



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

INGENIERÍA METABÓLICA EN *ESCHERICHIA COLI*: ESTUDIO DE UNA
ENZIMA DE INTERÉS PARA LA RUTA DE BIOSÍNTESIS DE BUTANOL A PARTIR
DE LA RUTA DEL ISOVALERATO

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA
E INGENIERO CIVIL QUÍMICO

DANTON IGOR FREIRE FLORES

PROFESOR GUÍA:
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
BÁRBARA ANDREWS FARROW
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

SANTIAGO DE CHILE
2017

RESUMEN

Producto de la crisis energética actual y el consumo proyectado a futuro, se están buscando maneras de diversificar la matriz energética, abriéndose a diversas opciones de preferencia renovables. En este contexto surge la producción de energía a partir de biomasa como una alternativa viable debido principalmente a su carácter natural y renovable. Dentro de este tipo de energía los biocombustibles son candidatos prometedores debido a su capacidad de utilizarse en motores de combustión interna sin producir gases de efecto invernadero y sin la necesidad de modificar las tecnologías ya existentes para su uso, siendo el biobutanol la alternativa más destacada por sobre el resto.

La producción de este tipo de biocombustible se ha tendido a desarrollar en los últimos años en plataformas biológicas, los llamados biocombustibles de tercera generación, debido principalmente al fácil acceso a la materia prima, las algas, y a la mayor eficiencia económica que este tipo de producción ofrece.

La producción biológica del biobutanol se centra principalmente en dos rutas metabólicas: La ruta de síntesis de valina y la ruta de Ehrlich. Cinco enzimas regulan la síntesis del biobutanol mediante estas dos rutas metabólicas dentro de las cuales la que presenta los parámetros cinéticos más bajos y por ende es el cuello de botella del proceso de síntesis es la acetolactato sintasa.

El objetivo del presente trabajo consiste en encontrar una enzima acetolactato sintasa en un microorganismo que presente parámetros cinéticos superiores a la mayoría de las enzimas de este tipo, para posteriormente expresar esta enzima en *Escherichia coli* de forma heteróloga y comparar los resultados en la producción de isobutanol con la enzima nativa de la bacteria. Se pretende además realizar mediante diseño racional *in silico* una mutación en la enzima heteróloga con el fin de mejorar la eficiencia catalítica de esta.

Mediante búsqueda bibliográfica se determinó que la enzima acetolactato sintasa de *Klebsiella pneumoniae* posee parámetros cinéticos que la hacen una opción atractiva para este estudio. Se realizaron mutaciones sitio-dirigidas *in silico* en esta enzima y se estimaron los aumentos en la afinidad entre la enzima y el ligando. La mutación Y543R de la enzima presenta el mayor aumento en la afinidad por el sustrato dentro de las opciones probadas con un aumento del 12% en comparación con la original.

No se logró expresar la enzima de forma heteróloga en los experimentos de laboratorio debido a un error en el diseño de promotores que resultó en la expresión de una enzima oxido-reductasa de tamaño similar a la acetolactato sintasa.

Se propone para futuros trabajos un ensayo de Nested PCR para la correcta obtención del gen que codifica la enzima acetolactato sintasa a partir del DNA genómico de *Klebsiella pneumoniae* y una vez expresada correctamente la enzima realizar las comparaciones tanto en los parámetros cinéticos como en la producción de isobutanol con la enzima nativa de *Escherichia coli* y con la enzima heteróloga mutada.

*“Ser un romántico viajero
y el sendero continuar
ir más allá del horizonte
do remonta la verdad
el desnudo de mujer
contemplar la realidad*

*brindemos camaradas por la universidad
en ánforas azules de cálida emoción
brindemos por la vida fecunda de ideal
sonriendo con el alma prendida en el amor*

*ser un romántico bohemio
cuyo en sueño es el querer
ver las amadas ya olvidadas
y dejadas al pasar
y en desnudo de mujer
contemplar la realidad*

*brindemos camaradas por la universidad
en ánforas azules de cálida emoción
brindemos por la vida fecunda de ideal
sonriendo con el alma prendida en el amor”*

DEDICATORIA

A los que están

A los que estuvieron

A los que estarán

AGRADECIMIENTOS

Por poder estar aquí hoy, yo Danton Freire, quiero agradecerles especialmente a:

- 1) Mi Familia
- 2) Mi Familia
- 3) Mi Familia
- 4) Mi Familia
- 5) Mi Familia
- 6) Mi Familia
- 7) Mi Familia
- 8) Mi Familia
- 9) Mi Familia
- 10) Mi Familia

Nadie más podría ocupar los 10 primeros lugares de mi lista. Ustedes lo han sido todo para mí. Todas las cosas que pudiese llegar a lograr profesionalmente, todos los éxitos, todas las celebraciones, todos los sueños no significarían nada si no los tuviera a ustedes a mi lado. Un grupo de personas que forja un lazo tan extraordinariamente fuerte a base de amor, de confianza, de estar ahí cuando el otro te necesita, de enseñarte cuando el otro se siente extraviado... Gracias a ustedes viejo, vieja, Bubu, Abuela Gaby, Tata Raúl, Abuela Elena, Tata Wense, Prim@s, Ti@s, etc... es que hoy soy quien soy y tengo la posibilidad de estar acá... así que si a alguien tengo que agradecerles es a ustedes! LOS AMO.

11) A mis amigos! Dicen que los amigos son las familia que uno escoge y por eso también quiero agradecerles el apoyo y los buenos momentos que hemos pasado, y el haber estado conmigo en los malos. El Team Down del nacional, los cabros de la sección 3, la Cabaña de la Droga y todos los otros que no me da el espacio aquí para poder nombrarlos... Gracias por todo chicos!

12) A los profesores. Ustedes tienen la difícil tarea de educar, y eso es una responsabilidad muy grande ya que están construyendo el mundo del mañana al momento de formar a las personas que lo habitaran. Gracias especialmente a los profesores del IN, que siempre además de enseñarte la materia se dejaban un espacio para recordarte que la vida no es solo aprenderse libros y formulas dejando espacio a lo humano (tan olvidado que esta hoy en nuestros días), al profesor Juan Asenjo por permitirme ser parte de este proyecto, a los profesores Álvaro Olivera y Bárbara Andrews por darse el tiempo de revisar mi trabajo y finalmente a José Duguet, quien con la paciencia de un monje estuvo conmigo guiándome en este proyecto y enseñándome todo paso a paso y de la mejor forma posible, muchas gracias José! Eres un excelente guía, un excelente profesional y una excelente persona.

13) Al Romántico Viajero y al Fútbol! Por ser un estilo de vida para mí.

Tabla de Contenido

1. Propósito.....	1
2. Introducción	1
2.1 Situación energética actual a nivel mundial	1
2.2 El potencial de la energía a partir de Biomasa.....	2
2.3 Biocombustibles: El Isobutanol	4
2.4 Producción biológica de biocombustibles: Biocombustibles de 3era generación.	8
2.5 Biosíntesis de isobutanol: Ruta de la valina y Ruta de Ehrlich.	10
2.6 Regulación de la ruta de la valina.	13
2.7 Acetolactato Sintasa.....	15
2.8 Softwares para modelamiento enzimático por diseño racional.....	17
3. Objetivos	21
3.1 General.....	21
3.2 Específicos	21
4. Metodologías.....	22
4.1 Acetolactato sintasa candidata para mutagenesis.	22
4.2 Definir mutación a realizar.	22
4.3 Extracción de DNA genómico del microorganismo.....	22
4.4 Análisis filogenético del microorganismo	22
4.4 Amplificación del gen <i>ilvK</i>	23
4.5 Ligación en vector pET22b mediante Gibson Assembly	23
4.6 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	23
4.7 Producción de la proteína recombinante.....	24
4.8 Purificación de la proteína recombinante	24
5. Resultados y Discusiones	26
5.1 Elección del microorganismo para trabajar.	26
5.2 Definir la mutación a realizar.	27
5.3 Extracción del DNA genómico del microorganismo, amplificación del 16S DNA y amplificación del gen <i>ilvK</i>	29
5.4 Ligación del gen <i>ilvK</i> en vector pET22b y transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	32
5.5 Producción de la proteína recombinante.....	37
5.6 Purificación de proteína recombinante.	39
5.6 Resultados de Secuenciación	40

6. Conclusiones y Recomendaciones	44
7. Bibliografía.....	45
8. Anexos.....	48
Anexo N°1: Secuencia nucleotídica gen <i>ilvK</i> (1680bp)	48
Anexo N°2: Secuencia aminoacídica enzima acetolactato sintasa.....	49
Anexo N°3: Mapa vector pET22b	50
Anexo N°4: Diseño de partidores	51
Anexo N°5: DNA & Protein Ladders.	51
Anexo N°6: Resultados de las secuenciaciones de los DNA 16S (DIFF1) y el inserto (DIFF6).	52

