



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO Y GLICERALDEHÍDO A
PARTIR DE ALGINATO MEDIANTE INMOVILIZACIÓN
ENZIMÁTICA EN SUPERFICIE CELULAR

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS DE
LA INGENIERÍA MENCIÓN INGENIERÍA QUÍMICA Y
BIOTECNOLOGÍA

DIEGO IGNACIO LAGOS SUSAETA

PROFESORA GUÍA:
BARBARA ANDREWS FARROW

PROFESORES CO-GUÍAS:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
LORETO PARRA ATALA
JUAN ASENJO DE LEUZE

SANTIAGO DE CHILE

2016

RESUMEN DE LA TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE:

Magíster en Ciencias de la Ingeniería, mención Ingeniería Química y Biotecnología

POR: Diego Ignacio Lagos Susaeta

FECHA: diciembre, 2016

PROFESORA GUÍA: Barbara Andrews Farrow

PRODUCCIÓN DE ÁCIDO PIRÚVICO Y GLICERALDEHÍDO A PARTIR DE ALGINATO MEDIANTE INMOVILIZACIÓN ENZIMÁTICA EN SUPERFICIE CELULAR

Los procesos biotecnológicos industriales utilizan diversas azúcares simples como fuente de carbono y energía para sus procesos. La mayor parte de estas provienen desde fuentes agrícolas, lo que conlleva a un impacto ambiental negativo en cuanto al: uso de suelos arables/deforestación, agua dulce, agroquímicos y sus respectivos impactos derivados. El alginato, obtenido desde maroalgas, se presenta como una interesante alternativa por cuanto su producción evita la mayor parte de estos impactos negativos. Sin embargo, la utilización directa de alginato como fuente de carbono por parte de la mayor parte de los microorganismos de uso industrial se ve imposibilitada por cuanto estos precinden de la ruta metabólica necesaria para su degradación e incorporación al metabolismo central.

El presente trabajo propone un proceso biotecnológico capaz de realizar la bio-conversión de alginato a ácido pirúvico y gliceraldehído, productos que pueden ser utilizados directamente como fuente de carbono por diversos microorganismos en reemplazo de las fuentes comunes. La ruta de conversión consiste en cuatro enzimas de proceso: una endo-alginato liasa (ALY), una exo-alginato liasa (OAL), una aldosa reductasa (DEHR) y una glucanato aldolasa (KDGA). Estas cuatro enzimas fueron obtenidas desde diversos recursos genéticos y expresadas en forma soluble intracelular. La actividad específica sobre su respectivo sustrato fue demostrada para estas enzimas, a excepción de DEHR para la que no se cuenta con un método de determinación de actividad.

La proteína del antígeno 43 (Ag43) es un autotransportador nativo de *Escherichia coli*. Ag43 produce la exposición de un dominio de la proteína (PD) sobre la membrana celular externa, pero anclada a la célula mediante un dominio de translocación (TU). Mediante herramientas de ingeniería genética es posible intercambiar el PD por diversas proteínas, entre ellas enzimas, dando lugar a los denominados catalizadores de célula completa.

Con el fin de evitar la necesidad de transporte de sustratos y productos a través de la membrana celular, para impedir que el ácido pirúvico producido sea consumido y para permitir la recuperación del poder enzimático, se propone que las cuatro enzimas de proceso (ALY, OAL, DEHR, KDGA) sean fusionadas a Ag43 en reemplazo de PD. Para validar el funcionamiento de este sistema de inmovilización basado en Ag43, una proteína fluorescente (EGFP) fue intercambiada por el dominio PD. Con la utilización de tripsina para la liberación de la proteína fluorescente acoplada a Ag43, se pudo demostrar que el sistema basado en Ag43 permite exponer en forma correcta las proteínas en la membrana celular externa. Todas las enzimas de proceso fusionadas a Ag43 fueron expresadas correctamente, sin embargo, para ninguna de ellas se pudo demostrar actividad específica sobre su respectivo sustrato.

Todos los ensamblajes genéticos desarrollados en este trabajo se realizaron mediante *Gibson Assembly*. Un programa computacional para el diseño específico de partidores para esta técnica fue desarrollado.

Tabla de contenido

Introducción.....	1
Sustratos y productos.....	2
Exposición en superficie celular.....	5
Ruta metabólica y exposición en superficie.....	6
Objetivos.....	8
Objetivo general.....	8
Objetivos específicos.....	8
1 Diseño, construcción y expresión de una ruta enzimática para la síntesis de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato.....	9
1.1 Enzimas de la ruta metabólica.....	9
1.1.1 Recursos genéticos.....	9
1.1.2 Descripción enzimática.....	11
1.2 Construcción de plásmidos de expresión (versión soluble).....	15
1.2.1 Plásmido base (pET22b-HisTag-pelB).....	15
1.2.2 Ensamble de enzimas del proceso.....	15
1.2.3 Transformación bacteriana y selección de clones positivos.....	16
1.2.4 Inducción de producción de proteínas.....	16
1.3 Cuantificación de la actividad enzimática.....	18
1.3.1 [Endo] Alginato Liasa (ALY) y [Exo/Oligo] Alginato Liasa (OAL).....	18
1.3.2 DEHU reductasa (DEHR).....	19
1.3.3 Ceto-deoxi-glucanato aldolasa (KDGA).....	19
2 Diseño, construcción y expresión de un sistema de inmovilización de proteínas en la superficie de membrana celular aplicado a la ruta enzimática.....	21
2.1 Diseño y construcción del plásmido base para la versión inmovilizada basada en Antígeno 43.....	21
2.2 Validación de la exposición en superficie.....	23
2.2.1 Susceptibilidad de EGFP a degradación por tripsina.....	23
2.2.2 Tratamiento de cultivos con tripsina.....	23
2.3 Ensamble de los genes de las enzimas de proceso con el sistema de inmovilización de Ag43.....	26
2.3.1 Transformación bacteriana y selección de clones positivos.....	26
2.3.2 Inducción de producción de proteínas.....	27
3 Programa computacional para diseño de cebadores para <i>Gibson assembly</i>	28
3.1 Generalidades de <i>Gibson assembly</i>	28
3.2 Software PDTGA.....	31
3.2.1 Descripción de funcionalidades.....	31
3.2.2 Descripción de interfaz.....	32

Conclusiones y perspectivas.....	34
Bibliografía.....	36
Apéndices.....	41
Apéndice A: Lista de cepas.....	41
Apéndice B: Lista de plásmidos.....	42
Apéndice C: Lista de cebadores.....	44
Apéndice E: Medios, soluciones, tampones, kits y reactivos.....	46
Apéndice F: Protocolos.....	51
Apéndice G: Equipos.....	54
Apéndice E: Material suplementario.....	55

Índice de tablas

Tabla 1 Moldes y cebadores para reacciones de PCR usados en la amplificación de genes codificantes de proteínas y enzimas versión soluble.....	15
Tabla 2 Mezcla de reacción para la acción de la enzima KDGA.....	20
Tabla 3 Mezcla para la determinación de la concentración de ácido pirúvico mediante ensayo NADH-LDH.....	20
Tabla 4 Moldes y cebadores para reacciones de PCR en amplificación de genes codificantes de proteínas y enzimas versión inmovilizada con Ag43.....	25
Tabla 5 Programa de PCR amplificación de genes codificantes para enzimas de proceso.....	50
Tabla 6 Temperaturas de apareamiento para los fragmentos amplificados por PCR.....	50

Índice de gráficos

Gráfico 1 Actividad alginato liasa fracciones solubles.....	18
Gráfico 2 Análisis de tratamiento de célula completa con proteasas.....	24
Gráfico 3 Curva estándar DNS.....	54
Gráfico 4 Curva estándar NADH.....	54
Gráfico 5 Curva estándar ácido pirúvico determinado por método NADH-LDH.....	55

Índice de figuras

Figura 1 Reemplazo de fuentes de carbono de origen agrícola por derivados de alginato.....	2
Figura 2 Dominios, exportación, maduración y anclaje de Ag43 en membrana citoplasmática bacteriana.....	6
Figura 3 Ruta metabólica para la bio-conversión de alginato en ácido pirúvico y gliceraldehído.....	7
Figura 4 Ruta metabólica con fusión de enzimas de proceso a sistema Ag43.....	7
Figura 5 Representación gráfica de actividad OAL.....	12
Figura 6 Representación gráfica de actividad DEHR.....	13
Figura 7 Estructura cristalina de YagE KDGA (PDB 4ONV).....	13
Figura 8 Representación gráfica de actividad KDGA.....	14
Figura 9 Fracción soluble de enzimas de proceso.....	17
Figura 10 Reacción de la enzima KDGA acoplada a NADH-LDH para determinación de concentración de ácido pirúvico.....	19
Figura 11 Electroforesis en gel de agarosa 1% para los fragmentos utilizados en la construcción del plásmido pET22b-Ag43-EGFP.....	22
Figura 12 Electroforesis en gel de acrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) para los sedimentos resultantes del tratamiento con tripsina.....	24
Figura 13 Proteína total enzimas de proceso asociadas a Ag43.....	26
Figura 14 Flujo de proceso ligación por Gibson Assembly.....	28
Figura 15 Vista de pantalla del software PDTGA.....	32

Introducción

Una importante cantidad de procesos biotecnológicos industriales utilizan glucosa, sucrosa u otras azúcares simples similares como fuente de carbono y energía para sus procesos (Figura 1 - A). La mayor parte de estas provienen desde fuentes agrícolas. Por ejemplo, la industria de producción de etanol en Brasil a partir de caña de azúcar o en Estados Unidos a partir, principalmente, de maíz alcanza una producción de 17,5 billones de litros anuales de producto (Mielenz, 2001). La demanda por estos recursos agrícolas, conlleva a un impacto ambiental negativo en cuanto al: uso de suelos arables/deforestación, agua dulce, agroquímicos y sus respectivos impactos derivados.

El alginato, proveniente de maroalgas, se presenta como una interesante alternativa a los carbohidratos provenientes de cultivos agrícolas por cuanto el cultivo de estas algas: no requiere de suelos arables, agua dulce o químicos para el control de plagas. Sin embargo, la utilización directa de alginato como fuente de carbono por parte de la mayor parte de los microorganismos de uso industrial se ve imposibilitada por cuanto estos prescinden de la maquinaria enzimática necesaria – ruta metabólica – para su degradación e incorporación al metabolismo central.

El presente trabajo propone un proceso biotecnológico capaz de realizar la bio-conversión de alginato a ácido pirúvico y gliceraldehído, productos que pueden ser utilizados como fuente de carbono por diversos microorganismos de uso industrial – considerando una reducción del gliceraldehído a glicerol (da Silva, Mack, & Contiero, 2009; El-Mansi & Holms, 1989). Con esto, se propone un reemplazo a los sustratos convencionales de origen agrícola para la industria biotecnológica por uno con mejor balance respecto de su impacto ambiental.

Dentro de las posibilidades, la integración de una ruta metabólica de degradación de alginato a ácido pirúvico y gliceraldehído en forma heteróloga a un microorganismo de uso industrial cuenta como una opción (Figura 1 - B). Sin embargo, las dificultades propias de expresión heteróloga de una nueva ruta en cada nuevo microorganismo junto a la necesidad de modificar cada una de las cepas que pretenda utilizar el alginato como fuente de carbono, reviste una desventaja significativa para esta alternativa. Además, el transporte de alginato a través de la membrana es, en general, una etapa limitante en la cinética de crecimiento de los cultivos, por lo que esta opción necesitaría además de la incorporación de transportadores de membrana específicos.

A raíz de esto, la alternativa propuesta consiste en diseñar un sistema de producción de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato en una etapa previa a la fermentación de estos azúcares derivados de alginato por parte de algún microorganismo de uso industrial (Figura 1 - C).

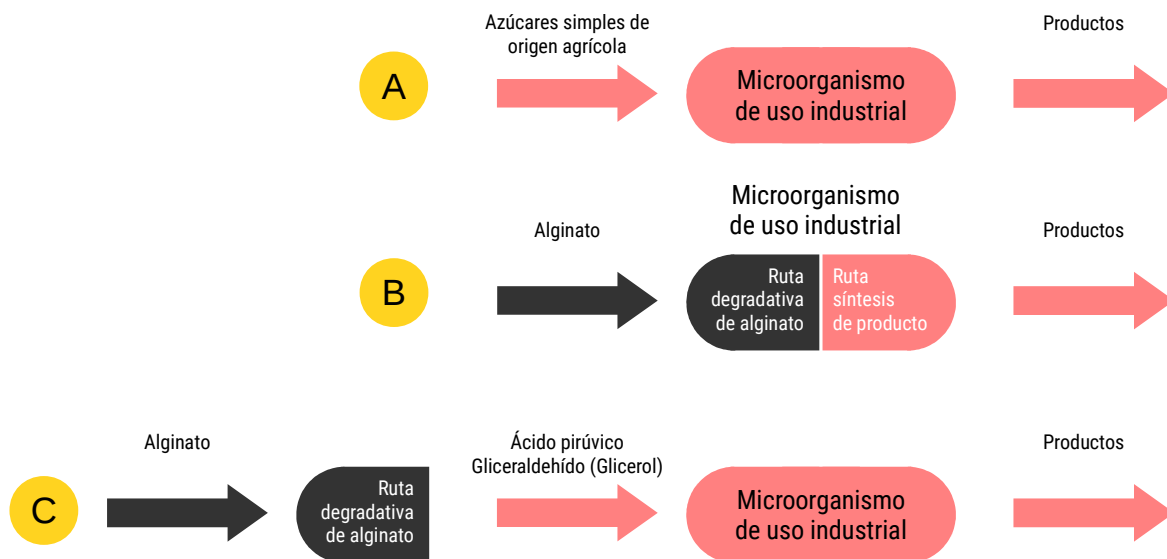


Figura 1 | Reemplazo de fuentes de carbono de origen agrícola por derivados de alginato.

A) Esquema de procesos actual. B) Alternativa de incorporación de ruta metabólica en microorganismos de uso industrial en forma heteróloga. C) Alternativa de producción de derivados de alginato en proceso previo a fermentación, sin necesidad de modificación de microorganismo de uso industrial.

Sustratos y productos

Alginato

Las macroalgas se presentan como una interesante fuente de carbono y energía para diversos procesos, por cuanto no utilizan tierras arables ni agua dulce para su producción junto a un ciclo cerrado de carbono, esto, acoplado a una alta tasa de crecimiento y a factibilidad de producción masiva (Horn, Aasen, & Stgaard, 2000; Roesijadi, Jones, & Zhu, 2010).

Dentro de éstas macroalgas, aquellas de tipo pardas presentan alto potencial como biomasa dado su alta velocidad de crecimiento, disponibilidad de zonas de cultivo y conocimiento de la especie (Horn et al., 2000). El alginato es uno de los principales carbohidratos constituyentes de esta familia de algas, alcanzando hasta un 60% de su peso seco (Draget, Smidsrød, & Skjåk-Bræk, 2005; Gorin & Spencer, 1966).

Estructuralmente, el alginato es un polímero lineal formado a partir de dos monómeros de ácidos urónicos: β -D-manuronato (M) y α -L-glucuronato (G). Estos ácidos urónicos corresponden a un tipo de azúcar ácida de seis carbonos – $(C_6H_8O_6)_n$ – donde el grupo hidroxilo del carbono terminal ha sido oxidado para transformarse en un grupo carboxilo (Draget et al., 2005). Guluronarato es epímero de manuronarato respecto del carbono 5 de su estructura. Por otro lado, estos monómeros pueden ordenarse dentro del polímero en cadenas de M consecutivos (*M-block*), de G consecutivos (*G-block*) o alternados (*MG-block*).

La mayor parte de la producción de alginato mundial es a partir de macroalgas, principalmente desde: *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria digitata*, *Ascophyllum nodosum*, *Laminaria japonica*, *Ecklonia maxima*, *Lessonia nigrescens* y *Durvillaea antarctica* (Rehm, 2009), siendo los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Ascophyllum* los más importantes en

términos productivos. Debido, tanto a la variedad de alga como a la estacionalidad, condiciones de cultivo y fracción de la planta, la composición y concentración de alginato es variable.

Las aplicaciones actuales de este polímero se basan en tres propiedades que éste presenta: aumento de viscosidad de soluciones acuosas, formación de geles (al agregar sales de calcio) y la formación de films y fibras de alginato de calcio. Las industrias en que se aplica es la textil, alimentaria, química (inmovilización de catalizadores), farmacéutica y médica, entre otras¹. Se estima una producción anual aproximada de 30.000 toneladas métricas anuales (2009) con un valor de \$USD 12/kg (Bixler & Porse, 2011; Devrimci, Yuksel, & Sanin, 2012).

Ácido pirúvico

El ácido pirúvico (IUPAC | ácido 2-oxopropanoico) es un compuesto de importancia biológica por ser un compuesto intermediario en las rutas de carbohidratos, proteínas y lípidos. Es utilizado como aditivo en la industria de alimentos, como precursor en industria farmacéutica (ej.: producción de triptófano, tirosina, alanina, DOPA), agrícola (formulación de agroquímicos), polímeros, cosméticos y numerosas otras aplicaciones., por lo que su demanda se encuentra en constante aumento (Xu, Qiu, Gao, & Ma, 2008).

Su síntesis química se basa en un proceso simple pero de alto costo, a través de una deshidratación y des-carboxilación de ácido tartárico. Su elevado costo, que se debe principalmente a que debe ser recuperado por destilación a temperaturas del orden de 200 [°C], se encuentra en el orden de USD\$ 8.000 a 9.000/tonelada (Y. Li, Chen, Liang, & Lun, 2000).

La producción por medios biotecnológicos resulta, en general, con un mejor balance de costos de producción respecto de la alternativa química. Existen, al menos, tres métodos de producción mediante microorganismos/enzimas. La fermentación directa de fuentes de carbono – principalmente glucosa pero también ácido propanoico, lactato, 1,2-propanediol o ácido propiónico – por parte de diversos microorganismos – principalmente de los géneros *Candida*, *Debaryomyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis*, *Escherichia*, *Schizophyllum*, *Nocardia*, *Pseudomonas* o *Enterococcus*, entre otras – tiene un mejor resultado de costo-eficiencia dentro de estas alternativas, junto a mayores grados de pureza. La producción se encuentra en rangos de fermentación de 24-72 [horas], concentraciones de 1,5-67 [g/L] y rendimientos de 0,15-0,67 [g/g]. Este sistema encuentra su principal dificultad en la baja concentración extracelular que puede alcanzar el ácido pirúvico dada su naturaleza de metabolito intermediario de diversas rutas metabólicas y baja capacidad de transporte a través de la membrana celular (Xu et al., 2008).

El ácido pirúvico puede ser utilizado directamente por diversos microorganismos de importancia industrial como *Escherichia coli* o *Saccharomyces cerevisiae*, por ejemplo, como fuente de carbono (Akita, Nishimori, Shimamoto, Fujii, & Iefuji, 2000; Kreth, Lengeler, & Jahreis, 2013).

Gliceraldehído

El gliceraldehído (IUPAC | 2,3-dihydroxypropanal) existe en la naturaleza principalmente como intermediario de la glicólisis en organismos. Industrialmente es utilizado principalmente como intermediario de síntesis orgánicas.

Gliceraldehído puede ser transformado a glicerol mediante métodos químicos y biológicos (Lee, Hodosek, Brooks, & Kador, 1998; Rinaldi, 2014). El glicerol se presenta como una prometedora nueva fuente de carbono como reemplazo de las fuentes de carbono convencionales dada su

1 FAO, accedido el 2.OCT.16, <<http://www.fao.org/docrep/006/y4765e/y4765e08.htm>>

abundancia como co-producto de otros procesos industriales, su capacidad de ser utilizado directamente por diversos microorganismos y la posibilidad de generar diversos productos (da Silva et al., 2009). Si bien la producción de glicerol es abundante en diversos procesos industriales, su utilización en el proceso planteado permite el aprovechamiento del gliceraldehído generado en la reacción de la aldolasa sobre KDG (Ruta metabólica y exposición en superficie, pág. 6).

Exposición en superficie celular

Generalidades

La técnica de exposición en superficie de membrana celular (*microbial cell surface display*) es un sistema conformado por una proteína con dos o más dominios o dos proteínas. El primer dominio (o proteína) se encuentra anclado a la membrana celular estableciendo una interacción mediante enlace covalente o interacción no-covalente con un segundo dominio o proteína, respectivamente.

