



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología

PROYECTO

**Clonación molecular y caracterización de genes de
Myrciaria dubia potencialmente útiles para la producción
biotecnológica de vitamina C**

INVESTIGADORES

Dr. Jorge Luis Marapara del Águila (FCB-UNAP) [Investigador Principal]

Dr. Juan Carlos Castro Gómez (FCB-UNAP)

Dr. Richard Charles Garratt (IFSC-USP)

Dra. Marianela Cobos Ruiz (LBB-UCP)

M.Sc. Sixto Alfredo Imán Correa (ACRF-INIA)

Blgo. Jorge Angulo Quintanilla (FCB-UNAP)

TESISTAS

Pre-grado: 04 tesis

Post- Grado: 02 tesis

PRACTICANTES: 04 practicantes

DURACIÓN: 02 años

MONTO: S/. 60,000.00

IQUITOS – PERÚ

2015

I. TITULO

Clonación molecular y caracterización de genes de *Myrciaria dubia* potencialmente útiles para la producción biotecnológica de vitamina C

1.1. ÁREA DE INVESTIGACIÓN EN EL QUE SE INSERTA EL PROYECTO

Biotecnología

1.2. DURACIÓN DEL PROYECTO

02 años

Inicio: Jun/2015

Término: Jun/2017

1.3. COSTO TOTAL DEL PROYECTO

S/. 60,000.00

1.4. NOMBRES Y APELLIDOS DE LOS INVESTIGADORES

Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila

Investigador Principal, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Teléfono: 065236121, correo electrónico: jmandela@hotmail.com.

Dr. Juan Carlos Castro Gómez

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Teléfono: 965-017215, correo electrónico: juanccgomez@yahoo.es.

Dr. Richard Charles Garrat

Investigador, Instituto de Física de São Carlos, Universidad de São Paulo, Av. Trabalhador São-Carlens 400 – Pq. Arnold Schimidt, CEP: 13566-590, São Carlos-SP-Brasil, Teléfono: (16) 3373-975, correo electrónico: richard@ifsc.usp.br

Dra. Marianela Cobos Ruiz

Investigadora, Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética (LBB), Universidad Científica del Perú (UCP), Av. Abelardo Quiñones Km 2,5, San Juan Bautista, Iquitos, Teléfono: 065-263569, correo electrónico: marianela_cobosr@yahoo.es.

MSc. Sixto Alfredo Imán Correa

Investigador, Área de Conservación de Recursos Fitogenéticos (ACRF), Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Calle San Roque 209, San Juan Bautista, Teléfono: 065261132, correo electrónico: siman@inia.gob.pe

Blgo. Jorge Angulo Quintanilla

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB). Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Departamento Académico de Ciencias Biomédicas y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Teléfono: 965-017215, correo electrónico: bqbmgen@yahoo.es.

1.5. INSTITUCIONES COMPROMETIDAS**Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP)**

Es la Institución ejecutora principal, cuenta con el CIRNA implementado con equipos para realizar varios de los análisis propuestos en el Proyecto.

Instituto de Física de São Carlos (IFSC)

Es una Institución participante que cuenta con el Área de Cristalografía implementado con Laboratorios y Equipos para realizar los análisis cristalográficos del Proyecto.

Universidad Científica del Perú (UCP)

Institución participante que cuenta con el LBB proporcionará el soporte en la formación de recursos humanos y análisis moleculares en el presente proyecto.

Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA)

Institución participante, que cuenta con una colección de germoplasma de *Myrciaria dubia* y proporcionará las muestras biológicas para realizar los análisis requeridos en el Proyecto.

II. ÍNDICE

I. Título	2
II. Índice	3
III. Resumen del Proyecto	5
IV. Planteamiento del Problema	6
V. Antecedentes de la Investigación	9
VI. Hipótesis	11
VII. Objetivos de la Investigación	12
VIII. Metodología del Proyecto	13
IX. Metas por componentes	18
X. Resultados esperados	19
XI. Estrategias a utilizar para la transferencia y comunicación de los resultados	20
XII. Impactos esperados	21
XIII. Infraestructura y equipos a utilizarse	23
XIV. Cronograma de actividades por componentes mensualizado y responsables	24
XV. Resumen del presupuesto por rubros, partidas y componentes en soles	25
XVI. Monitoreo y evaluación: Matriz de Marco Lógico	27
XVII. Referencias bibliográficas	29
XVIII. Anexos	34

III. RESUMEN DEL PROYECTO

Debido a los múltiples efectos beneficiosos de la vitamina C (ácido L-ascórbico, AA) para el buen funcionamiento y conservación de nuestra salud, el AA tiene una gran demanda en la industria. Por ese motivo desde inicios de los años 1930 se han desarrollado sistemas químicos de producción industrial. Aunque se han incorporado algunas innovaciones mediante biotransformaciones microbianas, aún tienen serias limitaciones porque son ineficientes, tienen una gran demanda energética, son costosos y causan polución ambiental. Por tanto, es urgente desarrollar sistemas de producción biotecnológica. El reciente descubrimiento de vías metabólicas para la síntesis de AA en plantas nos ofrece una buena oportunidad, en particular de *Myrciaria dubia*, una especie amazónica caracterizada por sintetizar y almacenar altas concentraciones de AA. Recientemente hemos analizado su transcriptoma e identificado 5 vías para sintetizar AA, es decir es una fuente de genes útiles para la producción biotecnológica de AA. Por tanto, nuestro objetivo es realizar la clonación molecular y caracterización de genes de *Myrciaria dubia* potencialmente útiles para la producción biotecnológica de vitamina C. Para lograr este objetivo las muestras botánicas (frutos pintones) serán colectadas de la Colección de germoplasma de *M. dubia* del INIA, a partir del cual se purificará el ARN total y se realizará la síntesis del ADN complementario. Posteriormente, se realizará el aislamiento y clonación molecular de los genes de la vía biosintética de AA (vía D-manosa/L-galactosa) con técnicas estándares y en base a la información del transcriptoma que actualmente disponemos. Luego se procederá a realizar la producción en *Escherichia coli* y purificación de las enzimas recombinantes de la vía metabólica mencionada. Finalmente, con las enzimas puras procederemos a realizar los análisis funcionales y estructurales mediante cristalografía. Los hallazgos científicos generados impulsarán el desarrollo de procesos biotecnológicos patentables que estarán basados en la ingeniería genética, ingeniería metabólica e ingeniería de proteínas. Estos sistemas serán sustentables e impactarán positivamente en la mejora del nivel socioeconómico regional y nacional.

Palabras clave: biotecnología molecular, biosíntesis de vitamina C, vía D-manosa/L-galactosa.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Está demostrado que los sistemas actuales de producción industrial de Ácido L-Ascórbico (AA, vitamina C) presenta varios problemas. Por ejemplo, son poco eficientes, requieren de un alto suministro de energía, emplean diversos químicos y consecuentemente son altamente contaminantes. Debido a ello, se está incrementando la presión para desarrollar métodos alternativos de producción industrial de AA. Esto se atribuye a la creciente preocupación por la contaminación ambiental, el incremento en el costo de insumos porque se están destinando a la producción de biocombustibles, problemas legales de diversa índole y la necesidad de incrementar la eficiencia de procesos y reducir costos de capital (26,27). Por tanto, urge desarrollar aproximaciones biotecnológicas que tengan la capacidad de competir y desplazar a los actuales procesos de producción comercial de AA. Esto es factible porque mediante la biotecnología, en comparación con los sistemas de producción convencionales, estos procesos pueden ser más rentables porque hay menos desperdicio de materiales y energía, resulta en menos emisiones de gases con efecto invernadero y otros contaminantes, permite un mayor y más eficiente uso de recursos renovables y menos dependencia de recursos no renovables (14).

En este contexto, la reciente elucidación de las vías biosintéticas de AA en plantas representa una excelente oportunidad para desarrollar sistemas alternativos patentables de producción biotecnológica de esta vitamina. Hasta la fecha se han identificado cinco vías metabólicas putativas para la síntesis de AA en plantas. Estas vías metabólicas son la vía similar al de animales (1), la vía del myo-inositol (28), la vía del ácido galacturónico (29), la vía de la L-gulosa (30) y la vía de la D-manosa/L-galactosa (31). Esta última vía metabólica ha sido mejor estudiada en varias especies de plantas porque es considerada la más importante para la biosíntesis de AA (1,2,29,31). 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. 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) (2,29,32). Tal como se muestra en la Figura 2 (ver anexo), todos los genes de la vía D-manosa/L-galactosa (y la mayoría de genes de las otras vías metabólicas) han sido identificados por nuestro grupo de investigación al secuenciar, ensamblar y anotar el transcriptoma de los frutos de *Myrciaria dubia* (33), un arbusto amazónico que sobresale por su gran capacidad de acumular altísimas concentraciones de AA (34–37).