Índice de ilustraciones

Figura 1. Historial del consumo energético mundial y proyecciones.	1
Figura 2. Matriz energética Chilena.	2
Figura 3. Procesos de conversión, productos y aplicaciones.....	3
Figura 4. Diferentes métodos de producción de biocombustibles a partir de biomasa.	5
Figura 5. Factores que influyen en la evaluación de los biocombustibles.....	5
Figura 6. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biobutanol y Bioetanol comparados con el Petróleo.....	6
Figura 7. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biodiesel y BTL comparados con el Diésel Crudo.	6
Figura 8. Comparación de los costos de producción después de la corrección con densidades energéticas de los escenarios seleccionados.....	7
Figura 9. Rutas de biosíntesis de valina y leucina.....	11
Figura 10. Ehrlich Pathway.	12
Figura 11. Ruta de síntesis de biobutanol.....	13
Figura 12. A Estructura cristalizada de una ALS de <i>K. pneumoniae</i>	16
Figura 13. Estructura 3D de un monómero de la enzima acetolactato sintasa visualizada en el software UCSF Chimera.....	18
Figura 14. Visualización de la secuencia aminoacídica de la enzima acetolactato sintasa.	19
Figura 15. Selección de un aminoácido de interés candidato para mutagenesis.	19
Figura 16. Selección del rotámero del aminoácido a insertar en la estructura.....	20
Figura 17. Aminoácidos que componen el sitio activo de la enzima acetolactato sintasa de <i>K. pneumoniae</i> y su interacción con el cofactor TPP donde posteriormente se une el ligando 26	26
Figura 18. Electroforesis del DNA genómico de la cepa ATCC y TM.....	30
Figura 19. Amplificación del 16S DNA a la cepa <i>K. pneumoniae</i> ATCC, <i>K. pneumoniae</i> TM, <i>E. coli</i> (Control positivo) y control negativo.	31
Figura 20. PCR gradiente para la amplificación del gen <i>ilvK</i>	32
Figura 21. Electroforesis del pET22b Backbone.....	33
Figura 22. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b- <i>ilvK</i> . Placa N°1.	33
Figura 23. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b- <i>ilvK</i> . Placa N°2.	34
Figura 24. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin quimiotransformar (control negativo).	34
Figura 25. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b (control positivo).....	35
Figura 26. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°1.....	36
Figura 27. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°2.....	36
Figura 28. SDS PAGE de la primera electroforesis..	37
Figura 29. SDS PAGE de la segunda electroforesis.....	38
Figura 30. SDS PAGE de la electroforesis realizada con las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía.....	39

Figura 31. Análisis BLAST hecho entre la secuencia del inserto y el DNA genómico de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700660.....	41
Figura 32. Ubicación del gen codificante de la enzima oxido-reductasa en el genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700660.....	42
Figura 33. Análisis de complementariedad entre los partidores IlvkEc_FW y IlvkEc_RV con las secuencias complementarias del inserto.....	42
Figura 34. Secuencia aminoacídica obtenida a partir de la traducción de la secuencia nucleotídica del inserto.	43
Figura 35. Mapa del vector pET22b.....	50
Figura 36. Ladders utilizados en el presente trabajo de tesis.	51
Figura 37. Ladder de proteína utilizado en el presente trabajo de tesis.....	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales productos de la conversión de Biomasa	4
Tabla 2. Aporte de América Latina a la producción mundial de algarofitas en toneladas/año	9
Tabla 3. Aporte de América Latina a la producción mundial de algas productoras de ficocoloides en toneladas/año	9
Tabla 4. Exportaciones chilenas de algas y sus derivados entre 1998 y 2001.	10
Tabla 8. Moléculas intermediarias de la ruta de biosíntesis de valina y las enzimas que catalizan las reacciones.....	10
Tabla 9. Enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de valina y distintos microorganismos de donde provienen	14
Tabla 10. Valores de R para enzimas AHAS y ALS y los respectivos organismos de origen.....	17
Tabla 11. Resultados del Molecular Docking de las mutaciones.....	28
Tabla 12. Tabla resumen de los partidores utilizados en el presente trabajo de tesis.	51

1. Propósito

La presente memoria tiene como propósito el estudio de tres enzimas participantes en la ruta de síntesis de isobutanol en un organismo recombinante, para posteriormente escoger la enzima limitante entre estas tres y realizarle mejoras en cuanto a la capacidad catalítica mediante diseño racional de proteínas *in silico* en una primera instancia y posteriormente expresarla de forma heteróloga en *Escherichia coli*, con el fin de desarrollar una cepa utilizable en la industria de los biocombustibles.

2. Introducción

2.1 Situación energética actual a nivel mundial

En los últimos años se ha hecho cada vez más presente el tema de la “crisis energética” asociada al aumento sostenido del consumo de energía a nivel mundial, principalmente por parte de las economías emergentes y al agotamiento de las fuentes generadoras convencionales (Energy Information Administration, 2005). Se pronostica que para el año 2030 el consumo será un 25% mayor al actual, siguiendo la tendencia de la última década (ver Figura 1).

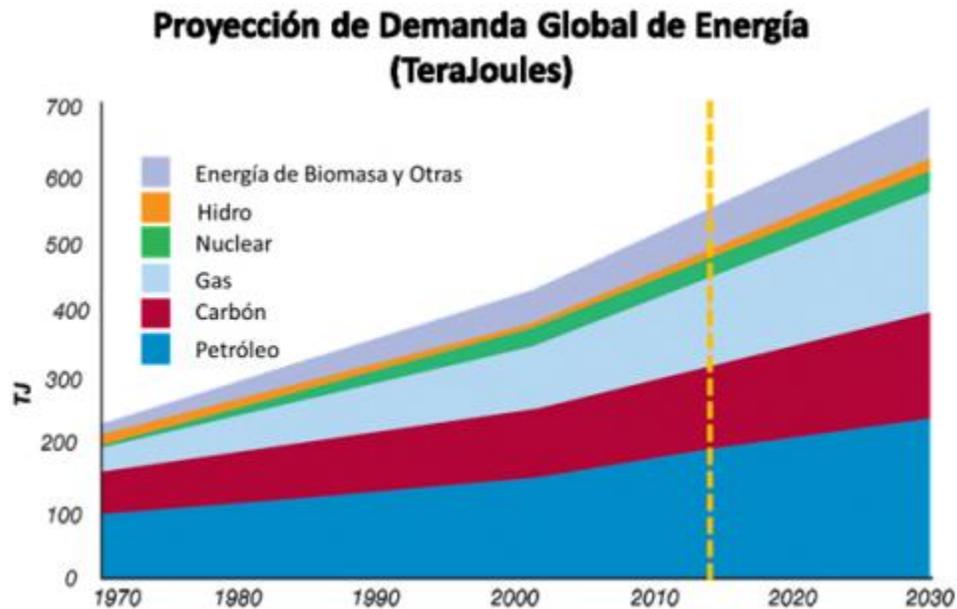


Figura 1. Historial del consumo energético mundial y proyecciones.

Consumo energético mundial, años 1970-2013 y proyecciones al 2030 (Artinaid Organization, 2013).

A partir del gráfico de la Figura 1 se deduce que en la actualidad cerca del 88% del consumo mundial de energía tiene su origen en fuentes no renovables: 35% corresponden al petróleo, 25% al gas natural, 20% al carbón mineral y un 8% a la energía nuclear. El 12% restante está compuesto por la energía hidráulica, la biomasa y otras fuentes renovables de energía como la eólica, solar y geotérmica entre otras.

En Chile sin embargo, estos porcentajes varían. Tal y como se puede apreciar en la Figura 2 el aporte de las energías renovables no convencionales asciende a un 35,6% de la producción sobre el total de la matriz, debido principalmente al gran aporte realizado por la energía proveniente de recursos hídricos tales como embalses y centrales de pasada. Aun así, el 64,4% restante proviene de combustibles fósiles convencionales.

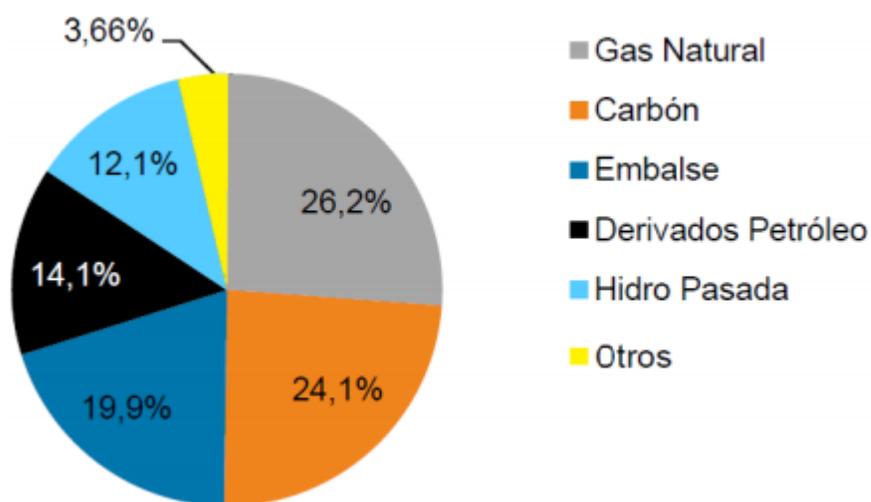


Figura 2. Matriz energética Chilena.

Matriz energética Chilena y sus fuentes de origen (Generadoras de Chile, 2017).

Es por esto que últimamente tanto a nivel industrial como académico se están buscando alternativas para promover cambios en cuanto a la generación y el uso de la energía. Mejoras tecnológicas que permitan un aumento de la eficiencia en los equipos, uso responsable de la energía y nuevas fuentes generadoras, idealmente renovables, son algunos de los ítems en los que se ha hecho necesario invertir de modo de cubrir la capacidad requerida en el futuro, pero de una manera sostenible.

2.2 El potencial de la energía a partir de Biomasa

Una de las opciones mayormente estudiadas es la bioenergía, que corresponde a una serie de productos con contenido energético obtenidos a partir de la transformación de materia orgánica. Su carácter natural y renovable la hace atractiva para la industria, tanto a pequeña como a gran escala.