Existen diversas aplicaciones para esta técnica, entre ellas, producción de anticuerpos, bio-adsorbentes, vacunas orales, detección de mutaciones o bio-sensores. Otra aplicación, denominada biocatalizadores de célula completa (*whole cell biocatalyst*), consiste en que la proteína expuesta es una enzima. Por tanto, se trata de un mecanismo de inmovilización enzimática basada en principios biológicos, en vez de métodos químicos como generalmente se realizan estas inmovilizaciones. Presenta, al igual que toda inmovilización, la posibilidad de catalizar reacciones de sustratos en solución junto a la recuperación enzimática, por centrifugación celular, para su re-utilización. Por encontrarse al exterior de la célula, si se compara con un proceso enzimático intracelular, se evita la necesidad de transporte de los sustratos/productos a través de la membrana celular, dinámica que suele ser limitante en la velocidad de procesos de bio-conversión. Todo esto ayuda también a simplificar/reducir los procesos de separación de los productos, etapa que suele ser de alto costo.

Antígeno 43

La familia de autotransportadores constituye un amplio y diverso grupo de proteínas de secreción y de membrana externa en numerosas bacterias Gram-negativas. El Antígeno 43 (Ag43, o también designado como Agn43) es una proteína de membrana autotransportadora nativa de *E. coli*. Se expone en forma abundante - ~50.000 [unidades/célula] – en la superficie celular una proteína generando adherencia en algunas cepas. Esto provoca formación de *films* en superficies así como un incremento en la patogenicidad de las cepas que lo expresan (Ramesh, Sendra, Cirino, & Varadarajan, 2012; Roche, McFadden, & Owen, 2001).

El Ag43 se encuentra codificado por un gen denominado *flu* (eng: *fluffing*. esp: esponjoso) y está conformado por tres dominios: un péptido de señal (SP) que dirige la secreción de la proteína a la membrana interna celular, el antígeno o dominio de proteína (PD) que entrega la característica adherencia a superficie y la secuencia de anclaje o unidad de translocación (TU) que forma un β -barril en la membrana externa por la que el PD atraviesa para quedar unido a TU pero expuesto a la superficie (Figura 2). Presenta además, el Ag43, la propiedad de liberar el dominio PD bajo ciertas condiciones ambientales. Esto ocurre por la presencia de un mecanismo de autoproteólisis que genera la ruptura de un enlace peptídico entre el dominio PD y el TU. Sin embargo, la interacción entre ambos dominios se mantiene por uniones no-covalentes, si las condiciones del medio – a temperatura y/o pH – son adecuadas (Henderson, Navarro-Garcia, Desvaux, Fernandez, & Ala'Aldeen, 2004).

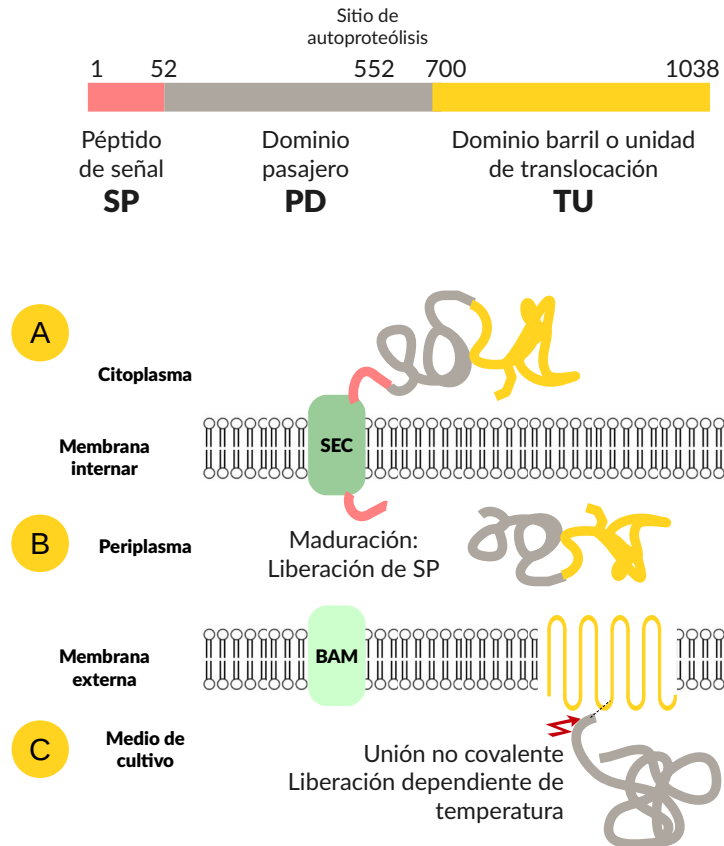


Figura 2 | Dominios, exportación, maduración y anclaje de Ag43 en membrana citoplasmática bacteriana.

Ruta metabólica y exposición en superficie

La ruta metabólica propuesta para la conversión de alginato en ácido pirúvico y gliceraldehído (Figura 3) se compone de cuatro enzimas: una alginato liasa enolítica ([endo] alginato liasa, ALY), otra exolítica ([exo/oligo] alginato liasa, OAL), una reductasa de ácidos urónicos (DEHU reductasa, DEHR) y una aldolasa (KDG aldolasa, KDGA). La descripción detallada de cada enzima se realiza más adelante (Diseño, construcción y expresión de una ruta enzimática para la síntesis de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato → Descripción enzimática).

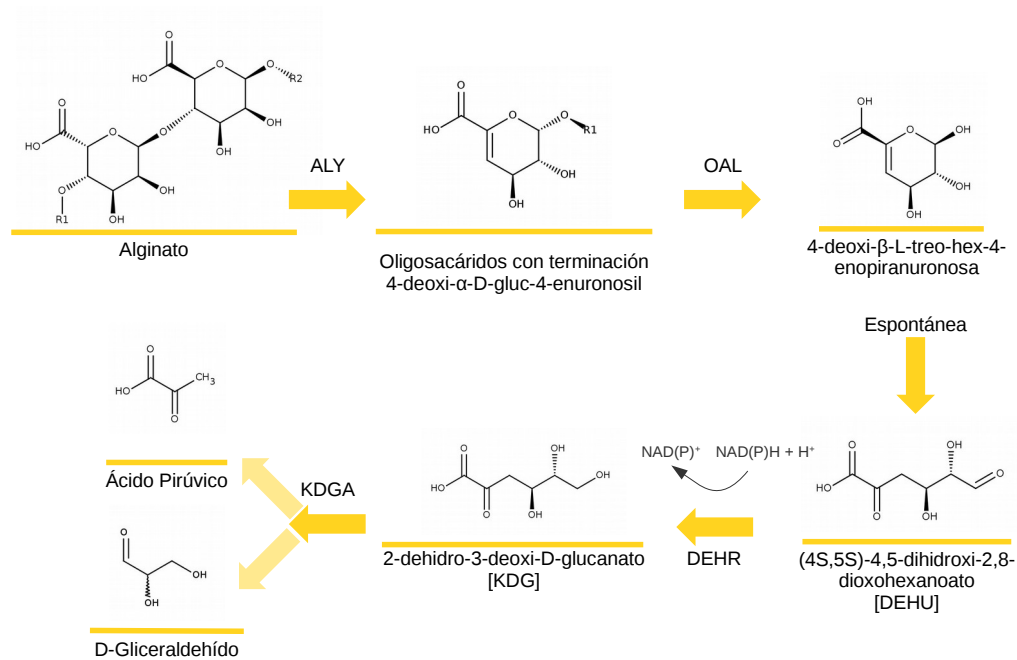


Figura 3 | Ruta metabólica para la bio-conversión de alginato en ácido pirúvico y gliceraldehído.

La fusión de cada una de estas enzimas al Ag43 permitirá su exposición en superficie para la que la conversión se realice en el exterior de la célula, sin necesidad de transporte de sustratos y productos, así como la mantención del ácido pirúvico en el medio extracelular, evitando su utilización en el metabolismo celular de las bacterias que expresan el sistema de exposición en superficie (Figura 4). Además, el poder catalítico podrá ser recuperado por centrifugación celular permitiendo su re-utilización.

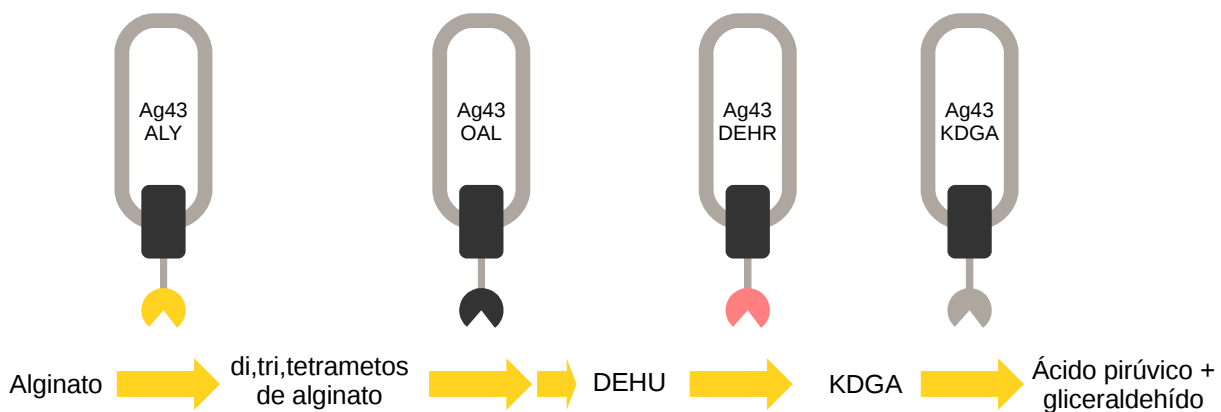


Figura 4 | Ruta metabólica con fusión de enzimas de proceso a sistema Ag43.

Objetivos

Objetivo general

Producir ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato utilizando enzimas inmovilizadas en la superficie de la membrana celular bacteriana.

Objetivos específicos

1. Diseñar, construir y expresar una ruta enzimática para la síntesis de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato
2. Diseñar, construir y expresar un sistema de inmovilización enzimático en la superficie de membrana celular bacteriana basado en el Antígeno 43
3. Diseñar, construir, expresar y caracterizar el funcionamiento del ensamble de las enzimas de proceso con el sistema de inmovilización

1 Diseño, construcción y expresión de una ruta enzimática para la síntesis de ácido pirúvico y gliceraldehído a partir de alginato

1.1 Enzimas de la ruta metabólica

1.1.1 Recursos genéticos

Proteína fluorescente verde (EGFP)

El gen codificante para una proteína fluorescente verde [Enhanced Green Fluorescent Protein – EGFP] fue obtenido a partir de un plásmido relacionado a la producción de virus adenoasociados en células mamíferas pscAAV-GFP (Apéndice B: Lista de plásmidos). Esta proteína fue utilizada como reportera para los sistemas de expresión: control de inducción, validación de exposición en superficie, etc.

[Endo] Alginato Liasa (ALY)

El gen codificante para una enzima alginato liasa de tipo endolítica fue obtenido desde una cepa antártica de *Pseudoalteromonas* en un trabajo anterior (Salazar, Oriana. No publicado). En dicho trabajo, este gen fue nombrado *aly_f18_b* y fue amplificado mediante PCR para ser clonado a un vector pGEMT-easy dando origen al plásmido el denominado pGEMT-ALY (Apéndice B: Lista de plásmidos).

El gen *aly_f18_b* fue amplificado mediante PCR (ver Construcción de plásmidos de expresión (versión soluble) y Ensamble de los genes de las enzimas de proceso con el sistema de inmovilización de Ag43) y una vez realizada la secuenciación (Macrogen, Inc.) del fragmento obtenido, se concluye que la secuencia clonada en el plásmido de expresión corresponde, tanto para la versión soluble como la inmovilizada, a:

> Secuencia [Endo] Alginato liasa según secuenciación (PCR con cebadores ALY_fwd y ALY_rev sobre molde pGEMT-ALY)

```
GCGACGATCAATAATGCTGGATTTGAAGATGGTTGGAATAACTGGAATGAAACAGAACCCAGCGGCTATTTTCAGGTAGTGCTTACAAG
GGTTTTAAATCATTAAAAATTCAAGGTAGTCCAGGGCGTGTACCAGAATGTAGATGTAGATCGAAATACTCAGTACACGTTAAGT
GCGTACGTACTTGGCAAGGGACAAATCGGCATTAACGATCTTAATGGTTTGTAAAAAGTGAGAAATTTAACGTTTCTTCGTGGACA
AAAGTATCTAAACTTTACCACAGCTAATACAGGTTGCTACAAGTATTTGCTAAGCATGATAAGAGCTCAAGCGATGTTTCGTTTT
GATGACTTTTCGTTAACTAAGGGTAGTCTTCTGGCGCGGAGACACAGGTGGTGGTGATACTGGCGGTGGCGACACTGGTGGTGGC
TCAGGTATAGCAAGCAACATCACCAACGGTGGTATTTTGACCTGAAGGTAACGATCCTCATCCATTAGTAAATAGCGACACTTTA
GAGTTTGTCTCTAGAAGCGCGTCATATCACTCCAACGGGAATGGCTGGCGTCATGAATATAAAGTAAAAGAAAGTGCACGTGTT
GCAATGACCGAAACCTATGAGGTTTTGAGGCAACTGTAAAAGTTGAAATGTCAGATGGTGGTAAAACGATTATTTCTCAGCACCAC
GCTAGCGATACGGGTACGATTTCAAAGTATATGTTTCAGATACTGATGAATCAGGTTTTGATGATAGCATAGCAGGTAACGGGATT
TTTGACGTTTATGTTTCGCTGCGTAAACACAGTGGTAAAGAAGAAAAACATGCACTAGGTACTATCAGAAGTGGTGGTTCATTCAAT
CTAAAAGTAGTTAATAATTACGGTGATGTAGATGTGACTGCATTAGGTACTACCTTTGGTATTCCGGTAGAAGATGATTTCAGAATCT
TACTTTAAGTTTGGTAATTTTACAATCACAAGACCCATATACACTAGATGAGTGTGGCGAGTCAGGAAACTCAGATTCATTTAA
GAGTGCTTTGAAGATTTAGGAATTACAAAAGCTAAAGTAAACAATGACTGACGTTAGTTACACGCGTAGAACTAAT
```

Realizando comparación contra base de datos pública *Nucleotide collection (nr/nt)* de BLAST/NIH (Altschul, Gish, Miller, Myers, & Lipman, 1990) se obtiene, como mejor resultado (*E-value*), un porcentaje de identidad de un 93% de esta secuencia respecto del gen de

Pseudoalteromonas elyakovii cepa IAM14594 (Sequence ID: gb|AF082561.1|AF082561) (Sawabe, Takahashi, Ezura, & Gacesa, 2001).

[Exo/Oligo] Alginato Liasa (OAL)

El gen codificante para la enzima alginato liasa de tipo exolítica fue obtenido a partir de DNA genómico de *Agrobacterium fabrum* cepa C58. Este gen es denominado *atu3025* (Gene ID | 1135040).

DEHU reductasa (DEHR)

El gen codificante para la enzima DEHU reductasa corresponde al gen *v12b01_24244* de *Vibrio splendidus* 12B01 (gb | CH724171.1) con optimización de codones realizada en un trabajo previo a partir de DNA genómico de *Escherichia coli* cepa BAL1611 (Enquist-Newman et al., 2014).

Ceto-deoxi-glucanato aldolasa (KDGA)

El gen codificante para la enzima ceto-deoxi-glucanato aldolasa corresponde al gen *yage* (Gene ID | 944925) obtenido a partir de DNA genómico de *Escherichia coli* cepa K12 sub-cepa DH10B.

1.1.2 Descripción enzimática

Generalidades de alginato liasas

Las alginato liasas, también conocidas como alginasas o alginato depolimerasas, catalizan la degradación de alginato a través de un mecanismo de β -eliminación. Estas enzimas se encuentran presentes en diversos organismos: algas, moluscos, hongos, bacterias y virus. Se encuentran clasificadas² en tres grupos, de acuerdo a su especificidad por sustrato:

1. EC 4.2.2.11: Afinidad por bloques guluronato (G) (poliguluronato liasa)
2. EC 4.2.2.3: Afinidad por bloques manuronato (M) (polimanuronato liasa)
3. EC 4.2.2.-: Afinidad por bloques MG (bi-funcional alginato liasa)

De acuerdo a su similaridad de secuencia aminoacídica, las alginato liasas son clasificadas en siete familias polisacárido liasa³ (PL): PL5, PL6, PL7, PL14, PL15, PL17 y PL18.

Actualmente, se cuenta con, aproximadamente, nueve estructuras tridimensionales de estas enzimas⁴. En base a éstas, los mecanismos de reconocimiento de sustrato y catálisis han sido determinadas para algunas de estas familias. Por ejemplo, la triada Tyr, His y Asn (Gln) se encuentra conservada en las familias PL5 y PL7 siendo responsable de la actividad catalítica. En particular, la familia PL18 presenta diferencias estructurales significativas respecto de las restantes familias junto a mecanismos de acción indeterminados.

[Endo] Alginato Liase (ALY)

Tomando en consideración la secuencia de la alginato liase obtenida en este trabajo a partir del resultado de secuenciación, se puede determinar que dentro de las secuencias en base de datos *Nucleotide collection (nr/nt)* de BLAST/NIH la de mayor similitud corresponde a un gen de *Pseudoalteromonas elyakovii* cepa IAM14594 (Sequence ID: gb|AF082561.1|AF082561) codificante para una alginato liase de la familia PL18 con un 93% de identidad. A través de un análisis utilizando el software HHpred (Söding, Biegert, & Lupas, 2005), un software de alta sensibilidad para búsqueda de secuencias similares, se obtuvo que la secuencia de la alginato liase usada en este trabajo presenta una identidad aminoacídica de un 80% respecto de una enzima de *Pseudoalteromonas* sp. cepa SM0524 (gb | EU548077.2) también perteneciente a la familia PL18.

Dados estos antecedentes, todo parece indicar que la alginato liase clonada pertenece también a la familia PL18. Esta familia solo se cuenta con dos estructuras tridimensionales conocidas (PDB | 1J1T | 4Q8K), sin encontrarse definidos los mecanismos de reconocimiento o catálisis. La razón para esto último es que esta familia presenta diferencias estructurales importantes con el resto de las familias (Dong et al., 2014). Todas las proteínas de esta familia son de origen bacteriano, provenientes de los géneros *Alteromonas*, *Arcobacter*, *Pseudoalteromonas* y *Saccharophagus*⁵.

2 De acuerdo al estándar del *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB)

3 De acuerdo al estándar de la *Carbohydrate-Active enZymes Database* (CAZy)

4 En *Protein Data Bank* (PDB)

5 Cazy, accedido el 29.SEP.16, <http://www.cazy.org/PL18_all.html>

La enzima producida presenta un peso molecular de 40.10 kDa según análisis bioinformático y electroforésis en gel de acrilamida.

[Exo/Oligo] Alginato Liasa (OAL)

La alginato liasa de *Agrobacterium tumefaciens* gen *atu3025* es miembro de la familia polisacárido liasa (PL) 5 (PL5) y actúa, a diferencia de la mayor parte de las enzimas de este tipo, en forma exolítica liberando monosacáridos insaturados, correspondientes a los ácidos urónicos β -D-manuronato y su epímeto α -L-glucuronato (4-deoxi-L-eritro-hex-4-enopiruranonatos) (Ochiai, Yamasaki, Mikami, Hashimoto, & Murata, 2010). Estos monosacáridos son compuesto ciclados inestables que, espontáneamente, se modifican para formar un producto lineal de nombre (4S,5S)-4,5-dihidroxi-2,8-dioxohexanoato, conocido también bajo la sigla DEHU⁶ (Figura 5).

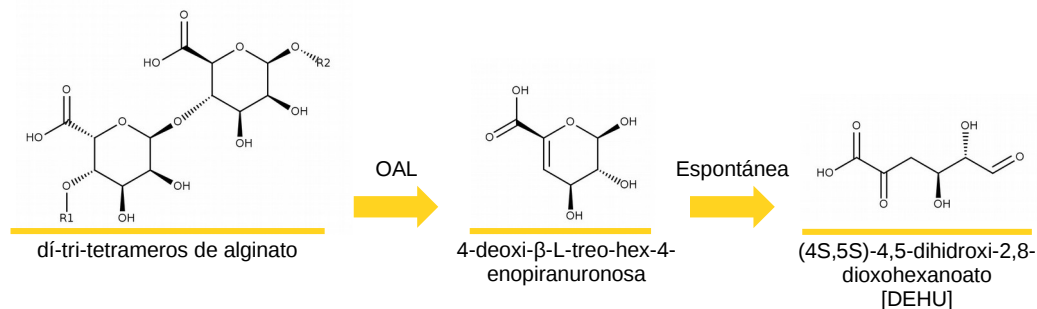


Figura 5 | Representación gráfica de actividad OAL.

El mecanismo de reacción de esta enzima es, al igual que para las endo-alginato liasas, por β -eliminación. Se trata de una proteína de 87.88 kD, según análisis bioinformático y electroforésis en gel de acrilamida, cuya estructura tridimensional (PDB | 3AFL) se encuentra dilucidada y caracterizada (Ochiai et al., 2010)..

