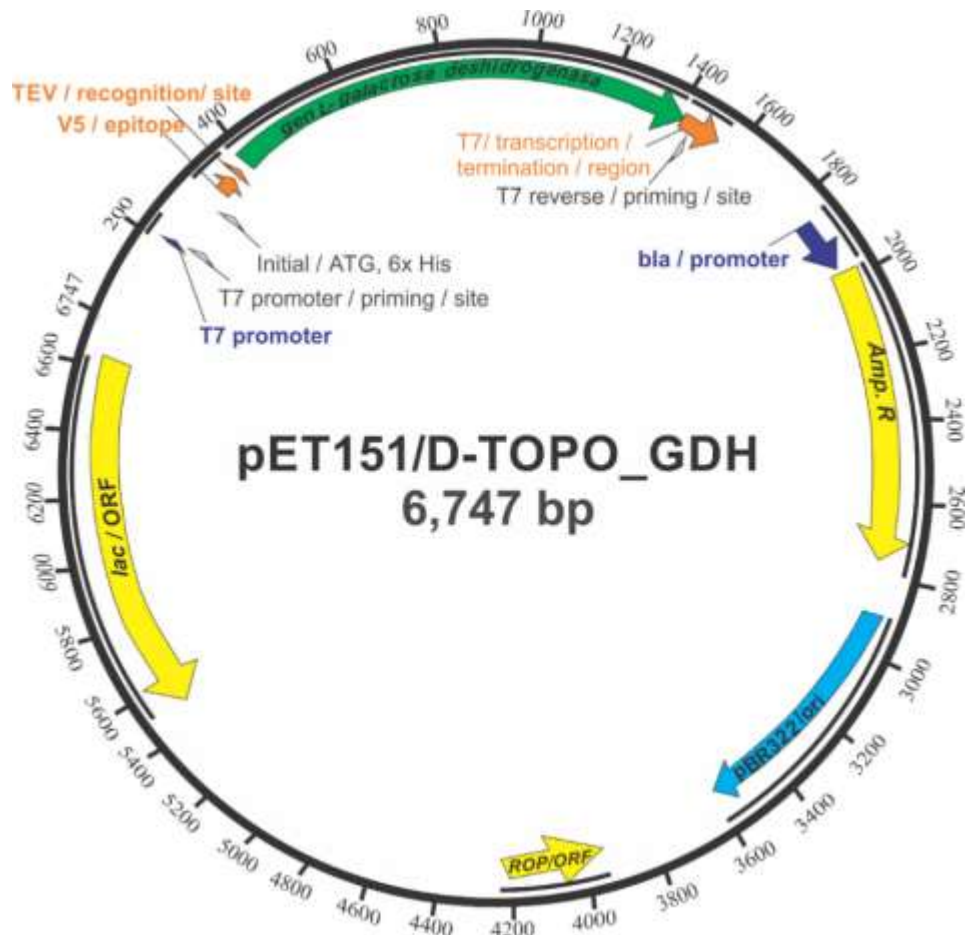


Figura 3. Mapa del vector de expresión Pet151/D-TOPO-GDH (6,747 pb).

Fuente: Modificado por el autor a partir de Thermo Fisher Scientific.

Para la expresión y purificación de la proteína de interés, se seleccionó una colonia aislada al azar de *E. coli* Rosetta BL21 (DE3) transformada con el vector de expresión recombinante pET151/D-TOPO-GDH, la cual presenta resistencia a los antibióticos cloranfenicol (34 µg/mL) y ampicilina 50 (µg/mL). Se prepararon las células bacterianas quimiocompetentes para su transformación por shock-térmico empleando el protocolo descrito por Pope & Kent con algunas modificaciones (46–48), (Anexo 2).

3.4.4.1. Test de expresión y solubilidad de la enzima

recombinante L-galactosa deshidrogenasa de *Myrciaria dubia*.

Para la expresión de la proteína *MdGDH*, se realizó un pre-inóculo de una colonia aislada de *E. coli* Rosetta DE3 transformada con el vector de expresión recombinante pET151/D-TOPO-*GDH* en 5 mL de medio de LB suplementado con antibióticos (cloranfenicol 34 µg/mL y ampicilina 50 µg/mL) e incubado en agitación (80 rpm) a 37°C por 16 h. Luego el pre-inóculo fue transferido a 100 mL de medio LB suplementado con los mismos antibióticos e incubado en agitación (150 rpm) a 37°C hasta obtener una DO_{600nm} de 0,6 a 0,8 (esta etapa se realizó por duplicado para realizar la expresión en dos temperaturas diferentes). Lograda la DO_{600nm} deseada, se indujo la expresión del gen *MdGDH* del vector de expresión recombinante con la adición de 0,3 mM de IPTG e incubó en agitación (150 rpm) en dos condiciones: 20°C por 16 h (**muestra 1**) y 37°C por 4 h (**muestra 2**).

Cumplido el tiempo de inducción de ambas condiciones, las células fueron cosechadas por centrifugación a 4,000 rpm a 4°C por 45 min. Posteriormente, fueron resuspendidas en 10 mL de tampón A (100 mM Tris; 150 mM NaCl; 5% de glicerol; pH 7,8) y lisadas por ultrasonificación con 10 ciclos de 30 s ON e intervalos de 59 s OFF. Con la finalidad de separar las fracciones soluble e insoluble, el lisado celular fue centrifugado a 13,000 rpm por 45 min a 4°C. Finalmente, las fracciones fueron colectadas y analizadas por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (49–51).

Definida las condiciones óptimas para expresar la proteína soluble, se procedió su expresión en un litro de cultivo.

3.4.4.2. Purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de *Myrciaria dubia*.

La enzima *MdGDH* recombinante fue purificada en dos etapas, la primera mediante cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC, por sus siglas en inglés) y la segunda etapa mediante cromatografía de exclusión molecular (SAC, por sus siglas en inglés). La primera etapa de purificación es factible porque la enzima recombinante expresada tiene una cola de seis histidinas (6x-His) en la región N-terminal (Figura 03). Para ello, la fracción soluble de la proteína *MdGDH*, fue aplicada en una columna cromatográfica de 20 mL conteniendo 3 mL de Ni²⁺-NTA[®] Superflow[™], equilibrada con 5X volúmenes de tampón A. Después de ligar la enzima a la resina, se realizaron dos etapas de lavados: la primera con 15 mL de tampón A y la segunda con 10 mL de tampón A conteniendo 25 mM de imidazol. Luego de los lavados, la enzima fue eluida de la resina en tres etapas: la primera con 10 mL de tampón A + 100 mM de imidazol, la segunda con 5 mL de tampón A + 250 mM de imidazol y la tercera con 5 mL de tampón A + 500 mM de imidazol. La pureza de las fracciones fue analizada por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% .(Anexo 3)

La segunda etapa de purificación, permitió separar los agregados protéicos, contaminantes y los diversos estados oligoméricos presentes en las fracciones obtenidas en la purificación por IMAC. Para

ello, las fracciones eluidas que contenían la enzima *MdGDH* fueron agrupadas y concentradas en un volumen final de 2 mL con un concentrador Amicon^R de tamaño de poro de 30 kDa (Sigma Aldrich). La solución enzimática fue inyectada en una columna HiLoad 16/60 Superdex 200 prep grade previamente equilibrada con tampón B (HEPES 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5%, pH: 7,8) y acoplada al sistema de purificación de proteínas ÄKTA (GE Healthcare). La purificación fue realizada con una elución isocrática de 1,5X del volumen total de la columna bajo un flujo de 1 mL/min, monitoreando la presencia de la enzima *MdGDH* recombinante por su absorbancia a 280_{nm} y colectando fracciones de 1 mL. La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% (49,50).

3.4.5. Caracterización funcional de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa *de Myrciaria dubia*

3.4.5.1. Caracterización biofísica

3.4.5.1.1. Cromatografía de exclusión molecular acoplada al difractor de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS)(52).

La concentración de la *MdGDH* obtenida fue ajustada a 4 mg/mL y centrifugada a 10,000 rpm a 4°C por 10 min. Después, 50 µl fue inyectado en una columna *Superdex 200 10/300 GL* equilibrada con tampón C (20 mM Tris pH 7,8; 150 mM NaCl) acoplada en un módulo de separación *Waters 600 Controler*, el cual está conectado al sistema *miniDAWN TREOS-MALS (Wyatt Technologies)*, usando un flujo de 0,3 mL/min. Los datos fueron colectados a temperatura

ambiente y examinados utilizando el programa *ASTRA 7.0.1* (Wyatt Technologies).

3.4.5.1.2. Análisis del plegamiento de la proteína *MdGDH* y su estabilidad térmica con espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD).

Esta técnica se empleó para determinar la conformación estructural de la enzima *MdGDH* (53) La solución enzimática fue cambiada de tampón A al tampón D (fosfato 20 mM pH 7,8 conteniendo 100 mM de NaCl y 5% de glicerol); esto es necesario porque el experimento no puede tener altos contenidos de sal en el tampón ni usar el tampón Tris. Después del cambio de tampón, las muestras fueron diluidas a una concentración de 0,2 mg/mL para realizar los experimentos y centrifugados a 10,000 rpm por 10 min con el fin de remover impurezas o precipitados protéicos.

Los espectros de CD fueron obtenidos en un espectropolarímetro *Jasco J-815 CD Spectrometer* (Tokio, Japon) del grupo de Biofísica del Instituto de Física de São Carlos, monitoreando en el intervalo de longitud de onda de 195 a 270 nm con una resolución de 0,2 nm y utilizando una cubeta de 0,1 cm de camino óptico. Los espectros de seis escaneos a una velocidad de 50 nm/min fueron promediados. Los espectros fueron convertidos para elipticidad molar media por residuo (MRW-Mean Residue Weight) de acuerdo con la ecuación (e.1).

$$\theta_{MRW, \gamma} = \frac{MRW \times \theta_{\gamma}}{10 \times d \times c} \quad (e.1)$$

Donde $MRW=M/(N-1)$, siendo M la masa molecular de la proteína en Dalton y N el número de aminoácidos. θ_λ consiste en la elipticidad observada en (grados) en longitud de onda λ , d corresponde el camino óptico (en cm) y c la concentración de la proteína (g/mL).

Con el objetivo de analizar el efecto de la temperatura sobre el plegamiento y la obtención de la temperatura de melting (T_m) de la *MdGDH*, las muestras fueron sometidas a un gradiente de temperatura de 20°C a 80°C, con incrementos de 2°C y la señal de CD medido a 222 nm. Las curvas se expresaron en términos de fracción de proteína desnaturalizada (fD), de acuerdo a la siguiente ecuación (e.2).

$$fD = \frac{\theta_{obs} - \theta_{t0}}{\theta_{tf} - \theta_{t0}} \quad (e.2)$$

Donde: θ_{obs} es el valor de elipticidad medida a lo largo de la variación de temperatura; θ_{tf} es el valor de la elipticidad en 80°C, θ_{t0} es el valor de la elipticidad en 20°C.