La biomasa fue la principal fuente de energía para actividades humanas hasta la primera mitad del siglo XIX, cuando el carbón, el petróleo, el gas y otras fuentes de energía tuvieron un importante crecimiento, pero esta aun representa el 10% de la energía utilizada a nivel mundial (Goldemberg, 2009). La mayor parte de la energía proveniente de biomasa es aun "biomasa tradicional" como madera y carbón extraídos de bosques nativos, lo cual es no sustentable, además de ser biomasa utilizada con baja eficiencia para cocinar y calefacionar, y que provoca problemas de contaminación. Este uso es el adoptado mayormente en las zonas rurales y por lo general no se apoya en las actividades comerciales. Hoy en día hay un gran interés para la modernización en el uso de esta biomasa, especialmente la síntesis de alcoholes a partir de diversas fuentes para el reemplazo de la gasolina o del biodiesel para el reemplazo del petróleo diésel, más allá de la producción de electricidad y carbón vegetal utilizando madera de los bosques plantados. Tan recientemente como en 2004, la "biomasa moderna" sostenible representaba el 2% del consumo mundial de energía (Goldemberg, 2009).

Dentro del concepto de biomasa moderna se han investigado diversos procesos para el mayor aprovechamiento de la biomasa, tanto biológicos –fermentaciones, producción de hidrogeno-, térmicos –gasificación, combustión, pirolisis- como físicos (Bridgewater, 2006). En la Figura 3 se pueden apreciar los distintos procesos de conversión de biomasa, los principales productos generados, y los mercados de interés para estos productos. Análogamente en la Tabla 1 se aprecia más en detalle la gran variedad de productos obtenidos a través de los diferentes tratamientos de la biomasa, tanto combustibles como químicos.

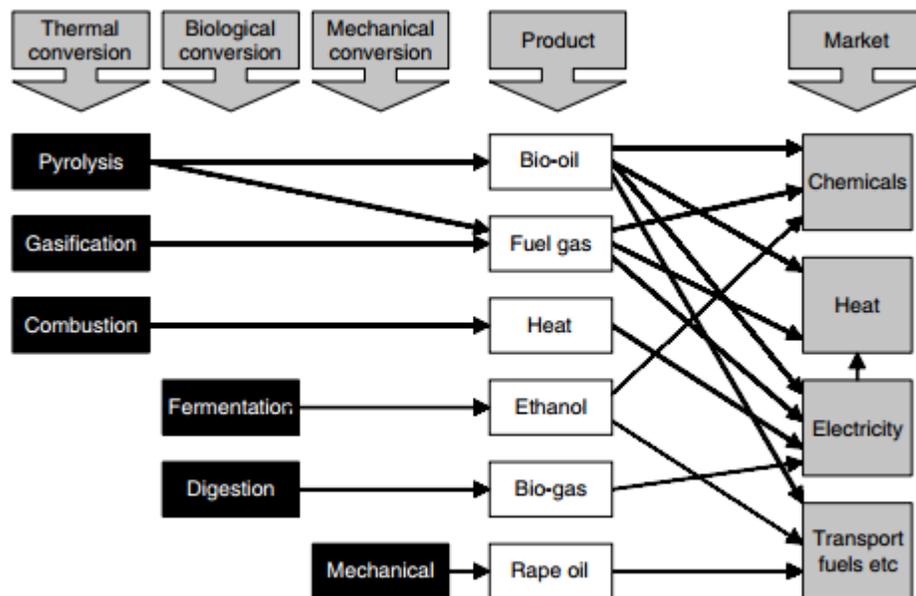


Figura 3. Procesos de conversión, productos y aplicaciones (Bridgewater, 2006).

Tabla 1. Principales productos de la conversión de Biomasa (Bridgewater, 2006).

Product	Biological processing	Physical processing	Thermal processing
<i>Fuels</i>			
Additives	✓	✓	✓
Alcohols	✓		✓
Charcoal			✓
Diesel-type fuels		✓	
Fischer-Tropsch liquids			✓
Fuel oil			✓
Gas	✓		✓
Gasoline			✓
Hydrogen	✓		✓
<i>Chemicals</i>			
Acetone	✓		
Activated carbon			✓
Butanol	✓		
Ethanol	✓		
Fertilisers	✓		✓
Fine chemicals	✓	✓	✓
Food additives	✓		✓
Hydrogen	✓		✓
Methane	✓		✓
Methanol			✓
Resins			✓

2.3 Biocombustibles: El Isobutanol

Dentro de las múltiples alternativas para aprovechar la biomasa los biocombustibles capaces de utilizarse en motores de combustión interna representan un ámbito de gran interés debido principalmente a las intenciones por reducir las emisiones de gases de invernadero por estos motores cuando queman combustibles fósiles. En la Figura 4 se puede apreciar los distintos tipos de combustibles y biocombustibles que se pueden obtener a partir de distintas materias primas tales como el crudo de petróleo, el gas natural, el carbón y la biomasa. Dentro de esta última categoría podemos encontrar los biocombustibles producidos en base a fermentaciones como el bioetanol y el biobutanol entre otros, mientras que también los existen en base a aceites, cuyo principal exponente es el biodiesel.

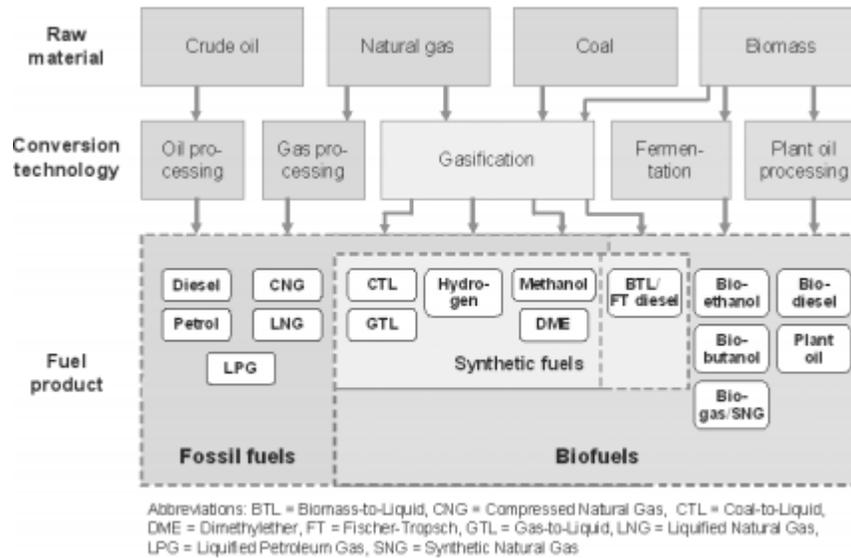


Figura 4. Diferentes métodos de producción de biocombustibles a partir de biomasa (Festel, 2008).

Al momento de analizar las distintas variedades de biocombustibles existentes para determinar que opción es la que mejor se adecua a las necesidades existentes hoy en día se deben evaluar distintos criterios, tanto técnicos y económicos como ecológicos y políticos (Ver Figura 5).

Factores Técnicos	Factores Económicos	Factores Políticos/Ecológicos
<ul style="list-style-type: none"> - Suministro de materias primas - Tecnologías de conversión - Tecnologías de motores - Necesidades/inversiones de infraestructura 	<ul style="list-style-type: none"> - Costos de combustible - Costos de modificación de motores - Costos de infraestructura y disponibilidad - Impactos en la balanza comercial 	<ul style="list-style-type: none"> - Costos de emisión y reducción de GEI. - Apoyo a los agricultores - Uso eficiente de los suelos - Reducción en la dependencia del petróleo crudo.

Figura 5. Factores que influyen en la evaluación de los biocombustibles (Festel, 2008).

El factor decisivo para que un biocombustible tenga éxito en el mercado es el precio de este en la estación de servicio, por lo que el análisis comparativo se centra principalmente en los costos de producción de este. Estos costos de producción se pueden dividir en distintas secciones: costos de distribución, costos de mezcla, costos de capital, costos de conversión y costo de las materias primas. En las Figuras 6 y 7 se presentan los costos de producción totales para tres distintos tipos de biocombustibles: Biobutanol, Bioetanol y Biodiesel (Festel, 2008).

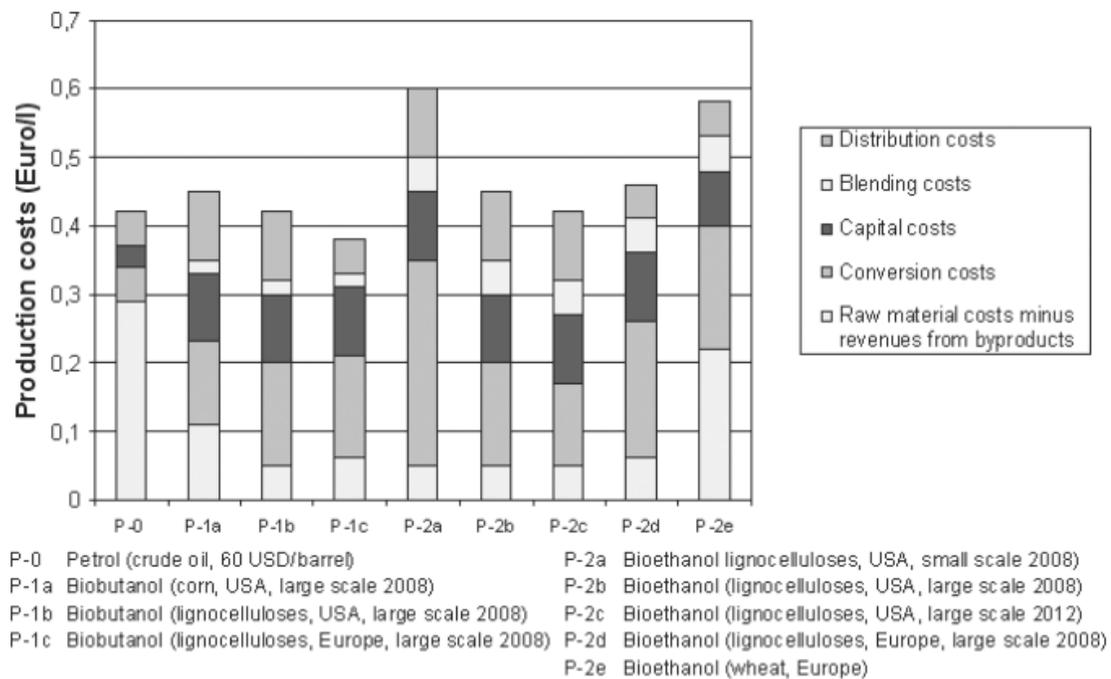


Figura 6. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biobutanol (P-1) y Bioetanol (P-2) comparados con el Petróleo (P-0) (Festel, 2008). Los distintos costos de producción presentados para cada tipo de biocombustible corresponden a las distintas condiciones de producción: materia prima, lugar geográfico y escala de producción.