Por tanto, con el propósito fundamental de contribuir al desarrollo de sistemas alternativos de producción biotecnológica de AA con gran potencial para ser patentados, en

esta propuesta de investigación planteamos la siguiente pregunta de investigación **¿Es posible realizar la clonación molecular y caracterización de genes de *Myrciaria dubia* potencialmente útiles para la producción biotecnológica de vitamina C?** Con los análisis planteados en esta propuesta podremos responder esta pregunta y nos permitirán desarrollar en un futuro procesos biotecnológicos para realizar la biosíntesis de AA. Estos sistemas de producción frecuentemente no requiere de altas temperaturas, de solventes orgánicos y pH extremos. Al mismo tiempo ofrece reducción de costos e incremento de la calidad del producto, mayor especificidad de la reacción, la pureza del producto, mayor seguridad y un menor impacto ambiental (38–41). Además, los genes aislados serán herramientas moleculares de gran utilidad que impulsarán el desarrollo de por lo menos tres campos de actividad para la producción biotecnología moderna de AA: la ingeniería metabólica, la ingeniería genética y la ingeniería de proteínas. Al respecto, ya existen algunas experiencias previas en el que han empleado genes de plantas para realizar la ingeniería metabólica de sistemas fúngicos con el propósito de incrementar la producción de AA a nivel de laboratorio (42–44), pero requieren de mejoras significativas para que sean competitivos con los sistemas de producción actuales. Adicionalmente, se ha demostrado que mediante la transferencia de genes, homólogos a los identificados en *M. dubia*, a otras especies de plantas, estas han potenciado su capacidad de biosíntesis y han sido enriquecidas con un mayor contenido de AA (45–49).

En conclusión, los resultados de esta investigación brindarán productos finales con un gran impacto inmediato y a mediano plazo para la comunidad científica, para el desarrollo de sistemas de producción biotecnológica de AA a nivel industrial y para la mejora del nivel socioeconómico regional y nacional. Porque los hallazgos de esta investigación aportarán significativamente al estado del arte que serán presentados en eventos científicos nacionales e internacionales y estarán públicamente disponibles en publicaciones científicas de revistas nacionales e internacionales indexadas. También, los genes aislados, clonados y expresados en sistemas heterólogos serán usados para la producción in vitro de AA y podrán posteriormente ser empleados en aplicaciones de ingeniería genética e ingeniería metabólica para incrementar la eficiencia de biotransformaciones en distintos sistemas biológicos (bacterias, levaduras, microalgas, etc) para la producción de AA. Es decir, todos los avances en ciencia, tecnología e innovación, gracias a los resultados de esta investigación, permitirán establecer nuevos sistemas de producción que generarán más y diversos puestos de trabajo en todos los niveles de la cadena productiva y de comercialización de AA y otros productos derivados de los nuevos sistemas de producción biotecnológica que se impulsen en la amazonía. Esto se expresará en mejoras significativas

de los niveles socioeconómicos y por ende en la calidad de vida de los pobladores a nivel local, regional y nacional.

V. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Roles de la vitamina C en plantas y animales

La vitamina C, también denominada ácido L-ascórbico (AA) es un metabolito que tiene múltiples funciones en plantas y animales. En las plantas, ha sido documentado que el AA cumple múltiples roles en el control de la fotosíntesis, expansión y crecimiento celular, transporte electrónico, antioxidante entre otros roles importantes (1,2). En los animales y específicamente en humanos que han perdido la habilidad de sintetizarlo por deficiencia de la enzima L-gulonolactona oxidasa (3), el AA es un nutriente esencial. Inicialmente fue identificado como el factor que previene el escorbuto (4) y se ha demostrado que cumple diversos roles bioquímicos fundamentales como regulación de la expresión de genes (5–7), es importante en todas las condiciones de estrés que están vinculados a los procesos inflamatorios e involucran la inmunidad (8). Además, actúa como un cofactor esencial de diversas metaloenzimas responsables de funciones fisiológicas claves, tales como la hidroxilación de colágeno, biosíntesis de carnitina, α -amidación de hormonas peptídicas, hidroxilación de dopamina y el metabolismo de tirosina (9). También actúa como donador y aceptor en reacciones de transferencia de electrones y su rol más vital en el cuerpo humano es como antioxidante hidrosoluble (10).

Tecnologías para la producción industrial de vitamina C

Debido a las diversas funciones del AA en el hombre, esta vitamina tiene una gran demanda en múltiples aplicaciones industriales. Por ejemplo, es ampliamente usada en las industrias de fármacos, de alimentos, de cosméticos, de bebidas y en otros campos nuevos de la industria (11,12). Para satisfacer esta gran demanda, se estima que la producción global del AA es de 60 000 a 80 000 toneladas métricas al año y genera ingresos anuales que exceden los 500 a 600 millones de dólares (13,14). La gran mayoría del AA sintetizado actualmente es por un método químico desarrollado por Reichstein y Grüssner hace más de 80 años (15). Este método consta de una etapa de biocatálisis dentro de una serie de unidades operativas basadas en reacciones químicas (Figura 1 en anexo).

Aunque el proceso químico de Reichstein y Grüssner aparentemente presenta todas las ventajas que podría esperarse de una tecnología con muchas décadas de desarrollo, sin embargo tiene varias limitaciones. Primero, es poco eficiente, porque sólo permite convertir aproximadamente el 50% de D-glucosa en ácido L-ascórbico (16). Segundo, es un método que consume una gran cantidad de energía, porque demanda altas temperaturas y presiones en varias etapas. Finalmente, muchas de las transformaciones químicas requieren cantidades considerables de solventes orgánicos e inorgánicos y reactivos tales como

acetona, ácido sulfúrico e hidróxido de sodio. Aunque algunos de estos compuestos pueden ser reciclados, se requieren estrictos controles ambientales, resultando en costos significativos para la disposición de los desechos (12).

Para superar las limitaciones indicadas, las compañías chinas (responsables de ~80% de la producción mundial) han desarrollado desde hace más de 40 años tecnologías de producción que se basan en fermentaciones bacterianas (11). Como las bacterias industrialmente útiles no sintetizan AA, la atención se ha enfocado en su uso para la síntesis de intermediarios del proceso químico de Reichstein y Grüssner (11,16–21), específicamente la producción del ácido 2-ceto-L-gulónico (Figura 1 en anexo), un intermediario clave para la manufactura del AA. Además, se han propuesto sistemas catalíticos continuos con potencial para evolucionar a aplicaciones comerciales en la producción de este intermediario (22–24). Sin embargo, en todos los casos mencionados el ácido 2-ceto-L-gulónico es convertido en AA empleando tecnologías convencionales de procesamiento químico. Estas son comercialmente indeseables debido al empleo de múltiples etapas químicas o el uso de grandes cantidades de cloruro de hidrógeno gaseoso, requerimiento de costosos equipos de procesamiento y producción de AA con impurezas, por lo que requiere una exhaustiva etapa de purificación (25).

Estudios sobre la estructura tridimensional de enzimas

Hasta la fecha no se han reportado investigaciones sobre ingeniería de proteínas para enzimas que participan en la producción de AA en plantas. Esto se atribuye a que hasta el momento sólo se ha resuelto la estructura tridimensional de la enzima GDP-manosa-3',5'-epimerasa de *Arabidopsis thaliana* (50). Por tanto, es necesario purificar, cristalizar y resolver la estructura tridimensional del mayor número posible de enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de las plantas, particularmente de *M. dubia*. Este tipo de información es fundamental para entender los mecanismos catalíticos de estas enzimas y al entender las relaciones estructura-función nos permitirá realizar diseños racionales mediante evolución dirigida en combinación con sistemas de tamizaje apropiados para mejorar las propiedades de estas enzimas y sean compatibles con aplicaciones industriales (51–57). Debido al gran valor comercial del AA todos los sistemas que se desarrollen podrán ser patentados, como varios de los sistemas desarrollados desde principios de los años 1930 cuando se inició la producción comercial de esta vitamina (58). Además, de los beneficios mencionados la producción de estas proteínas recombinantes pueden tener otras aplicaciones biotecnológicas y como proteínas tienen una alta cotización en el mercado y están siendo comercializados por algunas empresas biotecnológicas (59).

VI. HIPÓTESIS

Los genes clonados y caracterizados de *Myrciaria dubia* codifican las enzimas de la vía metabólica D-manosa/L-galactosa, porque estas enzimas presentan una estrecha relación entre su estructura tridimensional y la función catalítica específica con sus sustratos. Esto se evidencia por su capacidad de biosíntesis de vitamina C *in vitro*. Consecuentemente, con la validación experimental de la función bioquímica de estos genes podremos impulsar el desarrollo de sistemas biotecnológicos patentables para la producción comercial de vitamina C mediante aproximaciones de ingeniería genética, ingeniería metabólica e ingeniería de proteínas que serán sustentables e impactarán positivamente en la mejora socioeconómica regional y nacional.

VII. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Realizar la clonación molecular y caracterización de genes de *Myrciaria dubia* potencialmente útiles para la producción biotecnológica de vitamina C

Objetivos específicos

Aislar y clonar los genes de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*

Producir y purificar las enzimas recombinantes de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*

Realizar el análisis funcional y estructural de las enzimas recombinantes de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*

VIII. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Colecta de muestras botánicas

Los frutos pintones (70 a 80 días después de la antesis) serán colectados del banco de germoplasma de *M. dubia*, transportadas con hielo seco al laboratorio, donde serán almacenadas a -80°C hasta el momento de su uso. Cabe indicar que el banco de germoplasma de esta especie se encuentra en la Estación Experimental el “Dorado” (03°57'17"S, 73°24'55"W) del Instituto Nacional de Innovación Agraria, en la Región Loreto. Este banco de germoplasma fue establecido hace aproximadamente 20 años y consiste de 43 accesiones representativas de la variabilidad genética de *M. dubia*, porque la colección deriva de rodales naturales de ocho cuencas hidrográficas de la amazonía peruana (Amazonas, Curaray, Itaya, Nanay, Napo, Ucayali, Putumayo y Tigre). Ver flujograma de procedimientos en la Figura 3 del anexo.

