

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