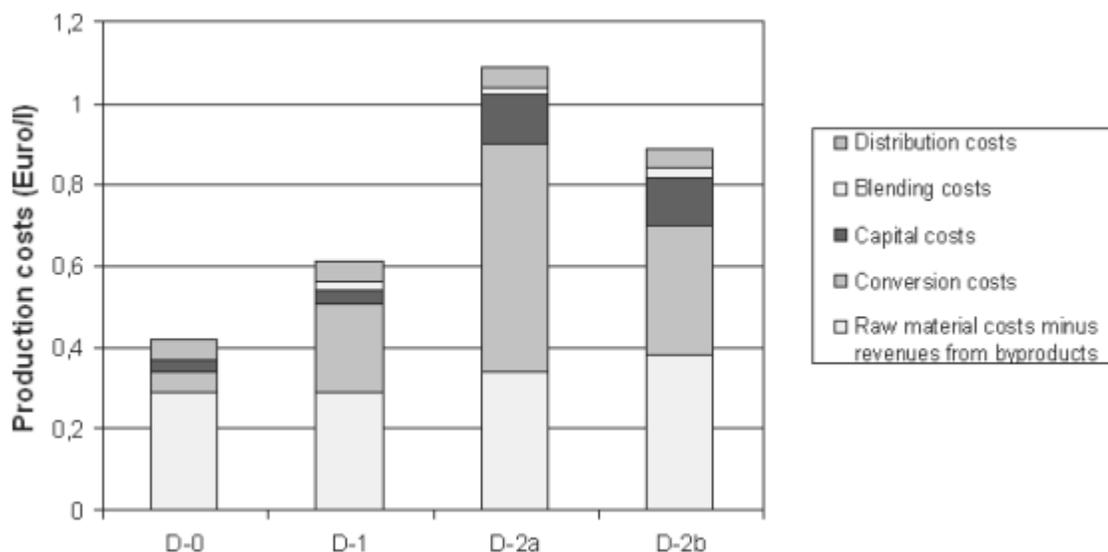


Figura 7. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biodiesel (D-1) y BTL (D-2) comparados con el Diésel Crudo (D-0) (Festel, 2008).

Se observa que el biobutanol producido a partir de lignocelulosa posee el menor costo de producción entre las distintas alternativas, alcanza un costo de aproximadamente 0,38 [Euros/l]. Le siguen en Bioetanol con un costo de 0,42 [Euros/l] al producirlo a partir de lignocelulosa

igualmente y el Biodiesel es el que presenta el mayor costo de producción alcanzo el valor de 0,6 [Euro/lt].

Estas ventajas en el costo de producción del Biobutanol se deben principalmente a su capacidad de poder mezclarse hasta en un 85% con gasolina sin necesidad de realizar modificaciones a los motores para utilizar esta mezcla (Blending cost), además el Biobutanol posee una menor higroscopicidad en comparación a los otros biocombustibles, por lo que no corroe los motores tan rápidamente como el Bioetanol y su transporte se hace fácilmente a través de cañerías, a diferencia del Bioetanol, que debe ser transportado en tanques de mezcla (Nicolaas Buijs, 2013). Otro punto a tener en consideración en esta evaluación económica es la densidad energética de los distintos tipos de biocombustibles, en donde el Biobutanol también aparece como una de las mejores opciones (densidad energética en MJ/L: Petróleo 32, diésel 35.3, Bioetanol 21.14, Biobutanol 29.2, Biodiesel 32.65) (Festel, 2008). Al incluir este último aspecto la evaluación económica cambia, haciendo al Biobutanol aún más rentable como se puede ver en la Figura 8.

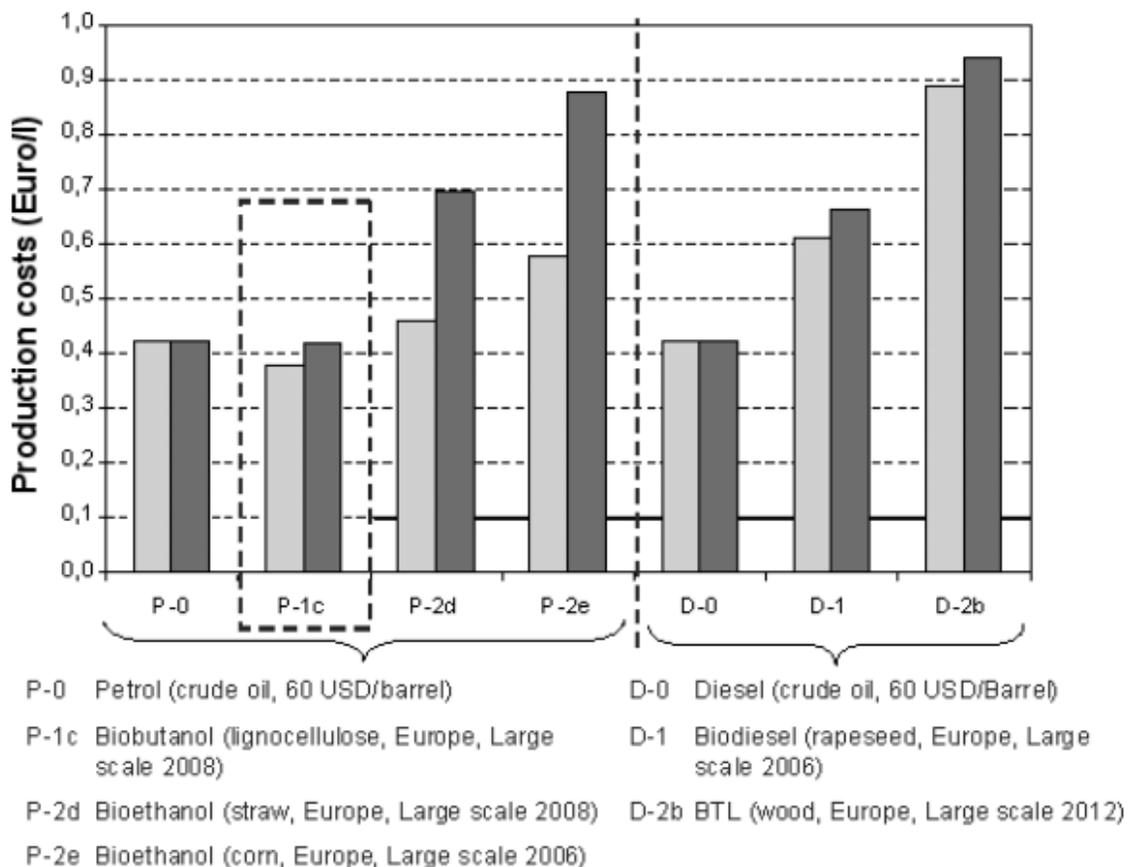


Figura 8. Comparación de los costos de producción después de la corrección con densidades energéticas de los escenarios seleccionados (Festel, 2008).

2.4 Producción biológica de biocombustibles: Biocombustibles de 3era generación.

Dentro de las distintas fuentes utilizadas para la producción de biocombustibles se pueden identificar tres categorías: biocombustibles de primera, segunda y tercera generación.

Los **biocombustibles de primera generación** se producen directamente de cosechas que pueden destinarse a la alimentación humana o del ganado, y por lo tanto su producción es muy polémica teniendo en cuenta los millones de personas en el mundo que mueren por hambre.

Las principales fuentes de los biocombustibles de primera generación son el almidón, el azúcar, grasas animales y los aceites vegetales. Los principales cultivos empleados son el maíz, la caña de azúcar, la soja y los aceites vegetales vírgenes.

Los **biocombustibles de segunda generación** también se conocen con el nombre de biocombustibles avanzados. Lo que les diferencia de los de primera generación es el hecho de que la materia prima usada para su producción no son cosechas que pueden destinarse para alimentación en primera instancia. También se diferencia en que se cultivan aprovechando áreas marginales improductivas en cultivos para alimentación y que no se requiere agua o fertilizantes para su cultivo (Hackenberg, 2003).

Se suelen emplear tecnologías específicas para su extracción. Esto no significa que los biocombustibles de segunda generación no se puedan quemar directamente como la biomasa. Las fuentes principales de los biocombustibles de segunda generación contienen gran cantidad de lignina y celulosa, por lo que necesita procesos previos a su fermentación: conversión termoquímica (gasificación, pirolisis o torrefactado) y conversión bioquímica.