DEHU reductasa (DEHR)

(4S,5S)-4,5-dihidroxi-2,8-dioxohexanoato (DEHU) reductasa (DEHR) corresponde a la enzima codificada por el gen *v12b01_24244* de *Vibrio splendidus* cepa 12B01 (gb | CH724171.1) con optimización de codones. Presenta un peso molecular de 30.65 kDa, según análisis bioinformático y electroforésis en gel de acrilamida, sin estructura tridimensional dilucidada.

En esta reacción, los DEHU son transformados a 2-dehidro-3-deoxi-D-glucanato (KDG) (Figura 6). Esta reductasa de grupos aldosa es NAD(P)H dependiente. Se ha demostrado su preferencia por NADH como cofactor (Takase, Ochiai, Mikami, Hashimoto, & Murata, 2010; Wargacki et al., 2012).

⁶ Biocyc, accedido el 29.SEP.16, <<http://biocyc.org/META/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=PWY-6986>>

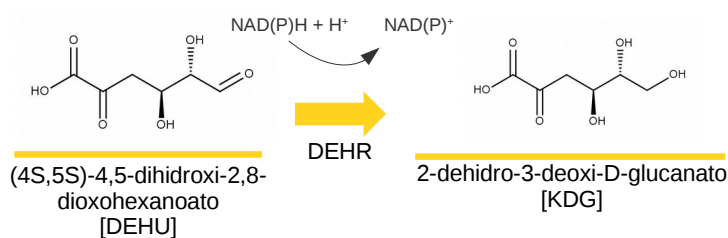


Figura 6 | Representación gráfica de actividad DEHR.

Ceto-deoxi-glucanato aldolasa (KDGA)

La 2-dehidro-3-deoxi-D-glucanato (KDG) aldolasa (KDGA) se encuentra codificada en el gen YagE (Gene ID | 944925) de *Escherichia coli* cepa K12 sub-cepa DH10B. Se trata de una enzima tetramérica (Figura 7) de 32,54 kDa, según análisis bioinformático y electroforésis en gel de acrilamida, con estructura tridimensional dilucidada (PDB | 4ONV), al igual que su mecanismo de reacción (Bhaskar et al., 2011).

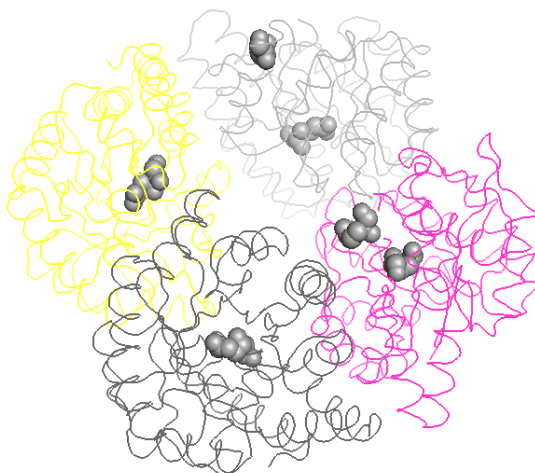


Figura 7 | Estructura cristalina de YagE KDGA (PDB | 4ONV).

Muestra sus cuatro sub-unidades en complejo con seis moléculas de KDG.

Esta aldolasa es capaz de efectuar reacciones de retro-aldol (inversa a la condensación de aldol, o, simplemente, reacción de aldol) sobre KDG para producir ácido pirúvico y D-gliceraldehído (Figura 8).

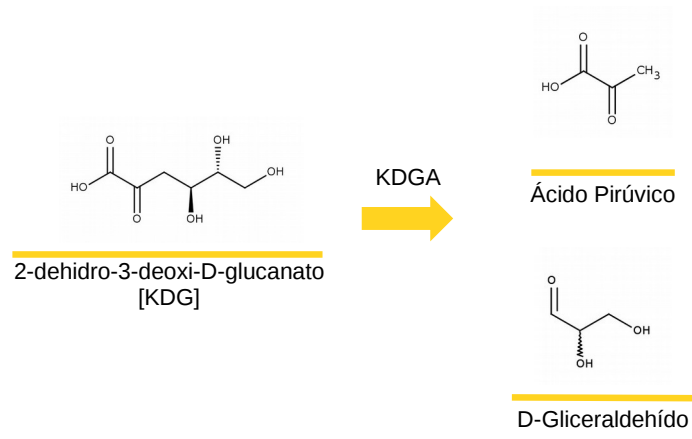


Figura 8 | Representación gráfica de actividad KDGA.

1.2 Construcción de plásmidos de expresión (versión soluble)

Dado que la inmovilización enzimática puede resultar en una reducción o pérdida de la actividad, junto a que algunas de las enzimas seleccionadas no se encuentra con actividad comprobada, así como el necesario establecimiento y verificación de los métodos de medición de actividad enzimática, se realiza, en una primera instancia, la expresión de las enzimas del proceso en forma soluble, vale decir, se realizan los constructos genéticos para que éstas sean sintetizadas en el citoplasma celular, sin estar asociadas al sistema de inmovilización de Ag43. estos constructos se denominan *versión soluble*.

Esta versión de las enzimas fue realizada utilizando como base el plásmido de expresión pET22b (Apéndice B: Lista de plásmidos), clonando las enzimas del proceso entre el término del péptido de señal de exportación a periplasma *pelB* y el inicio de la cola de poli-histidina *HisTag*. El péptido de señal permitirá la extracción de la enzima mediante fraccionamiento de periplasma, mientras que la cola de poli-histidina permitirá su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (*Immobilized Metal Affinity Chromatography/IMAC*) con algún metal divalente (Ni, Co, Cu, Fe) en resina de agarosa.

1.2.1 Plásmido base (pET22b-HisTag-pelB)

La construcción genética para la expresión de los genes codificantes de las enzimas para la degradación de alginato, se realizó, mediante PCR. Como plásmido base se utilizó un fragmento lineal de 5427 pb (pET22b-HisTag-pelB), el cual se obtuvo utilizando el plásmido pET22b como molde de DNA, los cebadores pET22b-HisTag_fwd y pET22-pelB_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51). La reacción de PCR fue purificada tras pasar por electroforesis en gel de agarosa mediante el *GeneJET Gel Extraction Kit* (Apéndice E.4: Kits). La concentración del fragmento purificado fue determinada mediante espectrofotometría usando el equipo MaestroNano (Apéndice G: Equipos).

1.2.2 Ensamble de enzimas del proceso

Los plásmidos pET22b-EGFP, pET22b-ALY, pET22b-OAL, pET22b-DEHR y pET22b-KDGA corresponden a la ligación del plásmido base (pET22b-HisTag-pelB) a la proteína EGFP y las enzimas ALY, OAL, DEHR y KDGA respectivamente.

FRAGMENTO	MOLDE DE PCR	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
EGFP_sol	pscAAV-GFP	EGFP_fwd	EGFP_rev
ALY_sol	pGEMT-Ag43	ALY_fwd	ALY_rev
OAL_sol	gDNA <i>Agrobacterium fabrum</i> cepa C58	OAL_fwd	OAL_rev
DEHR_sol	gDNA <i>Escherichia coli</i> cepa BAL1611	DEHR_fwd	DEHR_rev
KDGA_sol	GDNA <i>Escherichia coli</i> cepa K12 sub-cepa DH10B	KDGA_fwd	KDGA_rev

Tabla 1 | Moldes y cebadores para reacciones de PCR usados en la amplificación de genes codificantes de proteínas y enzimas versión soluble

Para la construcción de cada uno de estos plásmidos se realizó una amplificación del gen codificante de cada una de las proteínas/enzimas mediante PCR. El molde de DNA y los cebadores utilizados en cada reacción los muestra la Tabla 1. El mix de PCR y programa de PCR lo muestra la Tabla 5 (pág. 51).

Cada reacción de PCR fue purificada tras pasar por electroforesis en gel de agarosa mediante el *GeneJET Gel Extraction Kit* (Apéndice E.4: Kits). Tras determinar su concentración mediante espectrofotometría usando el equipo MaestroNano (Apéndice G: Equipos), fue ligado al vector base mediante *Gibson assembly* (Apéndice F: Protocolos → Gibson assembly).

1.2.3 Transformación bacteriana y selección de clones positivos

Para cada constructo, bacterias quimiocompetentes (Apéndice F: Protocolos → Células quimiocompetentes y transformación bacteriana) de *E. coli* cepa Top10 (Apéndice A: Lista de cepas) fueron transformadas utilizando 10 [ul] de producto de ligación para 100 [ul] de células quimiocompetentes. Se sembró 100 [ul] de la solución de transformación en una placa LB suplementado con 50 ug/ml de ampicilina y se incubó por 16 [h] a 37 [°C].

Mediante PCR de colonias (Apéndice F: Protocolos → PCR de colonias) se realizó la búsqueda del fragmento de DNA insertado en el plásmido base. Posteriormente se realizó un cultivo en medio LB suplementado con 50 ug/ml de ampicilina de un clon positivo por 16 [h], tras lo cual se realizó extracción de plásmidos mediante GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Apéndice E.4: Kits) y un análisis del patrón de digestión con enzimas de restricción. Todos los plásmidos seleccionados fueron verificados por secuenciación (Macrogen, Inc.). Bacterias quimiocompetentes (Apéndice F: Protocolos → Células quimiocompetentes y transformación bacteriana) de *E. coli* cepa BL21 (Apéndice A: Lista de cepas) fueron transformadas utilizando los plásmidos extraídos del paso anterior.

1.2.4 Inducción de producción de proteínas

Medio ZYP5052 (Apéndice E.1: Medios de cultivo) fue inoculado a razón 1:100 con *E. coli* cepa BL21 portando el respectivo plásmido e incubado a 25 [°C] por 16 [h] para la producción de cada proteína/enzima de interés. Para la obtención de la fracción soluble de proteínas, un volumen de 5 [ml] fue centrifugado a máxima velocidad por 2 [min] y descartado el sobrenadante. El sedimento fue lavado dos veces en idéntico volumen de PBS (Apéndice E.3: Tampones) y luego resuspendido en el mismo volumen. Tras sonicar éste volumen (20 W_{RMS} por 10 [s] con 30 [s] de incubación en hielo, repetido por 4 veces), fue centrifugado a máxima velocidad y 4 [°C] por 10 [min]. El sobrenadante es considerada la fracción soluble, mientras que el sedimento, resuspendido en PBS, es considerada la fracción insoluble. Un gel de electroforesis de acrilamida 12,5% en condiciones denaturantes con tinción de azul de comassie muestra las fracciones solubles obtenidas (Figura 9).

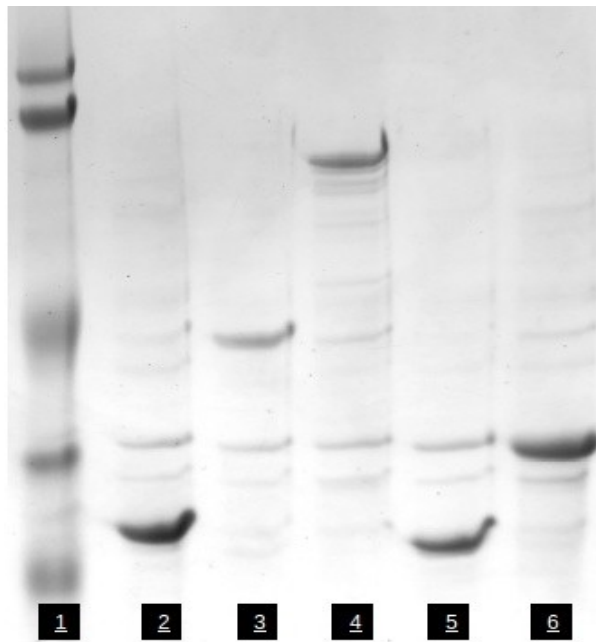


Figura 9 | Fracción soluble de enzimas de proceso.

12[ul] por canal. 1) Pierce™ Prestained Protein MW Marker, ThermoFisher cat#26612. 2) EGFP_sol. 3) ALY_sol. 4) OAL_sol. 5) DEHR_sol. 6) KDGA_sol.

1.3 Cuantificación de la actividad enzimática

1.3.1 [Endo] Alginato Liasa (ALY) y [Exo/Oligo] Alginato Liasa (OAL)

La determinación de la actividad liasa sobre alginato fue realizada mediante la cuantificación de grupos carbonilos (C=O) reductores generados por la acción endolítica de la enzima. Para esto se utilizó el método de estimación de azúcares reductores con ácido di-nitrosalicílico (DNS) (Miller, 1959).

Para ser usado como sustrato para la enzima, alginato de sodio 0,5% + sales fue preparado (Apéndice E.3: Tampones). Los ensayos de actividad se realizaron, de acuerdo a una modificación a un protocolo antes descrito (L. Li, Jiang, Guan, Wang, & Guo, 2011). Brevemente, se mezcló la solución de alginato 0,5% con la la fracción soluble de la enzima en razón 4:1 e incubada a 37 [°C] por 1 [h] con agitación de 750 [rpm]. El producto de esta reacción fue mezclado en proporción 1:1 con DNS e incubado a 100 [°C] por 10 [min]. Un volumen de 150 [ul] de este producto es medido en placa de 96 pocillos por espectrofotometría (Apéndice G: Equipos → Espectrofotómetro) a 550 [nm]. Una curva estándar de DNS fue realizada con concentraciones conocidas de glucosa (Apéndice E: Material suplementario → Curva estándar DNS; Gráfico 3) para determinar la relación entre absorbancia y cantidad de extremos reductores mediante interpolación.

Tras incubar alginato, según este protocolo, con la fracción soluble de ALY y OAL, usando como blancos agua y el extracto soluble de GFP en reemplazo de la fracción soluble, se pudo determinar la efectiva actividad liasa de estas dos enzimas sobre alginato.

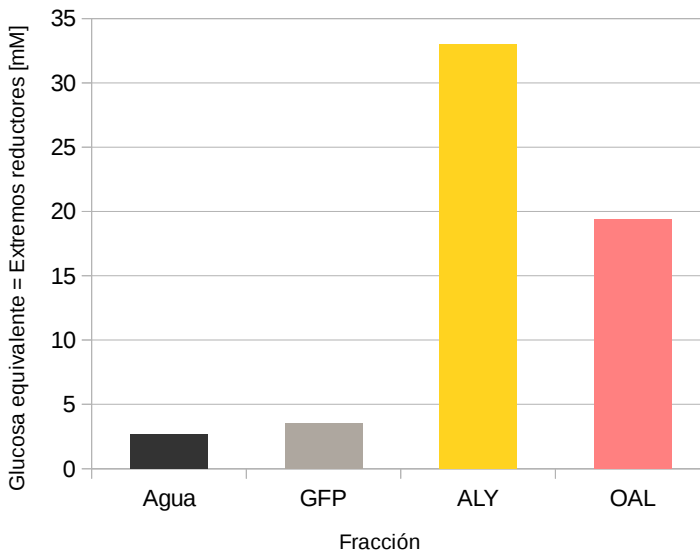


Gráfico 1 | Actividad alginato liasa fracciones solubles

1.3.2 DEHU reductasa (DEHR)

Debido a limitaciones técnicas, no fue posible determinar la actividad DEHU reductasa de la enzima DEHR, no obstante la participación de esta enzima en la ruta degradativa de alginato ha sido demostrada por otros autores (Wargacki et al., 2012).

1.3.3 Ceto-deoxi-glucanato aldolasa (KDGA)

A diferencia de la inducción del resto de las enzimas, esta fue inducida utilizando IPTG. Una concentración de IPTG de 200 [uM] se adicionó a un cultivo de *E. coli* de 3 [h] de crecimiento a 37 [°C] previamente inoculado a razón 1:100 con un pre-cultivo de 16 [h]. Como control se utilizó un cultivo en idénticas condiciones pero sin adición de IPTG: La extracción de las fracciones solubles se realizó de la misma forma antes descrita para el resto de las fracciones.

La cuantificación de la actividad KDG-aldolasa se realizó monitoreando la cantidad de ácido pirúvico consumido bajo condiciones de exceso de gliceraldehído en presencia de la enzima KDGA, siendo KDG el producto de esta reacción, lo que corresponde a la reacción inversa a la establecida para la ruta degradativa. El ácido pirúvico es medido indirectamente mediante un ensayo NADH-LDH. En este ensayo, la enzima lactato-dehidrogenasa (LDH) cataliza la reacción de ácido pirúvico a ácido láctico consumiendo NADH (Figura 10). Por su parte, la concentración de NADH se mide por absorbancia a 340 [nm] usando espectrofotometría (Apéndice G: Equipos).

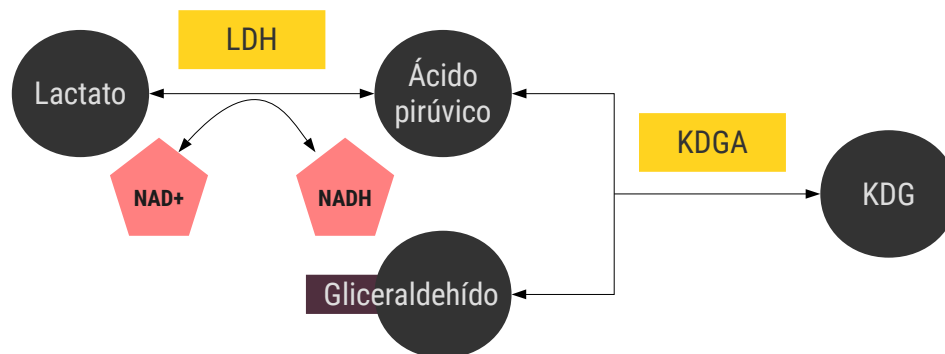


Figura 10 | Reacción de la enzima KDGA acoplada a NADH-LDH para determinación de concentración de ácido pirúvico.

Los reactivos, concentraciones y tiempos de incubación corresponden a una modificación realizada a un protocolo antes descrito (Bhaskar et al., 2011). Una curva de calibración, utilizando concentraciones conocidas de NADH y otra de concentraciones conocidas de ácido pirúvico fueron realizadas (Apéndice E: Material suplementario).

La reacción de la KDGA se realizó por incubación a 37 [°C] por 1 [h] de la muestra que establece la Tabla 2.

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	UNIDAD
Tris[100 mM]-HCl pH 7,5	-	-
Ácido pirúvico	20	mM
Gliceraldehído	8	mM
KDGA (fracción soluble)	20	%v/v

Tabla 2 | Mezcla de reacción para la acción de la enzima KDGA

Luego, la concentración de ácido pirúvico se establece mediante el método NADH-LDH antes descrito. Para esto se incubó la mezcla que muestra la Tabla 3 a 37 [°C] por 1 [h] y luego se midió un volumen de 150 [ul] en espectrofotómetro a 340 [nm].

REACTIVO	CONCENTRACIÓN	UNIDAD
Tris[100 mM]-HCl pH 7,5	-	-
NADH	1000	uM
LDH	0,1875	uU
Sobrenadante reacción KDGA	5	%v/v

Tabla 3 | Mezcla para la determinación de la concentración de ácido pirúvico mediante ensayo NADH-LDH

Los resultados muestran una absorbancia de 0,13 para el control y 0,433 para el cultivo inducido. Este último valor equivale a una concentración, sustrayendo el valor de absorbancia obtenido del blanco, de NADH de 377 [uM] y de ácido pirúvico de 622 [uM] según las curvas de calibración. Con esto, se tiene un 38% del máximo teórico de conversión de sustrato asociado a la actividad de esta enzima.

2 Diseño, construcción y expresión de un sistema de inmovilización de proteínas en la superficie de membrana celular aplicado a la ruta enzimática

2.1 Diseño y construcción del plásmido base para la versión inmovilizada basada en Antígeno 43

La versión inmovilizada de las enzimas de proceso de degradación de alginato se realizó utilizando el plásmido de expresión pET22b como base. Se comenzó con la obtención de un fragmento lineal mediante digestión con las enzimas de restricción (Apéndice F: Protocolos → Digestión con enzimas de restricción) *NdeI* y *MscI*, formando el fragmento pET22b-dd-*NdeI*-*MscI*. Tras pasar por electroforesis en gel de agarosa, la banda correspondiente al peso (5428 pb) fue purificada mediante el *GeneJET Gel Extraction Kit* (Apéndice E.4: Kits). La concentración del fragmento purificado fue determinada mediante espectrofotometría usando el equipo MaestroNano (Apéndice G: Equipos). Este fragmento se ligó mediante *Gibson assembly* al fragmento SP-EGFP-TU. Este último fragmento está conformado por:

- SP: Péptido de señal de Ag43. Fragmento de 156 pb, amplificado desde el plásmido pGEMT-Ag43 utilizando los cebadores SP_fwd y SP_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51).
- EGFP: Proteína fluorescente verde. Fragmento de 717 pb, amplificado desde el plásmido pscAAV-GFP utilizando los cebadores EGFP_Ag43_fwd y EGFP_Ag43_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51).
- TU: Dominio de anclaje a membrana de Ag43. Fragmento de 1464 pb, amplificado desde el plásmido pGEMT-Ag43 utilizando los cebadores TU_fwd y TU_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51).