Purificación de ARN Total y síntesis de ADN complementario

El ARN total será purificado a partir de la pulpa de los frutos colectados usando el método CTAB, extracción con solventes orgánicos y tratamiento con ADNasa tal como ha sido estandarizado en nuestro laboratorio (60). La calidad y cantidad del ARN purificado será evaluado mediante análisis espectrofotométrico y electroforesis desnaturizante en gel según Sambrook *et al.* (61). El ADN complementario (ADNc) será obtenido a partir de 2,0 µg de ARN total usando MuLV Reverse Transcriptase y oligo(dT)₁₆ siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Las condiciones de la reacción serán como sigue: 25°C por 10 min, 42°C por 1 h y desnaturización de la enzima a 95°C por 5 min.

Aislamiento y clonación molecular de los genes

Actualmente nosotros disponemos de secuencias completas de las regiones codantes de los seis genes de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia* gracias al secuenciamiento, ensamblado y anotación del transcriptoma de los frutos de esta especie que completamos el año pasado (33). En base a estas secuencias se diseñarán por lo menos dos pares de cebadores específicos para amplificar toda la región codante de cada gen con el programa Primer 3 plus (62,63). Estas regiones génicas serán amplificadas a partir del ADNc usando un termociclador MasterCycler ep Gradient (Eppendorf). Cada reacción de PCR (20 µL) contendrá PCR buffer 1x, MgCl₂ 2-4 mM, dNTPs 0,8 mM, cebadores 0,5-1,0 µM, Phusion® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0,4 U y ADNc 2-4 µL. El protocolo del PCR consistirá de una etapa inicial de desnaturización por 5 min a

95°C, seguido por 35 a 40 ciclos de 45 seg a 95°C, 30 seg a 45-60°C y 1 min a 72°C y finalizará con una etapa de extensión por 10 min a 72°C. Los productos amplificados serán resueltos en gel de agarosa al 2% y las bandas de ADN candidatas (productos de tamaños esperados) serán retirados del gel con ayuda de un bisturí. Posteriormente, los productos de PCR serán purificados usando el Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, CA, USA) y ligados en el vector de clonación pCR[®]2.1-TOPO (Invitrogen, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de ligación serán introducidos en células competentes de *Escherichia coli* mediante electroporación con el sistema Gene Pulser Xcell[™] Electroporation Systems o con el método de shock térmico (61). Las secuencias génicas serán confirmadas por secuenciamiento en ambas hebras de clones independientes usando los cebadores M13 Forward (-20) y M13 Reverse y se verificará su identidad con análisis bioinformáticos tales como el alineamiento con el programa Clustal Omega (64) y análisis BLAST (65). Las colonias que presenten los plásmidos recombinantes correctos serán cultivadas y a partir del cultivo se purificarán los plásmidos con un kit apropiado o el método de lisis alcalina (61).

Producción y purificación de las enzimas recombinantes

La expresión de los genes se llevará a cabo con el aLICator[™] Ligation Independent Cloning and Expression System (Thermo Scientific, USA), que permite la clonación independientemente de ligación y una estricta regulación de la expresión de los genes. Para cada gen se diseñarán dos cebadores específicos del sistema y amplificarán los genes (de los plásmidos recombinantes) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR serán purificados usando el Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, USA), los productos puros serán tratados con la ADN polimerasa del bacteriófago T4 (se usa la actividad exonucleasa 3'→5' de la enzima) para generar extremos 5' y 3' cohesivos. Luego los productos con sus extremos cohesivos serán mezclados con una alícuota del vector pLATE52, el cual añadirá al extremo amino terminal de la proteína recombinante una cola de seis histidinas (*His-tag*) y un sitio de corte para la proteasa WELQut. El vector pLATE52 + producto de PCR con extremos cohesivos serán usados para transformar mediante electroporación con el sistema Gene Pulser Xcell[™] Electroporation Systems o con el método de shock térmico (61) diferentes cepas competentes de *Escherichia coli* (BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, Rosetta[™]2(DE3)pLysS, etc) a fin de evaluar el mejor sistema hospedero de expresión heteróloga. Para producir las enzimas, una colonia de *E. coli* portadora del plásmido recombinante será inoculado en 5 mL de medio Luria Bertani (LB) fresco suplementado con 100 µg/mL de ampicilina y pre-incubado a 37°C por 12 horas con agitación a 200 rpm. Luego el cultivo será transferido a 1 L de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina e incubado a 37°C con agitación a 200 rpm.

Cuando el cultivo alcance una densidad óptica apropiada ($DO_{600nm} = 0,5$ a $0,6$) se añadirá Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) de $0,1$ a 1 mM para inducir la expresión de las enzimas. Las enzimas serán expresadas bajo el control del promotor del bacteriófago T7, que es reconocido específicamente por la ARN polimerasa T7. Después de 6 a 12 horas de inducción se cosecharán las células por centrifugación a $5\ 000\times g$ por 20 min a $4^{\circ}C$ y el precipitado bacteriano será almacenado a $-80^{\circ}C$. Posteriormente, el precipitado bacteriano será resuspendido en un tampón de lisis (NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM y 1 mM DTT), lisados por sonicación y centrifugados a $20\ 000\times g$ por 20 min a $4^{\circ}C$. El sobrenadante será pasado a través de un filtro de $0,2\ \mu m$ y transferido a una columna de agarosa- Ni^{2+} -NTA para su purificación con el sistema de purificación ÄKTA star (GE Healthcare Bio-Sciences). La columna será lavada con 3 a 4 volúmenes de tampón de lavado (NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM). Las enzimas recombinantes-*His-tag* serán eluidas con el tampón de elución (NaH_2PO_4 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 300 mM) y serán tratadas con la proteasa WELQut para eliminar el *His-tag* amino terminal. Posteriormente, las enzimas serán purificadas mediante una columna de exclusión molecular Sephacryl S-200 y concentradas (~ 5 mg/mL) con Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Concentrators (Millipore®, USA). Alícuotas de las enzimas serán congeladas a $-80^{\circ}C$ hasta su uso. La cuantificación de las proteínas se realizará con el método colorimétrico de Bradford (66) y el análisis por SDS-PAGE se ejecutará según Laemmli (67) en un gel de poliacrilamida al 12%, usando el sistema de electroforesis Mini-PROTEAN® 3 cell (Biorad, USA). Las proteínas serán visualizadas después de teñirlas con azul brillante de coomassie al 0,1%.

Análisis funcional de las enzimas recombinantes

GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18): la actividad catalítica se medirá según Major *et al.* (50) en una mezcla de reacción que contendrá Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM, GDP-D-manosa 100 μM , en un volumen final de reacción de 1 mL. La reacción se iniciará por la adición de 2 a 4 μL de la enzima e incubará a $30^{\circ}C$ por 1 hora. La reacción se detendrá a $95^{\circ}C$ por 10 min y las muestras serán centrifugadas a $20\ 000\ g$ por 10 min a $4^{\circ}C$. Los productos de la reacción enzimática (GDP-L-Galactosa y GDP-L-gulosa) presentes en el sobrenadante serán cuantificados de acuerdo a Linster *et al.* (70). Brevemente, 20 μL del sobrenadante será inyectado en una columna Purospher®STAR LiChroCART 250-4,6 NH_2 ($5\ \mu m$, $250 \times 4,6$ mm) con cartucho protector LiChroCART® 4-4 mantenido a $40^{\circ}C$. La fase móvil será NH_2PO_4 100 mM pH 3,7 con una gradiente de 10-500 mM a 2 mL/min y los productos serán detectados a 254 nm usando un HPLC (Elite La Chrome, HP 1100).

L-galactosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.316): la actividad catalítica se ensayará por la formación de NADH de acuerdo a Gatzek *et al.* (72) en una mezcla de reacción Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NAD 0,5 mM y L-galactosa 1,5 mM en un volumen final de reacción de 1 mL. La reacción se iniciará por la adición de 2 a 4 μ L de la enzima y la cinética de la reacción se realizará a 30°C y seguirá a 340 nm por aproximadamente 20 min en un espectrofotómetro (ThermoSpectronic, Genesys 6.0).

L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3): la actividad se medirá de acuerdo a Hancock *et al.* (73) y Oba *et al.* (74) en una mezcla de reacción que contiene PBS 10 mM pH 7,8, KCN 100 μ M, Triton X-100 0,03%, citocromo C 1 mg/mL y L-galactono-1,4-lactone 4 mM en un volumen final de reacción de 1 mL. La reacción se iniciará por la adición de 2 a 4 μ L de la enzima y su cinética se realizará a 30°C y seguirá la reducción de citocromo C a 550 nm por aproximadamente 20 min en un espectrofotómetro. Para los cálculos de la actividad catalítica de la enzima se tendrá en cuenta que el valor del coeficiente de extinción molar del citocromo C a 550 nm es 25300.

La especificidad de las enzimas se evaluará midiendo su actividad catalítica con varios sustratos relacionados. El pH óptimo para la actividad de las enzimas se determinará usando diferentes tampones a una concentración de 25 mM. Entre estos tampones tenemos al citrato (pH 4,0), acetato (pH 5,0), MES (pH 6,0), fosfato (pH 7,0), Hepes (pH 8,0), Tris (pH 9,0) y CHES (pH 10) ajustados a una fuerza iónica de 25 mM con NaCl. Para determinar el efecto de la temperatura, las enzimas serán sometidas a distintas temperaturas de 0 a 90°C, atemperadas a 4°C, y la actividad enzimática residual será medida bajo las condiciones mencionadas. Los parámetros cinéticos K_m y V_{max} serán calculados de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten ($V_o = V_{max} \frac{[Sustrato]}{K_m + [Sustrato]}$) en base a la actividad enzimática con diferentes concentraciones del sustrato (75). El número de recambio de las enzimas se calculará con la ecuación: $K_{cat} = V_{max}/[Enzima]$ y su eficiencia catalítica con la ecuación: $E_c = K_{cat}/K_m$ (76).