Finalmente, el término “**Biocombustibles de tercera generación**” se aplica particularmente a los biocombustibles obtenidos a partir de algas. Las microalgas o macroalgas son consideradas superiores al compararlas con las plantas terrestres -en términos de almacenamiento de energía solar, asimilación de nutrientes y potencial para la producción de biocombustibles- debido a su alta eficiencia fotosintética y mayores rendimientos de biomasa, además de que no ocupan suelo potencialmente cultivable, no requieren agua de uso humano para su cultivo y ayudan a la captación del CO₂ atmosférico (Rachna Bhateria, 2015). Por lo que su uso como materia prima para la producción de biocombustible posee una eficiencia superior a los biocombustibles de primera y segunda generación en términos de producción/inversión.

La industria de las algas en América Latina juega un papel importante a nivel mundial pues aproximadamente el 17% de las algas que se industrializan provienen de esta región. En las algas rojas es donde su contribución es más significativa ya que contribuye con el 37% de la biomasa, aproximadamente. En este ámbito el mayor protagonista es Chile, quien aprovechando sus 6.435 km de costa aporta un 13% de las algas que se procesan a nivel mundial y es el país de mayor producción de agarofitas (21%) y el mayor productor de *Gracilaria* (50%) (Zertuche, 2014). Por otro lado Argentina, Brasil y México contribuyen también con cantidades importantes de algas productoras de carragenofitas y algas pardas productoras de alginatos (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Aporte de América Latina a la producción mundial de agarofitas en toneladas/año. En paréntesis el porcentaje total a nivel sudamericano.

País	<i>Gelidium</i>	<i>Gracilaria</i>	Porcentaje de la producción Mundial
Argentina		2500 (10%)	5,4
Brasil		1000 (4%)	2,2
Chile	430 (2%)	12800 (50%)	28,6
México	1500 (7%)		3,2
Total	1930 (9%)	16320	39,4

Tabla 3. Aporte de América Latina a la producción mundial de algas productoras de ficocoloides en toneladas/año. En paréntesis el porcentaje total a nivel mundial.

País	Carregenofitas	Alginatofitas	Agarofitas
Argentina	80	500	2500
Brasil	1100		1000
Chile	7300	19600	12820
México	300	4000	1500
Perú	20		
Total	8800 (11%)	24100 (14%)	17820 (37%)

Sin embargo la mayor parte de esta producción es exportada en forma de materia prima de bajo valor comercial al extranjero: Por ejemplo, en el año 2002 un 85% del total de algas extraídas fue vendida en forma de materia prima como algas secas, mientras que un 13,4% restante fue vendido en forma de derivados de algas (un 7,9% en forma de Carragenina, y un 5,5% en forma de agar) (Patricia Latorre, 2004).

Tabla 4. Exportaciones chilenas de algas y sus derivados entre 1998 y 2001 (Patricia Latorre, 2004).

Exportaciones chilenas de algas y sus derivados			
<i>Año</i>	<i>(Cifras en miles de US\$)</i>		
	<i>Cantidad (t)</i>	<i>Valor (US\$)</i>	<i>Precio Tonelada (US\$)</i>
1998	47.621	76.935	1.616
1999	45.242	83.844	1.853
2000	41.030	89.101	2.172
2001	40.331	82.090	2.035

Una buena alternativa entonces para darle un mayor valor agregado a la gran disponibilidad de biomasa algal de las costas Chilenas sería su tratamiento y procesamiento para la elaboración de un biocombustible de tercera generación como el biobutanol. Esta propuesta además de generar un crecimiento para la economía nacional contribuye también a la disminución de la huella de carbono y a la diversificación de la matriz energética nacional.

2.5 Biosíntesis de isobutanol: Ruta de la valina y Ruta de Ehrlich.

La valina es uno de los veinte aminoácidos codificados por el ADN. Este aminoácido, en humanos, es uno de los aminoácidos esenciales. Forma parte integral del tejido muscular, puede ser usado para conseguir energía por los músculos en ejercitación, posibilita un balance de nitrógeno positivo e interviene en el metabolismo muscular y en la reparación de tejidos (wikipedia, 2016).

La ruta metabólica de biosíntesis se inicia a partir del ácido pirúvico o piruvato y posee tres moléculas intermediarias antes de terminar en valina. La serie de reacciones está indicada en la siguiente tabla:

Tabla 5. Moléculas intermediarias de la ruta de biosíntesis de valina y las enzimas que catalizan las reacciones.

Reactivo	Producto	Enzima que cataliza la reacción
Piruvato	2-acetolactato	Acetolactato sintasa (ALS)/ Acetohidroxiacido sintasas (AHAS)
2-acetolactato	Dihidroxi-isovalerato	Cetoácido reductoisomerasa (KARI)
Dihidroxi-isovalerato	2-cetoisovalerato	Dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD)
2-cetoisovalerato	Valina	Branched chain aminoacid aminotransferase (BCAT)

Esta ruta biosintética puede terminar también en la síntesis de leucina, otro aminoácido esencial, a través del intermediario 2-cetoisovalerato. En la figura 11 se observa un esquema de la ruta de biosíntesis de la leucina a partir de la ruta de la valina.

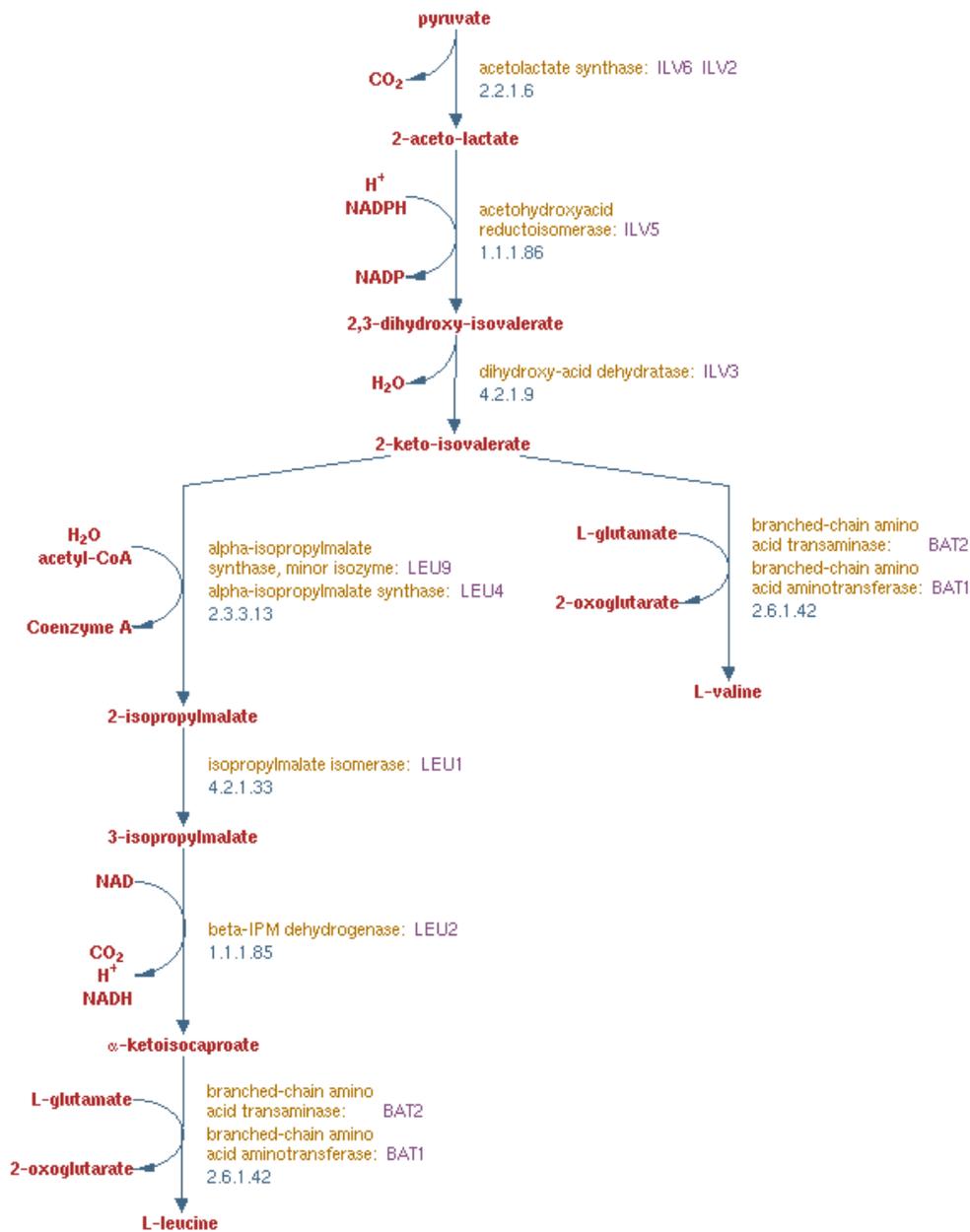


Figura 9. Rutas de biosíntesis de valina y leucina (Database, Saccharomyces Genome, 2016).

Estas rutas biosintéticas están además asociadas a la llamada ruta de Ehrlich, la cual es la principal ruta para la biosíntesis de alcoholes de fusel, como el isobutanol. En la figura 12 se observa el esquema general de la ruta de Ehrlich.