Una vez amplificados los fragmentos mediante los PCR antes detallados, purificados y su concentración cuantificada, fueron ligados secuencialmente mediante *Gibson assembly*. Para esto, primero se ligó SP a EGFP, formando el fragmento SP-EGFP. Este fragmento fue amplificado desde el producto de ligación mediante PCR utilizando los cebadores SP_fwd y EGFP_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51).

Una vez purificado y cuantificado, el fragmento SP-EGFP fue ligado mediante *Gibson assembly* al fragmento TU formando el fragmento SP-EGFP-TU. Este fragmento fue amplificado desde el producto de ligación mediante PCR utilizando los cebadores SP_fwd y TU_rev y el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51). La Figura 11 muestra un gel de agarosa con cada uno de los fragmentos de la construcción del plásmido. Una vez purificado y cuantificado, el fragmento SP-EGFP-TU fue ligado mediante *Gibson assembly* al fragmento pET22b-dd-*NdeI*-*MscI* formando el plasmido pET22b-Ag43-EGFP. Bacterias *E. coli* cepa Top10 fueron transformadas (Apéndice F: Protocolos → Células quimiocompetentes y transformación bacteriana) con este producto de ligación. Mediante selección por antibiótico en placa (ampicilina 50 ug/ml), comprobación por PCR de colonia (Apéndice F: Protocolos → PCR de colonias) y análisis de patrón de digestión con enzimas de restricción de una miniprep del plásmido, se seleccionó una colonia positiva para el producto esperado.

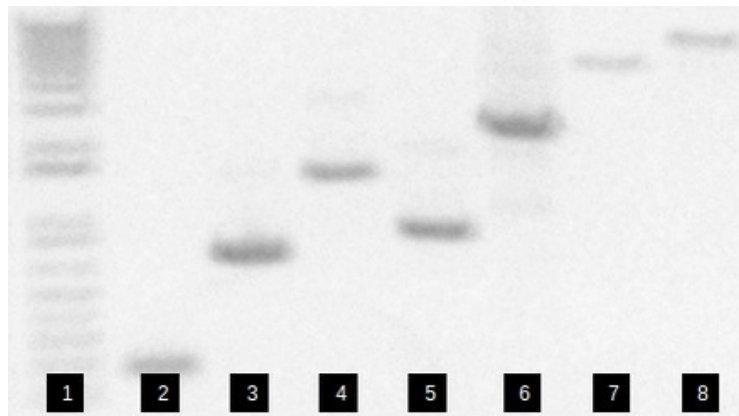


Figura 11 | Electroforésis en gel de agarosa 1% para los fragmentos utilizados en la construcción del plásmido pET22b-Ag43-EGFP.

Carriles: 1) ThermoFisher 1kb plus DNA ladder. 2) SP. 3) EGFP. 4) TU. 5) SP-EGFP. 6) SP-EGFP-TU. 7) pET22b dig. EcoRI. 8) pET22b-Ag43-EGFP dig. EcoRI.

2.2 Validación de la exposición en superficie

Para validar el posicionamiento de la proteína EGFP en la superficie celular, se realizó un tratamiento con tripsina. Esta proteasa es capaz de remover las proteínas de membrana con exposición externa. Se tiene por antecedente que EGFP no es susceptible a degradación por tripsina (Chiang, Okou, Griffin, Verret, & Williams, 2001; Muñoz-Gutiérrez, Moss-Acosta, Trujillo-Martinez, Gosset, & Martinez, 2014).

2.2.1 Susceptibilidad de EGFP a degradación por tripsina

Para comprobar la veracidad de no-susceptibilidad de EGFP a degradación por tripsina, un cultivo de *E. coli* cepa BL21 portando el plásmido pET22b-EGFP fue crecido en medio ZYP5020 (Apéndice E.1: Medios de cultivo) suplementado con ampicilina 50 [ug/ml] a 25 [°C] y 250 [rpm] por 16 [h] inoculado con un pre-cultivo de 16 [h] a razón 1:100. Un volumen de 5 [ml] de este cultivo fue centrifugado a 8.000 [rpm] por 1 [min] en una micro-centrífuga (Apéndice G: Equipos), lavados dos veces con PBS y resuspendidos en 2 [ml] del mismo tampón. Luego, se sonicó el volumen (20 W_{RMS} por 10 [s] con 30 [s] de incubación en hielo, repetido por 4 veces), y centrifugó a máxima velocidad y 4 [°C] por 10 [min]. La fluorescencia del sobrenadante, que corresponde a la fracción de proteína soluble, fue medida utilizando un fluorímetro (Apéndice G: Equipos) con un par de filtro sextación (Ex) y emisión (Em) Ex: 485 [nm] | Em: 538 [nm]. Luego, se añadió 5 [ul] de tripsina 50 mg/L (Apéndice E.5: Reactivos) a un volumen de 150 [ul] de esta fracción para ser incubada a temperatura ambiente por 3 [h]. Durante este tiempo se midió la fluorescencia cada 15 [min]. Los resultados dan cuenta de una mantención de la fluorescencia.

2.2.2 Tratamiento de cultivos con tripsina

Para el análisis de tratamiento de célula completa con proteasas se tomaron 3 cultivos: 1) *E. coli* cepa BL21 portando el plásmido pET22b-BFP, 2) *E. coli* cepa BL21 portando el plásmido pET22b-EGFP y 3) *E. coli* cepa BL21 portando el plásmido pET22b-Ag43-EGFP. El primero expresa una proteína fluorescente intracelular, el segundo una proteína fluorescente con péptido de señal de exportación a periplasma y el tercero una proteína fluorescente asociada a Ag43.

Los tres cultivos fueron crecidos en medio ZYP5020 (Apéndice E.1: Medios de cultivo) suplementado con ampicilina 50 [ug/ml] a 25 [°C] y 250 [rpm] por 16 [h] inoculados con un pre-cultivo de 16 [h] en razón 1:100. Un volumen de 5 [ml] de cada uno fue centrifugado a 8.000 [rpm] por 1 [min] en una micro-centrífuga (Apéndice G: Equipos), lavados dos veces con PBS y resuspendidos en 2 [ml] del mismo tampón. A un volumen de 500 [ul] de cada cultivo se le agregó 50 [ul] de tripsina 50 mg/L (Apéndice E.5: Reactivos) y se incubó a 37 [°C] por 10 [min]. Como control, el mismo volumen fue incubado a las mismas condiciones sin agregar tripsina. Tras la incubación, los cultivos fueron centrifugados a 14.000 [rpm] en micro-centrífuga por 2 [min] y el sobrenadante separado a un nuevo vial. El sedimento fue lavado con PBS y resuspendido en 500 [ul] del mismo tampón. De cada muestra, 150 [ul] fueron medidos utilizando un fluorímetro (Apéndice G: Equipos) con un par de filtros Ex: 485 [nm] | Em: 538 [nm] para EGFP y Ex: 390 [nm] | Em: 517 [nm] para BFP. La fluorescencia porcentual respecto del total los muestra el Gráfico 2.

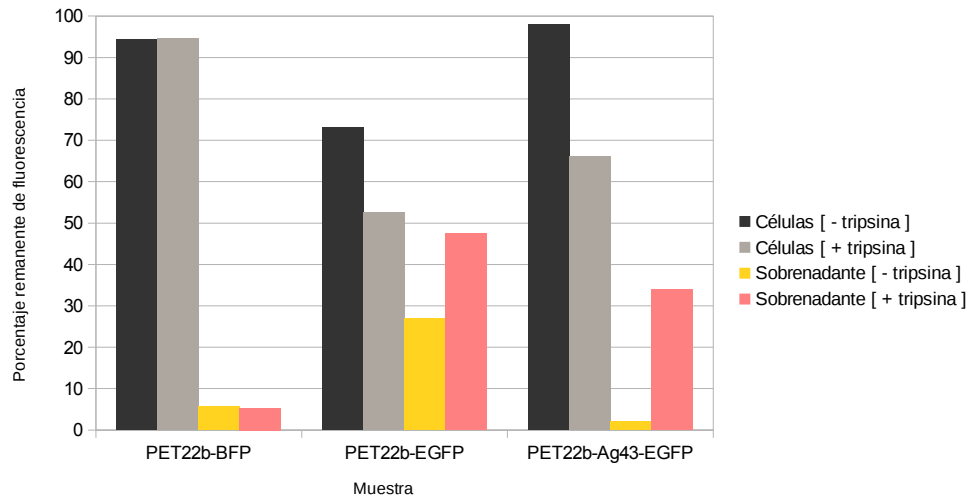


Gráfico 2 | Análisis de tratamiento de célula completa con proteasas

Un gel de electroforesis de proteínas denaturante en acrilamida (*SDS-PAGE*) fue realizado sobre los sedimentos obtenidos del experimento anterior (Figura 12).

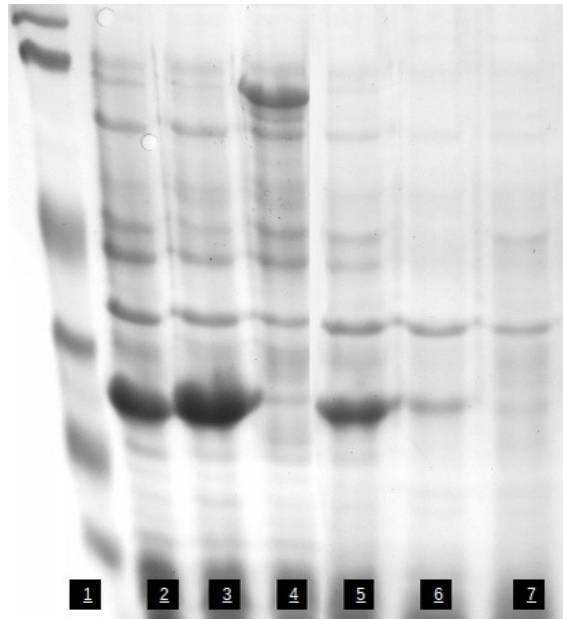


Figura 12 | Electroforésis en gel de acrilamida en condiciones denaturantes (SDS-PAGE) para los sedimentos resultantes del tratamiento con tripsina.

Carriles: 1) Pierce™ Prestained Protein MW Marker, ThermoFisher cat#26612. 2) BFP sin tripsina. 3) EFPG sin tripsina. 4) EGFP-Ag43 sin tripsina. 5) BFP con tripsina. 6) EGFP con tripsina. 7) EGFP-Ag43 con tripsina.

2.3 Ensamble de los genes de las enzimas de proceso con el sistema de inmovilización de Ag43

Los plásmidos pET22b-Ag43-ALY, pET22b-Ag43-OAL, pET22b-Ag43-DEHR y pET22b-Ag43-KDGA fueron construidos reemplazando el fragmento EGFP del plásmido base (pET22b-Ag43-EGFP) por las enzimas ALY, OAL, DEHR y KDGA respectivamente. Para esto se amplificó mediante PCR el plasmidio pET22b-Ag43-EGFP utilizando los cebadores TU_fwd y SP_rev, el mix de PCR y programa de PCR que muestra la Tabla 5 (pág. 51), para obtener el fragmento pET22b-Ag43-TU-SP.

Para la construcción de cada uno de estos plásmidos se realizó una amplificación del fragmento de DNA correspondiente al gen codificante para cada una de las enzimas mediante PCR. El molde de DNA y los cebadores utilizados en cada reacción los muestra la Tabla 4. El mix de PCR y programa de PCR lo muestra la Tabla 5 (pág. 51).

Tanto del fragmento base pET22b-Ag43-TU-SP como cada gen de cada enzima, fue purificada tras pasar por electroforesis en gel de agarosa mediante el *GeneJET Gel Extraction Kit* (Apéndice E.4: Kits). Tras determinar su concentración mediante espectrofotometría usando el equipo MaestroNano (Apéndice G: Equipos), fueron ligados cada fragmento correspondiente a cada enzima con el fragmento pET22b-Ag43-TU-SP mediante *Gibson assembly* (Apéndice F: Protocolos → Gibson assembly).

FRAGMENTO	MOLDE DE PCR	CEBADOR SENTIDO	CEBADOR ANTISENTIDO
EGFP_Ag43	pscAAV-GFP	EGFP_Ag43_fwd	EGFP_Ag43_rev
ALY_Ag43	pGEMT-Ag43	ALY_Ag43_fwd	ALY_Ag43_rev
OAL_Ag43	gDNA <i>Agrobacterium fabrum</i> cepa C58	OAL_Ag43_fwd	OAL_Ag43_rev
DEHR_Ag43	gDNA <i>Escherichia coli</i> cepa BAL1611	DEHR_Ag43_fwd	DEHR_Ag43_rev
KDGA_Ag43	GDNA <i>Escherichia coli</i> cepa K12 sub-cepa DH10B	KDGA_Ag43_fwd	KDGA_Ag43_rev

Tabla 4 | Moldes y cebadores para reacciones de PCR en amplificación de genes codificantes de proteínas y enzimas versión inmovilizada con Ag43

2.3.1 Transformación bacteriana y selección de clones positivos

Para cada constructo, bacterias quimiocompetentes (Apéndice F: Protocolos → Células quimiocompetentes y transformación bacteriana) de *E. coli* cepa Top10 (Apéndice A: Lista de cepas) fueron transformadas utilizando 10 [ul] de producto de ligación para 100 [ul] de células quimiocompetentes. Se plaqueó 100 [ul] de transformación en una placa LB-Ampicilina y se incubó por 16 [h] a 37 [°C] para selección de clones positivos seleccionado mediante PCR de colonias (Apéndice F: Protocolos → PCR de colonias). Tras un cultivo de 16 [h], se realizó extracción de plásmidos mediante GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Apéndice E.4: Kits) y un análisis del patrón de digestión con enzimas de restricción. Todos los plásmidos seleccionados fueron verificados por secuenciación (Macrogen, Inc.). Bacterias quimiocompetentes (Apéndice F: Protocolos → Células quimiocompetentes y transformación bacteriana) de *E. coli* cepa BL21

(Apéndice A: Lista de cepas) fueron transformadas utilizando los plásmidos extraídos por miniprep.

2.3.2 Inducción de producción de proteínas

Medio ZYP5052 (Apéndice E.1: Medios de cultivo) fue inoculado a razón 1:100 con *E. coli* cepa BL21 portando el respectivo plásmido e incubado a 25 [°C] por 16 [h] para la producción de cada proteína/enzima de interés. Un volumen de 5 [ml] fue centrifugado a 8.000 [rpm] en microcentrífuga (Apéndice G: Equipos) por 2 [min] y descartado el sobrenadante. El sedimento fue lavado dos veces en idéntico volumen de PBS (Apéndice E.3: Tampones) y luego resuspendido nuevamente en el mismo volumen. Un gel de electroforesis de acrilamida 12,5% en condiciones denaturantes con tinción de azul de comassie muestra la fracción de proteína total en cada muestra (Figura 13).

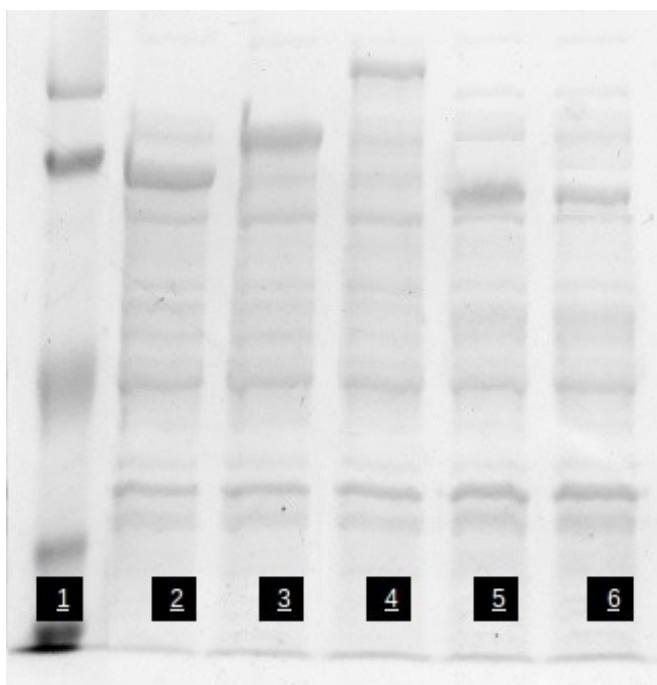


Figura 13 | Proteína total enzimas de proceso asociadas a Ag43.

12[ul] por canal. 1) Pierce™ Prestained Protein MW Marker, ThermoFisher cat#26612. 2) EGFP_Ag43. 3) ALY_Ag43. 4) OAL_Ag43. 5) DEHR_Ag43. 6) KDGA_Ag43.

La actividad de las enzimas inmovilizadas fue cuantificada mediante los mismos protocolos de determinación de actividad antes detallados (Cuantificación de la actividad enzimática, pág. 18). El volumen de fracción soluble fue reemplazado con la suspensión celular en PBS recién descrita. No se obtuvo actividad significativa para las versiones inmovilizadas de ALY, OAL y KDGA. Al igual que en la versión soluble, DEHR no pudo ser evaluada por falta de un método de medición relativamente simple/económico de implementar.

3 Programa computacional para diseño de cebadores para *Gibson assembly*

3.1 Generalidades de *Gibson assembly*

La técnica de ligación denominada *Gibson assembly* fue desarrollada en el instituto J. Craig Venter y licenciada por NEB. Permite la ligación simultánea de múltiples fragmentos, independientemente de su largo o de la necesidad de extremos compatibles, en una reacción isotérmica de menos de una hora en un solo tubo (Gibson et al., 2009).

La reacción de ligación se basa en la acción de tres enzimas:

1. Exonucleasa 5' → 3': genera extremos de hebra simple en cada fragmento de DNA a ligar.
2. DNA polimerasa: completa los *gaps* generados luego de la acción de la exonucleasa, la cual pierde actividad rápidamente.
3. DNA ligasa: cierra los *nicks* resultantes.

Los extremos de los fragmentos a ligar comparten regiones de similitud que permite la hibridación de las hebras simples complementarias luego de la acción de la exonucleasa. En la Figura 14 se esquematiza gráficamente el proceso de *Gibson assembly*.

El flujo de trabajo para realizar ligación por esta técnica consiste en:

1. Diseño de cebadores para amplificar los fragmentos. El plásmido base también puede ser amplificado por PCR. Los cebadores presentan extensión para renerar las regiones comunes entre los fragmentos (regiones de similitud).
2. Amplificación mediante PCR de los fragmentos con una polimerasa de alta fidelidad
3. Preparación del plásmido base utilizando enzimas de restricción o PCR con una polimerasa de alta fidelidad
4. Purificación, opcional, y determinación de la concentración de los fragmentos mediante electroforésis en gel de agarosa o Espectrofotómetro de micro-volumen
5. Adición de los fragmentos lineales la mezcla de reacción que contiene las enzimas antes descritas e incubación a 50 [°C] por 15 – 60 [min]
6. Transformación de bacterias en caso de productos de ligación circulares o uso como molde de PCR, u otra técnica, para productos de ligación lineales

El detalle del protocolo para realizar la ligación por este método se encuentra descrito en este trabajo (Apéndice F: Protocolos → *Gibson assembly*).

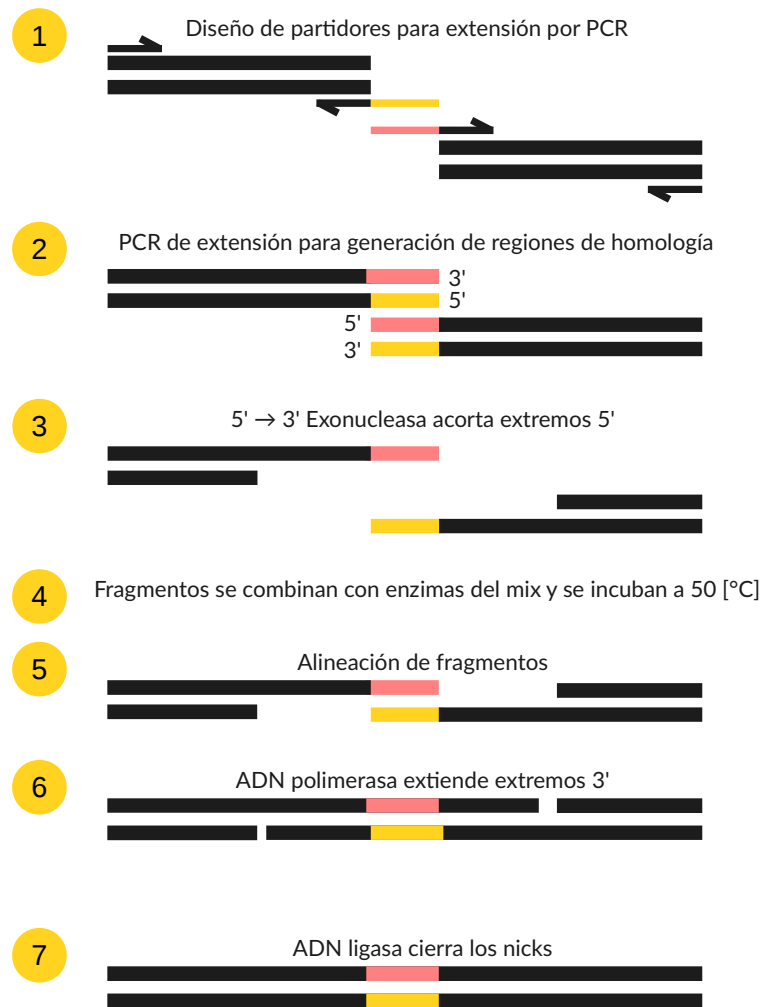


Figura 14 | Flujo de proceso ligación por Gibson Assembly.