Para todos los ensayos una unidad de actividad enzimática (U) es definida como la cantidad de enzima que en un minuto convierte 1 μ mol de sustrato en producto. Asimismo, en todos los ensayos enzimáticos se usará como control negativo una alícuota de la enzima pura tratada con proteinasa K por 30 min y sometido a ebullición por 10 min.

Análisis estructural de las enzimas recombinantes

El análisis cristalográfico de las enzimas se realizará con y sin sus respectivos sustratos en el Instituto de Física de São Carlos (IFSC) y se emplearán protocolos de búsqueda multiparamétricos convencionales (77) en gotas sentadas en cámaras termoestables a 4°C o 18°C. Para esto se utilizará el robot de microcristalización Honeybee 931 (Genomic Solutions Inc.) que realiza los ensayos de cristalización de forma automática en placas de 96 pocillos utilizando gotas de 0,7 a 1,0 μL de la solución enzimática. Cada pocillo permite el uso de tres enzimas distintas o diferentes concentraciones de la misma enzima, lo cual permitirá acelerar la búsqueda de las condiciones óptimas para la formación de los cristales. Alternativamente, en el caso de que se tenga cantidades limitantes de la proteína se utilizará el robot Gryphon que permite el montaje de 100 nL de proteína por pocillo. La colecta de datos a partir de los cristales instantáneamente congelados se realizará en las líneas de cristalografía de proteínas del Sincrotón de tercera generación Diamond Light Source (Inglaterra) empleando la tecnología de detección *pixel array* (Pilatus), los análisis también se llevarán a cabo con el difractómetro Rigaku 007 disponible en el grupo de cristalografía del IFSC. La estructura cristalográfica será determinada por técnicas del patrón de sustitución molecular cuando sea posible, sino con la incorporación de selenocisteína en las enzimas expresadas y/o la incorporación de metales pesados para poder emplear métodos estándares de ajuste de fases en múltiples longitudes de onda. Asimismo, cuando sea apropiado, se emplearán técnicas de mejoramiento de los mapas de densidades electrónicas y extensión de las fases. Para el procesamiento de los datos se emplearán los programas MOSFLM y AIMLESS de CCP4 (78) o XDS (79). Para una mejor resolución y refinamiento de las estructuras protéicas se emplearán los paquetes de los programas Phenix (80) y CCP4. Para visualizar los mapas de las densidades electrónicas y construcción de los modelos se empleará el programa COOT (81). Todas las estructuras tridimensionales generadas en esta investigación serán depositadas en el RCSB Protein Data Bank (82,83).

IX. METAS POR COMPONENTES

Componentes	Metas	
	Primer año	Segundo año
Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa	Se ha aislado y clonado los genes de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> al 100%	
Producción y purificación de las enzimas	Se ha realizado la producción y purificación de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 75%	Se ha realizado la producción y purificación de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%
Análisis funcional y estructural de las enzimas		Se ha realizado el análisis funcional y estructural de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%
Formación de recursos humanos	Se ha contribuido con la formación de 2 voluntarios, 2 practicantes, 2 tesis de pre-grado y 1 tesis de Maestría. También, se ha realizado 1 curso teórico-práctico	Se ha contribuido con la formación de 2 voluntarios, 2 practicantes, 2 tesis de pre-grado y 1 tesis de Doctorado. Además, se ha realizado 1 curso teórico-práctico
Difusión de resultados	Se ha expuesto los avances de las investigaciones en 2 encuentros científicos internacionales, se ha enviado 1 artículo para su publicación en revista nacional o internacional indexada	Se ha expuesto los avances de las investigaciones en 1 encuentro científico internacional, se ha enviado 2 artículos para su publicación en revista nacional o internacional indexada

X. RESULTADOS ESPERADOS

Al finalizarse este Proyecto de investigación se cuenta con los genes de la vía D-manosa/L-galactosa (GDP-manosa-3',5'-epimerasa, L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa) de *M. dubia* clonados y caracterizados funcional y estructuralmente. Con estos logros estaremos estableciendo los fundamentos para la implementación y desarrollo de procesos biotecnológicos para la producción de vitamina C en base a los genes de *M. dubia*. Además, de contribuir con la formación del recurso humano, se ha consolidado una red científica constituida por un equipo multidisciplinario e interinstitucional de investigadores con capacidad para el aislamiento, clonación molecular y caracterización funcional y estructural de enzimas.

XI. ESTRATEGIAS A UTILIZAR PARA LA TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los conocimientos científicos producidos en este Proyecto se realizarán mediante artículos científicos publicados en revistas indizadas nacionales e internacionales. Adicionalmente, los resultados obtenidos serán expuestos en encuentros científicos locales, nacionales e internacionales (ECI). Asimismo, los resultados y publicaciones estarán disponibles en el portal web de la UNAP, del INIA y del IFSC. Además, el conocimiento científico producido será difundido a todos los estudiantes de las diferentes Facultades de la UNAP en las disciplinas de Bioquímica, Biología Celular y Molecular, Procesos Biotecnológicos y Genética General, Genética Vegetal, Mejoramiento Genético entre otras disciplinas relacionadas.

XII. IMPACTOS ESPERADOS

a) Mejora de las capacidades técnicas

La ejecución del presente Proyecto aportará significativamente en la mejora de las capacidades técnicas y científicas de las instituciones participantes, particularmente de la UNAP. Porque para cumplir con las metas y objetivos propuestos requerirá el uso de tecnologías de última generación empleados en el aislamiento y clonación de genes, secuenciamiento de ADN, producción de enzimas mediante tecnología del ADN recombinante y el análisis cristalográfico para determinar la estructura 3D de las tres enzimas (GDP-manosa-3',5'-epimerasa, L-galactosa deshidrogenasa y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa). Por tanto, nuestro recurso humano (voluntarios, practicantes, tesis y docentes investigadores) será fortalecido con estas nuevas tecnologías y herramientas que incrementarán el nivel de nuestras investigaciones. Además, nuestra red de colaboración científica nacional e internacional con el Instituto de Física de São Carlos (IFSC), la Universidad Científica del Perú (UCP), y el Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) será vigorizada y estimulará el desarrollo de nuevas investigaciones con *M. dubia*.

b) Formación de investigadores jóvenes

Nuestro equipo contribuirá con la formación de jóvenes investigadores que estará constituida por lo menos de 4 voluntarios, 4 practicantes, 4 tesis de pre-grado y 2 de post-grado de la Facultad de Ciencias Biológicas, Ciencias Forestales y áreas afines.

c) Tesis de pregrado y/o postgrado

De acuerdo a nuestra misión como docentes e investigadores apoyaremos con la realización de 4 tesis de pre-grado y 2 tesis de post-grado (1 de Maestría y 1 de Doctorado). Este apoyo será constante desde la elaboración y presentación del anteproyecto de tesis, asesoramiento en el desarrollo de experimentos y trabajos de Laboratorio, redacción del informe final de tesis y sustentación.

d) N° de personas capacitadas

Calculamos que con el desarrollo de dos cursos teóricos-prácticos previstos en el Proyecto capacitaremos un aproximado de 100 personas. Además, teniendo en cuenta que los resultados de nuestras investigaciones fortalecerán las actividades académicas de asignaturas como bioquímica, bioquímica y nutrición, biología celular y molecular, procesos biotecnológicos y genética, entonces estaremos contribuyendo con la capacitación de unos 200 estudiantes.

e) Acceso para servicios especializados

Para el desarrollo de tres componentes del Proyecto (Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa, Producción y purificación de las enzimas y Análisis funcional y estructural de las enzimas) se requerirá el acceso a servicios especializados como la clonación molecular, el secuenciamiento de ADN, producción de proteínas recombinantes por ingeniería genética y análisis cristalográfico de las enzimas en el Instituto de Física de São Carlos (IFSC).

f) Publicaciones, eventos científicos

Nuestro equipo de investigadores frecuentemente difunde los resultados de sus investigaciones científicas en revistas nacionales e internacionales indexadas. Asimismo, hemos participado en encuentros científicos internacionales exponiendo nuestros trabajos de investigación. En concordancia con estas actividades, en la realización de este proyecto se publicará en revistas nacionales e internacionales por lo menos 3 artículos científicos y participar en por lo menos 2 encuentros científicos internacionales que se desarrollarán en la ciudad de Lima.

g) Generación de conocimientos o producción de nuevas tecnologías

Los resultados de esta investigación impactarán significativamente en la ciencia y tecnología. Primero, al demostrar la función bioquímica de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa para la biosíntesis de AA en *M. dubia* se ampliará el conocimiento de esta vía en las plantas. Segundo, la demostración que este sistema multienzimático tiene capacidad de biosíntesis de AA, permitirá el desarrollo de sistemas de producción biotecnológica de AA. Tercero, al lograr resolver la estructura tridimensional de las tres enzimas de esta vía estaremos estableciendo un hito sin precedentes sobre la maquinaria molecular de biosíntesis de AA en plantas, que contribuirán a dilucidar los mecanismos catalíticos y realizar proyectos racionales de evolución dirigida. Todos estos avances permitirán el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas mediante ingeniería genética, ingeniería metabólica e ingeniería de proteínas para la producción biotecnológica de AA.