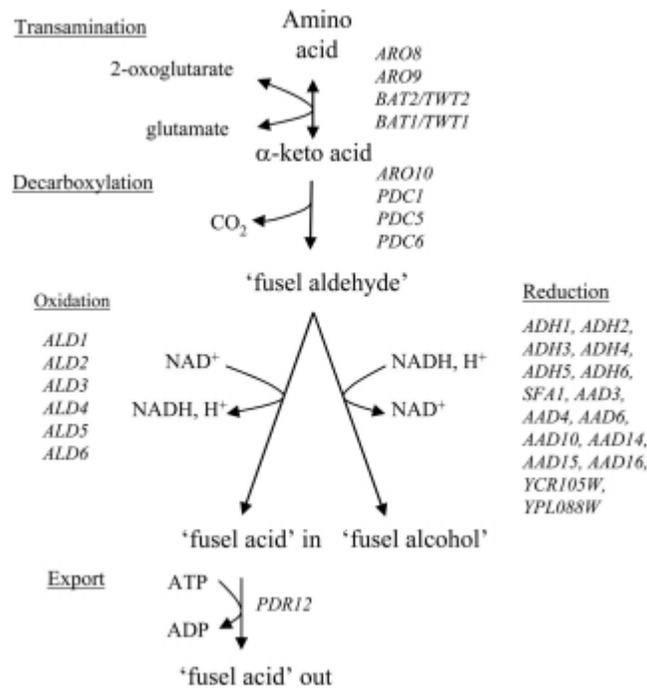


Figura 10. Ruta de Ehrlich. Catabolismo de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, isoleucina y valina). Se indican los distintos genes codificantes para las enzimas de cada etapa (Lucie Hazelwood, 2008).

Células procariotas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Corynebacterium Glutamicum* han sido testeadas con éxito en la producción de isobutanol a través de los dos últimos pasos de la ruta de Ehrlich (descarboxilación y reducción), estos consisten en la conversión de una molécula de 2-cetoácido, intermediario en la vía de biosíntesis de valina y leucina, en alcoholes de fusel (Blombach y Eikmanns 2011). En la ruta biosintética de valina, dos moléculas de piruvato se convierten en 2-cetoisovalerato (2-KIV) a través de actividades secuenciales de acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS), cetoácido reductoisomerasa (KARI) y dihidroxi-ácido deshidratasa (DHAD). El isobutanol se produce a partir de 2-KIV por dos etapas sucesivas de la ruta de Ehrlich, que implica la descarboxilación por la 2-cetoacidcarboxilasa (KDC) y la reducción de un grupo aldehído por la alcohol deshidrogenasa (ADH) (Atsumi et al., 2008; Hazelwood et al. 2008). Aunque las cepas bacterianas manipuladas produjeron altas concentraciones de isobutanol con altos rendimientos la toxicidad del isobutanol para estos microorganismos es el principal obstáculo para sus aplicaciones a escala industrial (Atsumi et al., 2010, Weber et al., 2010, Yamamoto et al., 2013).

La ruta de síntesis de isobutanol queda entonces de la siguiente forma:

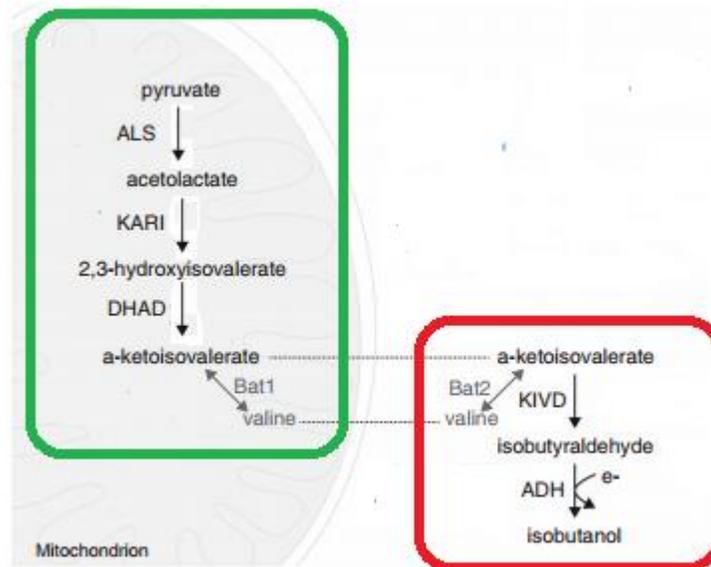


Figura 11. Ruta de síntesis de biobutanol. La ruta está compuesta en su primera parte (verde) por la ruta de biosíntesis de valina y en su segunda parte (rojo) por la ruta de Ehrlich (Nicolaas Buijs, 2013).

2.6 Regulación de la ruta de la valina.

La primera parte de la ruta de biosíntesis de isobutanol (ruta de la valina) ocurre a nivel mitocondrial y se encuentra regulada por tres enzimas: Acetolactato sintasa (ALS) o acetohidroxiácido sintasa (AHAS), cetoácido reductoisomerasa (KARI) y Dehidroxi-ácido deshidratasa (DHAD). Cada una de estas enzimas es sintetizada por los genes *ilvB*, *ilv5* e *ilv3* respectivamente en *Escherichia coli* y poseen distintas afinidades por sus correspondientes sustratos (piruvato, 2-acetolactato y 2,3 hidroxiisovalerato respectivamente). En la tabla 9 se observan distintos valores de K_M y k_{cat} de estas enzimas, además de calcularse la constante de especificidad (k_{cat}/K_M), valor que representa la afinidad de una enzima por un sustrato y el grado de conversión a producto del complejo Enzima-Sustrato (ES).

Tabla 6. Enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de valina y distintos microorganismos de donde provienen. Se presentan los valores de K_M , k_{cat} y la constante de especificidad (k_{cat}/K_M) para todas las enzimas.

Enzima	Organismo	K_M [mM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M	Referencia
ALS	<i>L. lactis</i>	8,3			(Ronald Duggleby, 2000)
AHAS	<i>Yeast</i>	8,2			(Ronald Duggleby, 2000)
ALS	<i>B. subtilis</i>	13,6	121	8,9	(James Liao, 2016)
AHAS I	<i>E. coli</i>	4,8	71,5	14,9	(Inna Belenky, 2012)
ALS	<i>K. pneumoniae</i>	34,1	533	15,6	(Siew Siew Pang, 2004)
AHAS	<i>C. glutamicum</i>	8,3			(D. Leyval, 2003)
KARI	<i>E. coli</i>	0,04	3,6	87,3	(Sabine Bastian, 2011)
KARI	<i>Hordeum Vulgare</i>	0,011			(Jorg Durner, 1999)
KARI	<i>Salmonella</i>	0,29	18,33	63,2	(John Hofler, 1975)
KARI	<i>Neurospora Crassa</i>	0,32			(Kazuyoshi Kiritani, the reductoisomerase of neurospora crassa, 1966)
KARI	<i>Thermotoga maritima</i>	16,7	7,38	9,55	(Takahiro Shimosaka, 2016)
KARI	<i>C. glutamicum</i>	1,4			(D. Leyval, 2003)
DHAD	<i>C. glutamicum</i>	1,2			(D. Leyval, 2003)
DHAD	<i>S. cerevisiae</i>	1,7			(D. Leyval, 2003)
DHAD	<i>Neurospora Crassa</i>	0,58			(Kazuyoshi Kiritani, The Dihydroxy Acid Dehydratase of Neurospora crassa, 1965)
DHAD	<i>E. coli</i>	1,5	185	123	(Dennis Flint, 1993)
DHAD	<i>S. sulfatarius</i>	0,54	76	140	(Seonghun Kim, 2006)
DHAD	<i>Spinach</i>	1,5	25	16,7	(Dennis Flint M. E., 1987)

El pH óptimo al que trabajan estas enzimas se encuentra dentro del rango entre 7-8.5, siendo la ALS la que funciona a menor valor, a pH 7, mientras que KARI y DHAD funcionan óptimamente a pH 7.5 y 8 respectivamente (D. Leyval, 2003).

Es de especial interés el estudio de la enzima acetolactato sintasa (ALS). Como se observa de la tabla 9, la enzima ALS posee los valores más bajos de eficiencia catalítica en comparación a las otras dos enzimas, por lo que se plantea la posibilidad de que esta enzima sea el cuello de botella de la ruta biosintética. Además el piruvato, sustrato de la ALS, es un catabolito altamente requerido por un gran número de rutas metabólicas paralelas a la ruta de síntesis de valina (Nicolaas Buijs, 2013), lo que produce una alta competencia por su disponibilidad. Estas condiciones hacen de esta enzima un punto clave en cuanto a la biosíntesis de isobutanol.

2.7 Acetolactato Sintasa

Existen dos tipos de enzimas que catalizan la reacción de piruvato a 2-acetolactato, las acetohidroxiácido sintasas (AHAS) y las acetolactato sintasas (ALS). Estas dos enzimas son muy similares entre sí, como se puede ver al comparar sus secuencias aminoacídicas (2236 aminoácidos cada una) y su común requerimiento por tiamina difosfato (TPP) y Mg^{+2} como cofactor (Siew Siew Pang, 2004), sin embargo poseen pequeñas diferencias tanto estructurales como funcionales. Primero, las AHAS se pueden encontrar tanto en bacterias como en hongos, algas y plantas superiores, mientras que las ALS están presentes únicamente en bacterias (Siew Siew Pang, 2004), segundo, mientras la actividad de las AHAS muestra inhibición por producto (valina, leucina, isoleucina) las ALS no muestran este tipo de regulación (David Chipman, 1998) y tercero, el pH óptimo de funcionamiento de las AHAS es aproximadamente de 7, mientras que las ALS funcionan mejor a pH cercanos a 6 (Natan Gollop, 1990). Sin embargo, la diferencia más importante presente en estas dos enzimas es el uso del cofactor FAD: Mientras las AHAS necesitan de FAD para su correcto funcionamiento las ALS son enzimas FAD-independientes (Siew Siew Pang, 2004). La función que cumple esta molécula como cofactor aún no se encuentra bien definida, sin embargo estudios de cristalización de estas enzimas sugieren que esta molécula cumple una función netamente de soporte estructural, y que no se encuentra químicamente involucrada en la catálisis de la reacción (Yadi Liu, 2016).