3.4.5.2. Caracterización bioquímica

3.4.5.2.1. Cuantificación de la *MdGDH*

Se empleó un espectrofotómetro NanodropTM 2000/c (Termo Fisher), el cual fue configurado para la lectura de *MdGDH* proporcionando el coeficiente de extinción molar (ϵ) y la masa molecular teórico de la *MdGDH* en KDa calculados con el software **ProtParam** (<http://web.expasy.org/protparam/>).

3.4.5.2.2. Actividad enzimática de la *MdGDH*

Se midió según el método descrito por Castro *et al* (54) con algunas modificaciones empleando un SpectraMax Plus 384 Microplate Spectrofluorometer System. La reacción se realizó en un volumen final de 200 μ L y contenía tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,8); 0,2 mM de NAD⁺; 0,5 mM L-galactosa (L-gal), se inició la medición de la actividad enzimática por la adición de 2 μ l de la enzima (1nM), registrándose la absorbancia a 340 nm cada 10 s a 26,5°C por 10 min. El control negativo del ensayo contenía 2 μ l de NAD⁺ con 98 μ l de tampón Tris-HCl (pH 7,8).

3.4.5.2.3. Determinación de los parámetros cinéticos de la *MdGDH*

Los parámetros cinéticos tales como K_m (Constante de Michaelis-Menten) y velocidad máxima (V_{max}) fueron calculados de acuerdo a la ecuación (e.3) de Michaelis-Menten en base a la actividad enzimática con diferentes concentraciones del sustrato (0 – 3 mM), el número de recambio de las enzimas se calculó con la ecuación (e.4) y finalmente se calculó su eficiencia catalítica con la ecuación (e.5).

$$V_0 = \frac{V_{max}[sustrato]}{K_m + [sustrato]} \quad (e.3)$$

Donde: V_0 es el valor de Velocidad inicial, V_{max} es la velocidad máxima de la reacción y K_m concentración de sustrato a la cual la reacción alcanza la mitad de su velocidad máxima.

$$k_{cat} = V_{max}/[E] \quad (e.4)$$

Donde: K_{cat} es el valor del número de recambio, V_{max} es la velocidad máxima y $[E]$ concentración de la enzima.

$$k_c = k_{cat}/K_m \quad (e.5)$$

Donde: K_c es el valor de la constante de especificidad, K_{cat} número de recambio y K_m la constante de Michaelis.

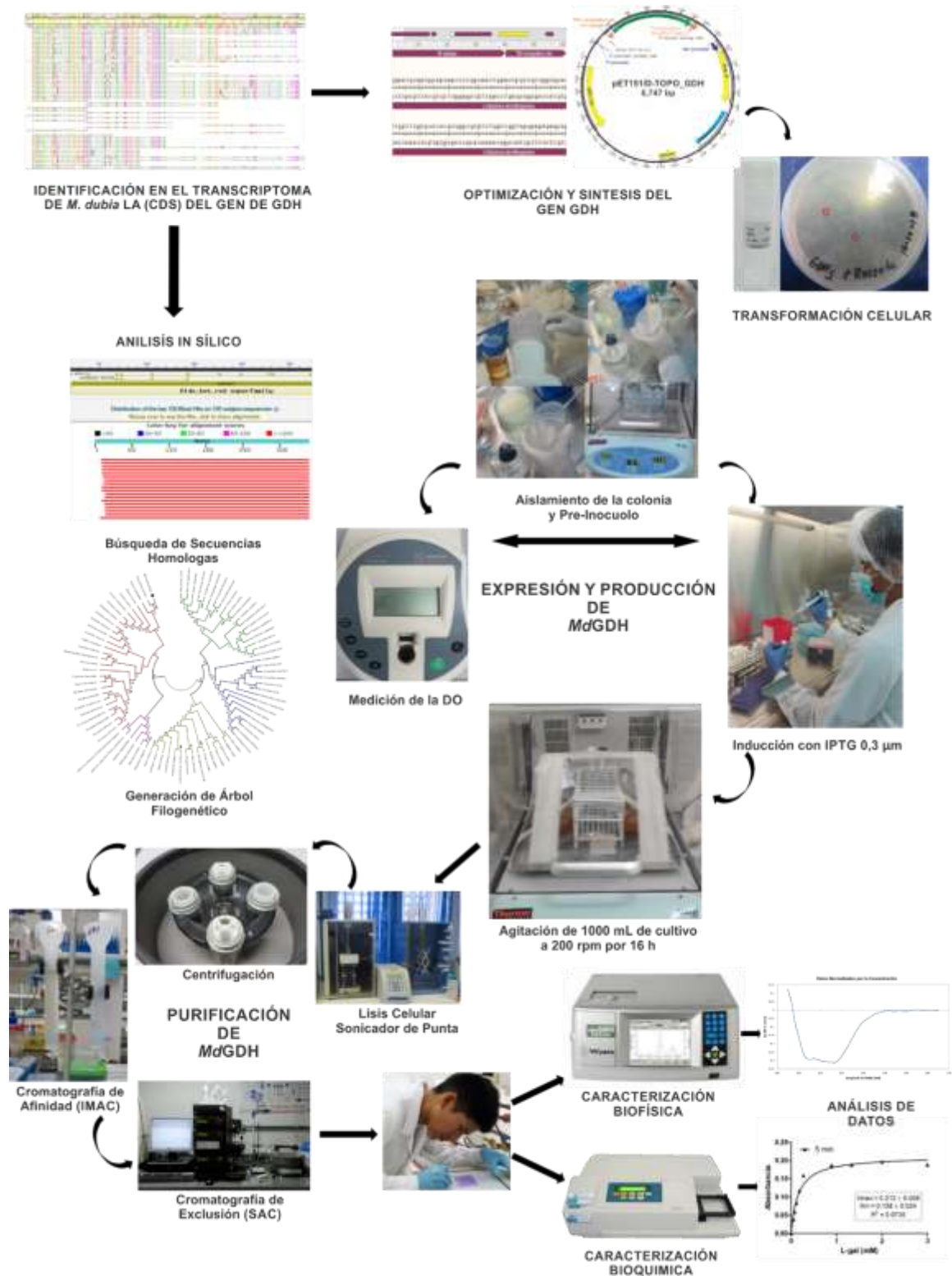


Figura 4. Flujoograma de la clonación y caracterización de la enzima *MdGDH*. Fuente: Elaborada por el autor.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Identificación en el transcriptoma de *Myrciaria dubia* del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa.

En base a la secuencia aminoacídica de la enzima L-galactosa deshidrogenasa de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: ADJ21815.1) se logró identificar el gen (región codificante) que codifica la enzima *MdGDH* en la base de datos del transcriptoma de frutos de *M. dubia*. De un total de 70,460 transcritos ensamblados que conforman la base de datos se ha identificado 10 transcritos con mayor identidad aminoacídica (Figura 5, Tabla 01). El Transcripto 1 (T1), mostró 81 % de identidad comparando su secuencia de aminoácidos con la correspondiente de *A. thaliana*, indicándonos que el T1 es producto de la transcripción del gen que codifica la enzima L-galactosa deshidrogenasa de *M. dubia* (Tabla 1).

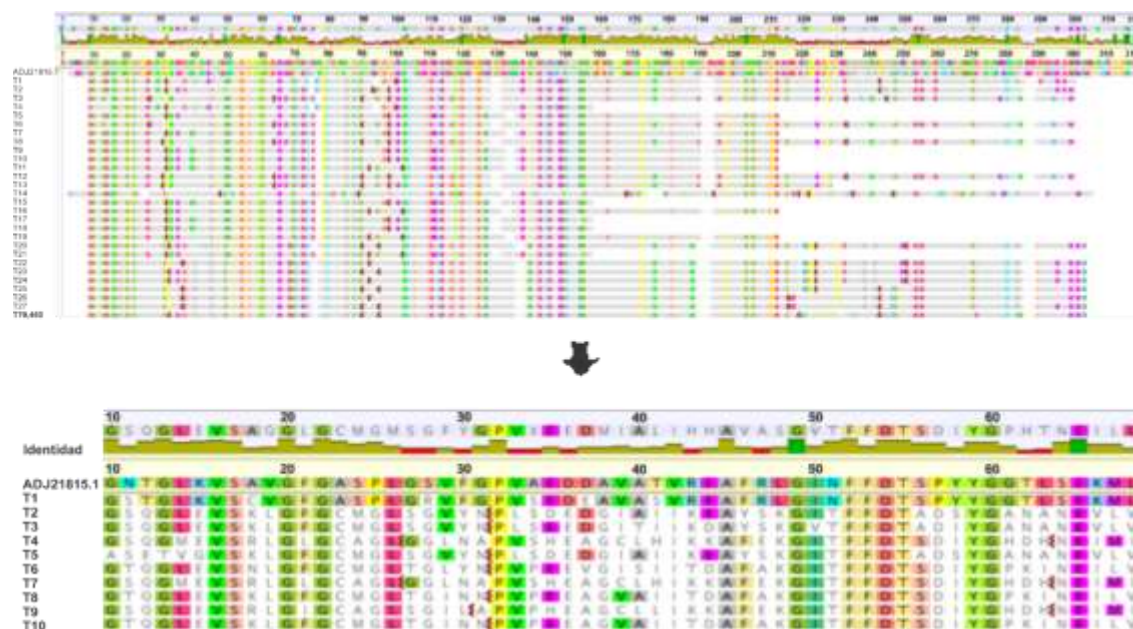


Figura 5. Mapa de secuencias del gen que codifica la enzima *MdGDH* de la base de datos de transcritos ensamblados del transcriptoma de frutos de *M. dubia*.

Tabla 1. Matriz del porcentaje de identidad de la enzima L-galactosa deshidrogenasa (GDH) de *Arabidopsis thaliana* (GenBank: ADJ21815.1) con secuencias de transcritos ensamblados del transcriptoma de frutos de *M. dubia*.

	ADJ21815.1	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
ADJ21815.1	Porcentaje (%)	81	27	26	28	36	32	28	33	28	33
T1	81		26	26	27	34	31	28	32	28	32
T2	27	26		79	54	97	69	56	69	56	69
T3	26	26	79		60	78	76	61	76	60	76
T4	28	27	54	60		58	67	91	68	88	68
T5	36	34	97	78	58		60	58	60	58	60
T6	32	31	69	76	67	60		67	97	68	97
T7	28	28	56	61	91	58	67		68	96	68
T8	33	32	69	76	68	60	97	68		69	100
T9	28	28	56	60	88	58	68	96	69		69
T10	33	32	69	76	68	60	97	68	100	69	

4.2 Caracterización *in silico* de la enzima L- galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de *Myrciaria dubia*.