Dentro de los puntos del flujo de trabajo antes mencionado, la etapa de diseño de cebadores requiere del cálculo de las propiedades de estos para cumplir, simultáneamente, con los requerimientos de un PCR junto a las consideraciones para las regiones de similitud generada entre las secuencias adyacentes. La suma de restricciones para cada partidor es (tener en consideración que se trata de un PCR de extensión):

1. La temperatura de fusión (T_m) de la región 3' del partidor – es decir, la región del partidor que hibrida directamente con el molde de DNA – debe tener ser superior a 45-48 [°C] e inferior a 72 [°C]. Esto es una recomendación general para cualquier partidor.
2. La T_m de la región 3' del partidor *forward* debe ser similar, ± 3 [°C], a la T_m de la región 3' del partidor *reverse*. Esto es una recomendación general para cualquier partidor.
3. La T_m del partidor completo – es decir, incluyendo la región 3' y la de extensión – debe tener ser superior a 45-48 [°C] e inferior a 72 [°C]. Esto es una recomendación general para cualquier partidor.

4. La T_m del partidor *forward* completo debe ser similar, ± 3 [°C], a la T_m del partidor *reverse* completo. Esto es una recomendación general para cualquier partidor.
5. La región de similitud (*overlap sequence*) formada por la unión de las extensiones de los extremos adyacentes de dos fragmentos debe tener una T_m superior a 48 [°C].

Encontrar un diseño de cebadores que cumpla simultáneamente todos estos requisitos no es trivial, y su diseño manual puede resultar lento y propenso a errores, en particular, por manipulación manual de las secuencias. Existen algunos software de diseño de cebadores para *Gibson assembly*⁷. Entre ellos existen algunos que requieren licencia, mientras que, de todos los de libre uso ninguno entrega la funcionalidad de un diseño personalizado de los cebadores. Por ejemplo, el usuario quisiera definir qué fragmentos generan extensión y cuales no, o qué T_m quiere para la región de similitud o para cada región o par de cebadores.

⁷ Entre otros:

NEBuilder <<http://nebuilder.neb.com/>>.

SIG-DNA, Gibson assembly[®] Primer Design Tool <<https://sgidna.com/gibson-assembly-primers.html>>.

SnapGene <http://www.snapgene.com/resources/gibson_assembly/>

3.2 Software PDTGA

A raíz de estos antecedentes, en el marco de este trabajo de tesis, se realizó el diseño y programación de un software para diseño personalizado de cebadores para *Gibson assembly*. Se trata de un software con acceso desde navegador web. Está programado en lenguajes web estándar: PHP, HTML, CSS y toda la funcionalidad en Javascript/jQuery. Esta elección de utilizar Javascript permite que los cálculos sean realizados directamente en el computador del cliente (usuario) sin necesidad de consulta al servidor. Dado que los cálculos son simples/rápido no se requiere de la potencia de un servidor para entregar los resultados oportunamente. Además disminuye el tiempo de diseño, al no requerir interacción cliente-servidor repetidas veces.

3.2.1 Descripción de funcionalidades

Se comenzó con la construcción del software, denominado PDTGA – *primer design tool for Gibson assembly*, en una primera versión de prototipo, disponible en <http://cofla.cl/gibson/> con la mayor parte funcional implementada. Luego se pasó a una segunda versión con mejora de interfaz, sesión de usuario y diseño automático (opcional) de los cebadores <http://pdtga.cofla.cl/>. Se espera contar pronto con una versión en funcionamiento en servidores del CeBiB <http://cebib.cl/>.

El código javascript/jquery que define los cálculos de los cebadores y las regiones de homología se encuentra en los anexos de este documento (Apéndice E: Material suplementario → Código jquery software diseño de cebadores), así como en línea <http://pdtga.cofla.cl/wp-content/themes/pdtga/inc/js/diegol-gibson.js>.

El software está montado sobre un gestor de contenidos⁸ que cuenta con funcionalidades relacionadas a la gestión de usuarios. PDTGA ofrece la posibilidad que cualquier persona cree un usuario dentro del sistema que le permita guardar sus diseños y secuencias. Sin embargo, también permite realizar un diseño sin necesidad de un registro, pero los datos se pierden al cerrar el navegador/pestaña. Cualquier persona puede registrar una cuenta, sin necesidad de permisos o pagos.

En cuanto al funcionamiento del diseño de cebadores, PDTGA requiere, primeramente, que el usuario ingrese la secuencia de los fragmentos a ligar, incluyendo la secuencia del plásmido base. Estas secuencias deben estar dispuestas en el orden final de ligación. El software ofrece la posibilidad de reorganizar el orden de los fragmentos. Las secuencias deben empezar en la posición inicial de la ligación, al igual que en el término, es decir, no ofrece la posibilidad de establecer por separado la posición de inicio o término de la región a amplificar. Se debe escoger también el la topología del producto de ligación, es decir, si se trata de un constructo lineal o circular.

Una vez ingresadas las secuencias de cada fragmento a ligar y su topología (lineal o circular), el usuario cuenta con dos opciones: realizar un diseño manual o uno automático. Para realizar un diseño manual, el usuario debe ingresar cuatro parámetros para cada fragmento: el largo de la región 3' del partidor *forward*, es decir, el número de pares de bases que tendrá el partidor basado en la secuencia del molde de DNA desde el inicio de la secuencia entregada para el fragmento; el largo de la región de extensión del partidor, es decir, el número de pares de bases que tendrá el partidor basado en la secuencia del fragmento adyacente (en dirección 5' en este caso) desde el

⁸ Wordpress <http://wordpress.org/>

final de la secuencia entregada para el fragmento adyacente; y análogamente para el partidor *reverse*.

En base a estos cinco parámetros (secuencia y largos de cebadores) el software calcula la secuencia del par de cebadores para cada fragmento. Luego el usuario puede mover los largos de las dos regiones de cada partidor para obtener las T_m deseadas tanto para las dos regiones de cada partidor como para la región de similitud generada por la extensión de los cebadores de dos fragmentos adyacentes.

Por otra parte, el diseño automático de cebadores realiza los cálculos para que las T_m de cada par de cebadores sea lo más similar posible y cumplir al mismo tiempo con la T_m mínima requerida para las regiones de similitud. Esta opción considera que, para cada fragmento, se permita o no que los cebadores tengan extensión (a través de la opción *Allow extension*).

Para cada fragmento, partidor y región de similitud, se calcula su largo, T_m , T_m ajustada por sales ($T_{m,adj}$), peso molecular y porcentaje de bases GC, como parámetros importantes de diseño.

3.2.2 Descripción de interfaz

La interfaz (Figura 15) cuenta con cuatro columnas. En la primera columna se identifica al comienzo al usuario y proyecto que se está visualizando. Entrega la opción de renombrar el proyecto. Luego, en *SETUP*, está la opción para agregar un fragmento a la ligación, en la segunda columna se agrega, y de definir la topología – lineal o circular – de la ligación. Más abajo se encuentra el botón *Automátic design* de cebadores, cuya función fue antes descrita. Para el diseño se puede asignar las T_m mínimas para cada partidor y para la región de similitud. En *Configuration* se puede ajustar la concentración de sales, utilizada para el cálculo de la T_m ajustada por sales ($T_{m,adj}$). Con *Load/Save* se guarda el proyecto actual o se cargan proyectos guardados con anterioridad en la sesión de usuario actual. De la misma forma, con *Delete* se elimina el proyecto actual y con *New design* se crea uno nuevo, descartando los cambios realizados al proyecto actual.

Finalmente, las siguientes tres columnas muestran los fragmentos a ligar, los cebadores y las regiones de similitud generadas según los parámetros entregados. Cada una de estas secuencias puede ser escondida con el botón al costado del nombre de la secuencia. A los fragmentos es posible modificar su nombre así como arrastrarlos para reorganizar su orden.

User **[Logout]**
diegol

Project
ALY

SETUP

+ Add a fragment

Morphology

Linear

Circular

⚡ Automatic design

⚙️ Configuration

📁 Load

💾 Save

🗑️ Delete

📄 New design

Fragments

Show all Hide all

pET22_pekB

ALY (-TAA)

Primer lengths

FWD: 19
Extension FWD: 14
REV: 20
Extension REV: 16

Allow extension

Sequence

```
GCGACGATCAATAATGCTGGGTTGAAGATGGTTGGAG
TAACTGGAATGAACAGAACCTGCAGCTATCTCAGGTA
CTGCCTATATAGGCTCTAATCATTAAMATTCAMGCTAG
```

pET22_HIS_tag

Primers

Show all Hide all

ALY (-TAA) (forward)

Primer Tm is greater than recommended (68 °C)

5' - | AGCCGGCGATGGCCGCGACGATCAATAATGCTG
| - 3'

Sequence details

Length: 33 bp Tm: 69.4 °C Tm_adj: 78.9 °C
MW: 10188 g/mol GC: 60%

3' region sequence details

Length: 19 bp Tm: 48.9 °C Tm_adj: 55.2 °C
MW: 5836 g/mol GC: 47%

ALY (-TAA) (reverse)

5' - |
GGTGGTGGTGGTGGTATTAGTTCTACGCGTGTAAAC |
- 3'

Sequence details

Length: 36 bp Tm: 67.9 °C Tm_adj: 77.8 °C
MW: 11249 g/mol GC: 52%

3' region sequence details

Length: 20 bp Tm: 47.7 °C Tm_adj: 54.3 °C
MW: 6107 g/mol GC: 40%

Overlap regions

Show all Hide all

pET22_pekB - ALY (-TAA)

5' - | AGCCGGCGATGGCC | - 3'

Sequence details

Length: 14 bp Tm: 49.1 °C Tm_adj: 52.5 °C
MW: 4289 g/mol GC: 78%

ALY (-TAA) - pET22_HIS_tag

5' - | CACCACCACCACCACC | - 3'

Sequence details

Length: 16 bp Tm: 51.1 °C Tm_adj: 55.8 °C
MW: 4685 g/mol GC: 68%

Figura 15 | Vista de pantalla del software PDTGA.

Conclusiones y perspectivas

Durante el desarrollo de este trabajo se pudo concretar diversos logros así como fracaso de diseños experimentales sin el resultado esperados. Surgen, también, múltiples desafíos que permitirán concretar la propuesta planteada.

Se concretó, en primer lugar, la expresión heteróloga de las cuatro enzimas de proceso necesarias para la ruta propuesta de conversión de alginato en ácido pirúvico y gliceraldehído. De estas cuatro enzimas, tres demuestran tener actividad sobre el sustrato planeado, mientras que una de ellas no cuenta con un método de determinación de actividad factible técnica/económicamente en este momento, sin embargo, debido al trabajo de otros autores, se encuentra demostrada su actividad (Enquist-Newman et al., 2014). Dado esta primera validación, resulta necesario ahora que las actividades enzimáticas deban ser calculadas en forma específica y en términos de productividad/rendimiento respecto del sustrato/cultivo, con el fin de estimar la factibilidad técnica y económica de este proceso.

De estas cuatro enzimas de proceso, la alginato liasa se presenta como una interesante alternativa de estudio. Su secuencia, tanto aminoacídica como nucleotídica, no se encuentra hasta el momento reportada – máxima similitud obtenida es del 93% respecto de las bases de datos públicas - por lo que se podría tratar de una nueva enzima. Dado su grado de similitud a dos alginato liasas antes reportadas, podría esta pertenecer a la familia con pocos miembros, distinta estructuralmente a las otras y con bajo nivel de caracterización: la PL18. Como es un gen proveniente de cepas antárticas, puede presentar, adicionalmente, actividad a baja temperatura, lo que puede resultar de gran importancia industrial.

La utilización de enzimas de proceso dependiente de cofactores en el proceso enzimático planteado, específicamente el requerimiento de NADH por parte de DEHR, podría ser visto como un factor limitante a la propuesta, dado el alto costo de estos. A nivel industrial, los procesos con enzimas inmovilizadas requieren de la regeneración de estos cofactores. Gracias a esto, existe numerosa investigación sobre estos procesos lo que conlleva a un alto nivel de conocimiento sobre la química de la regeneración de estas moléculas (Liu & Wang, 2007). En el caso particular de NADH numerosos métodos de regeneración eficiente de ha sido reportada (Orlich & Schomäcker, 2002), lo que reduce la incertidumbre sobre este punto.

La construcción del sistema de inmovilización y su análisis mediante fluorescencia entrega antecedentes nuevos e interesantes. Dado que se trabajó con una proteína fluorescente no susceptible de degradación por parte de tripsina, el estudio de Ag43 con esta enzima revela información que permite contrastar otros resultados obtenidos mediante este método. En otros estudios (Muñoz-Gutiérrez et al., 2014; Muñoz-Gutiérrez, Oropeza, Gosset, & Martínez, 2012) se emplea esta técnica para demostrar la exposición externa de una proteína de interés. El análisis del Gráfico 2 como de la Figura 12 revelan que el método de tripsina no tiene un efecto sobre las proteínas intracelulares (BFP en este caso), es decir, su acción no provoca, al menos una significativa, lisis celular. Muestra además que las proteínas con señal de exportación a periplasma (EGFP en este caso) son des-ancladas de la membrana externa, probablemente, debido a una desestabilización de ésta. Vale decir, es capaz de remover proteínas que no se encuentran expuestas al medio de cultivo/solución de suspensión bacteriana. Con esto, los métodos utilizados por los autores antes mencionados, y varios otros, podrían resultar no concluyentes. Pese a esto, y observando los resultados de fluorescencia para la proteína

fluorescente anclada unida a Ag43 (EGFP-Ag43) se observa que el tratamiento con tripsina es altamente eficiente para este caso, dando cuenta de una diferencia en la dinámica respecto de la versión periplasmática (EGFP) lo que puede ser explicado por la exposición externa de la proteína. Esto es un fuerte argumento a favor de la correcta exposición de la proteína.

Dentro de los fracasos de este trabajo cuenta los resultados negativos para la actividad de las enzimas de proceso unidas al sistema de exposición: ALY-Ag43, OAL-Ag43 y KDGA-Ag43. Existen varias razones que pueden explicar estos resultados negativos. Primero está la posibilidad de que las enzimas vean reducida en forma importante, o anulada, su actividad debido al anclaje. Esto podría ocurrir por cambios conformacionales debido a la unión al dominio TU de Ag43 o a impedimentos estéricos en su interacción con el sustrato por la presencia de la misma membrana u otros compuestos en la membrana – como lipo-poli-sacáridos u otras proteínas. Otro factor posible es la cepa utilizada para la expresión de los constructos ya que no existe, dentro de la literatura consultada, antecedentes previos del uso de ésta (BL21) para la exposición en superficie de proteínas. Esto resulta en un nuevo desafío que nace de este trabajo.

En el caso de OAL-Ag43 se debe tener en consideración el tamaño de la enzima, factor que puede comprometer su correcta excreción a periplasma así como su correcto plegamiento. Respecto de la actividad de KDGA-Ag43, dada su conformación de tetrámero resulta esperable la detección de nula actividad.

Sin embargo, resulta interesante poder determinar los factores que afectan a estos procesos de inmovilización en superficie celular dadas las ventajas que provee el sistema: recuperación del poder enzimático por centrifugación celular y simplificación de los procesos de lisis celular y purificación de productos, que conlleva también a una reducción en los costos de los procesos. Junto a esto, se ha demostrado también un aumento en la estabilidad enzimática producto de la inmovilización, lo que aumenta aún más el balance de costo-eficiencia en el empleo de esta técnica (Muñoz et al., 2014; Sun et al., 2015). (Muñoz-Gutiérrez et al., 2014).

El *software* de diseño de cebadores permitió la determinación de todos los cebadores de fragmentos utilizados en etapas de ligación de este trabajo. Experimentalmente, las temperaturas de pareamiento de los cebadores resultaron ser las predichas por el programa para la mayor parte de los casos, reduciendo así el número de iteraciones y el tiempo de trabajo en el laboratorio. Además permitió la incorporación de esta técnica por parte de otros investigadores del CeBiB: 12 usuarios en la primera versión y más de 7 usuarios con más de 34 diseños en la segunda versión.

Contando ya con esta segunda versión del software, se ha iniciado un proceso de trabajo conjunto a otro grupo del CeBiB – perteneciente a la Universidad de Santiago, Departamento de Ciencias de la Computación a cargo del profesor Mario Inostroza – con el fin de poner en marcha una tercera versión con algoritmos de optimización para el diseño automático de cebadores que permita entregar un mejor resultado, aumentando de esta forma las posibilidades de éxito en el trabajo de laboratorio. Ya se encuentra una *versión beta* de este trabajo conjunto disponible en línea <<http://bioserver2.diinf.usach.cl:8080/AutoPrimerX-web/>>.

Tomando en cuenta los logros obtenidos, los fracasos, así como los desafíos, la propuesta realizada en esta tesis abre posibilidades de nuevas investigaciones. La puesta en marcha de este proceso a nivel industrial requiere aún de numerosos estudios y etapas de desarrollo pero tiene su mirada puesta en el aprovechamiento de los recursos nacionales disponibles junto a un potenciamiento de su industria así como a la sustentabilidad de los procesos industriales del área biotecnológica.