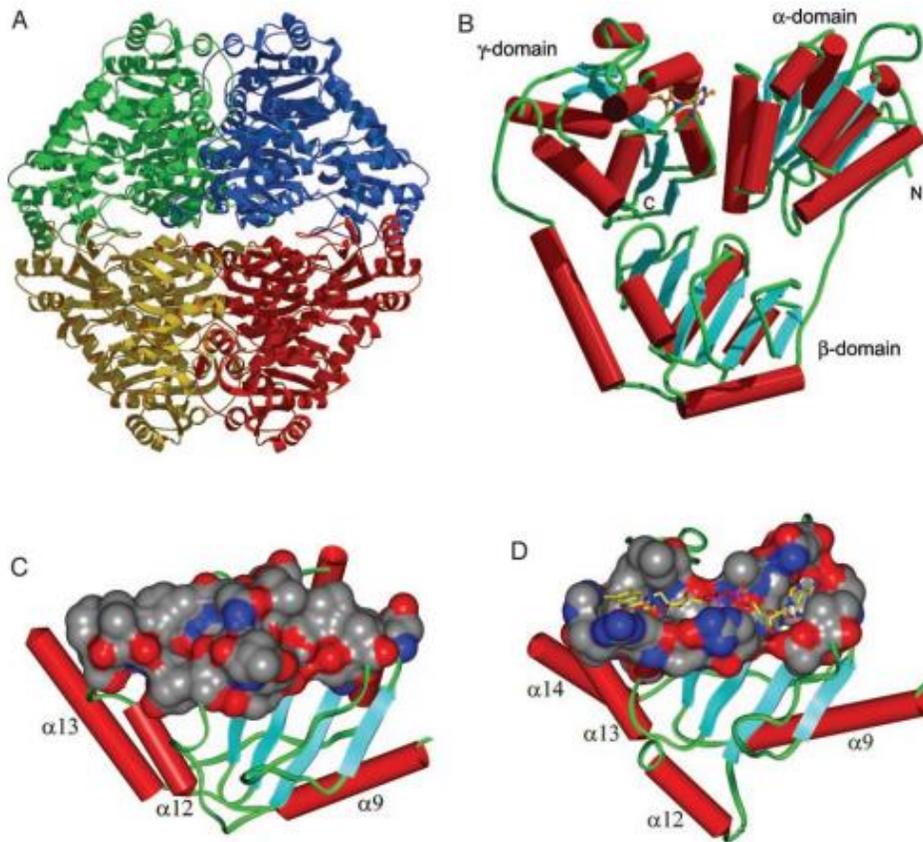
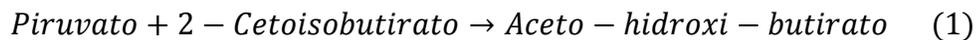


Figura 12. A Estructura cristalizada de una ALS de *K. pneumoniae*. Se distinguen los 4 monómeros idénticos entre si y de 559 aminoácidos cada uno en distintos colores. B Ampliación de uno de los monómeros, se distingue que cada monómero está compuesto por 3 dominios: alfa, beta y gamma. C representa el dominio beta de la ALS y D el dominio beta de una AHAS, dominio en el cual se posiciona el cofactor FAD (Siew Siew Pang, 2004).

Otro punto a tener en cuenta sobre estas enzimas es que son capaces de catalizar dos reacciones distintas (Natan Gollop, 1990):



Sin embargo la preferencia de cada enzima por estos sustratos es distinta. Mientras que las AHAS tienen mayor preferencia por el 2-cetobutirato, las ALS son más propensas a utilizar piruvato como sustrato. Para cuantificar la selectividad de estas enzimas por un sustrato o por otro se define el factor R de la siguiente forma:

$$R = \frac{V_{AHB}}{V_{AL}} * \frac{[piruvato]}{[2 - cetoisobutirato]}$$

Si el valor de este factor es grande entonces la enzima tiene mayor preferencia por el 2-cetoisobutirato como sustrato, mientras que si el valor es pequeño la enzima tendera a utilizar piruvato como sustrato. En la Tabla 10 se observan distintos valores de R para AHAS y ALS provenientes de distintos microorganismos.

Tabla 7. Valores de R para enzimas AHAS y ALS y los respectivos organismos de origen
(Natan Gollop, 1990).

Organism	Enzyme	R
1. <i>Escherichia coli</i> K-12	AHAS I, purified (A. Aulabaugh and J. V. Schloss)	2
2. <i>E. coli</i>	AHAS III, purified (2)	40
3. <i>Salmonella typhimurium</i>	AHAS II, purified (32)	65
4. <i>Serratia marcescens</i>	<i>ilvGM</i> product, crude extract of MF2000(pPU129)	75
5. <i>Edwardsiella tarda</i>	<i>ilvGM</i> product, crude extract of MF2000(pPU139)	65
6. <i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>ilvGM</i> product, crude extract of MF2000(pPU137)	80
7. <i>K. aerogenes</i>	AHAS III-like, crude extract of MF2000(pNG047)	35
8. <i>K. aerogenes</i>	pH6 ALS, crude extract of AA-1	0.08
9. <i>Bacillus subtilis</i>	<i>ilvBN</i> product, crude extract of CU9090(pMAVxx)	70
10. <i>B. subtilis</i>	<i>alsS</i> product (pH6 ALS), crude extract of CU9090(pDK6)	0.06
11. <i>Corynebacterium glutamicum</i>	Crude extract	20
12. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>ILV2</i> product, crude extract of YT669	30
13. <i>Chlorella emersonii</i>	Crude extract	22
14. <i>Porphyridium</i> sp.	Crude extract	40

De la tabla 10 se puede apreciar que el valor del factor R para las enzimas AHAS generalmente es superior a 20 (exceptuando la AHAS I de *E. coli*), mientras que para las enzimas ALS el valor R es cercano a 0, por lo que al momento de diseñar un microorganismo recombinante para la producción de isobutanol es altamente deseable la expresión de enzimas ALS en la ruta de biosíntesis.

2.8 Softwares para modelamiento enzimático por diseño racional.

Dada la baja capacidad catalítica (k_{cat}/K_M) que poseen las enzimas del tipo acetolactato sintasas en comparación con el resto de las enzimas de la ruta de biosíntesis de valina es que surge como opción la posibilidad de mejorar esta característica mediante mutaciones sitio dirigidas en la enzima, con el fin de aumentar la afinidad entre el ligando y el sitio catalítico de esta. Realizar estas pruebas en laboratorio suponen un alto gasto de recursos y tiempo, por lo que para realizar una evaluación preliminar de las mejores opciones de mutación se han diseñado diversos softwares que estiman la afinidad existente entre un ligando y el sitio catalítico de una enzima mediante el análisis de la estructura 3D de la enzima y las fuerzas intermoleculares existentes entre los radicales de los aminoácidos que forman el sitio catalítico.

UCSF Chimera es un software de visualización para investigación exploratoria y análisis de enzimas (Eric Pettersen, 2004). En este software se cargan archivos en formato PDB en donde se encuentran almacenados los datos de la estructuras 3D de la enzima de interés tal como se aprecia en la Figura 13.



Figura 13. Estructura 3D de un monómero de la enzima acetolactato sintasa visualizada en el software UCSF Chimera.

Las diversas herramientas presentes en este software permiten tanto visualizar como modificar la secuencia aminoacídica de la enzima.

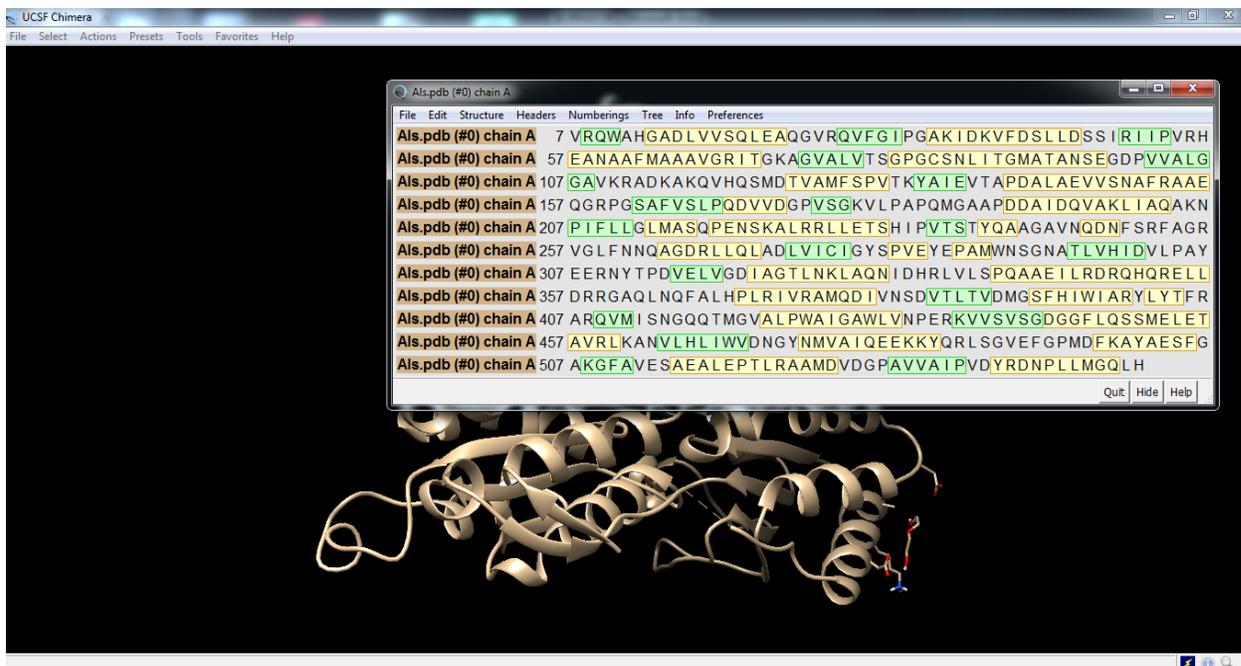


Figura 14. Visualización de la secuencia aminoacídica de la enzima acetolactato sintasa.