Con la secuencia nucleotídica del T1 se obtuvo la correspondiente secuencia de aminoácidos de la enzima *MdGDH*. Respecto a la predicción de su localización intracelular, los programas empleados muestran que la enzima puede estar localizada en distintos compartimentos. Por ejemplo, el programa **Plant-mPloc** indica que podría localizarse en la membrana celular, el cloroplasto y el citosol, mientras que el programa **TargetP** predice que podría estar en el cloroplasto, la mitocondria y en la vía secretora, debido a que contiene los péptidos cTP, mTP y SP (péptidos señales o transitorios de dichas localizaciones).

Adicionalmente, con el programa **ProtParam tool** se calculó que la enzima *MdGDH* consta de 324 residuos de aminoácidos y en su composición

presenta los 20 tipos de aminoácidos, siendo la leucina (L) el aminoácido más frecuente, mientras que el triptófano fue el aminoácido menos frecuente (Tabla 2). También se estimó que tiene un peso molecular mayor de 30 kDa, su pl teórico es cercano a 5,0. Asimismo, se ha estimado que está constituido por 4,927 átomos (**C₁₅₅₆H₂₄₈₀N₄₀₆O₄₇₁S₁₄**), tiene un coeficiente de extensión molar de 24,8 y la enzima es clasificada como estable (Tabla 3). Además,

Tabla 2. Composición de aminoácidos de la enzima *MdGDH*.

Aminoácido	N°	Porcentaje
Leu (L)	36	11,1
Gly (G)	30	9,3
Ser (S)	30	9,3
Val (V)	25	7,7
Ala (A)	24	7,4
Glu (E)	20	6,2
Pro (P)	20	6,2
Lys (K)	19	5,9
Ile (I)	18	5,6
Asp (D)	16	4,9
Thr (T)	13	4,0
Gln (Q)	12	3,7
Phe (F)	12	3,7
Arg (R)	11	3,4
Asn (N)	10	3,1
Tyr (Y)	9	2,8
Met (M)	8	2,5
Cys (C)	6	1,9
His (H)	3	0,9
Trp (W)	2	0,6

Tabla 3. Características físico-químicas de la enzima *MdGDH*

Parámetros	GDH
N° de aminoácidos	324
Peso Molecular	34,84 kDa
pl Teórico	5,3
N° de átomos	4,927
Coeficiente de extinción molar	24,8

Mediante las herramientas **InterPro**, **Pfam**, **CD-search** y **PredictProtein** nos indica que la enzima *MdGDH* pertenece a la super familia Aldo/ceto reductasa (Figura 6), con dominio de enzimas relacionadas a las oxidorreductasas dependientes de NADP (IPR036812).

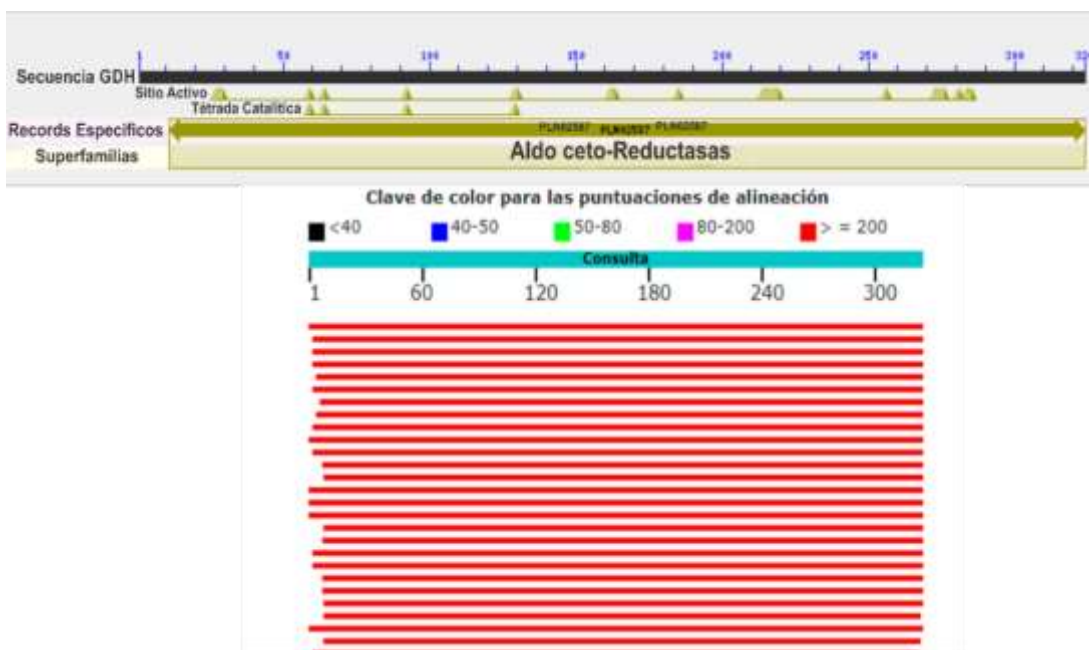


Figura 6. Alineamiento de secuencia aminoacídica de la enzima *MdGDH*.

Asimismo, mediante el análisis protein-BLAST del GenBank se ha mostrado que la enzima *MdGDH* presenta homología (Tabla 4, Figura 7) con la correspondiente enzima de otras especies de plantas que pertenecen a las familias Myrtaceae, Euphorbiaceae, Theaceae, Actinidiaceae, Brassicaceae y Amaranthaceae. Los resultados indican que constan de más de 200 aminoácidos, la cobertura de la secuencia es superior al 90 % y las identidades de las enzimas varían de 75,32% a 95,37%.

Tabla 4. Porcentaje de Identidad de la enzima *MdGDH* con sus homólogos de otras especies de plantas depositadas en el GenBank.

secuencias están sombreados. Los asteriscos muestran el consenso de residuos de aminoácidos en las siete especies.

Adicionalmente, en base a las secuencias aminoacídicas alineadas de las enzimas GDH de diversas especies se construyó un árbol filogenético consenso que muestra las relaciones evolutivas de la enzima *MdGDH* comparado con 48 taxones. El árbol filogenético indica que las especies se agrupan en cinco grandes clados. En uno de estos clados, *MdGDH* forma un sub-clado con *Eucalyptus grandis* y otras seis especies adicionales de plantas (Figura 8).

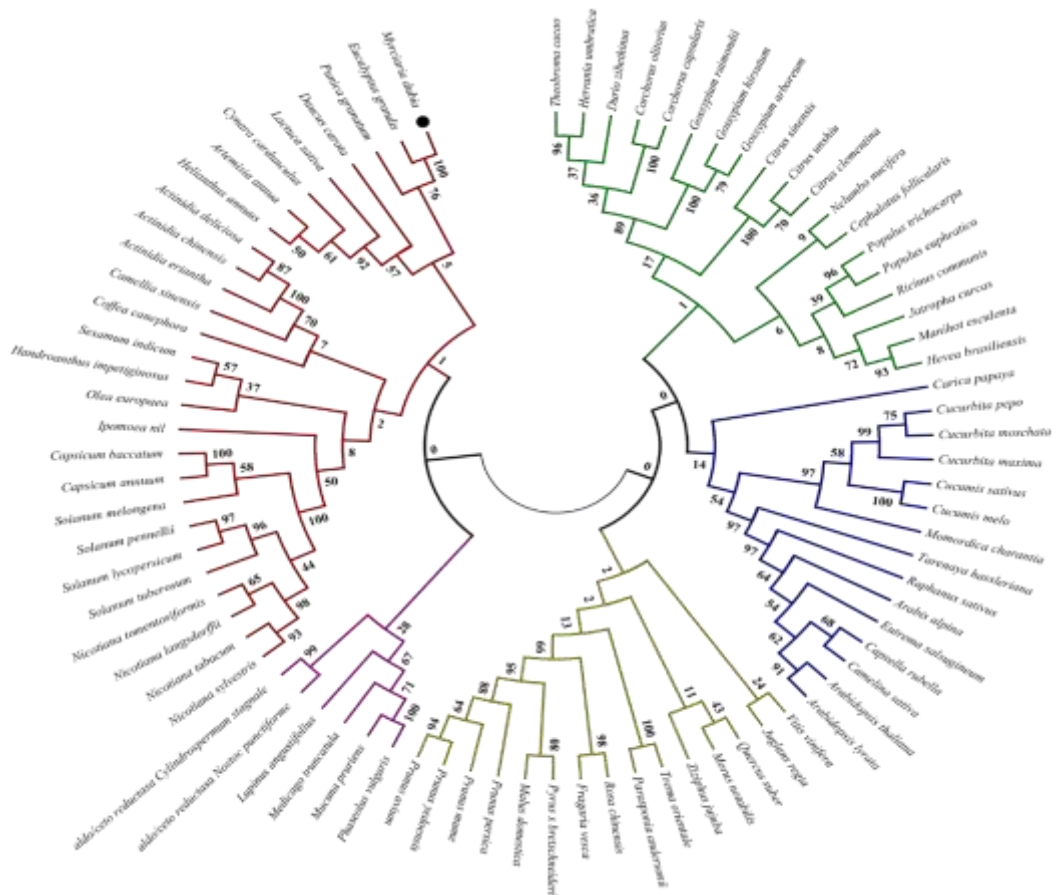


Figura 8. Árbol filogenético que muestra la relación filogenética de *MdGDH* con las correspondientes enzimas GDH de otras especies.

4.3. Clonación, expresión y purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de la vía D-manosa/L-galactosa de *Myrciaria dubia*.

Se logró expresar la enzima *MdGDH* recombinante en las dos temperaturas evaluadas (37°C y 20°C). Pero, a 20°C se observa una mayor solubilidad de la enzima recombinante (Figura 9). En ambas condiciones se evidencia que la enzima tiene un peso molecular de ~ 39,3 kDa (incluida la cola de histidina).

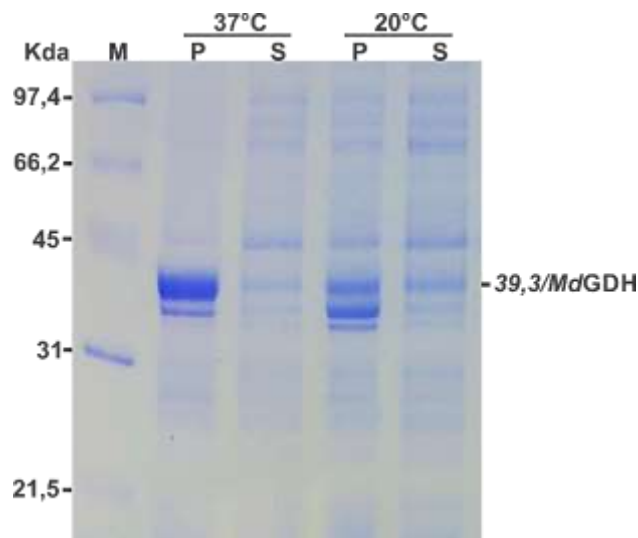


Figura 9. Cromatografía del test de solubilidad de la enzima *MdGDH* expresada en dos temperaturas. M: marcador de masa molecular, P: fracción insoluble, S: fracción soluble, realizada en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%).