XIII. INFRAESTRUCTURA Y EQUIPOS A UTILIZARSE

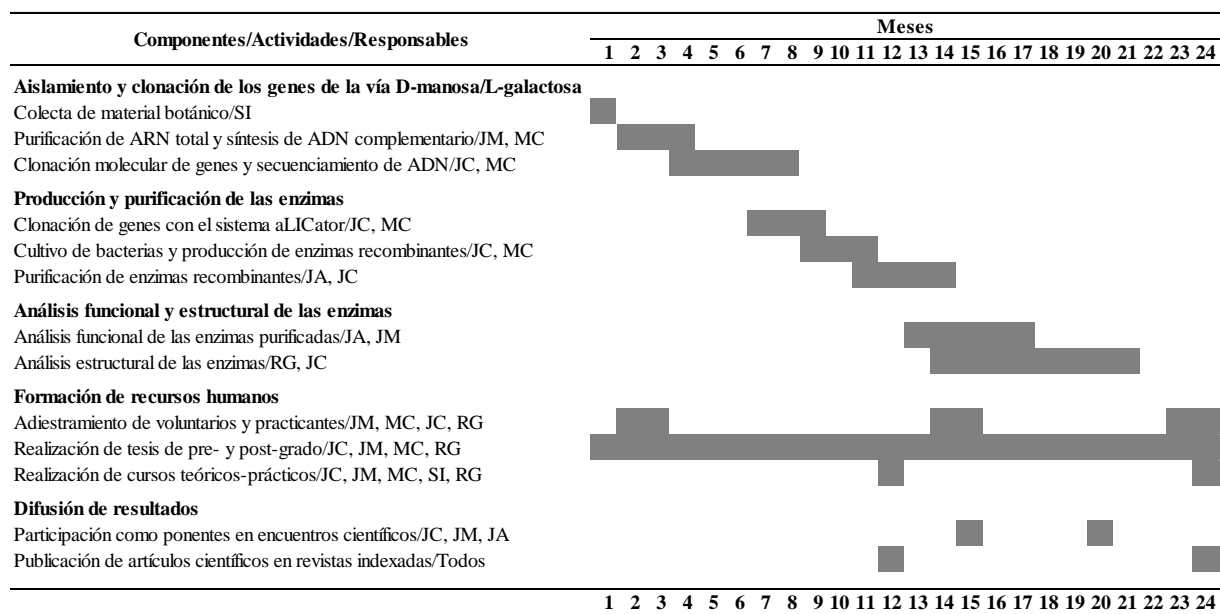
La **Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA** tiene equipos para realizar técnicas bioquímicas y de biología molecular consideradas en el Proyecto, tales como PCR en Tiempo Real, Microcentrífugas refrigeradas, Fluorómetro de microplacas, Citómetro de flujo (para analizar células y determinar el tamaño de genomas), Equipo de HPLC, Analizador Genético 3130XL (para el secuenciamiento del ADN), equipos de electroforesis, y un Sistema de Fotoregistro BioDocAnalyze.

El Instituto de Física de São Carlos (IFSC) en el Área de Cristalografía está equipado para cumplir con todas las etapas necesarias para la resolución de estructuras protéicas por difracción de rayos X. Entre otros equipos, cuenta con tres sistemas Akta de purificación de proteínas (General Electric), centrífugas y ultracentrífugas (Sorvall), termocicladores (C100, BioRad), equipos de electroforesis (BioRad, General Electric), espectrofotómetros (Cary Series, Agilent), cámaras de cristalización termoestabilizadas (construcción propia), cámara fría, robot de cristalización (Honeybee861 Cartesian), microscopios y estereoscopios (Olympus SZ61, Leica MZ 125), sistema BiacoreX para SPR (Biacore/GE), fermentadores y dos sistemas para colecta de datos de difracción de rayos X con ánodos rotatorios (Rigaku microMaz 007 con RAXIS IV++eII).

El Laboratorio de Biotecnología y Bioenergética de la UCP cuenta con equipos para purificación y análisis de ácidos nucleicos tales como Centrífuga Universal Refrigerada, Espectrofotómetro NanoDrop 2000, cabina de bioseguridad, entre otros equipos menores.

La **Estación Experimental Agraria San Roque del INIA**, cuenta con la Colección Nacional de Germoplasma de *M. dubia*, constituido por 43 accesiones (muestras representativas de la variabilidad genética de esta especie) obtenidos de 43 lugares diferentes de la amazonía peruana pertenecientes a 8 principales cuencas hidrográficas de la Región Loreto (Nanay, Itaya, Napo, Ucayali, Putumayo, Curaray, Tigre y Amazonas).

XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES POR COMPONENTES MENSUALIZADO Y RESPONSABLES



Leyenda: JM: Jorge Marapara, JC: Juan Castro, MC: Marianela Cobos, RG: Richard Garrat, SI: Sixto Imán

XV. RESUMEN DEL PRESUPUESTO POR RUBROS, PARTIDAS Y COMPONENTES EN SOLES

Presupuesto por rubros

RUBRO	MONTO (S/.)	%
a) Desarrollo de los componentes y actividades	21,000.00	35.00
b) Movilidad local para el equipo de investigadores	6,000.00	10.00
c) Pasajes y viáticos para capacitación	10,000.00	16.67
d) Adquisición de accesorios para equipos	3,500.00	5.83
e) Mantenimiento preventivo y reparación de equipos	4,500.00	7.50
f) Servicios de terceros vinculados a las actividades del Proyecto	8,000.00	13.33
g) Pago para adquirir bibliografía especializada	1,500.00	2.50
h) Organización de seminarios, talleres y similares	2,600.00	4.33
i) Gastos operativos del Proyecto	2,900.00	4.83
TOTAL S/.	60,000.00	100.00

Presupuesto por partidas genéricas y componentes

PARTIDA	DESCRIPCIÓN	COMPONENTES					TOTAL (S/.)
		Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa	Producción y purificación de las enzimas	Análisis funcional y estructural de las enzimas	Formación de recursos humanos	Difusión de resultados	
23.12.11	Vestuario, accesorios y prendas diversas	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	300.00
23.15.12	De oficina	100.00	100.00	100.00	100.00	200.00	600.00
23.15.31	Aseo, limpieza y tocador	100.00	300.00	300.00	0.00	0.00	700.00
23.15.41	Electricidad, Iluminación y electrónica	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	300.00
23.16.199	Otros accesorios y repuestos para maquinaria	1,500.00	1,500.00	500.00	0.00	0.00	3,500.00
23.18.21	Material, insumos, instrumental y acc. Médico	8,000.00	8,000.00	5,000.00	0.00	0.00	21,000.00
23.19.11	Libros, textos y otros materiales impresos	500.00	500.00	500.00	0.00	0.00	1,500.00
23.21.11	Pasajes y gastos de transporte Internacional	0.00	0.00	0.00	5,000.00	500.00	5,500.00
23.21.22	Viaticos y asignaciones en el exterior	0.00	0.00	0.00	4,000.00	500.00	4,500.00
23.21.299	Movilidad Local	2,000.00	2,000.00	2,000.00	0.00	0.00	6,000.00
23.22.44	servicio de impresiones, encuadernación y err	0.00	0.00	0.00	500.00	500.00	1,000.00
23.24.15	Servicios de mantenimiento, acondicionamier	1,500.00	1,500.00	1,500.00	0.00	0.00	4,500.00
23.27.101	Seminarios, talleres y similares	0.00	0.00	0.00	2,600.00	0.00	2,600.00
23.27.1199	Servicios diversos	3,000.00	2,500.00	2,500.00	0.00	0.00	8,000.00
	TOTAL (S/.)	16,900.00	16,600.00	12,600.00	12,200.00	1,700.00	60,000.00

Presupuesto por componentes

COMPONENTE	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	MONTO (S/.)
Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa	Informe	1	16,900.00
Producción y purificación de las enzimas	Base de datos	1	16,600.00
Análisis funcional y estructural de las enzimas	Base de datos	1	12,600.00
Formación de recursos humanos	Informes	4 voluntarios	12,200.00
	Informes	4 practicantes	
	Tesis	4 tesis de pre-grado	
	Tesis	1 tesis de Maestría	
	Tesis	1 tesis de Doctorado	
	Afiches	2 cursos teóricos-prácticos	
Difusión de resultados	Certificados	2 encuentros científicos	1,700.00
	Artículos	3 artículos científicos	
TOTAL S/.			60,000.00