Bibliografía

- Akita, O., Nishimori, C., Shimamoto, T., Fujii, T., & Iefuji, H. (2000, January 22). Transport of pyruvate in *Saccharomyces cerevisiae* and cloning of the gene encoded pyruvate permease. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry. <http://doi.org/10.1271/bbb.64.980>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10. [http://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](http://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Bhaskar, V., Kumar, M., Manicka, S., Tripathi, S., Venkatraman, A., & Krishnaswamy, S. (2011). Identification of biochemical and putative biological role of a xenolog from *Escherichia coli* using structural analysis. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 79, 1132–1142. <http://doi.org/10.1002/prot.22949>
- Bixler, H. J., & Porse, H. (2011). A decade of change in the seaweed hydrocolloids industry. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 321–335. <http://doi.org/10.1007/s10811-010-9529-3>
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., ... Glansdorff, N. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), 1453–62. <http://doi.org/10.1126/science.277.5331.1453>
- Chiang, C.-F., Okou, D. T., Griffin, T. B., Verret, C. R., & Williams, M. N. V. (2001). Green Fluorescent Protein Rendered Susceptible to Proteolysis: Positions for Protease-Sensitive Insertions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(2), 229–235. <http://doi.org/10.1006/abbi.2001.2537>
- da Silva, G. P., Mack, M., & Contiero, J. (2009). Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*, 27(1), 30–39. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.07.006>
- Devrimci, H. A., Yuksel, A. M., & Sanin, F. D. (2012). Algal alginate: A potential coagulant for drinking water treatment. *Desalination*, 299, 16–21. <http://doi.org/10.1016/j.desal.2012.05.004>
- Dong, S., Wei, T.-D., Chen, X.-L., Li, C.-Y., Wang, P., Xie, B.-B., ... Zhang, Y.-Z. (2014). Molecular insight into the role of the N-terminal extension in the maturation, substrate recognition, and catalysis of a bacterial alginate lyase from polysaccharide lyase family 18. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(43), 29558–69. <http://doi.org/10.1074/jbc.M114.584573>

- Draget, K., Smidsrød, O., & Skjåk-Bræk, G. (2005). Alginates from algae. *Biopolymers Online*, 1–30. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/3527600035.bpol6008/full>
- El-Mansi, E. M. T., & Holms, W. H. (1989). Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures. *Microbiology*, 135(11), 2875–2883. <http://doi.org/10.1099/00221287-135-11-2875>
- Enquist-Newman, M., Faust, A. M. E., Bravo, D. D., Santos, C. N. S., Raisner, R. M., Hanel, A., ... Yoshikuni, Y. (2014). Efficient ethanol production from brown macroalgae sugars by a synthetic yeast platform. *Nature*, 505(7482), 239–43. <http://doi.org/10.1038/nature12771>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J. C., Hutchison, C. a, & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–5. <http://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Gorin, P. A. J., & Spencer, J. F. T. (1966). Exocellular alginic acid from *Azotobacter vinelandii*. *Canadian Journal of Chemistry*, 44(9), 993–998. <http://doi.org/10.1139/v66-147>
- Gray, J. T., & Zolotukhin, S. (2012). Design and Construction of Functional AAV Vectors (pp. 25–46). http://doi.org/10.1007/978-1-61779-370-7_2
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C., & Ala'Aldeen, D. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 68(4), 692–744. <http://doi.org/10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004>
- Horn, S. J., Aasen, I. M., & Stgaard, K. (2000). Ethanol production from seaweed extract. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 25(5), 249–254. <http://doi.org/10.1038/sj.jim.7000065>
- Kreth, J., Lengeler, J. W., & Jahreis, K. (2013). Characterization of Pyruvate Uptake in *Escherichia coli* K-12. *PLoS ONE*, 8(6), e67125. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0067125>
- Lee, Y. S., Hodoscek, M., Brooks, B. R., & Kador, P. F. (1998). Catalytic mechanism of aldose reductase studied by the combined potentials of quantum mechanics and molecular mechanics. *Biophysical Chemistry*, 70(3), 203–216. [http://doi.org/10.1016/S0301-4622\(97\)00115-4](http://doi.org/10.1016/S0301-4622(97)00115-4)
- Li, L., Jiang, X., Guan, H., Wang, P., & Guo, H. (2011). Three Alginate Lyases from Marine Bacterium *Pseudomonas fluorescens* HZJ216: Purification and Characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164(3), 305–317. <http://doi.org/10.1007/s12010-010-9136-4>

- Li, Y., Chen, J., Liang, D.-F., & Lun, S.-Y. (2000). Effect of nitrogen source and nitrogen concentration on the production of pyruvate by *Torulopsis glabrata*. *Journal of Biotechnology*, 81(1), 27–34. [http://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00273-X](http://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00273-X)
- Liu, W., & Wang, P. (2007). Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances*, 25(4), 369–84. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.03.002>
- Mielenz, J. R. (2001). Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. *Current Opinion in Microbiology*, 4(3), 324–329. [http://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00211-3](http://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00211-3)
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <http://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Muñoz-Gutiérrez, I., Moss-Acosta, C., Trujillo-Martinez, B., Gosset, G., & Martinez, A. (2014). Ag43-mediated display of a thermostable b-glucosidase in *Escherichia coli* and its use for simultaneous saccharification and fermentation at high temperatures. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 106. <http://doi.org/10.1186/s12934-014-0106-3>
- Muñoz-Gutiérrez, I., Oropeza, R., Gosset, G., & Martinez, A. (2012). Cell surface display of a β -glucosidase employing the type V secretion system on ethanologenic *Escherichia coli* for the fermentation of cellobiose to ethanol. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(8), 1141–1152. <http://doi.org/10.1007/s10295-012-1122-0>
- Muñoz, C., Hidalgo, C., Zapata, M., Jeison, D., Riquelme, C., & Rivas, M. (2014). Use of cellulolytic marine bacteria for enzymatic pretreatment in microalgal biogas production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(14), 4199–206. <http://doi.org/10.1128/AEM.00827-14>
- Ochiai, A., Yamasaki, M., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Crystal Structure of Exotype Alginate Lyase Atu3025 from *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(32), 24519–24528. <http://doi.org/10.1074/jbc.M110.125450>
- Orlich, B., & Schomäcker, R. (2002). Enzyme Catalysis in Reverse Micelles (pp. 185–208). http://doi.org/10.1007/3-540-44604-4_6
- Ramesh, B., Sendra, V. G., Cirino, P. C., & Varadarajan, N. (2012). Single-cell characterization of autotransporter-mediated *Escherichia coli* surface display of disulfide bond-containing proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 38580–9. <http://doi.org/10.1074/jbc.M112.388199>
- Rehm, B. H. A. (2009). *Alginates: Biology and Applications*. (B. H. A. Rehm, Ed.) (Vol. 13). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <http://doi.org/10.1007/978-3-540-92679-5>

- Rinaldi, R. (2014). *Catalytic Hydrogenation for Biomass Valorization*. Royal Society of Chemistry.
- Roche, A. J., McFadden, J. P., & Owen, P. (2001). Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. *Microbiology*, *147*(1), 161–169. <http://doi.org/10.1099/00221287-147-1-161>
- Roesijadi, G., Jones, S. B., & Zhu, Y. (2010). Macroalgae as a Biomass Feedstock: A Preliminary Analysis (PNNL-19944), (September).
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning*. Retrieved from <http://nhjy.hzau.edu.cn/kech/jycz/jczs/ml-introduction/Content.pdf>
- Sawabe, T., Takahashi, H., Ezura, Y., & Gacesa, P. (2001). Cloning, sequence analysis and expression of *Pseudoalteromonas elyakovii* IAM 14594 gene (alyPEEC) encoding the extracellular alginate lyase. *Carbohydrate Research*, *335*(1), 11–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553350>
- Söding, J., Biegert, A., & Lupas, A. N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research*, *33*(Web Server issue), W244-8. <http://doi.org/10.1093/nar/gki408>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, *41*(1), 207–234. <http://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Sun, F., Pang, X., Xie, T., Zhai, Y., Wang, G., Sun, F., ... Klemm, P. (2015). BrkAutoDisplay: functional display of multiple exogenous proteins on the surface of *Escherichia coli* by using BrkA autotransporter. *Microbial Cell Factories*, *14*(1), 129. <http://doi.org/10.1186/s12934-015-0316-3>
- Takase, R., Ochiai, A., Mikami, B., Hashimoto, W., & Murata, K. (2010). Molecular identification of unsaturated uronate reductase prerequisite for alginate metabolism in *Sphingomonas* sp. A1. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, *1804*(9), 1925–1936. <http://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.05.010>
- Wargacki, A. J., Leonard, E., Win, M. N., Regitsky, D. D., Santos, C. N. S., Kim, P. B., ... Yoshikuni, Y. (2012). An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science (New York, N.Y.)*, *335*(6066), 308–13. <http://doi.org/10.1126/science.1214547>
- Wood, D. W., Setubal, J. C., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J. P., Okura, V. K., ... Nester, E. W. (2001). The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science (New York, N.Y.)*, *294*(5550), 2317–23. <http://doi.org/10.1126/science.1066804>

Xu, P., Qiu, J., Gao, C., & Ma, C. (2008). Biotechnological routes to pyruvate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 105(3), 169–75. <http://doi.org/10.1263/jbb.105.169>

--

Apéndices

Apéndice A: Lista de cepas

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA DEL RECURSO
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58		(Wood et al., 2001)
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> cepa B con DE3, un profago λ portando un gen de T7 RNA polymerasa and <i>lacI^q</i> F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB⁺</i>] _{K-12} (λ^S)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) pLysS	Con plásmido pLysS resistente a Cloramfenicol F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> λ (DE3 [<i>lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5</i>]) [<i>malB⁺</i>] _{K-12} (λ^S) pLysS[<i>T7p20 ori_{p15A}</i>](Cm ^R)	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> DH10B	<i>mcrA</i> Δ <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL endA1 nupG</i> Δ<i>dcm</i></i>	Invitrogen
<i>Escherichia coli</i> K-12 DH10B	K-12 wildtype F ⁻ λ^- <i>ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>	(Blattner et al., 1997)
<i>Escherichia coli</i> Top10	Cepa utilizada para clonamiento de rutina. F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1</i> λ^-	Invitrogen

Apéndice B: Lista de plásmidos

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA DEL RECURSO
pscAAV-GFP	Plásmido AAV (virus adeno-asociado). Porta el gen para EGFP, optimizado para expresión en células animales.	(Gray & Zolotukhin, 2012)
pGEMT-ALY	Plásmido de clonamiento portando el gen de una alginato liasa obtenido desde una especie no identificada de <i>Pseudoalteromonas</i> . Según la referencia, podría tratarse de <i>Pseudoalteromonas</i> sp. cepa IAM14594, sin embargo, por secuenciación, el gen solo presenta un 93% de identidad.	Salazar, Oriana. No publicado
pGEMT-Ag43	Plásmido de clonamiento portando el gen Ag43 (<i>Escherichia coli</i> antigen 43 precursor (agn43B) gene gb: AF233272.1).	Olivera, Álvaro. No publicado
pET22b	Plásmido de clonamiento y expresión en <i>E. coli</i> . Transcripción bajo el control del bacteriofago T7. Péptido de señal de exportación a periplasma pelB en N-terminal y His-Tag en C-terminal.	Novagen
pET22b-EGFP	EGFP insertada entre término de pelB y comienzo de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-ALY	ALY insertada entre término de pelB y comienzo de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-OAL	OAL insertada entre término de pelB y comienzo de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-DEHR	DEHR insertada entre término de pelB y comienzo de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-KDGA	KDGA insertada entre término de pelB y comienzo de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43	Ag43 (con sus dominios SP, PD y TU) insertada entre inicio de pelB y final de HisTag del plasmidio pET22b mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43-EGFP	El dominio pasajero (PD) del vector pET22b-Ag43 es reemplazado por el gen de EGFP mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43-ALY	El dominio pasajero (PD) del vector pET22b-Ag43 es reemplazado por el gen de EGFP mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43-OAL	El dominio pasajero (PD) del vector pET22b-Ag43 es reemplazado por el gen de EGFP mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43-DEHR	El dominio pasajero (PD) del vector pET22b-Ag43 es reemplazado por el gen de EGFP mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
pET22b-Ag43-KDGA	El dominio pasajero (PD) del vector pET22b-Ag43 es reemplazado por el gen de EGFP mediante Gibson assembly (sin cicatrices presentes)	Este trabajo
PET22b-BFP	PET22b clonado con un gen para una proteína fluorescente azul	Rodríguez, Vida. No

(BFP), de origen no determinado, siendo expresada intracelularmente
(sin péptido de señal pelB).

publicado

Apéndice C: Lista de cebadores

Regiones subrayadas representan colas del partidor para generación de regiones de homología para ligación mediante Gibson assembly.

CEBADOR	SECUENCIA 5' → 3'	NOTA
ALY_Ag43_fwd	<u>CTCCCGGTGCTGGCCGCGACGATCAATAATGCT</u>	Obtención del gen ALY. Cola de homología a SP.
ALY_Ag43_rev	<u>GAGGCGAGAGTGACATTCGTATTAGTTCTACGCGTGTAAC</u> C	Obtención del gen ALY. Cola de homología a TU.
ALY_fwd	<u>AGCCGGCGATGGCCGCGACGATCAATAATGCTG</u>	Obtención del gen ALY. Cola de homología a pelB.
ALY_rev	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGATTAGTTCTACGCGTGTAAC</u>	Obtención del gen ALY. Cola de homología a HisTag.
DEHR_Ag43_fwd	<u>TCCCGGTGCTGGCCATGACTAAACCTGTAATCGG</u>	Obtención del gen DEHR. Cola de homología a SP.
DEHR_Ag43_rev	<u>GGCGAGAGTGACATTCGTCTTCTCTAGTTTAGCGAAGT</u>	Obtención del gen DEHR. Cola de homología a TU.
DEHR_fwd	<u>AGCCGGCGATGGCCATGACTAAACCTGTAATCGG</u>	Obtención del gen DEHR. Cola de homología a pelB.
DEHR_rev	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGCTTCTCTAGTTTAGCGAAG</u>	Obtención del gen DEHR. Cola de homología a HisTag.
EGFP_Ag43_fwd	<u>GTGCTGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCT</u>	Obtención del gen EGFP. Cola de homología a SP.
EGFP_Ag43_rev	<u>GAGAGTGACATTCGTCTTGTAGAGCTCGTCCATGCCGAG</u> A	Obtención del gen EGFP. Cola de homología a TU.
EGFP_fwd	<u>AGCCGGCGATGGCCATGGTGAGCAAGGGCG</u>	Obtención del gen EGFP. Cola de homología a pelB.
EGFP_rev	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGCTTGTAGAGCTCGTCCATG</u>	Obtención del gen EGFP. Cola de homología a HisTag.
KDGA_Ag43_fwd	<u>TCCCGGTGCTGGCCATGCCGCAGTCCGC</u>	Obtención del gen KDGA. Cola de homología a SP.
KDGA_Ag43_rev	<u>GGCGAGAGTGACATTCGTGCAAAGCTTGAGCTGTTG</u>	Obtención del gen KDGA. Cola de homología a TU.
KDGA_fwd	<u>AGCCGGCGATGGCCATGCCGCAGTCCGC</u>	Obtención del gen KDGA. Cola de homología a pelB.
KDGA_rev	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGGCAAAGCTTGAGCTGTTG</u>	Obtención del gen KDGA. Cola de homología a HisTag.
OAL_Ag43_fwd	<u>CTCCCGGTGCTGGCCATGCGTCCCTCTGCC</u>	Obtención del gen OAL. Cola de homología a SP.
OAL_Ag43_rev	<u>AGGCGAGAGTGACATTCGTGAACTGCTTGGGAAGGG</u>	Obtención del gen OAL. Cola de homología a TU.
OAL_fwd	<u>AGCCGGCGATGGCCATGCGTCCCTCTGCC</u>	Obtención del gen OAL. Cola de homología a pelB.
OAL_rev	<u>GGTGGTGGTGGTGGTGGAACTGCTTGGGAAGG</u>	Obtención del gen OAL. Cola de homología a HisTag.
PET22_fwd	CACCACCACCACCACCACTGA	Amplificación de vector pET22(b)

PET22_rev	GGCCATCGCCGGCTGGG	desde después del término de HisTag Amplificación de vector pET22(b) hasta antes del inicio pelB.
PET22_TU_fwd	ACGAATGTCACTCTCGCCTC	Amplificación de vector pET22(b)-SP-EGFP-TU desde TU
PET22_SP_rev	GGCCAGCACCGGGAGT	Amplificación de vector pET22(b)-SP-EGFP-TU hasta SP
SP_fwd	<u>TTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAACGAC</u> ATCTGAATACCTGCTACAGG	Amplificación de péptido de señal SP de Ag43. Cola de homología a pET22(b).
SP_rev	<u>TGCTCACCATGGCCAGCACCGGGAGTGAC</u>	Amplificación de péptido de señal SP de Ag43. Cola de homología a GFP.
TU_fwd	<u>CTCTACAAGACGAATGTCACTCTCGCCTCCGGTGCCA</u>	Amplificación de dominio de anclaje (barril β) desde Ag43. Cola de homología a GFP.
TU_rev	<u>CCGAATTAATTCCGATATCCATGGTCAGAAGGTCACATTC</u> AGTGTGGCCTGACC	Amplificación de dominio de anclaje (barril β) desde Ag43. Cola de homología a pET22(b).

Apéndice E: Medios, soluciones, tampones, kits y reactivos

Apéndice E.1: Medios de cultivo

Medio ZYP5052

Contiene, por litro de agua destilada (Studier, 2005):

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	9 g
KH ₂ PO ₄	6,8 g
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	3,4 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
Glicerol	5 ml
Glucosa	0,5 g
Lactosa	2 g
Agua destilada	Hasta 1 L

Medio LB

Contiene, por litro de agua destilada (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989):

Triptona	16 g
Extracto de levadura	10 g
NaCl	10 g

Apéndice E.2: Soluciones

Mix de PCR

Buffer HF	10	ul
10 mM dNTPs	1	ul
10 μ M Cebador_fwd	2,5	ul
10 μ M Cebador_rev	2,5	ul
Molde DNA	1	ul
Phusion DNA Polymerase	0,5	ul
Agua libre de nucleasas	32,5	ul

2X Gibson assembly Master Mix

Adaptado a partir de referencia (Gibson et al., 2009):

5X Isothermal reaction buffer	26,67	%
T5 Exonucleasa	0,005	U/ul
Phusion DNA Polymerasa	0,033	U/ul
Taq DNA ligasa	5,333	U/ul
Agua libre de nucleasas	-	-

Apéndice E.3: Tampones

Phosphate-buffered saline (PBS)

NaCl	137	mM
KCl	2,7	mM
Na ₂ HPO ₄	10	mM
KH ₂ PO ₄	1,8	mM

5X Isothermal reaction buffer

PEG 8000	25	% p/v
Tris-Hcl pH 7.5	500	mM
MgCl ₂	50	mM
DTT	50	mM
dATP	1	mM
dCTP	1	mM
dGTP	1	mM
dTTP	1	mM
NAD ⁺	5	mM
Agua libre de nucleasas	-	-

Alginato 0,5% + sales

Alginato	0,5	%p/v
Tris	100	mM
KCl	50	mM
NaCl	50	mM

Ajustar a pH 7,5 con HCl

Apéndice E.4: Kits

GeneJET Gel Extraction Kit

Purificación rápida y eficiente de fragmentos de DNA a partir de geles agarosa de bajo punto de fusión corriendo en tampones TAE o TBE. Fabricante ThermoFisher Scientific, código de catálogo: #K0692.

<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0692>>

GeneJET Plasmid Miniprep Kit

El kit de minipreparación de plásmidos Thermo Scientific GeneJET utiliza una exclusiva tecnología de membrana a base de sílice en forma de una práctica columna de centrifugado. Recupera hasta 20 µg de ADN plasmídico de alto número de copias en procedimiento de aislamiento. Fabricante ThermoFisher Scientific, código de catálogo: #K0502.

<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0502>>

Apéndice E.5: Reactivos

Ácido pirúvico

Sigma-Aldrich cat#107360

Alginato de sodio

Sigma-Aldrich cat#180947

Antibióticos

Ampicilina. Ampicilina Sigma-Aldrich cat#A1593 fue disuelto en agua destilada 50%v/v y etanol analítico 50% v/v a una concentración final de 50 mg/ml.

Gliceraldehído

Sigma-Aldrich cat#G5001

LDH

Sigma-Aldrich cat#L2500

NADH

Sigma-Aldrich cat#10128023001

Tripsina

Tripsina de páncreas bovino Sigma-Aldrich cat#T8003 fue disuelto en agua destilada con 1 [mM] HCl a una concentración de 50 mg/L.

Apéndice F: Protocolos

Programa de PCR

Los primeros 5 ciclos son necesarios solo en caso de PCR de extensión.

	PASO	TEMPERATURA [°C]	TIEMPO [S]
X 5	Denaturación inicial	98	30
	Denaturación	98	10
	Pareamiento	T_A^L	15
	Extensión	72	20 s / kb
X 30	Denaturación	98	10
	Pareamiento	T_A^H	15
	Extensión	72	20 s / kb
	Extensión final	72	300

Tabla 5 | Programa de PCR amplificación de genes codificantes para enzimas de proceso.

T_A^L y T_A^H según Tabla 6. Mix según Apéndice E.2: Soluciones → Mix de PCR.

Temperaturas de pareamiento programa PCR

FRAGMENTO	T_A^L [°C]	T_A^H [°C]
PET22b-HisTag-pelB	58	58
EGFP_sol	48	70
ALY_sol	47	67
OAL_sol	45	69
DEHR_sol	46	67
KDGA_sol	46	69
SP	60	67
TU	65	70
PET22b-TU-SP	53	53
EGFP_Ag43	60	70
ALY_Ag43	45	67
OAL_Ag43	47	70
DEHR_Ag43	47	66
KDGA_Ag43	46	67

Tabla 6 | Temperaturas de pareamiento para los fragmentos amplificados por PCR

Gibson assembly

Las reacciones de ligación utilizando Gibson assembly (Gibson et al., 2009) fueron llevadas a cabo en volúmenes de 10 [ul]. Cada una de ellas consiste en 5 [ul] del 2X Gibson assembly Master Mix (Apéndice E.2: Soluciones), 25-50 [ng] del vector y 2-3 veces en exceso (molar) de

los insertos. Los insertos son incorporados en relación equimolar. La mezcla, preparada en hielo, es incubada a una temperatura de 50 [°C] por 1 hora.