La purificación de la *MdGDH* por cromatografía de afinidad, confirma la pureza de las fracciones eluidas con el tampón A conteniendo 100, 250 y 500 mM de imidazol en las cuales presentan una única banda de ~ 39,3 kDa (Figura 10).

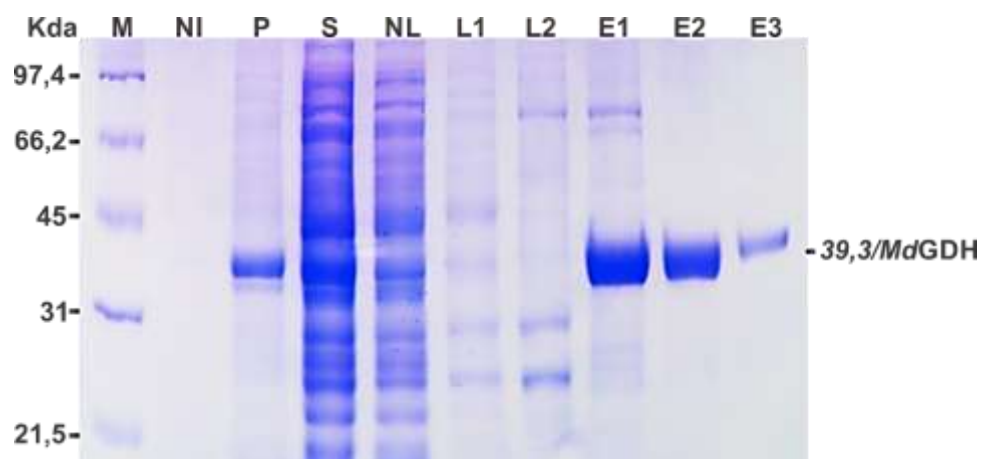


Figura 10. Cromatografía de afinidad de la enzima *MdGDH*. M: marcador de masa molecular, NI: Proteína no expresada con el agente inductor, P: fracción insoluble, S: fracción soluble, NL: Proteínas que no interactúan con el Ni⁺² inmovilizado en la resina, L1: Lavado, L2: Lavado con 25 mM de imidazol, E1: elución con 100 mM de imidazol, E2: elución con 250 mM de imidazol, E3: elución con 500 mM de imidazol. Electroforesis realizada en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%.

Posteriormente, la enzima *MdGDH* fue purificada por cromatografía de exclusión molecular, lográndose su elución entre los volúmenes 85 y 93 mL y verificado por gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (Figura 11A). Con el uso de esta técnica se logró separar la fracción enzimática del imidazol, el cual eluyó primero entre los volúmenes de 40 y 70 mL (Figura 11B). Adicionalmente, el análisis del perfil cromatográfico sugiere que la enzima *MdGDH* es probablemente monomérica, debido a la presencia de sólo un pico proteico eluído (Figura 11B). Finalmente, cabe indicar que a partir de un litro del cultivo bacteriano se obtuvo 4 mL de la enzima *MdGDH* pura a una concentración de 15 mg/mL (producción de 60 mg de la enzima *MdGDH* por litro de cultivo).

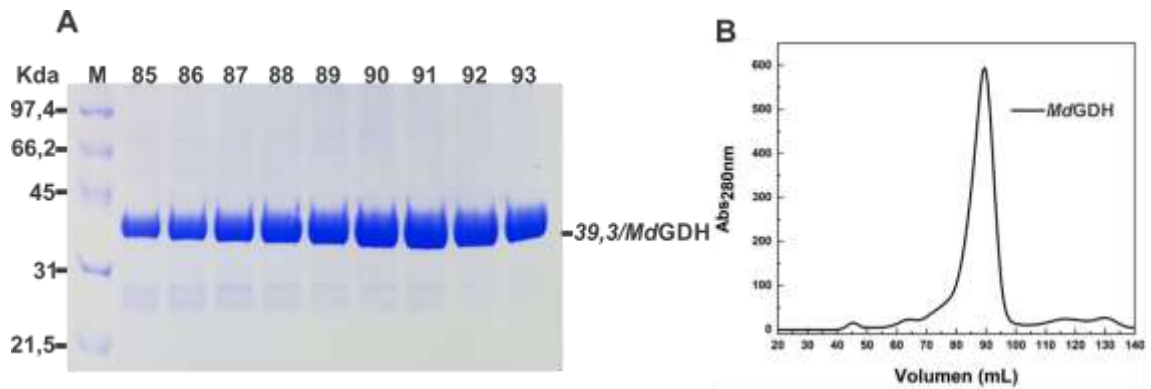


Figura 11. Cromatografía de exclusión molecular con la matriz HiLoad 16/600 Superdex 200 prep grade. (A). SDS-PAGE al 10% de las eluciones 85 a 93 (1 mL de cada elución) obtenidas en la purificación por exclusión molecular de la enzima *MdGDH*. M: marcador de peso molecular (B). Perfil de absorbancia a 280 nm de las eluciones 20 a 140 en el proceso de purificación de la enzima *MdGDH* por cromatografía de exclusión molecular.

4.4. Caracterización estructural de la enzima *MdGDH*

4.4.1. Caracterización biofísica

4.4.1.1. Cromatografía de exclusión molecular acoplada al esparcimiento de luz a múltiples ángulos (SEC-MALS).

Con la técnica SEC-MALS se corroboró el estado oligomérico y la masa molecular de la enzima *MdGDH*. La línea horizontal de color rojo en el cromatograma indica la homogeneidad (no presenta agregados) de la solución enzimática, asimismo, este análisis nos muestra que la enzima es un monómero de 38,6 kDa (Figura 12).

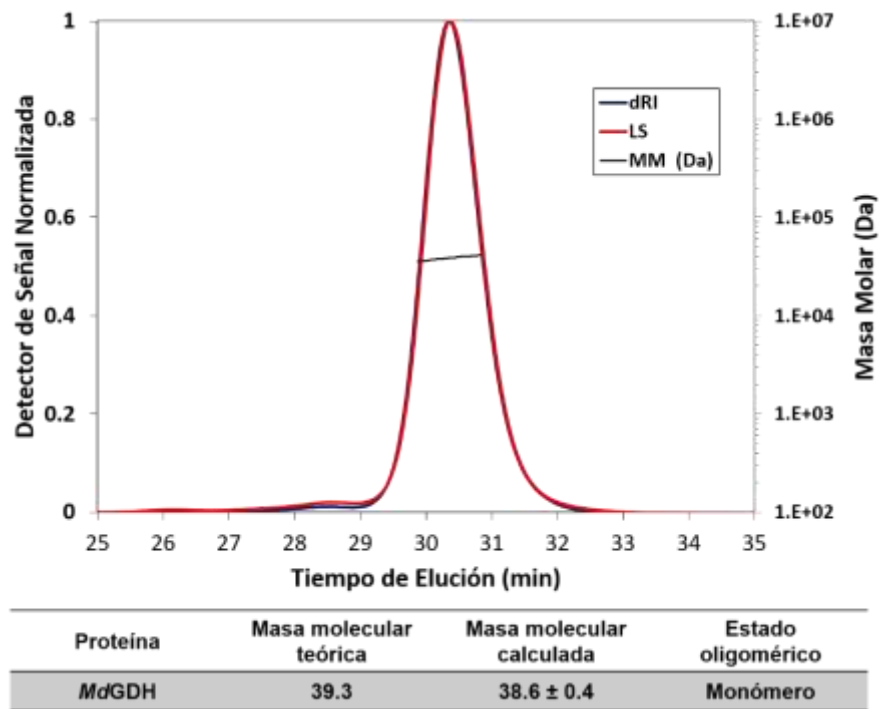


Figura 12. Cromatograma de SEC-MALS de la enzima *MdGDH*. El índice de refracción de la muestra (dRI), la cual eluye en un tiempo determinado, es usado para calcular el peso molecular del pico observado. La línea horizontal, muestra la homogeneidad de la muestra, el cuadro nos muestra los datos calculados por el SEC-MALS.

Adicionalmente, para evaluar la posibilidad de la formación de estados oligoméricos de mayor tamaño (homodímeros, homotrímeros, homotetrámeros, etc) de la enzima *MdGDH*, esta fue incubada con sus cofactores NAD^+ y NADH . Pero, el cromatograma nos muestra que la enzima conserva su estado monomérico, aunque presenta un leve

dislocamiento en los picos de los volúmenes 17 y 21 mL, pero esto no significa cambio de estado oligomérico. (Figura 13).

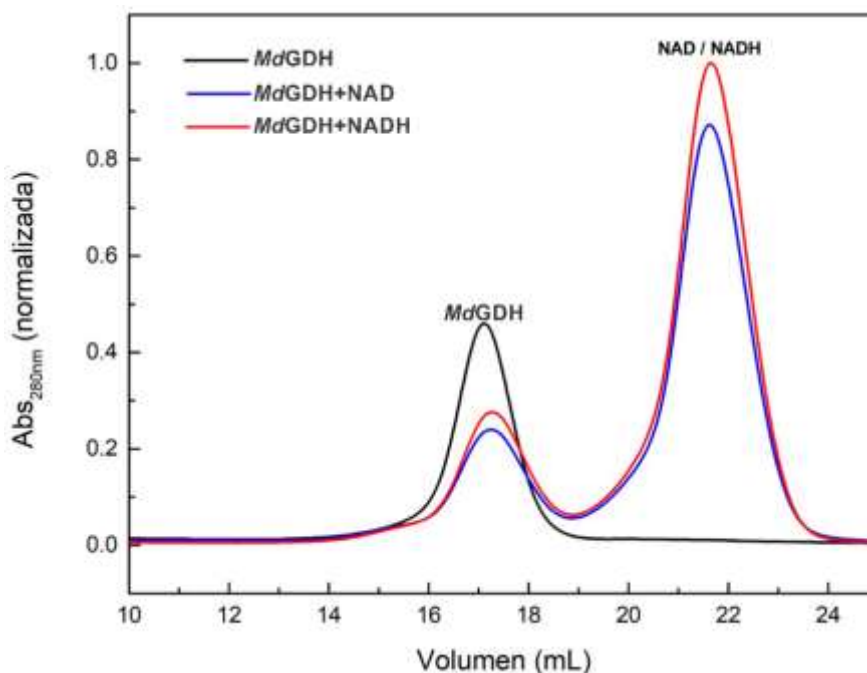


Figura 13. Cromatograma de exclusión molecular de la enzima *MdGDH* con los cofactores enzimáticos NAD⁺ y NADH empleando la matriz Superdex 200 10/300 GL.