XVI. MONITOREO Y EVALUACIÓN: MATRIZ DE MARCO LÓGICO

OBJETIVOS	INDICADORES VERIFICABLES	MEDIOS DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS DE IMPORTANCIA
<p>FIN Implementar y desarrollar procesos biotecnológicos para la producción industrial de vitamina C en la Amazonía peruana en base a los genes de <i>M. dubia</i></p>	Las empresas comercializan la vitamina C producida industrialmente mediante procesos biotecnológicos	Registros estadísticos de SUNAT, ADEX, INEI, Artículos científicos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, libros, tesis de pre y post-grado, informes	Apoyo decidido y priorizado de las autoridades competentes para la realización de investigaciones científicas básicas y aplicadas. <i>M. dubia</i> es una de las especies banderas de la región y el país.
<p>PROPÓSITO Realizar la clonación molecular y caracterización de genes de <i>Myrciaria dubia</i> potencialmente útiles para la producción biotecnológica de vitamina C</p>	Base de datos con información de los resultados de la clonación molecular, análisis estructural y funcional de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa	Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, tesis de pre y post grado publicadas. Resúmenes de eventos científicos, posters científicos y memorias anuales del Vicerrectorado de Investigación	Priorización de la investigación científica en la UNAP. Desembolso oportuno de los fondos, importación de productos en corto tiempo, disponibilidad de materiales y reactivos, existe agilidad en los trámites administrativos. Condiciones eléctricas adecuadas.
<p>RESULTADOS/PRODUCTOS Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa</p>	Se ha realizado el aislamiento y la clonación molecular de los tres genes de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%	Cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, registros de datos del citómetro de flujo, artículos publicados	Se dispone de cantidades suficientes de materiales y reactivos, no hay recorte presupuestal
Producción y purificación de las enzimas	Se producido y purificado las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%,	Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, posters científicos y memorias anuales del Vicerrectorado de Investigación	Importación adecuada y rápida de reactivos y materiales, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Análisis funcional y estructural de las enzimas	Al final el segundo año de ejecución del Proyecto se ha realizado el análisis funcional y estructural de las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%.	Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, tesis de pre y post grado publicadas.	No hay recorte presupuestal, las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, la importación de reactivos y materiales es rápida, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Formación de recursos humanos	Al finalizar el proyecto se habrá adiestrado a 4 voluntarios y 4 practicantes. Además, 4 tesis de pre y 2 de post-grado han sustentado sus tesis. También, se habrán realizado 2 cursos teóricos-prácticos	Tesis de pre y post-grado sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas	Las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, reactivos y materiales en buen estado, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Difusión de resultados	Al cabo del segundo año del Proyecto se ha participado como ponentes en 2 encuentros científicos internacionales y se tendrá 3 artículos en proceso de publicación en revistas nacionales e internacionales indexadas. Además, 6 tesis (4 de pre-grado y 2 de post-grado) han sido sustentadas y publicadas	Certificados como ponentes de 2 encuentros científicos, 3 artículos publicados o en proceso de publicación, Tesis de pre y post-grado sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio	Apoyo de las autoridades para la difusión de los resultados, desembolso oportuno de los fondos

OBJETIVOS	INDICADORES VERIFICABLES	MEDIOS DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS DE IMPORTANCIA
ACTIVIDADES			
Aislamiento y clonación de los genes de la vía D-manosa/L-galactosa Germinación de semillas y obtención de plántulas Análisis por citometría de flujo de los núcleos celulares	Se ha aislado y realizado la clonación molecular de los tres genes de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> . El presupuesto requerido es de S/. 16,900.00	Cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, registros de datos del citómetro de flujo, artículos publicados	Se dispone de cantidades suficientes de materiales y reactivos, no hay recorte presupuestal
Producción y purificación de las enzimas Purificación del ADN genómico a partir de plántulas Secuenciar el genoma Ensamblar de novo y anotar el genoma	Al segundo año de ejecución del Proyecto se ha realizado la producción y purificación de las tres enzimas de la vía D-manosa-L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%. El presupuesto requerido es de S/. 16,600.00	Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, posters científicos y memorias anuales del Vicerrectorado de Investigación	Importación adecuada y rápida de reactivos y materiales, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Análisis funcional y estructural de las enzimas Purificación de ARN total y ARNm de diferentes tejidos Síntesis del ADNc y secuenciamiento Ensamblado y anotación del transcriptoma	Al término del Proyecto se tiene resultados del análisis funcional y estructural al 100% de las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> . El presupuesto requerido es de S/. 12,600.00	Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, tesis de pre y post grado publicadas.	Las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, la importación de reactivos y materiales es rápida, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Formación de recursos humanos Adiestramiento de voluntarios y practicantes Realización de tesis de pre- y post-grad Realización de cursos teóricos-prácticos	Al finalizar el proyecto se ha adiestrado a 4 voluntarios y 4 practicantes. Además, 4 tesis de pre y 2 de post-grad han sustentado sus tesis. También, se habrán realizado 4 cursos teóricos-prácticos. El presupuesto requerido es de S/. 12,200.00	Tesis de pre y post-grad sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas	Las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, reactivos y materiales en buen estado, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Difusión de resultados Participación como ponentes en encuentros científicos Publicación de artículos científicos en revistas indexadas	Al finalizar el Proyecto hemos participado como ponentes en 2 encuentros científicos internacionales y se tendrá 3 artículos en proceso de publicación en revistas nacionales e internacionales indexadas. Además, 6 tesis (4 de pre-grad y 2 de post-grad) han sido sustentadas y publicadas. El presupuesto requerido es de S/. 1,700.00	Certificados como ponentes de 2 encuentros científicos, 3 artículos publicados o en proceso de publicación, Tesis de pre y post-grad sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio	Apoyo de las autoridades para la difusión de los resultados, desembolso oportuno de los fondos

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Smirnov N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2000;**35**(4):291-314.
2. Smirnov N, Conklin PL, Loewus FA. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 2001;**52**:437-67.
3. Nishikimi M, Fukuyama R, Minoshima S, Shimizu N, Yagi K. Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for L-gulonogamma-lactone oxidase, the enzyme for L-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem.* 1994;**269**(18):13685-8.
4. Carpenter KJ. The discovery of vitamin C. *Ann Nutr Metab.* 2012;**61**(3):259-64.
5. Catani MV, Costanzo A, Savini I, Levrero M, de Laurenzi V, Wang JYJ, et al. Ascorbate up-regulates MLH1 (Mut L homologue-1) and p73: implications for the cellular response to DNA damage. *Biochem J.* 2002;**364**(Pt 2):441-7.
6. Salnikow K, Donald SP, Bruick RK, Zhitkovich A, Phang JM, Kasprzak KS. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J Biol Chem.* 2004;**279**(39):40337-44.
7. Majewicz J, Rimbach G, Proteggente AR, Lodge JK, Kraemer K, Minihane AM. Dietary vitamin C down-regulates inflammatory gene expression in apoE4 smokers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;**338**(2):951-5.
8. 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.* 2014;**14**(5):444-52.
9. Sauberlich HE. Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr.* 1994;**14**:371-91.
10. Davey MW, Montagu MV, Inzé D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnov N, et al. Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *J Sci Food Agric.* 2000;**80**(7):825-60.
11. Zhou J, Du G, Chen J. Metabolic engineering of microorganisms for vitamin C production. *Subcell Biochem.* 2012;**64**:241-59.
12. Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol.* 2002;**20**(7):299-305.
13. 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.* 2000;**1543**(2):434-55.
14. Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology—a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnol Adv.* 2005;**23**(7–8):471-99.
15. Reichstein T, Grüssner A. Eine ergiebige Synthese der L-Ascorbinsäure (C-Vitamin). *Helv Chim Acta.* 1934;**17**(1):311-28.
16. Boudrant J. Microbial processes for ascorbic acid biosynthesis: a review. *Enzyme Microb Technol.* 1990;**12**(5):322-9.
17. Hancock R, Viola R. The use of micro-organisms for L-ascorbic acid production: current status and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2001;**56**(5-6):567-76.
18. Bremus C, Herrmann U, Bringer-Meyer S, Sahm H. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *J Biotechnol.* 2006;**124**(1):196-205.
19. Zou W, Liu L, Chen J. Structure, mechanism and regulation of an artificial microbial ecosystem for vitamin C production. *Crit Rev Microbiol.* 2013;**39**(3):247-55.

20. Zhang J, Zhou J, Liu L, Liu J, Chen K, Du G, et al. Enhancement of 2-keto-L-gulonic acid production using three-stage pH control strategy. *J Biotechnol.* 2010;**26**(9):1263-8.
21. Yang W, Han L, Mandlaa M, Chen H, Jiang M, Zhang Z, et al. Spaceflight-induced enhancement of 2-keto-L-gulonic acid production by a mixed culture of *Ketogulonigenium vulgare* and *Bacillus thuringiensis*. *Lett Appl Microbiol.* 2013;**57**(1):54-62.
22. Sonoyama T, Kobayashi K. Purification and properties of two 2,5-diketo-d-gluconate reductases from a mutant strain derived from *Corynebacterium* sp. *J Ferment Technol.* 1987;**65**(3):311-7.
23. Kaswurm V, Pacher C, Kulbe KD, Ludwig R. 2,5-Diketo-gluconic acid reductase from *Corynebacterium glutamicum*: Characterization of stability, catalytic properties and inhibition mechanism for use in vitamin C synthesis. *Process Biochem.* 2012;**47**(12):2012-9.
24. Kaswurm V, van Hecke W, Kulbe KD, Ludwig R. Engineering of a bi-enzymatic reaction for efficient production of the ascorbic acid precursor 2-keto-L-gulonic acid. *Biochem Eng J.* 2013;**79**:104-11.
25. Hubbs JC. Enzymatic process for the manufacture of ascorbic acid, 2-keto-L-gulonic acid and esters of 2-keto-L-gulonic acid. *US Pat 6136575 A.* 2000;
26. Market Price Analysis of Ascorbic Acid (Vitamin C) | PAT Vitamins [Internet]. [citado 18 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://patvitamins.com/news/10-30-2013-market-price-analysis-of-vitamin-c/>
27. Scherer R, Ford P. China's grip on key food additive. *Christian Science Monitor* [Internet]. 20 de julio de 2007 [citado 15 de enero de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.csmonitor.com/2007/0720/p01s01-woap.html>
28. Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol.* 2004;**134**(3):1200-5.
29. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci.* 2004;**9**(12):573-7.
30. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem.* 2003;**278**(48):47483-90.
31. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature.* 1998;**393**(6683):365-9.
32. Linster CL, Clarke SG. L-Ascorbate biosynthesis in higher plants: the role of VTC2. *Trends Plant Sci.* 2008;**13**(11):567-73.
33. Castro J, Maddox D, Cobos M, Requena D, Zimic M, Imán S, et al. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. *BMC Genomics.* 2015;In peer review.
34. Bradfield, RB, Roca, A. Camu-camu-a fruit high in ascorbic acid. *J Am Diet Assoc.* 1964;**44**:28-30.
35. Alves R, Filgueiras H, Moura C, Araujo N, Almeida A. Camu camu (*Myrciaria dubia* Mc Vaugh): a Rich Natural Source of Vitamin C. *Proc Interamer Soc Trop Hort.* 2002;**46**:11-3.
36. Imán S, Bravo L, Sotero V, Oliva 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;**2**(3):123-30.
37. Castro JC, Gutiérrez F, Acuña C, Cerdeira LA, Tapullima A, Marianela C, et al. Variación del contenido de vitamina C y antocianinas en *Myrciaria dubia* «camu-camu». *Rev Soc Quím Perú.* 2013;**79**(4):319-30.