Células quimiocompetentes y transformación bacteriana

Preparación de células quimiocompetentes:

1. Inocular medio LB a razón 1:1000 con cultivo bacteriano de 16 [h]
2. Crecer a 37 [°C], 250 [rpm] hasta $O.D_{600}=0,3$
3. Incubar en hielo por 10 [min]
4. Centrifugar por 10 [min], 5.000 [rpm] y 4 [°C]
5. Descartar sobrenadante
6. Resuspender el sedimento con 1/4 del volumen inicial de cultivo de $MgCl_2$ 0,1 [M]
7. Incubar en hielo por 5 [min]
8. Centrifugar por 10 [min], 5.000 [rpm] y 4 [°C]
9. Descartar sobrenadante
10. Resuspender el sedimento con 1/20 del volumen inicial de cultivo de $CaCl_2$ 0,1 [M]
11. Incubar en hielo por 20 [min]
12. Centrifugar por 10 [min], 5.000 [rpm] y 4 [°C]
13. Descartar sobrenadante
14. Resuspender el sedimento con 1/50 del volumen inicial de cultivo con una solución 85% $CaCl_2$ 0,1 [M] + 15% glicerol
15. Alicuotar (ej: 100 [ul]) y guardar a -80 [°C] hasta su utilización

Transformación:

1. Descongelar alícuota de células quimiocompetentes manteniendo la temperatura más baja posible
2. Mezclar ~ 2 [ul] de miniprep o 10 [ul] de producto de ligación por Gibson assembly con 100 [ul] de células quimiocompetentes
3. Incubar en hielo por 20 [min]
4. Incubar a 42 [°C] por 1 [min]
5. Incubar en hielo por 3 [min]
6. Agregar 9 volúmenes de LB
7. Incubar a 37 [°C] y agitación suave por 1 [h]
8. Plaquear 100 [ul] en LB con antibióticos relevantes para la selección

PCR de colonias

1. Resuspender una colonia – tomada con un asa o punta estéril – en 30 [ul] de agua estéril.
2. Homogenizar por pipeteo
3. Alicuotar 10 [ul] en un nuevo eppendorf y reservar el volumen restante (para inoculación de medio de cultivo en caso de resultados positivos)

4. Incubar los 10 [ul] a 98 [°C] por 10 [min]
5. Usar 1 [ul] de este producto como molde para una reacción de PCR de 50 [ul]

Digestión con enzimas de restricción

Para uso de enzimas NEB, se prepara un mix con:

- 1/10 v/v Tampón correspondiente (1.1, 2.1, 3.1 o CS)
- 1/50 v/v Enzima de restricción
- 1 ug DNA
- Completar con dH₂O

Incubar por 1 [h] a 37 [°C]. Desactivar por incubación según indicaciones del fabricante.

Apéndice G: Equipos

Fluorímetro: Thermo Scientific Fluoroskan Ascent

<<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/5210480>>

Micro-centrífuga: Hettich MIKRO 120

<<http://www.proscientific.com/centrifuges/mikro-120-microtube-package/>>

Espectrofotómetro: Hangzhou jungle – Scientific Instrument PCR Touch T960

<<http://www.biochrom.co.uk/product/44/biochrom-asy-uvm-340-microplate-reader.html>>

Espectrofotómetro de micro-volumen: MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer (MaestroGen Cat. No. MN-913)

<http://www.maestrogen.com/product_detail.asp?Pid=59>

Termociclador: Biochrom Asys UVM340 Microplate Reader

<http://www.jghz.com/en/products_detail/id-17.html>

Apéndice E: Material suplementario

Curva estándar DNS

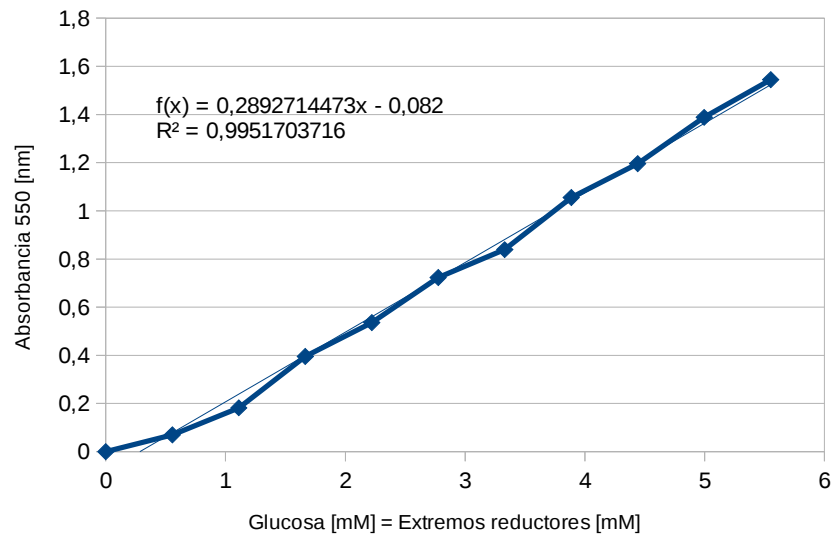


Gráfico 3 | Curva estándar DNS.

Glucosa:DNS = 1:1. Incubación 100 [°C] por 10 [min]. 150 [ul] en placa 96 pocillos

Curva estándar NADH

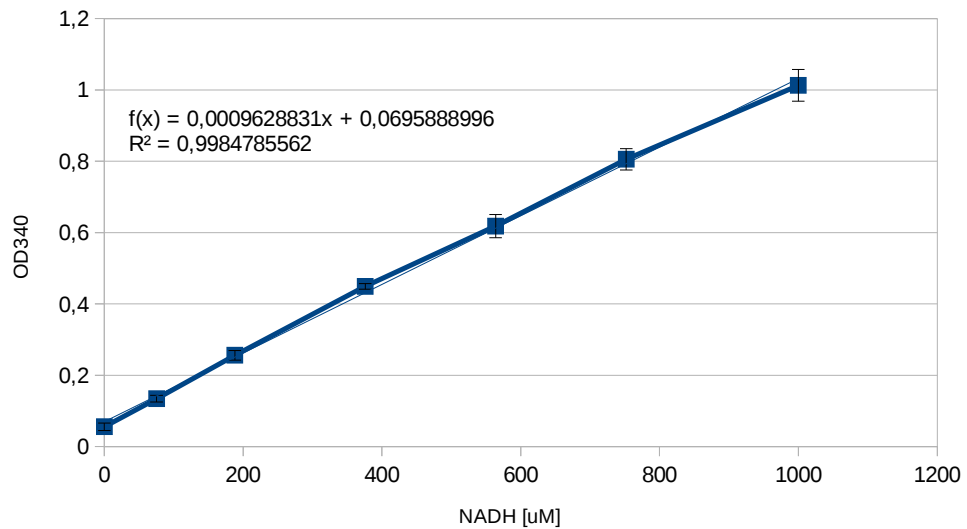


Gráfico 4 | Curva estándar NADH.

150 [ul] en placa 96 pocillos

Curva estándar ácido pirúvico por método NADH-LDH

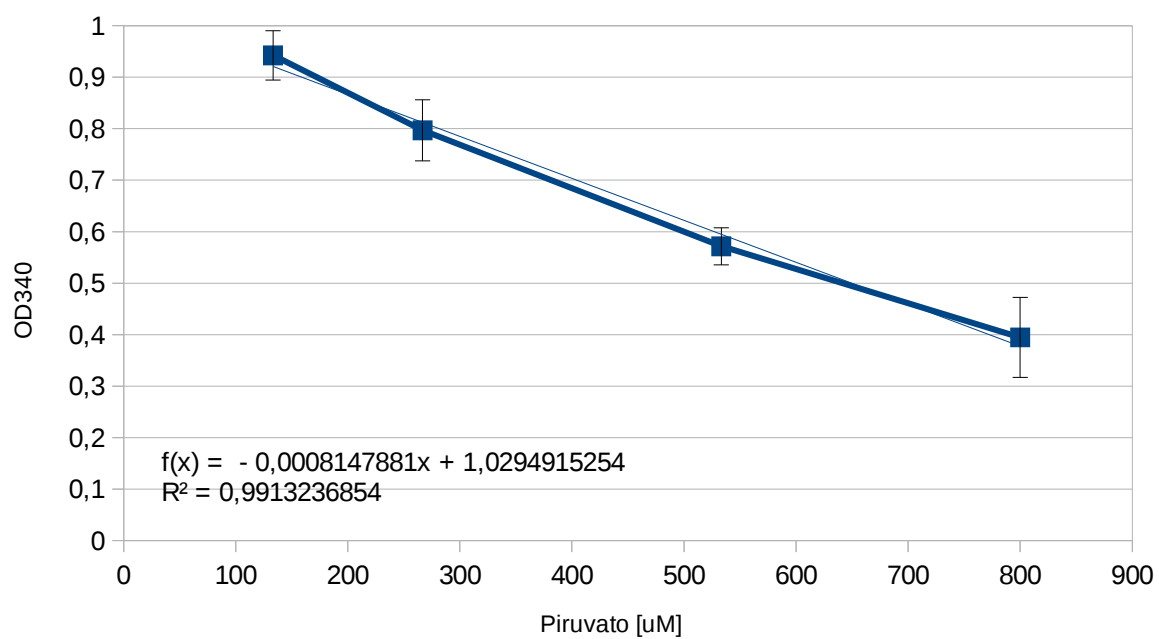


Gráfico 5 | Curva estándar ácido pirúvico determinado por método NADH-LDH.

Código jQuery software diseño de cebadores

```
function htmlspecialchars(str) {
  return str.replace('<', '&lt;').replace('>', '&gt;');
}
function mensaje_rapido(mensaje) {
  jQuery('#mensaje_rapido').html(mensaje);
  jQuery('#mensaje_rapido').show('fast').delay(2000).hide('fast');
}
function tm_secuencia(sequencia) {
  largo = sequencia.length;
  A = sequencia.replace(/^[^Aa]/g, '').length;
  T = sequencia.replace(/^[^Tt]/g, '').length;
  C = sequencia.replace(/^[^Cc]/g, '').length;
  G = sequencia.replace(/^[^Gg]/g, '').length;
  return calc_tm(largo, A, T, C, G);
}
function calc_tm(largo, A, T, C, G) {
  ret = '-';
  if (largo < 14)
    ret = (A + T) * 2 + (C + G) * 4;
  else
    ret = 64.9 + 41 * (C + G - 16.4) / (A + T + C + G);
  return '' + Math.floor(ret) + '.' + Math.round((ret - Math.floor(ret)) * 10);
}
function calc_tm_ajustado(largo, A, T, C, G) {
  Na = get_Na();
  ret = '-';
  if (largo < 14)
    ret = (A + T) * 2 + (G + C) * 4 - 16.6 * Math.log10(0.050) + 16.6 * Math.log10(Na / 1000);
  else
    ret = 100.5 + (41 * (G + C) / (A + T + G + C)) - (820 / (A + T + G + C)) + 16.6 *
    Math.log10(Na / 1000);
  /* if (largo >= 21)
    ret = 79.8 + 18.5 * Math.log10(Na / 1000) + (58.4 * (G + C) / (A + T + G + C)) + (11.8 * ((G +
    C) / (A + T + G + C)) * ((G + C) / (A + T + G + C))) - (820 / (A + T + G + C));*/
  return '' + Math.floor(ret) + '.' + Math.round((ret - Math.floor(ret)) * 10);
}
function calc_mw(A, T, C, G) {
  if (A !== 0 || T !== 0 || C !== 0 || G !== 0) {
    mw = A * 313.21 + T * 304.2 + C * 289.18 + G * 329.21 - 61.96;
    //return '' + Math.floor(mw) + '.' + Math.round((mw - Math.floor(mw)) * 10);
    return '' + Math.floor(mw);
  }
  else
    return '-';
}
function calc_gc(A, T, C, G) {
  if (A !== 0 || T !== 0 || C !== 0 || G !== 0) {
    gc = (C + G) / (A + T + C + G) * 100;
    //return '' + Math.floor(gc) + '.' + Math.round((gc - Math.floor(gc)) * 10);
    return '' + Math.floor(gc);
  }
  else
    return '-';
}
function complementario(sequencia) {
  sequencia = sequencia.replace(/g/g, "1");
  sequencia = sequencia.replace(/c/g, "2");
  sequencia = sequencia.replace(/1/g, "c");
  sequencia = sequencia.replace(/2/g, "g");
  sequencia = sequencia.replace(/G/g, "1");
  sequencia = sequencia.replace(/C/g, "2");
  sequencia = sequencia.replace(/1/g, "C");
  sequencia = sequencia.replace(/2/g, "G");

  sequencia = sequencia.replace(/a/g, "1");
  sequencia = sequencia.replace(/t/g, "2");
}
```



```

secuencia = secuencia.replace(/1/g, "t");
secuencia = secuencia.replace(/2/g, "a");
secuencia = secuencia.replace(/A/g, "1");
secuencia = secuencia.replace(/T/g, "2");
secuencia = secuencia.replace(/1/g, "T");
secuencia = secuencia.replace(/2/g, "A");
return secuencia;
}
function reverso(secuencia) {
return secuencia.split("").reverse().join("");
}
function complementario_reverso(secuencia) {
secuencia = complementario(secuencia);
return reverso(secuencia);
}
function get_Na() {
valor = parseInt(jQuery('#valor_Na').val());
if (valor > 0) {
return valor;
}
return 0;
}
function mostrar_detalle(secuencia, secuencia_3, campo_detalle, mostrar_tm, mostrar_tm_3) {
campo_detalle.empty();

largo = secuencia.length;
A = secuencia.replace(/^[Aa]/g, '').length;
T = secuencia.replace(/^[Tt]/g, '').length;
C = secuencia.replace(/^[Cc]/g, '').length;
G = secuencia.replace(/^[Gg]/g, '').length;

tm = '-';
tm_ajustado = '-';
gc = calc_gc(A, T, C, G);

if (largo > 0) {
campo_detalle.append(jQuery('<h6></h6>').addClass('txt').html('Sequence details'));
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('largo').html('Length: ' + largo + '
bp'));
if (mostrar_tm) {
tm = calc_tm(largo, A, T, C, G);
tm_ajustado = calc_tm_ajustado(largo, A, T, C, G);
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('tm').html('Tm: ' + tm + ' °C'));
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('tm tm_ajustado').html('Tm_adj: ' +
tm_ajustado + ' °C'));
}
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('pm').html('MW: ' + calc_mw(A, T, C, G) +
' g/mol'));
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('gc').html('GC: ' + gc + '% '));
}

largo_3 = secuencia_3.length;
A_3 = secuencia_3.replace(/^[Aa]/g, '').length;
T_3 = secuencia_3.replace(/^[Tt]/g, '').length;
C_3 = secuencia_3.replace(/^[Cc]/g, '').length;
G_3 = secuencia_3.replace(/^[Gg]/g, '').length;
tm_3 = '-';
tm_3_ajustado = '-';
gc_3 = calc_gc(A_3, T_3, C_3, G_3);

if (largo_3 > 0 && largo_3 < largo) {
campo_detalle.append(jQuery('<h6></h6>').addClass('txt').html('3\ region sequence details'));
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('largo largo_3').html('Length: ' +
largo_3 + ' bp'));
if (mostrar_tm_3) {
tm_3 = calc_tm(largo_3, A_3, T_3, C_3, G_3);
tm_3_ajustado = calc_tm_ajustado(largo_3, A_3, T_3, C_3, G_3);
campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('tm tm_3').html('Tm: ' + tm_3 + ' °C'));
}
}
}

```

```

        campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('tm      tm_3      tm_ajustado
tm_3_ajustado').html('Tm_adj: ' + tm_3_ajustado + ' °C'));
    }
    campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('pm pm_3').html('MW: ' + calc_mw(A_3,
T_3, C_3, G_3) + ' g/mol'));
    campo_detalle.append(jQuery('<span></span>').addClass('gc gc_3').html('GC: ' + gc_3 + '% '));
    }
    if (largo_3 > 0 && largo_3 === largo) {
        tm_3 = tm;
    }
    return {tm: tm, tm_3: tm_3, gc: gc, gc_3: gc_3};
}
function limpiar(fragmento) {
    secuencia = fragmento.children('.secuencia').val();
    secuencia = secuencia.replace(/^[^ATCGatcg]/g, '');
    fragmento.children('.secuencia').val(secuencia);
    mostrar_detalle(secuencia, '', fragmento.children('.detalle'), 0, 0);
}
function es_lineal() {
    if (jQuery('.lineal_o_circular:checked').val() === 'lineal') {
        return true;
    }
    return false;
}
function actualizar_partidores() {
    partidores = jQuery('#partidores');
    estado_mostrar = [];
    partidores.children().each(function () {
        estado_mostrar.push(jQuery(this).children('p.detalle').css('display'));
    });
    partidores.empty();
    fragmentos = jQuery('#fragmentos').children('.fragmento');
    num = 1;
    fragmentos.each(function () {
        fragmento = jQuery(this);
        secuencia = fragmento.children('.secuencia').val();
        nombre = htmlspecialchars(fragmento.children('h3').children('.nombre').val());
        if (nombre === '')
            nombre = 'N/D';
        largo_fwd = fragmento.children('.largo_fwd').val();
        largo_rev = fragmento.children('.largo_rev').val();
        largo_fwd_ext = fragmento.children('.largo_fwd_ext').val();
        largo_rev_ext = fragmento.children('.largo_rev_ext').val();
        fwd = '';
        rev = '';
        fwd_ext = '';
        rev_ext = '';
        if (largo_fwd > 0)
            fwd = secuencia.substr(0, largo_fwd);
        if (largo_rev > 0)
            rev = complementario_reverso(secuencia).substr(0, largo_rev);
        if (largo_fwd_ext > 0) {
            if (fragmento.prev().length > 0) {
                secuencia_prev = fragmento.prev().children('.secuencia').val();
                fwd_ext = secuencia_prev.substr(secuencia_prev.length - largo_fwd_ext, secuencia_prev.length);
            } else {
                if (!es_lineal()) {
                    secuencia_prev = jQuery('#fragmentos').children('.fragmento:last-
child').children('.secuencia').val();
                    fwd_ext = secuencia_prev.substr(secuencia_prev.length - largo_fwd_ext, secuencia_prev.length);
                }
            }
        }
        if (largo_rev_ext > 0) {
            if (fragmento.next().length > 0) {
                secuencia_next = fragmento.next().children('.secuencia').val();
                rev_ext = complementario_reverso(secuencia_next.substr(0, largo_rev_ext));
            } else {
                if (!es_lineal()) {

```

```

        secuencia_next = jQuery('#fragmentos').children('.fragmento:first-child').children('.secuencia').val();
        rev_ext = complementario_reverso(secuencia_next.substr(0, largo_rev_ext));
    }
}
if (fwd.length > 0 || rev.length > 0 || fwd_ext.length > 0 || rev_ext.length > 0) {
    partidoses.append('<div></div>').addClass('partidor');
    partidor = partidoses.children(':last-child');
    if (fwd.length > 0 || fwd_ext.length > 0) {
        partidor.append(
            jQuery('<h3></h3>').append(
                '<span class="fa fa-exchange"></span>',
                '<span class="nombre">' + nombre + ' (forward)</span>',
                '<i class="muestra_esconde fa fa-toggle-on"></i>'
            ),
            jQuery('<div class="advertencias"></div>'),
            jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html('5\ - | '),
            jQuery('<span></span>').addClass('secuencia fwd_ext secuencia_ext').html(fwd_ext),
            jQuery('<span></span>').addClass('secuencia fwd').html(fwd),
            jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html(' | - 3\ '),
            jQuery('<p></p>').addClass('detalles fwd')
        );
        detalles_fwd = mostrar_detalles(fwd_ext + fwd, fwd, partidor.children('.detalles.fwd'), 1, 1);
        //advertencias
        if (largo_fwd_ext > 0 && largo_fwd <= 0) {
            add_advertencia(partidor, 'This primer only has extension. Give some length to 3\ region', 'error');
        }
        if (detalles_fwd['tm_3'] < 45) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer Tm is lower than recomend (45 °C)', 'alert');
        }
        if (detalles_fwd['tm'] > 68) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer Tm is greater than recomend (68 °C)', 'alert');
        }
        if (detalles_fwd['gc'] < 40) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer GC content is lower than recomend (40%)', 'alert');
        }
        if (detalles_fwd['gc'] > 60) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer GC content is greater than recomend (60%)', 'alert');
        }
    }
    if (rev.length > 0 || rev_ext.length > 0) {
        partidor.append(
            jQuery('<h3></h3>').append(
                '<span class="fa fa-exchange"></span>',
                '<span class="nombre">' + nombre + ' (reverse)</span>',
                '<i class="muestra_esconde fa fa-toggle-on"></i>'
            ),
            jQuery('<div class="advertencias"></div>'),
            jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html('5\ - | '),
            jQuery('<span></span>').addClass('secuencia rev_ext secuencia_ext').html(rev_ext),
            jQuery('<span></span>').addClass('secuencia rev').html(rev),
            jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html(' | - 3\ '),
            jQuery('<p></p>').addClass('detalles rev')
        );
        detalles_rev = mostrar_detalles(rev_ext + rev, rev, partidor.children('.detalles.rev'), 1, 1);
        //advertencias
        if (largo_rev_ext > 0 && largo_rev <= 0) {
            add_advertencia(partidor, 'This primer only has extension. Give some length to 3\ region', 'error');
        }
        if (detalles_rev['tm_3'] < 45) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer Tm is lower than recomend (45 °C)', 'alert');
        }
        if (detalles_rev['tm'] > 68) {
            add_advertencia(partidor, 'Primer Tm is greater than recomend (68 °C)', 'alert');
        }
    }
    if (detalles_rev['gc'] < 40) {