4.4.1.2. Análisis del plegamiento de la enzima *MdGDH* y su estabilidad térmica con espectropolarimetría de dicroísmo circular (CD)

El análisis de la integridad conformacional de la enzima *MdGDH* y su estabilidad térmica mediante dicroísmo circular presentó un espectro caracterizado por un pico máximo positivo de 197 nm y dos picos mínimos en torno a 208 y 222 nm. Estos son perfiles típicos de proteínas $\alpha\beta$, donde existe predominancia de las hélices α sobre las hojas β (Figura 14).

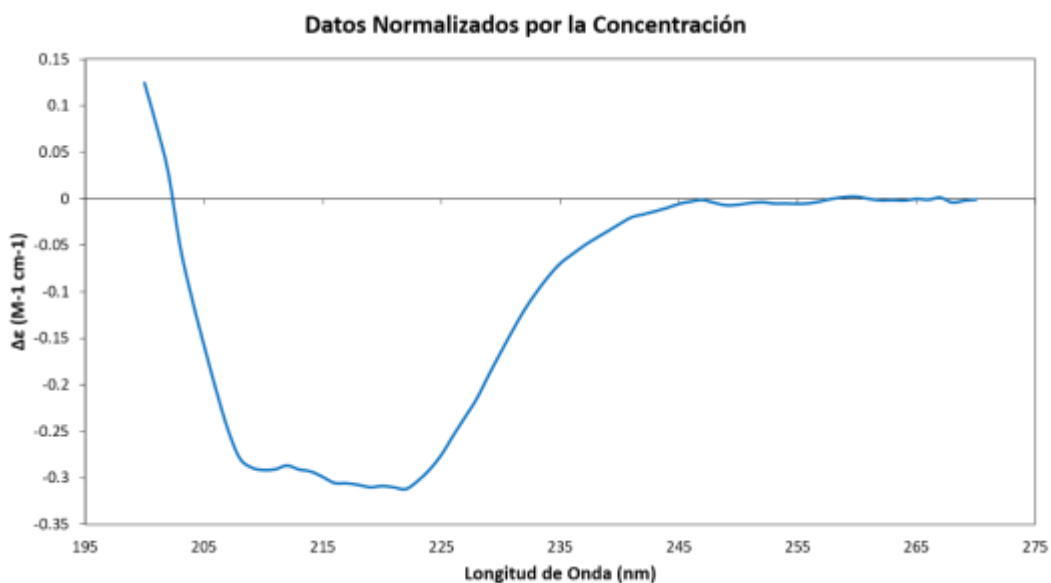


Figura 14. Espectro de dicroísmo circular de la enzima monomérica *MdGDH*. Los espectros muestran mínimos entre 208 y 222 nm, compatibles con proteínas de tipo $\alpha\beta$.

Cuando se evaluó el espectro de dicroísmo circular de la enzima *MdGDH* a diferentes temperaturas (20°C a 80°C) se evidenció que entre 20 y 40°C la enzima mantiene su conformación nativa, por la presencia de sus de hélices α y hojas β . Sin embargo, a temperaturas $\geq 48^\circ\text{C}$ la enzima se va desnaturalizando gradualmente y se encuentra completamente desnaturalizada a los 80°C. Este fenómeno de desnaturalización se evidencia por la ausencia de hélices α y hojas β (Figura 15). Asimismo, el análisis de la isoterma de desnaturalización de la enzima *MdGDH*, monitoreada por el cambio de elipticidad a 222 nm nos muestra una curva sigmoidea típica indicándonos que la temperatura de transición del estado nativo al desnaturalizado (T_m) fue de 48°C (Figura 16).

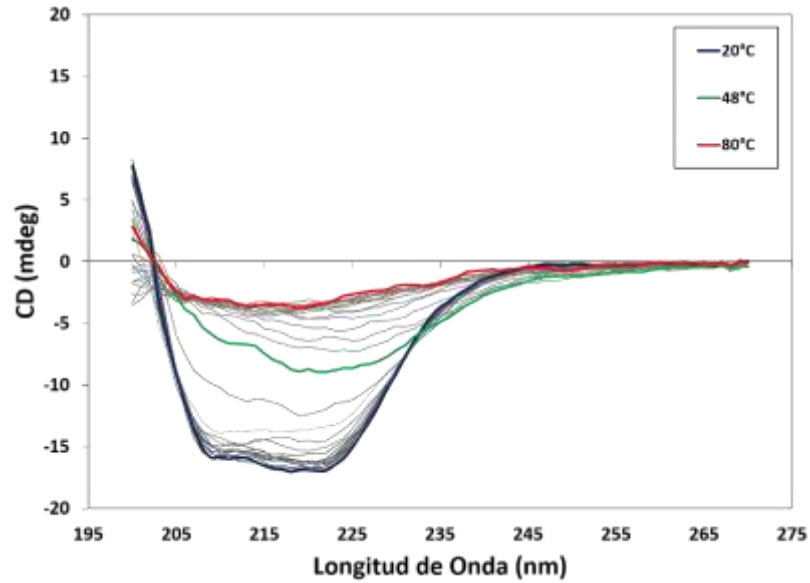


Figura 15. Espectro de dicroísmo circular de la enzima *MdGDH* en un rango de temperaturas de 20 a 80°C.

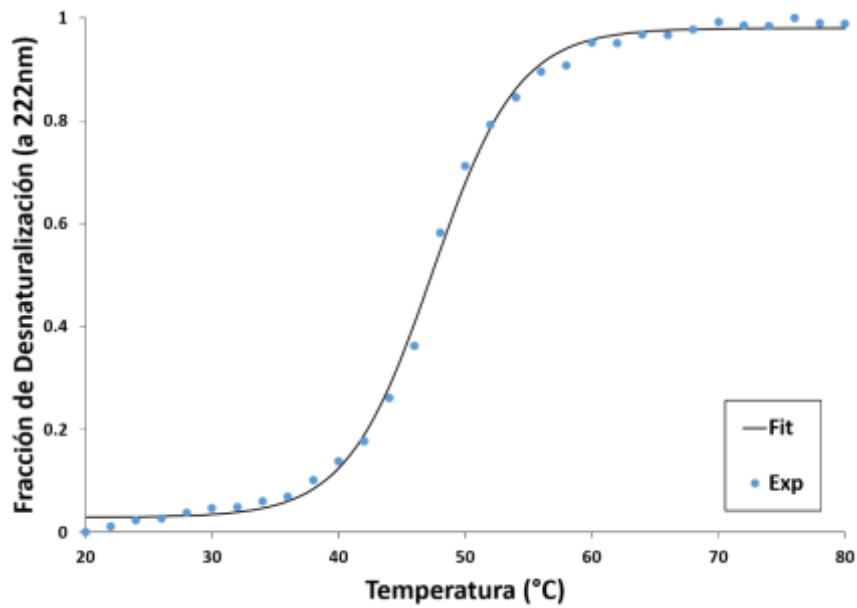


Figura 16. Isotherma de desnaturalización térmica de la enzima *MdGDH*, medida por la señal de dicroísmo circular a 222 nm. El T_m fue de 48°C.

4.5. Caracterización funcional de la enzima *MdGDH*

4.5.1. Actividad enzimática

Cuando se incubó la enzima *MdGDH* recombinante con el sustrato L-galactosa y el cofactor enzimático NAD^+ se evidenció un aumento de la absorbancia a 340 nm (pico de máxima absorción del NADH) en función al tiempo, indicándonos la formación de L-galactono-1,4-lactona y $\text{NADH} + \text{H}^+$, sugiriéndonos que la enzima *MdGDH* recombinante es activa (Figura 17).

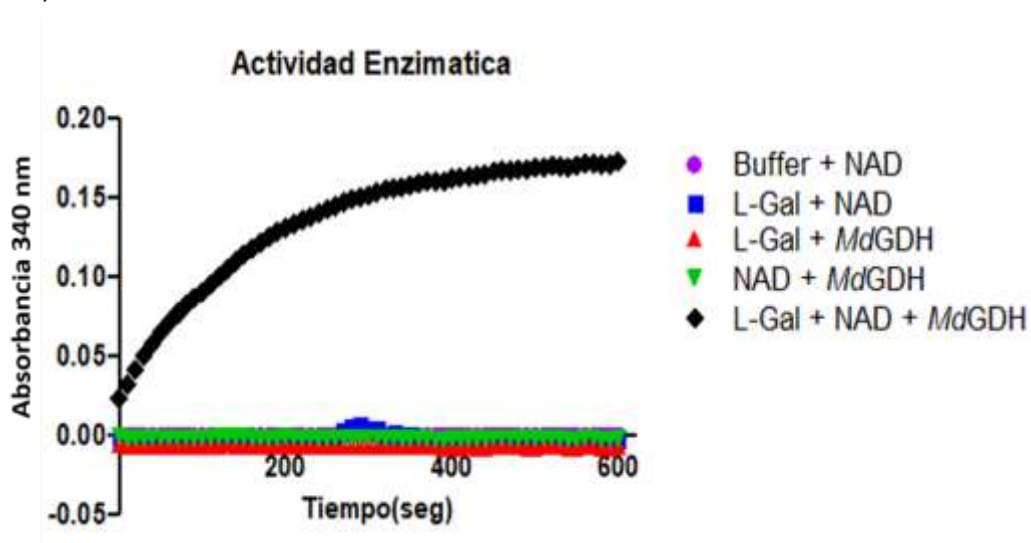


Figura 17. Actividad catalítica de la enzima *MdGDH* recombinante.

Evidencia de la formación de los productos de la reacción L-galactono-1,4-lactona y $\text{NADH} + \text{H}^+$

4.5.2. Determinación de los parámetros cinéticos de *MdGDH*

Cuando se midió la actividad catalítica de la enzima *MdGDH* recombinante con diferentes concentraciones del sustrato L-galactosa (0 a 2 mM), esta mostró una hipérbola rectangular, un patrón típico de las enzimas que se comportan de acuerdo a la cinética de Michaelis-Menten. En base a los ensayos realizados se ha estimado que el K_m de la enzima

MdGDH es igual a 0,3533 μmol y su velocidad máxima es de 86.10 $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Figura 18).