38. Cherry JR, Fidantsef AL. Directed evolution of industrial enzymes: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2003;**14**(4):438-43.
39. Wohlgemuth R. Biocatalysis — key to sustainable industrial chemistry. *Curr Opin Biotechnol.* 2010;**21**(6):713-24.
40. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;**13**(4):345-51.
41. Beilen JB van, Li Z. Enzyme technology: an overview. *Curr Opin Biotechnol.* 2002;**13**(4):338-44.
42. Sauer M, Branduardi P, Valli M, Porro D. Production of L-Ascorbic Acid by Metabolically Engineered *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;**70**(10):6086-91.
43. Rosa JCC, Colombo LT, Alvim MCT, Avonce N, Van Dijck P, Passos FML. Metabolic engineering of *Kluyveromyces lactis* for L-ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Microb Cell Factories.* 2013;**12**:59.
44. Kuivanen J, Penttilä M, Richard P. Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microb Cell Factories.* 2015;**14**(1):2.
45. Jain AK, Nessler CL. Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breed.* 2000;**6**(1):73-8.
46. Smirnov N. Vitamin C booster. *Nat Biotechnol.* 2003;**21**(2):134-6.
47. Agius F, González-Lamothe R, Caballero JL, Muñoz-Blanco J, Botella MA, Valpuesta V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat Biotechnol.* 2003;**21**(2):177-81.
48. Hancock RD, Viola R. Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. *J Agric Food Chem.* 2005;**53**(13):5248-57.
49. Ishikawa T, Dowdle J, Smirnov N. Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol Plant.* 2006;**126**:343-55.
50. Major LL, Wolucka BA, Naismith JH. Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: an enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *J Am Chem Soc.* 2005;**127**(51):18309-20.
51. Jäckel C, Hilvert D. Biocatalysts by evolution. *Curr Opin Biotechnol.* 2010;**21**(6):753-9.
52. Lutz S. Beyond directed evolution—semi-rational protein engineering and design. *Curr Opin Biotechnol.* 2010;**21**(6):734-43.
53. Tracewell CA, Arnold FH. Directed enzyme evolution: climbing fitness peaks one amino acid at a time. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;**13**(1):3-9.
54. Bornscheuer UT. Trends and challenges in enzyme technology. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2005;**100**:181-203.
55. Johannes TW, Zhao H. Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways. *Curr Opin Microbiol.* 2006;**9**(3):261-7.
56. Li Y, Cirino PC. Recent advances in engineering proteins for biocatalysis. *Biotechnol Bioeng.* 2014;**111**(7):1273-87.
57. Bommaris AS, Blum JK, Abrahamson MJ. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;**15**(2):194-200.

58. Hancock RD. Recent Patents on Vitamin C: Opportunities for Crop Improvement and Single-Step Biological Manufacture. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2009;**1**(1):39-49.
59. L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, mitochondrial recombinant protein | MyBioSource [Internet]. [citado 21 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.mybiosource.com/prods/Recombinant-Protein/L-galactono-1-4-lactone-dehydrogenase-mitochondrial/datasheet.php?products_id=1129330
60. Gómez JCC, Reátegui ADCE, Flores JT, Saavedra RR, Ruiz MC, Correa SAI. Isolation of high-quality total RNA from leaves of *Myrciaria dubia* «camu camu». *Prep Biochem Biotechnol*. 2013;**43**(6):527-38.
61. Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 2344 p.
62. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;**40**(15):e115.
63. Primer3Plus [Internet]. [citado 21 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>
64. Sievers F, Higgins DG. Clustal omega, accurate alignment of very large numbers of sequences. *Methods Mol Biol*. 2014;**1079**:105-16.
65. 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*. 1997;**25**(17):3389-402.
66. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;**72**:248-54.
67. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;**227**(5259):680-5.
68. Davis, AJ, Perugini, MA, Smith, BJ, Stewart, JD, Ilg, T, Hodder, AN, et al. Properties of GDP-mannose pyrophosphorylase, a critical enzyme and drug target in *Leishmania mexicana*. *J Biol Chem*. 2004;**279**(13):12462-8.
69. González-Romo, P, Sánchez-Nieto, S, Gavilanes-Ruiz, M. A modified colorimetric method for the determination of orthophosphate in the presence of high ATP concentrations. *Anal Biochem*. 1992;**200**(2):235-8.
70. Linster CL, Gomez TA, Christensen KC, Adler LN, Young BD, Brenner C, et al. Arabidopsis VTC2 encodes a GDP-L-galactose phosphorylase, the last unknown enzyme in the Smirnoff-Wheeler pathway to ascorbic acid in plants. *J Biol Chem*. 2007;**282**(26):18879-85.
71. Torabinejad J, Donahue JL, Gunesekera BN, Allen-Daniels MJ, Gillaspay GE. VTC4 is a bifunctional enzyme that affects myoinositol and ascorbate biosynthesis in plants. *Plant Physiol*. 2009;**150**(2):951-61.
72. 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*. 2002;**30**(4):541-53.
73. Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol*. 2003;**3**:7.
74. Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T. Purification and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem*. 1995;**117**(1):120-4.

75. Johnson KA, Goody RS. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*. 2011;**50**(39):8264-9.
76. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Principles of Biochemistry. 5th edition. New York: W. H. Freeman; 2008. 1100 p.
77. Bergfors T, editor. Protein Crystallization, Second Edition. 2nd edition. La Jolla, Calif: International University Line; 2009. 504 p.
78. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;**67**(Pt 4):235-42.
79. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;**66**(Pt 2):125-32.
80. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;**66**(Pt 2):213-21.
81. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;**66**(Pt 4):486-501.
82. Dutta S, Burkhardt K, Young J, Swaminathan GJ, Matsuura T, Henrick K, et al. Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank. *Mol Biotechnol*. 2009;**42**(1):1-13.
83. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB [Internet]. [citado 22 de enero de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