```

```

add_advertencia(partidor, 'Primer GC content is lower than recommended (40%)', 'alert');
}
if (detalles_rev['gc'] > 60) {
add_advertencia(partidor, 'Primer GC content is greater than recommended (60%)', 'alert');
}
}
partidor.addClass('partidor');
partidor.children('h3').children('.muestra_esconde').on('click', function () {
mostrar_esconder(jQuery(this).parent().parent());
});
if (estado_mostrar[num - 1] !== null && estado_mostrar[num - 1] === 'none') {
esconder(partidor);
}
num++;
}
});
}
function actualizar_ensambles() {
fragmentos = jQuery('#fragmentos').children('.fragmento');
ensambles = jQuery('#ensambles');
estado_mostrar = [];
ensambles.children().each(function () {
estado_mostrar.push(jQuery(this).children('p.detalles').css('display'));
});
ensambles.empty();
if (fragmentos.length > 1 || !es_lineal()) {
num = 1;
fragmentos.each(function () {
fragmento = jQuery(this);
if (fragmento.prev().length > 0 || !es_lineal()) {
fragmento_prev = '';
if (fragmento.prev().length > 0) {
fragmento_prev = fragmento.prev();
}
else {
if (!es_lineal()) {
fragmento_prev = jQuery('#fragmentos').children('.fragmento:last-child');
}
}
if (fragmento_prev === '') {
return;
}
ensambles.append(jQuery('<div></div>').addClass('ensamble'));
ensamble = ensambles.children(':last-child');
//aporte del gen
secuencia = fragmento.children('.secuencia').val();
secuencia_ensamble_gen = '';
largo_rev_ext = fragmento_prev.children('.largo_rev_ext').val();
secuencia_ensamble_gen = secuencia.substr(0, largo_rev_ext);
//aporte del gen previo
secuencia_prev = fragmento_prev.children('.secuencia').val();
secuencia_ensamble_gen_prev = '';
largo_fwd_ext = fragmento.children('.largo_fwd_ext').val();
secuencia_ensamble_gen_prev = secuencia_prev.substr(secuencia_prev.length - largo_fwd_ext,
secuencia_prev.length);
txt = '';
nom2 = htmlspecialchars(fragmento.children('h3').children('.nombre').val());
nom1 = htmlspecialchars(fragmento_prev.children('h3').children('.nombre').val());
if (nom1)
txt += nom1;
else
txt += 'N/D';
txt += ' - ';
if (nom2)
txt += nom2;
else
txt += 'N/D';
if (secuencia_ensamble_gen !== '' || secuencia_ensamble_gen_prev !== '') {
ensamble.append(

```

```

jQuery('<h3></h3>').append(
  '<span class="fa fa-tasks"></span>',
  '<span class="nombre">' + txt + '</span>',
  '<i class="muestra_esconde fa fa-toggle-on"></i>'
),
jQuery('<div class="advertencias"></div>'),
jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html('5\ - | '),
jQuery('<span></span>').addClass('cabecera'),
jQuery('<span></span>').addClass('secuencia_ensamble_gen_prev').html(secuencia_ensamble_gen_prev
),
jQuery('<span></span>').addClass('secuencia_ensamble_gen').html(secuencia_ensamble_gen),
jQuery('<span></span>').addClass('cabecera').html(' | - 3\ '),
jQuery('<p></p>').addClass('detalles')
);
detalles = mostrar_detalles(secuencia_ensamble_gen_prev + secuencia_ensamble_gen, '',
ensamble.children('.detalles'), 1, 0);
if (detalles['tm'] < 48) {
add_advertencia(ensamble, 'Overlap region must have Tm greater than 48 °C', 'error')
}
if (detalles['tm'] > 58) {
add_advertencia(ensamble, 'Overlap region Tm is recomended to in range 48 °C to 58 °C', 'alert')
}
ensamble.children('h3').children('.muestra_esconde').on('click', function () {
mostrar_esconder(jQuery(this).parent().parent());
});
if (estado_mostrar[num - 1] !== null && estado_mostrar[num - 1] === 'none') {
esconder(ensamble);
}
}
num++;
}
});
}
}
function add_fragmento() {
fragmentos = jQuery('#fragmentos');
fragmentos.children().each(function () {
esconder(jQuery(this));
});
fragmentos.append(jQuery('<div></div>').addClass('fragmento'));
fragmento = fragmentos.children(':last-child');
fragmento.append(
jQuery('<h3></h3>').append(
  '<i class="fa fa-bars"></i>',
  '<input type="text" placeholder="Fragment name" class="nombre" />',
  '<i class="muestra_esconde fa fa-toggle-on"></i>',
  '<i class="fa fa-remove mostrar_eliminar"></i>',
  '<p class="eliminar_confirmar"><span class="eliminar">Delete</span><span
class="cancela_eliminar">Cancel</span></p>'
),
jQuery('<h6></h6>').html('Primer lengths').addClass('txt'),
jQuery('<span></span>').html('FWD').addClass('col-md-6 col-sm-6 col-xs-12'),
jQuery('<input/>').attr({'type': 'number', 'placeholder': 'Forward length', 'min':
'0'}).addClass('largo largo_fwd col-md-6 col-sm-6 col-xs-12'),
jQuery('<span></span>').html('Extension FWD').addClass('col-md-6 col-sm-6 col-xs-12 extension'),
jQuery('<input/>').attr({'type': 'number', 'placeholder': 'Extension forward length', 'min':
'0'}).addClass('largo largo_fwd_ext col-md-6 col-sm-6 col-xs-12 extension'),
jQuery('<span></span>').html('REV').addClass('col-md-6 col-sm-6 col-xs-12'),
jQuery('<input/>').attr({'type': 'number', 'placeholder': 'Reverse length', 'min':
'0'}).addClass('largo largo_rev col-md-6 col-sm-6 col-xs-12'),
jQuery('<span></span>').html('Extension REV').addClass('col-md-6 col-sm-6 col-xs-12 extension'),
jQuery('<input/>').attr({'type': 'number', 'placeholder': 'Extension reverse length', 'min':
'0'}).addClass('largo largo_rev_ext col-md-6 col-sm-6 col-xs-12 extension'),
jQuery('<span></span>').html('Allow extension').addClass('col-md-6 allow_extension'),
jQuery('<input checked/>').attr({'type': 'checkbox'}).addClass('col-md-6
allow_extension_input'),
jQuery('<h6></h6>').html('Sequence').addClass('sequence_title txt'),
jQuery('<textarea></textarea>').attr({'placeholder': 'Fragment
sequence'}).addClass('secuencia'),

```

```

jQuery('<p></p>').addClass('detalles')
);
    //fragmento.children('h3').children('.nombre').val('Fragment
jQuery('#fragmentos').children().index(fragmento) + 1));
fragmento.children('h3').children('.muestra_esconde').on('click', function () {
mostrar_esconder(jQuery(this).parent().parent());
});
fragmento.children('h3').children('.mostrar_eliminar').on('click', function () {
jQuery(this).parent().children('.eliminar_confirma').toggle();
});
    fragmento.children('h3').children('.eliminar_confirma').children('.eliminar').on('click',
function () {
jQuery(this).parent().parent().parent().remove();
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
mensaje_rapido('Deleted');
});
    fragmento.children('h3').children('.eliminar_confirma').children('.cancela_eliminar').on('click'
, function () {
jQuery(this).parent().hide();
});
    fragmento.children('.secuencia, h3 input, .largo_fwd, .largo_rev, .largo_fwd_ext,
.largo_rev_ext').bind('paste cut keyup', function () {
limpiar(jQuery(this).parent());
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
});
    fragmento.children('h3').children('.nombre').bind('paste cut keyup', function () {
limpiar(jQuery(this).parent().parent());
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
});
    fragmento.children('.largo_fwd, .largo_rev, .largo_fwd_ext, .largo_rev_ext').bind('mouseup',
function () {
limpiar(jQuery(this).parent());
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
});
    fragmento.children('.allow_extension_input').change(function () {
jQuery(this).siblings('.extension').toggle();
});
esconder(fragmento);
mostrar_esconder(fragmento);
}
function mostrar_esconder(fragmento) {
if (fragmento.prop('visible') === undefined || fragmento.prop('visible') === true) {
esconder(fragmento);
}
else {
mostrar(fragmento);
}
}
function mostrar(fragmento) {
fragmento.children().not('h3').show();
fragmento.children('h3').children('.muestra_esconde').removeClass('fa-toggle-off');
fragmento.children('h3').children('.muestra_esconde').addClass('fa-toggle-on');
fragmento.prop('visible', true);
}
function esconder(fragmento) {
fragmento.children().not('h3').hide();
fragmento.children('h3').children('.muestra_esconde').removeClass('fa-toggle-on');
fragmento.children('h3').children('.muestra_esconde').addClass('fa-toggle-off');
fragmento.prop('visible', false);
}
function guardar() {
if (jQuery('#project_name').val() === '') {
mensaje_rapido('Give your proyect a name');
return;
}
}

```

```

jQuery(dame_el_form(true)).appendTo('body').submit();
}
function dame_el_form(con_cabecera) {
var form = jQuery('<form></form>');
jQuery(form).hide().attr('method', 'post').attr('action', '');
if (con_cabecera) {
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name',
'project_name').val(jQuery('#project_name').val());
jQuery(form).append(input);

var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'guardar').val('');
jQuery(form).append(input);
}

var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name',
'lineal_o_circular').val(es_lineal());
jQuery(form).append(input);

var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'na').val(get_Na());
jQuery(form).append(input);

fragmentos = jQuery('#fragmentos .fragmento');
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'nombre' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('h3').children('.nombre').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'secuencia' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.secuencia').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'largo_fwd' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.largo_fwd').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'largo_rev' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.largo_rev').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'largo_fwd_ext' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.largo_fwd_ext').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'largo_rev_ext' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.largo_rev_ext').val());
jQuery(form).append(input);
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'allow_extension_input' +
i).val(fragmentos.eq(i).children('.allow_extension_input').prop("checked"));
jQuery(form).append(input);
}
return form;
}
function dame_el_json(con_cabecera) {
return JSON.stringify(dame_el_form(con_cabecera).serializeArray());
}
function cargar_data() {
if (raw_data !== undefined && raw_data !== '') {
var raw = jQuery.parseJSON(raw_data);
if (raw.lineal_o_circular === true) {
// es lineal
jQuery('#lineal').prop('checked', true);
}
else {
// es circular
jQuery('#circular').prop('checked', true);
}
jQuery('#valor_Na').val(raw.na);
for (i = 0; true; i++) {
if (raw['nombre' + i] !== undefined) {
if (i !== 0) {
add_fragmento();
}
fragmento = jQuery('#fragmentos .fragmento:last-child');
fragmento.children('h3').children('.nombre').val(raw['nombre' + i]);
}
}
}

```

```

fragmento.children('.secuencia').val(raw['secuencia' + i]);
fragmento.children('.largo_fwd').val(raw['largo_fwd' + i]);
fragmento.children('.largo_rev').val(raw['largo_rev' + i]);
fragmento.children('.largo_fwd_ext').val(raw['largo_fwd_ext' + i]);
fragmento.children('.largo_rev_ext').val(raw['largo_rev_ext' + i]);
fragmento.children('.allow_extension_input').prop("checked", raw['allow_extension_input' + i]);
}
else {
break;
}
}
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
}
}
function eliminar() {
var form = jQuery('<form></form>');
jQuery(form).hide().attr('method', 'post').attr('action', '');
var input = jQuery('<input type="hidden" />').attr('name', 'eliminar').val('acc');
jQuery(form).append(input);
jQuery(form).appendTo('body').submit();
}
function add_advertencia(padre, advertencia, extraclass) {
padre = padre.children('.advertencias').last();
faclass = 'fa';
if (extraclass === 'alert') {
faclass += ' fa-bullhorn';
}
if (extraclass === 'error') {
faclass += ' fa-exclamation-triangle';
}
padre.append(
jQuery('<p></p>').html('<span class="' + faclass + '"></span><span>' + advertencia +
'</span>').addClass('advertencia ' + extraclass)
);
}
function auto_design() {
jQuery('#auto_design_errors span').html('');
jQuery('#auto_design_errors').hide();
// Setear a 0
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
fragmentos.eq(i).children('.largo_fwd').val(undefined);
fragmentos.eq(i).children('.largo_rev').val(undefined);
fragmentos.eq(i).children('.largo_fwd_ext').val(undefined);
fragmentos.eq(i).children('.largo_rev_ext').val(undefined);
}
// Que todos los fragmentos tengan secuencia
fragmentos = jQuery('#fragmentos .fragmento');
tm_min = parseInt(jQuery('#min_3_tm').val());
tm_overlap_min = parseInt(jQuery('#min_overlap_tm').val());
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
secuencia = fragmentos.eq(i).children('.secuencia').val();
if (secuencia.length < 1) {
jQuery('#auto_design_errors span').html('Some fragment sequence is empty');
jQuery('#auto_design_errors').show();
return;
}
}
// Fragmento por medio debe permitir extension
anterior = false;
primero = true;
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
chequeado = fragmentos.eq(i).children('.allow_extension_input').prop("checked");

```



```

if (primero) {
    primero = false;
    anterior = chequeado;
}
else {
    if (anterior === false && anterior === chequeado) {
        jQuery('#auto_design_errors span').html('Two consecutive fragments are disabled for extension in
it\'s primers');
        jQuery('#auto_design_errors').show();
        return;
    }
    else {
        anterior = chequeado;
    }
}
}

// Calculo de 3' de cada partidior
// veo que pueda hacer la Tm minima con la secuencia
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
    secuencia = fragmentos.eq(i).children('.secuencia').val();
    tm = tm_secuencia(secuencia);
    if (tm < tm_min) {
        jQuery('#auto_design_errors span').html('Can\'t reach minimum Tm for 3\' region primers in "' +
fragmento.children('h3').children('nombre').val() + "' fragment');
        jQuery('#auto_design_errors').show();
        return;
    }
}

//diseño las tm3'
anterior_tiene_extension = false;
este_tiene_extension = false;
siguiente_tiene_extension = false;
for (i = 0; i < fragmentos.length; i++) {
    este_tiene_extension = fragmentos.eq(i).children('.allow_extension_input').prop("checked");
    secuencia = fragmentos.eq(i).children('.secuencia').val();
    secuencia_rev = complementario_reverso(secuencia);
    secuencia_siguiente = '';
    secuencia_anterior = '';
    secuencia_siguiente_indice = -1;
    if (es_lineal()) {
        // si es anterior al último, tiene un siguiente
        if (i < fragmentos.length - 1) {
            secuencia_siguiente = fragmentos.eq(i + 1).children('.secuencia').val();
            siguiente_tiene_extension = fragmentos.eq(i + 1).children('.allow_extension_input').prop("checked");
            secuencia_siguiente_indice = i + 1;
        }
        // si es distinto del primero, tiene un anterior
        if (i > 0) {
            secuencia_anterior = fragmentos.eq(i - 1).children('.secuencia').val();
            anterior_tiene_extension = fragmentos.eq(i - 1).children('.allow_extension_input').prop("checked");
        }
        else {
            // si es el primero, el anterior es el último
            if (i === 0) {
                secuencia_anterior = fragmentos.eq(fragmentos.length - 1).children('.secuencia').val();
                anterior_tiene_extension = fragmentos.eq(fragmentos.length - 1).children('.allow_extension_input').prop("checked");
            }
            // sino es el anterior
            else {
                secuencia_anterior = fragmentos.eq(i - 1).children('.secuencia').val();
                anterior_tiene_extension = fragmentos.eq(i - 1).children('.allow_extension_input').prop("checked");
            }
        }
    }
}

```

```

// si es el último, el siguiente es el primero
if (i === fragmentos.length - 1) {
  secuencia_siguiente = fragmentos.eq(0).children('.secuencia').val();
  siguiente_tiene_extension = fragmentos.eq(0).children('.allow_extension_input').prop("checked");
  secuencia_siguiente_indice = 0;
}
// sino es el siguiente
else {
  secuencia_siguiente = fragmentos.eq(i + 1).children('.secuencia').val();
  siguiente_tiene_extension = fragmentos.eq(i + 1).children('.allow_extension_input').prop("checked");
  secuencia_siguiente_indice = i + 1;
}
}
secuencia_siguiente_rev = complementario_reverso(secuencia_siguiente);
secuencia_anterior_rev = complementario_reverso(secuencia_anterior);
//fwd
tm = 0;
posicion = 0;
while (tm < tm_min) {
  posicion++;
  partididor = secuencia.substr(0, posicion);
  tm = tm_secuencia(partididor);
}
if (posicion > 0) {
  fragmentos.eq(i).children('.largo_fwd').val(posicion);
}
//rev
tm = 0;
posicion = 0;
while (tm < tm_min) {
  posicion++;
  partididor = secuencia_rev.substr(0, posicion);
  tm = tm_secuencia(partididor);
}
if (posicion > 0) {
  fragmentos.eq(i).children('.largo_rev').val(posicion);
}

//fwd_ext y rev_ext
tm_fwd_ext = 0;
tm_rev_ext = 0;
posicion_fwd = secuencia.length;
posicion_rev = 0;
tm_total = 0;

if (secuencia_siguiente_indice !== -1) {
  while (tm_total < tm_overlap_min) {
    if (este_tiene_extension) {
      if (siguiente_tiene_extension) {
        if (parseInt(tm_fwd_ext) < parseInt(tm_rev_ext)) {
          posicion_fwd--;
        }
      }
      else {
        posicion_rev++;
      }
    }
    else {
      posicion_rev++;
    }
    else {
      posicion_fwd--;
    }
  }
  // fwd de la siguiente secuencia, basado en la actual
  partididor_fwd_ext = secuencia.substr(posicion_fwd, secuencia.length);
  tm_fwd_ext = tm_secuencia(partididor_fwd_ext);
  // reverso de la secuencia actual, basada en la siguiente
  partididor_rev_ext = secuencia_siguiente.substr(0, posicion_rev);
}

```

```

tm_rev_ext = tm_secuencia(partidor_rev_ext);
tm_total = tm_secuencia(partidor_fwd_ext + partidor_rev_ext);
}
}
if (posicion_rev > 0) {
fragmentos.eq(i).children('.largo_rev_ext').val(posicion_rev);
}
if (secuencia_siguiente_indice !== -1 && posicion_fwd < secuencia.length) {
fragmentos.eq(secuencia_siguiente_indice).children('.largo_fwd_ext').val(secuencia.length -
posicion_fwd);
}
}
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
jQuery('#auto_design').parent().hide();
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
mensaje_rapido('Done auto design');
}

jQuery(document).ready(function () {
jQuery('#fragmentos').sortable({
axis: 'y',
handle: '.fa-bars, .fa-exchange, .fa-tasks',
stop: function (event, ui) {
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
}
});
jQuery('.lineal_o_circular').change(function () {
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
});
jQuery('#add_fragmento').click(function () {
add_fragmento();
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
mensaje_rapido('Added');
});

jQuery('#guardar').click(function () {
guardar();
});
jQuery('#eliminar').click(function () {
eliminar();
});
jQuery('#configuracion, #select_lineal_circular').click(function () {
jQuery('#diseñador').hide();
jQuery('#configuracion_panel').show();
jQuery("input").keypress(function (event) {
if (event.which === 13) {
actualizar_Na();
event.preventDefault();
}
});
jQuery('#ok').click(function () {
actualizar_partidores();
actualizar_ensambles();
jQuery('#diseñador').show();
jQuery('#configuracion_panel').hide();
mensaje_rapido('Done');
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
});
jQuery('#cancelar, #ready').click(function () {
jQuery('#diseñador').show();
jQuery('#configuracion_panel').hide();
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
});
});
jQuery('.mostrar_todos').click(function () {

```

```

jQuery(this).parent().children('div').children('div').each(function () {
mostrar(jQuery(this));
});
});
jQuery('.esconder_todos').click(function () {
jQuery(this).parent().children('div').children('div').each(function () {
esconder(jQuery(this));
});
});
jQuery('.nombre_opcion').click(function () {
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
jQuery('.opciones_extra').hide();
jQuery(this).parent().addClass('menu_seleccionado');
jQuery(this).siblings('.opciones_extra').show();
});
jQuery('.cancel_opcion_extra').click(function () {
jQuery(this).parent().hide();
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
jQuery('#auto_design_errors').show();
});
jQuery('#auto_design').click(function () {
auto_design();
});
jQuery('#cargar').click(function () {
if (jQuery(this).children('.opciones_extra').html() === '') {
mensaje_rapido('No saved items found');
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
}
});
/*jQuery('#download').click(function () {
descarga = jQuery('<a></a>').prop({
href: 'data:text/plain;charset=UTF-8,' + encodeURIComponent(dame_el_json(false)),
download: 'pdtga.json',
id: 'descargar_ahora'
}).html('Download file');
jQuery('#download').parent().children('.opciones_extra').children('.boton').html(descarga);
jQuery('#descargar_ahora').click(function () {
jQuery('.opciones_extra').hide();
jQuery('menu div').removeClass('menu_seleccionado');
});
});
jQuery('#select_file').click(function () {
jQuery('#archivo_carga').click();
});*/
add_fragmento();
cargar_data();
}
);

```