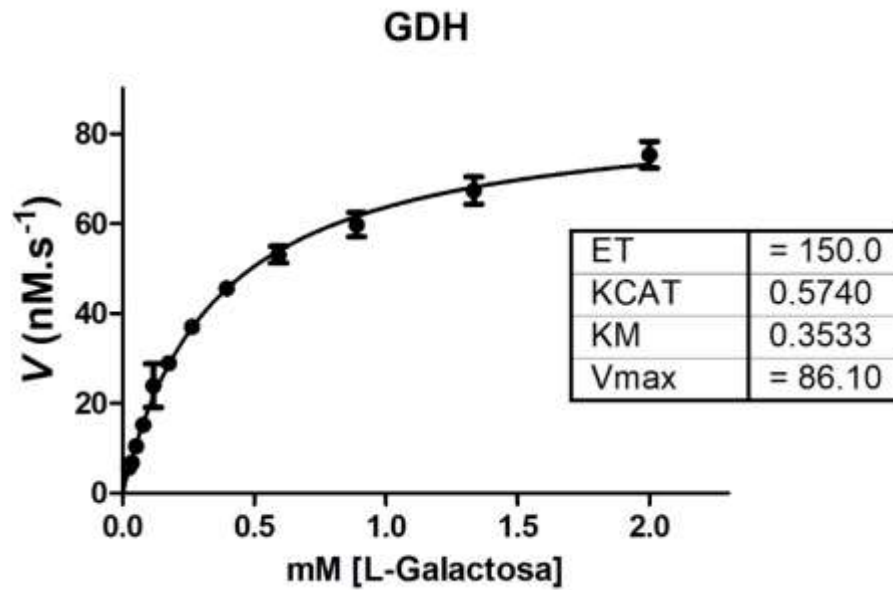


Figura 18. Efecto de la concentración del sustrato L-galactosa sobre la actividad catalítica de la enzima *MdGDH* recombinante.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

La identificación del gen (región codificante) que codifica la enzima GDH es crucial para llevar a cabo la correcta clonación del gen de interés. El porcentaje de identidad obtenido de la base de datos del transcriptoma de fruto de *M. dubia* fue de 81% comparado con la secuencia de aminoácidos de *A. thaliana*, lo cual indica que el producto obtenido es el gen que codifica a la enzima L-galactosa deshidrogenasa de *M. dubia* (*MdGDH*). Trabajos realizados por Mieda *et al.*,(15) en 2004 dedujeron la secuencia de aminoácidos de la enzima GDH para *Spinacia oleracea* (espinaca) a partir de secuencia de péptidos, esta secuencia presento entre 75 a 82 % de homología con otras secuencias de plantas; Laing *et al.*, (17) en 2004 observaron una homología, también en una secuencia de péptidos de *Actinidia deliciosa* (kiwi) con otras especies de plantas entre 78 a 80 % de identidad. Sin embargo, la identificación realizada por Mieda *et al.*, y Laing *et al.*, fue a partir de secuencias peptídicas cortas, lo que contrasta con el presente trabajo en donde se empleó el transcripto total del gen, lo que garantiza la identificación certera de la enzima *MdGDH*.

El uso de herramientas bioinformáticas para la optimización, síntesis del gen y caracterización *in silico* de enzimas de interés es crucial para la clonación, asimismo para calcular los parámetros físicos-químicos esenciales de la enzima de interés. Trabajos como los de Mieda *et al.*,(15) en 2004 dedujeron la secuencia de aminoácidos de la enzima GDH para *Spinacia oleracea* (espinaca) a partir de secuencia de péptidos, calculando una masa molecular teórica de 35,26 kDa de la secuencia de aminoácidos, esta secuencia presento entre 75 a 82 % de homología con otras secuencias de plantas; Laing

et al.,(17) en 2004 observaron una homología en las secuencia de aminoácidos de *Actinidia deliciosa* (kiwi) con otras especies de plantas entre 78 a 80 % de identidad y finalmente Momma & Fujimoto.,(18) en 2013 calcularon una masa molecular de 33,5 kDa de la secuencia de aminoácidos de la enzima GDH de *Oryza sativa* (arroz) . Estos trabajos emplearon metodologías análogas a los empleados en la presente tesis y básicamente son caracterizaciones *in silico* de la proteína GDH, es decir, realizaron esta caracterización previa clonación para verificar y constatar que el gen codifica realmente a la enzima GDH. En el presente trabajo se obtuvo de 75 a 95% de homología con respecto a otras especies de plantas, calculando una masa molecular teórica de 34,8 KDa de la enzima *MdGDH* a partir de su secuencia de aminoácidos, esto permitió la clonación del gen de interés con la secuencia aminoacídica completa. Además, en el presente trabajo de tesis se estudió la relación filogenética de la enzima *MdGDH* con 48 taxones, lo cual determinó que la enzima *MdGDH* no pertenece al mismo clado y tampoco forma ningún sub-clado con especies que presenten alto contenido de vitamina C, lo cual sugiere que podría no estar genéticamente relacionada. Además, se observó que la enzima es una oxidorreductasa, perteneciente a la familia aldo-ceto reductasa, por lo cual Laing *et al.*,(17) indican que podría tratarse de una enzima cloroplástico o citosólico. Sin embargo, en el presente trabajo se predice que podría estar dirigido a 3 organelos, cloroplasto, mitocondria y vía secretora, debido a que contiene los péptidos cTP, mTP y SP (péptidos señales o transitorios de dichas localizaciones).

En la actualidad existen empresas que brindan el servicio de clonación, ofreciendo la síntesis del gen de interés en el vector plasmídico que permite

la expresión y purificación de la proteína recombinante en un sistema bacteriano (*E. coli*), actividad que resulta económica y eficaz, pero para ello se tiene que tener la secuencia nucleotídica optimizada del gen de interés, lo cual se logró en el presente trabajo. Sin embargo, hoy en día el uso de proteínas recombinantes es aplicado en la industria tecnológica, como salud, agricultura, medio ambiente, etc. Precisamente independientemente del sistema que se utilice para la producción de la proteína de interés, estas presentan dificultades como parte del proceso, entre ellas encontramos; elevado costo de producción, la proteína de interés no siempre expresa bien, la proteína expresa, pero de forma insoluble impidiendo así su purificación. Los trabajos relacionados a expresión y purificación de proteínas recombinantes existen en muchos artículos científicos publicados en revistas de impacto, encontrándose muchas similitudes en cuanto al proceso empleado. Sin embargo, por cada proteína se debe optimizar las condiciones de expresión y purificación. Gatzek *et al.*,(13) en el 2002 expresaron la enzima GDH recombinante de *Arabidopsis thaliana*, induciendo su expresión con 0,1mM de IPTG por 4 horas (No indica la T°) en *E. coli* BL21 (DE3); Mieda *et al.*,(15) expresaron la enzima GDH recombinante de *Spinacia oleracea*, induciendo su expresión con 0.4 mM de IPTG por 6 horas a 37°C en *E. coli* BL21 (DE3) y finalmente Momma & Fujimoto.,(18) expresaron la enzima GDH recombinante de *Oryza sativa*, induciendo su expresión con 0.25 mM de IPTG por 6 horas a 37°C en *E. coli* BL21 (DE3). En contraste con la presente tesis se expresó la enzima GDH recombinante de *M. dubia*, induciendo su expresión con 0.3 mM de IPTG por 4 horas a 37°C y 20°C por 16 horas en *E. coli* Rosetta BL21 (DE3), en la cual a ambas Temperaturas (T°) expresa, sin

embargo, a 37°C la proteína se encuentra insoluble casi en su totalidad mientras que a 20°C la proteína también se encuentra insoluble pero se observa también un grado de solubilidad mayor que a 37°C, es por eso que se optó por expresar a 20°C en gran escala (1 a 2 litros). Determinándose que la optimización de la expresión para la misma enzima fue diferente en cada trabajo, esto podemos atribuir al vector plasmídico y a la cepa bacteriana empleada (la única diferente fue del presente trabajo), asimismo a factores bioquímicos (tampón de lisis, pH, agitación, etc.).

Por otro lado, los estudios relacionados a purificación de la enzima GDH iniciaron a partir de extractos de tejidos de plantas, posteriormente se realizaron con enzimas recombinantes para tratar de resolver su composición estructural, entre estos trabajos están, por ejemplo, Gatzek *et al.*, (13) en 2002, purificaron la enzima a partir de tejidos de *Pisum sativum*, indicando que la proteína obtenida es un homotetrámero con un peso molecular de 156 kDa, posteriormente purificaron la enzima recombinante de *Arabidopsis thaliana*, en la cual indican que la enzima es monomérica con un peso molecular de 42,4 kDa; Mieda *et al.*, (15), reportan que la enzima purificada a partir de hojas de *Spinacia oleracea* al principio la enzima tenía una masa molecular de 75 kDa (estimado por cromatografía de filtración en gel) pero la fracción activa presentó una masa molecular de 36 kDa (estimada por SDS-PAGE) ; masa molecular (37,3 kDa) similar a lo reportado por Laing *et al.*, (17) purificada a partir de hojas de *Actinidia deliciosa*, asimismo, purificaron la enzima recombinante, pero solo indican la masa molecular teórica (35,3 kDa); Momma & Fujimoto., (18) en 2013 reportan un peso molecular de 35 kDa (estimada por SDS-PAGE) en *Oryza Sativa* y además indican que la proteína

presenta un estado oligomérico monomérico. El contraste con el presente trabajo de tesis, la purificación de la enzima *MdGDH* recombinante presenta una masa molecular de 39,3 kDa (estimada por SDS-PAGE/SEC), sin embargo empleando SEC-MALS se determinó una masa molecular de 38,6 kDa y su estado oligomérico monomérico, SEC-MALS es considerada como técnica absoluta para determinar la masa molecular independiente de la conformación o las interacciones de columna, por lo cual este resultado representa mayor precisión con respecto a las técnicas empleados en los trabajos mencionados anteriormente, asimismo se determinó que la proteína no cambia su estado oligómero cuando este está unido a NAD/NADH (Cofactores), estos resultados reflejan una caracterización estructural de la enzima *MdGDH* recombinante, que permitió realizar análisis más precisos sobre la enzima. Por otro lado, empleando dicroísmo circular, permitió conocer la conformación estructural de la enzima. El trabajo realizado por Momma & Fujimoto.,(18) cristalizaron la proteína recombinante a partir de *Oryza sativa* pero no resolvieron su estructura, en el presente trabajo no se cristalizó la enzima *MdGDH* recombinante, pero se determinó la conformación estructural de la enzima *MdGDH* recombinante siendo conformado por hélices α + hojas β ; además se determinó la temperatura de plegamiento/desplegamiento de la enzima *MdGDH* recombinante, información aun no reportada para la enzima GDH.