XVIII. ANEXO

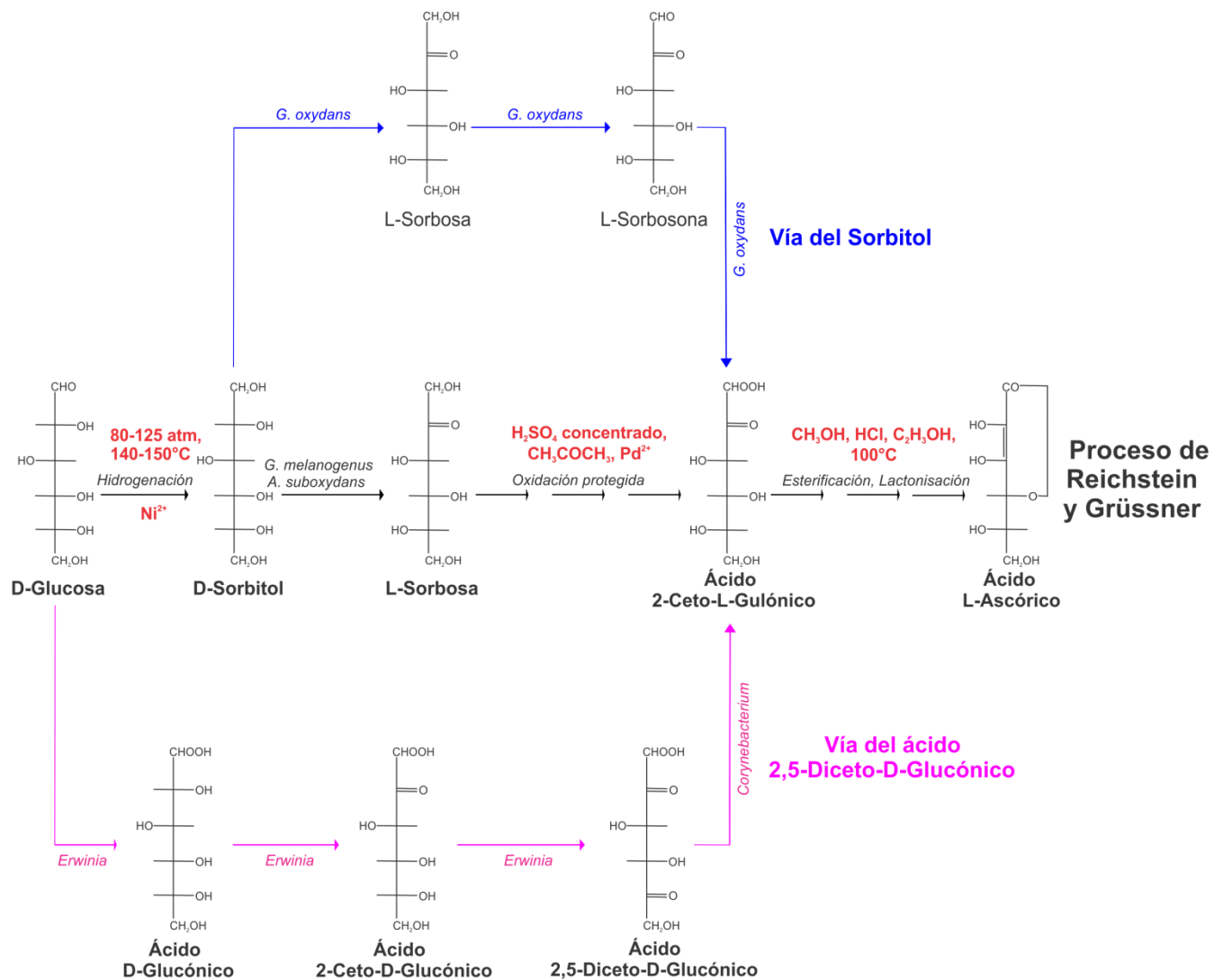


Figura 1. Proceso de Reichstein y Grüssner y vías microbianas asociadas para la producción industrial de vitamina C. Fuente: modificado de Hancock y Viola (12, 17).

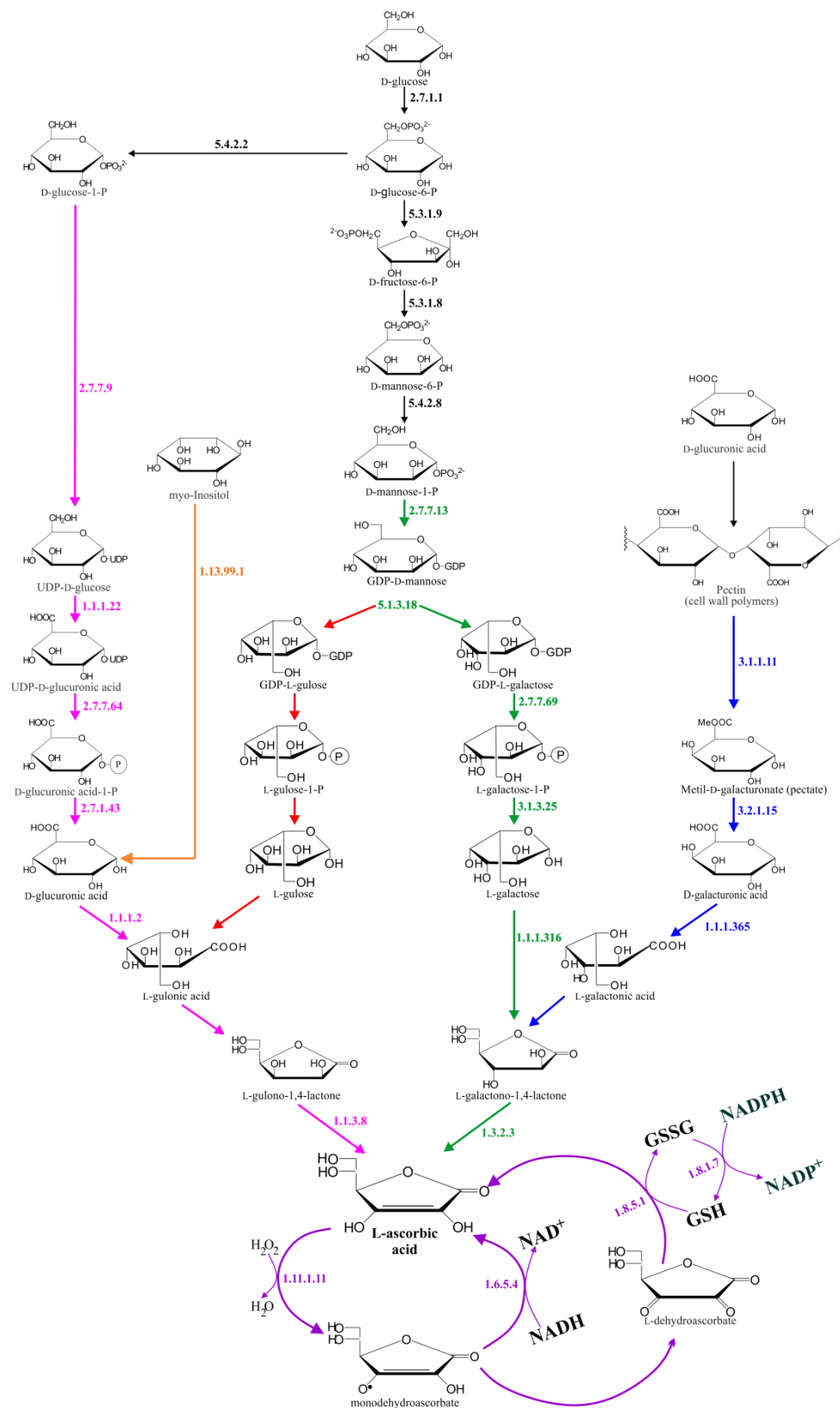


Figura 2. Vías metabólicas para la biosíntesis y reciclaje de vitamin C reconstruidas en base al metaensamblado y anotación del transcriptoma de frutos de *M. dubia*. Las reacciones de la vía D-manosa/L-galactosa son representadas por las flechas de color verde. Fuente: Castro *et al.* (33).

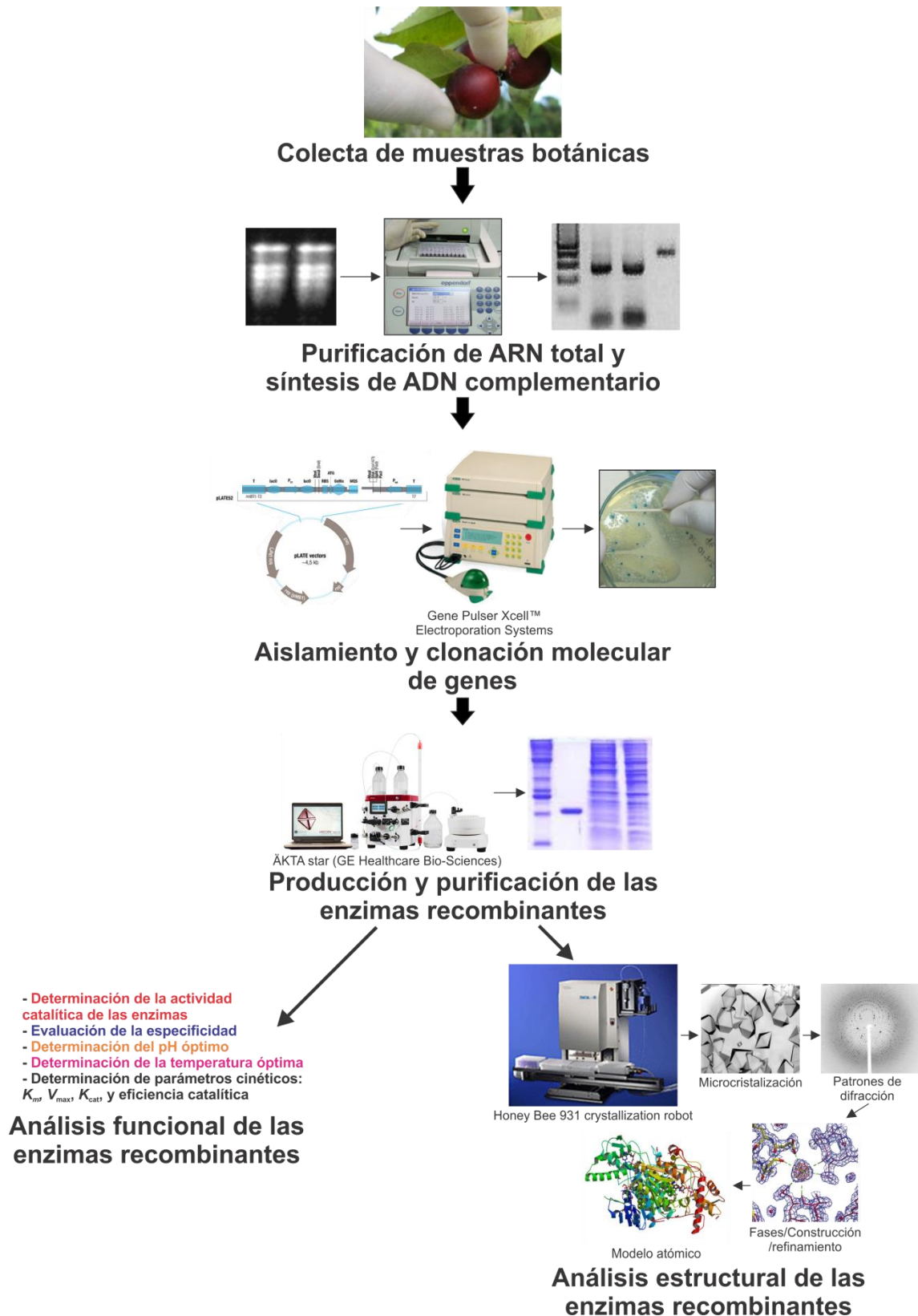


Figura 3. Flujograma de procedimientos que se emplearán en el proyecto para cumplir con los objetivos propuestos.