Los aspectos funcionales de la enzima GDH se iniciaron con el trabajo de Gatzek *et al.*, (13) en el 2002, a partir de la enzima de guisante (13) indicando un K_m a pH 8 de 430 μ M, ; similar a lo reportado por Laing *et al.*,(17) para Kiwi a pH 7,5 K_m de 300 μ M. Por otro lado la enzima GDH recombinante de

Arabidopsis thaliana (13) presenta un valor inferior a la enzima extraída a partir de tejidos vegetales, con pH de 8.5 a 9 y un K_m de 85 μM ; sin embargo para el caso de la enzima de *MdGDH* se obtuvo un K_m (L-gal) a pH 7,8, de 0,3533 μM con una velocidad máxima de 86.10 $\mu\text{mol.mg prot}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (Figura 17). Este resultado observado para la enzima recombinante de camu-camu indica una alta afinidad que tiene la enzima por su sustrato (L-gal) con respecto a los otros trabajos reportados hasta la actualidad. Sin embargo, debido a problemas en la adquisición del sustrato, para la presente tesis no se determinó el pH óptimo, Temperatura e Inhibición, este último en trabajos de Gatzek *et al.*,(13), Mieda *et al.*,(15) y finalmente Laing *et al.*,(17) coinciden que AA inhibe la enzima GDH fuertemente, incluso L-galactono-1,4-lactona también inhibe a la enzima, por lo cual probablemente esta enzima cumpla una función clave para la biosíntesis de AA en las plantas, funcionando como un regulador de la vía D-manosa/L-galactosa, asimismo, podría ser la clave para la explicación del porque en camu-camu ocurre la sobreexpresión de los genes que sintetizan AA, los estudios relacionado a expresión génica y actividad de la enzima nativa en hojas y fruto del gen GDH en camu camu reportado por Castro *et al.*, (16,19,54,55) muestran que GDH es la enzima que presenta menos expresión génica y actividad enzimática en comparación a GDP-manosa-3',5'-epimerasa (GME) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (L-GalDH) enzimas que sobreexpresan también como enzimas recombinantes (datos no mostrados).

CAPITULO VI: CONCLUSIONES

- Se identificó del transcriptoma de *M. dubia*, la secuencia correcta que codifica el gen de la enzima L-galactosa deshidrogenasa.
- Se caracterizó *in silico* la enzima L-galactosa deshidrogenasa de *M. dubia*, la cual presentó homología con una cobertura de la secuencia superior al 90 % con otras especies de plantas.
- La expresión, producción y purificación de la enzima recombinante L-galactosa deshidrogenasa de *M. dubia* fue determinante para realizar la caracterización funcional de esta.
- La caracterización funcional de la enzima MdGDH recombinante *in vitro*, nos indica que esta enzima podría ser clave en la vía de biosíntesis de AA en camu-camu.

CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

- Comparar la actividad de la enzima purificada a partir de tejido vegetal versus la enzima recombinante
- Determinar la estructura tridimensional de la enzima L-galactosa dehidrogenasa.
- Realizar estudios similiares con las otras enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*.

CAPÍTULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Arellano Acuña E, Rojas Zavaleta I, Paucar Menacho LM. Camu-camu (*Myrciaria dubia*): Fruta tropical de excelentes propiedades funcionales que ayudan a mejorar la calidad de vida. Sci Agropecu. octubre de 2016;7(4):433-43.
2. Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: A Renaissance. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol. 2001;52(1):437-67.
3. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature. mayo de 1998;393(6683):365-9.
4. Villanueva Tiburcio JE, Condezo Hoyos LA, Asquieri ER. Antocianinas, ácido ascórbico, polifenoles totales y actividad antioxidante, en la cáscara de camu-camu (*Myrciaria dubia* (H.B.K) McVaugh). Food Sci Technol. mayo de 2010;30:151-60.
5. Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for l-ascorbic acid production. Trends Biotechnol. 1 de julio de 2002;20(7):299-305.
6. Chotani G, Dodge T, Hsu A, Kumar M, LaDuca R, Trimbur D, et al. The commercial production of chemicals using pathway engineering. Biochim Biophys Acta BBA - Protein Struct Mol Enzymol. 29 de diciembre de 2000;1543(2):434-55.
7. Chen Z, Young TE, Ling J, Chang S-C, Gallie DR. Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. Proc Natl Acad Sci. 18 de marzo de 2003;100(6):3525-30.

8. Zhou J, Du G, Chen J. Metabolic Engineering of Microorganisms for Vitamin C Production. Springer, Dordrecht; 2012. (Subcellular Biochemistry).
9. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. J Sci Food Agric. 15 de mayo de 2000;80(7):825-60.
10. Conklin PL. Recent advances in the role and biosynthesis of ascorbic acid in plants. Plant Cell Environ. 1 de abril de 2001;24(4):383-94.
11. Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. Plant Physiol. 1 de marzo de 2004;134(3):1200-5.
12. Zou W, Liu L, Chen J. Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. Crit Rev Microbiol. 1 de agosto de 2013;39(3):247-55.
13. Gatzek S, Wheeler GL, Smirnoff N. Antisense suppression of l-galactose dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana* provides evidence for its role in ascorbate synthesis and reveals light modulated l-galactose synthesis. Plant J. 1 de junio de 2002;30(5):541-53.
14. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature. mayo de 1998;393(6683):365-9.

15. Mieda T, Yabuta Y, Rapolu M, Motoki T, Takeda T, Yoshimura K, et al. Feedback Inhibition of Spinach L-Galactose Dehydrogenase by L-Ascorbate. *Plant Cell Physiol.* 15 de septiembre de 2004;45(9):1271-9.
16. Castro JC, Cobos M, Maddox JD, Imán SA, Egoavil A, Torres J, et al. Gene expression and enzyme activities of the D-mannose/L-galactose pathway influence L-ascorbic acid content in *Myrciaria dubia*. *Biol Plant.* 1 de diciembre de 2015;59(4):783-7.
17. Laing WA, Frearson N, Bulley S, MacRae E. Kiwifruit L-galactose dehydrogenase: molecular, biochemical and physiological aspects of the enzyme. *Funct Plant Biol.* 15 de noviembre de 2004;31(10):1015-25.
18. Momma M, Fujimoto Z. Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice L-galactose dehydrogenase. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 1 de julio de 2013;69(7):809-11.
19. Castro Gómez JC, Gutiérrez Rodríguez F, Acuña Amaral C, Cerdeira Gutiérrez LA, Tapullima Pacaya A, Cobos Ruiz M, et al. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* «camu camu». *Rev Soc Quím Perú.* octubre de 2013;79(4):319-30.
20. Imán Correa S, Bravo Zamudio L, Sotero Solís V, Oliva Cruz C. Contenido de vitamina C en frutos de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, en cuatro estados de maduración, procedentes de la Colección de Germoplasma del INIA Loreto, Perú. *Sci Agropecu.* 2011.
21. Castro JC, Maddox JD, Cobos M, Imán SA. *Myrciaria dubia* “Camu Camu” Fruit: Health-Promoting Phytochemicals and Functional Genomic

Characteristics. Breed Health Benefits Fruit Nut Crops. 13 de junio de 2018.

22. Imán Correa SA, Melchor Aldana M. Tecnología para la producción del camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. Primera. Lima, Perú: Unidad de Medios y Comunicación Técnica; 2007.
23. Chase MW, Reveal JL. A phylogenetic classification of the land plants to accompany APG III. Bot J Linn Soc. 1 de octubre de 2009;161(2):122-7.
24. Byng J, Chase M, Christenhusz M, Fay M, Judd W, Mabberley D, et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. Bot J Linn Soc. 1 de mayo de 2016;181:1-20.
25. Lopez Lozano CP. Correlación del nivel de expresión de los genes PAL, CHS Y UFGT con la concentración de antocianinas en frutos de *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. Univ Nac Amaz Peru. 2016
26. Peters CM, Vasquez A. Estudios ecológicos de Camu-Camu (*Myrciaria dubia*). I. Producción de frutos en poblaciones naturales. Acta Amaz. 1987;17:161-88.
27. Acuña Amaral C, Cerdeira Gutiérrez LA. Comparación de la actividad catalítica de enzimas de la vía de Halliwell-AAa entre plantas de *Myrciaria dubia* camu-camu que producen frutos de alto y bajo contenido de vitamina C. Univ Nac Amaz Peru, 2013.

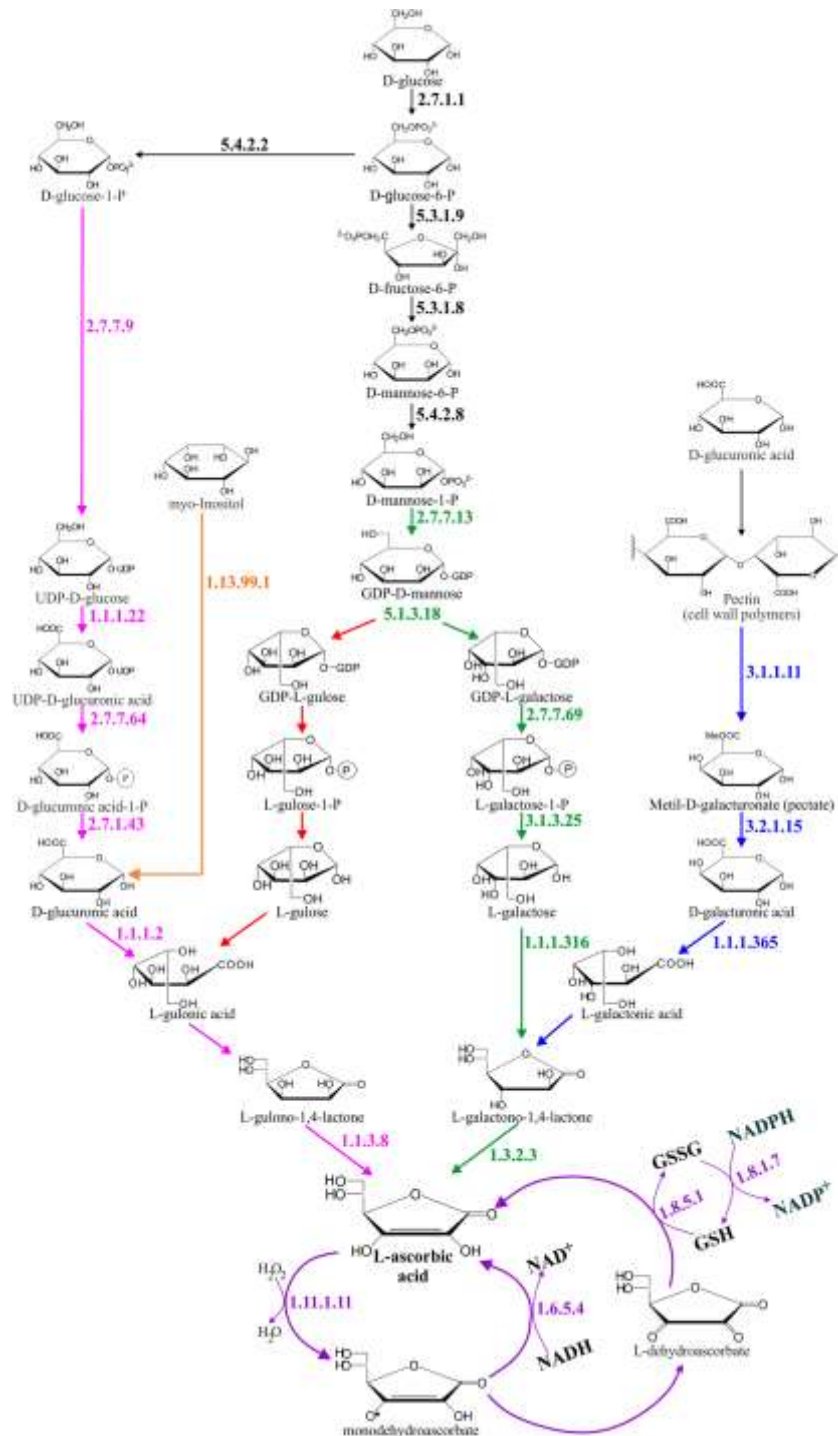
28. Pinedo Panduro M, Riva Ruíz R, Salgado R, Liliana E, Delgado Vásquez C, Villacrés Vallejo J, et al. Sistema de producción de camu camu en restinga. Inst Investig Amaz Peru, 2001.
29. Rodrigues RB, Menezes HCD, Cabral LMC, Dornier M, Reynes M. An Amazonian fruit with a high potential as a natural source of vitamin C: the camu-camu (*Myrciaria dubia*). Fruits. septiembre de 2001;56(5):345-54.
30. Imán Correa S, Pinedo Freyre S, Melchor Aldana M. Caracterización morfológica y evaluación de la colección nacional de germoplasma de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh, del INIA Loreto-Perú. Sci Agropecu, 2011.
31. Akter MS, Oh S, Eun J-B, Ahmed M. Nutritional compositions and health promoting phytochemicals of camu-camu (*Myrciaria dubia*) fruit: A review. Food Res Int. 1 de agosto de 2011;44(7):1728-32.
32. Sorice A, Guerriero E, Capone F, Colonna G, Castello G, Costantini S. Ascorbic Acid: Its Role in Immune System and Chronic Inflammation Diseases. Mini Rev Med Chem. 1 de abril de 2014;14(5):444-52.
33. Yunis Aguinaga J, Fernandes DC, Eto SF, Claudiano GS, Marcusso PF, Marinho-Neto FA, et al. Dietary camu camu, *Myrciaria dubia*, enhances immunological response in Nile tilapia. Fish Shellfish Immunol. 1 de noviembre de 2016;58:284-91.
34. Özkan F, Gündüz SG, Berköz M, Hunt AÖ, Yalın S. The protective role of ascorbic acid (vitamin C) against chlorpyrifos-induced oxidative stress in. Fish Physiol Biochem. 1 de junio de 2012;38(3):635-43.

35. Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv.* 1 de noviembre de 2005;23(7):471-99.
36. Castro JC, Maddox JD, Cobos M, Requena D, Zimic M, Bombarely A, et al. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. *BMC Genomics.* 24 de noviembre de 2015;16:997.
37. Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH. Ascorbate Biosynthesis in Mitochondria Is Linked to the Electron Transport Chain between Complexes III and IV. *Plant Physiol.* 1 de mayo de 2000;123(1):335-44.
38. Siendones E, González-Reyes JA, Santos-Ocaña C, Navas P, Córdoba F. Biosynthesis of Ascorbic Acid in Kidney Bean. l-Galactono- γ -Lactone Dehydrogenase Is an Intrinsic Protein Located at the Mitochondrial Inner Membrane. *Plant Physiol.* 1 de julio de 1999;120(3):907-12.
39. Baxevanis AD, Branch GT. *Bioinformatics: a Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins.* 2001.
40. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1 de septiembre de 1997;25(17):3389-402.
41. Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res.* 1 de enero de 2013;41(D1):D36-42.

42. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP. Biología celular y molecular. Ed. Médica Panamericana; 2005. 1096 p.
43. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. Bioquímica. Reverte; 2007. 1162 p.
44. Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. Principios de bioquímica Lehninger. 5.^a ed. Ediciones Omega, S.a.; 2007. 1296 p.
45. Overton TW. Recombinant protein production in bacterial hosts. Drug Discov Today. 1 de mayo de 2014;19(5):590-601.
46. Pope B, Kent HM. High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 1 de febrero de 1996;24(3):536-7.
47. Díaz Granados C, Chaparro-Giraldo A. Plant genetic transformation methods. Rev UDCA Actual Amp Divulg Científica. junio de 2012;15(1):49-61.
48. Hansen G, Wright MS. Recent advances in the transformation of plants. Trends Plant Sci. 1 de junio de 1999;4(6):226-31.
49. Nowakowski AB, Wobig WJ, Petering DH. Native SDS-PAGE: High Resolution Electrophoretic Separation of Proteins With Retention of Native Properties Including Bound Metal Ions. Met Integr Biometal Sci. mayo de 2014;6(5):1068-78.
50. Kresge N, Simoni RD, Hill RL. SDS-PAGE to Determine the Molecular Weight of Proteins: the Work of Klaus Weber and Mary Osborn. J Biol Chem. 16 de junio de 2006;281(24):e19-e19.

51. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. agosto de 1970;227(5259):680-5.
52. Folta-Stogniew E. Oligomeric states of proteins determined by size-exclusion chromatography coupled with light scattering, absorbance, and refractive index detectors. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2006;328:97-112.
53. Miles AJ, Wallace BA. Chapter 6 - Circular Dichroism Spectroscopy for Protein Characterization: Biopharmaceutical Applications. En: Houde DJ, Berkowitz SA, editores. *Biophysical Characterization of Proteins in Developing Biopharmaceuticals*. Amsterdam: Elsevier; 2015.
54. Castro JC, Araujo Á, Gutiérrez F, Correa SI. L-Galactosa deshidrogenasa y L-Gulono-1,4-lactona deshidrogenasa influyen en la biosíntesis de vitamina C en *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh «camu-camu». *ECIPeru Rev Encuentro Científico Int*. 2013;9(2 (Marzo)):77-83.
55. Egoávil A, Torres J, Cobos M, Imán SA, Marapara JL, Castro JC. Clonación molecular de los genes GDP-L-galactosa fosforilasa, L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono-1.4-lactona deshidrogenasa de la vía biosintética de vitamina C en *Myrciaria dubia* (camu camu). *Conoc Amaz*. 11 de noviembre de 2016;6(1):41-8.

ANEXOS



Anexo 1. Vías metabólicas para la biosíntesis y reciclaje de vitamina C reconstruidas en base al metaensamblado y anotación del transcriptoma de frutos de *M. dubia*. Las reacciones de la vía D-manosa/L-galactosa son representadas por las flechas de color verde. Fuente: Castro *et al.* (36).

Anexo 2. Preparación de células competentes para transformación por shock térmico.

Células Químico-competentes

1. Inocular en 2mL de medio LB una colonia aislada de *E. coli* Rosseta BL21(DE3).
2. Incubar el inoculo por 12 a 16 horas a 37 °C Y 80 revoluciones por minuto (rpm).
3. Transferir el inoculo para 100 mL de medio LB y incubar a 37 °C y 80 rpm hasta obtener una Absorbancia de 600 nanómetros (Abs_{600}) entre 0,5 a 0,7.
4. Colocar el cultivo en hielo picado durante 10 minutos. A partir de este paso mantener las células siempre en hielo.
5. Colectar las células por centrifugación a 5000 x g a 4 °C por 10 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y resuspender las células cuidadosamente en 20mL $MgCl_2$ 0,1 mol. L⁻¹, helado.
7. Centrifugar a 5000 x g, 4 °C por 10 minutos
8. Descartar el sobrenadante y resuspender las células cuidadosamente en 50mL $CaCl_2$ 0,1 mol. L⁻¹, helado.
9. Mantener la suspensión en hielo por 20 a 30 minutos, mezcle la suspensión 3 veces en este intervalo.
10. Centrifugar a 5000 x g, 4 °C por 10 minutos
11. Descartar el sobrenadante y resuspender las células cuidadosamente en 10mL $CaCl_2$ 0,1 mol. L⁻¹ + 15% (V/V) de glicerol, helado.

12. Distribuir alícuotas de 200 μ L en microtubos, congelar en N₂ líquido y guardar a -80 °C.

Para testar la calidad de las células, se usa dos alícuotas de células para transformación conforme al cuadro de abajo:

Alicuota	Transformación
1	Plásmido
2	Agua

Plaque la mitad de cada transformación en medio LB con antibiótico de selección y la otra mitad en LB sin antibiótico. Fuente: Instituto de Física de Sao Carlos.

Anexo 3. Soluciones para la preparación de geles separadores para electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida con tris-glicina.

Soluciones	Volúmenes por componentes por volumen de molde							
	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
Seis 6%								
H2O	2.6	5.3	7.9	10.6	13.2	15.9	21.2	26.5
30% mix acrilamida	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0	8.0	10.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% Persulfato de Amonio	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.00 4	0.00 8	0.01 2	0.01 6	0.02 0	0.02 4	0.03 2	0.04
Ocho 8%								
H2O	2.3	4.6	6.9	9.3	11.5	13.9	18.5	23.2
30% mix acrilamida	1.3	2.7	4.0	5.3	6.7	8.0	10.7	13.3
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% Persulfato de Amonio	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.00 3	0.00 6	0.00 9	0.01 2	0.01 5	0.01 8	0.02 4	0.03
Diez 10%								
H2O	1.9	4	5.9	7.9	9.9	11.9	15.9	19.8
30% mix acrilamida	1.7	3.3	5.0	6.7	8.3	10.0	13.3	16.7
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% Persulfato de Amonio	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.00 2	0.00 4	0.00 6	0.00 8	0.01 0	0.01 2	0.01 6	0.02
Doce 12%								
H2O	1.6	3.3	4.9	6.6	8.2	9.9	13.2	16.5
30% mix acrilamida	2	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	16.0	20.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% Persulfato de Amonio	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.00 2	0.00 4	0.00 6	0.00 8	0.01 0.01	0.01 2	0.01 6	0.02
Quince 15%								
H2O	1.1	2.3	3.4	4.6	5.7	6.9	9.2	11.5

30% mix acrilamida	2.5	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0	25.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8	5.0	6.3	7.5	10.0	12.5
10% SDS	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
10% Persulfato de Amonio	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25	0.3	0.4	0.5
TEMED	0.00 2	0.00 4	0.00 6	0.00 8	0.01	0.01 2	0.01 6	0.02

Soluciones	Volúmenes por componentes por volumen de molde							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Cinco 5 %								
H2O	0.68	1.4	2.1	2.7	3.4	4.1	5.5	6.8
30% mix acrilamida	0.17	0.33	0.5	0.67	0.83	1	1.3	1.7
1.5 M Tris (pH 6.8)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.63	0.75	1	1.25
10% SDS	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
10% Persulfato de Amonio	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.08	0.1
TEMED	0.00 1	0.00 2	0.00 3	0.00 4	0.00 5	0.00 6	0.00 8	0.01