Una vez que se tiene la secuencia aminoacídica desplegada es posible cambiar uno o más aminoácidos del sitio catalítico de la enzima seleccionando el aminoácido específico de la lista.

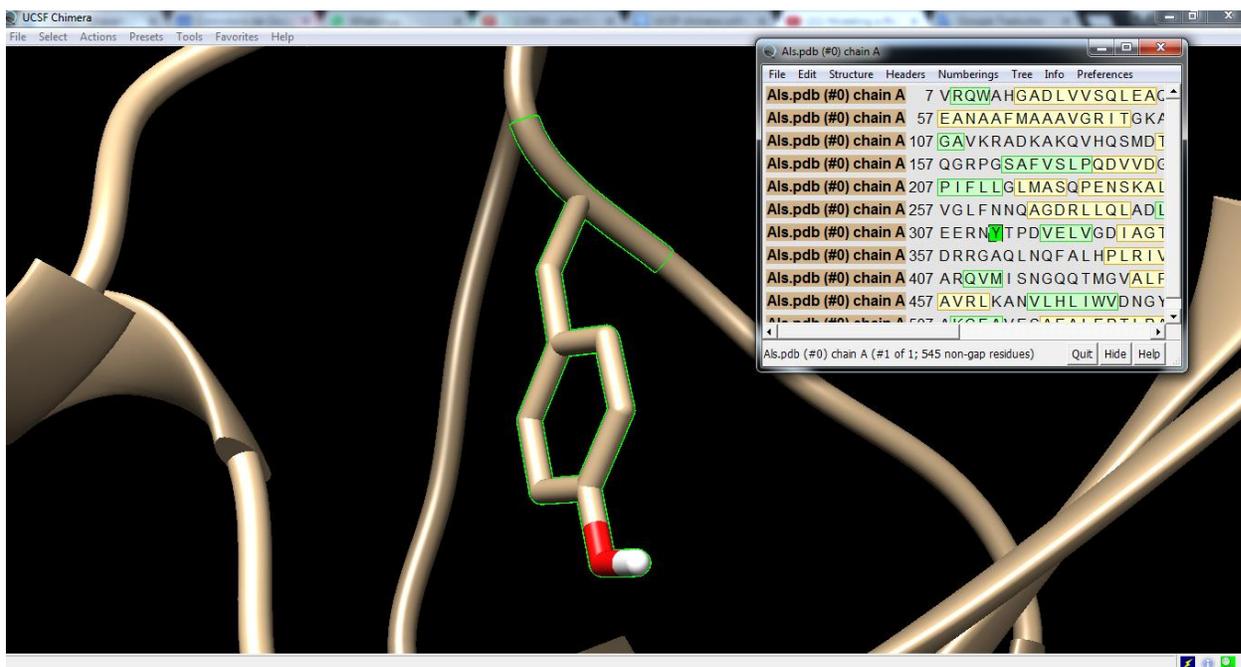


Figura 15. Selección de un aminoácido de interés candidato para mutagenesis. Se aprecia marcado el aminoácido tirosina (Y) en la secuencia y su estructura 3D en la interface del software.

Una vez seleccionado el aminoácido por el que se va a cambiar el original el software ofrece distintas configuraciones espaciales (rotámeros) posibles para el nuevo aminoácido. La lista exhibida presenta las configuraciones más comunes en la naturaleza en forma de porcentaje. Se

debe tener especial precaución de que el rotámero escogido no quede sobrelapado sobre otras estructuras previamente existentes.

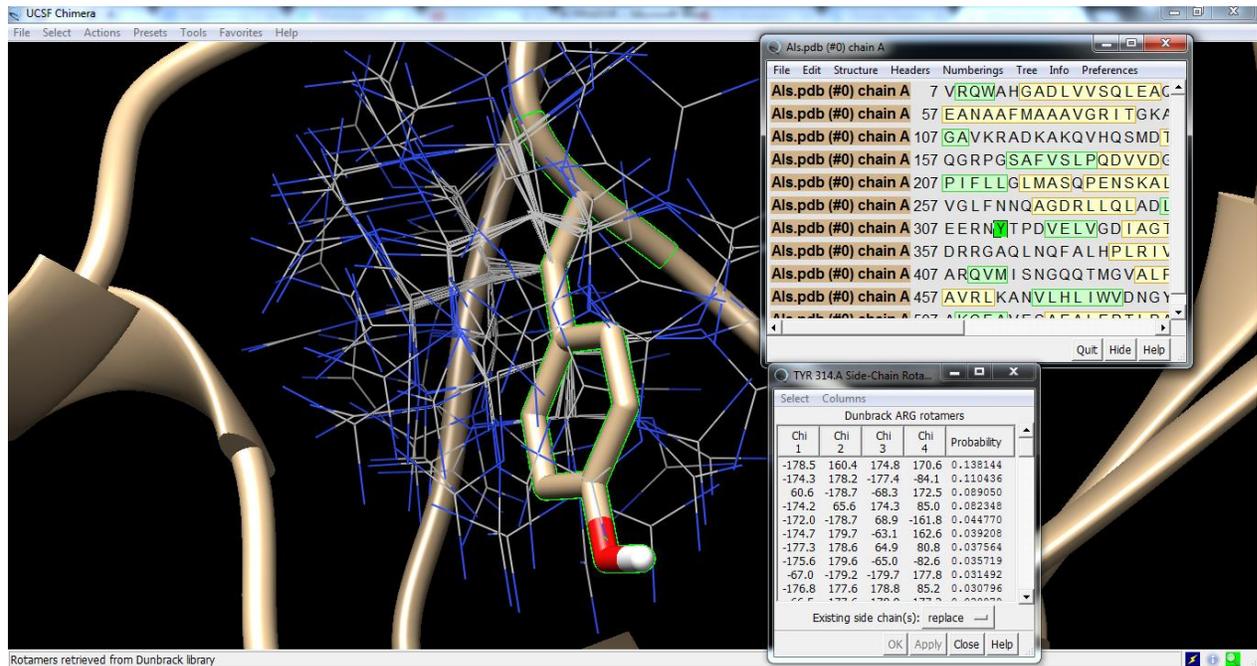


Figura 16. Selección del rotámero del aminoácido a insertar en la estructura (arginina en este caso).

Una vez realizada la mutación se guarda el archivo PDB y se procede a realizar el ensayo de molecular docking entre la enzima mutada y el ligando de interés.

SwissDock es un servicio web de molecular docking para enzimas basado en EADock DSS (Aurelien Grosdidier, 2011). Este servicio web disponible en www.swissdock.ch permite analizar los distintos acoplamientos posibles entre una enzima y un ligando y entrega como resultado una lista con distintos valores de energía libre de Gibbs (ΔG), correspondientes a los distintos acoplamientos probados. Los valores entregados están ordenados de más negativo (mayor afinidad) a más positivo (menor afinidad) (Aurelien Grosdidier, 2011).

La enzima es posible seleccionarla a partir de la base de datos del sitio o bien cargar la estructura de un archivo PDB, mientras que el ligando también es posible seleccionarlo de la base de datos del sitio o bien cargar un archivo MOL2 con la estructura del ligando de interés. Este servidor ofrece además la posibilidad de especificar las coordenadas del sitio catalítico para realizar el docking o dejar estos parámetros en blanco para probar el acoplamiento en todo el espacio.

3. Objetivos

3.1 General

El **objetivo general** del presente trabajo de título consiste en la expresión heteróloga de una enzima acetolactato sintasa utilizando el microorganismo *Escherichia coli* como plataforma biológica de expresión con el fin de evaluar los parámetros cinéticos de esta enzima para su uso en la producción de isobutanol a partir de la ruta de síntesis de valina y la ruta de Ehrlich.

3.2 Específicos

- a) Búsqueda bibliográfica de una enzima acetolactato sintasa (ALS) con alta capacidad catalítica candidata para mutagenesis.
- b) Plantear una mutación sitio-dirigida a la enzima escogida mediante análisis de diseño racional *in silico*.
- c) Aislamiento del gen que codifica para ALS a partir del DNA genómico del microorganismo seleccionado.
- d) Transformar *Escherichia coli* con el gen nativo aislado.
- e) Producción de proteína recombinante en *Escherichia coli*.
- f) Purificación y medición de actividad de la enzima heteróloga. Determinación de los parámetros K_M y v_{max} .

4. Metodologías

4.1 Acetolactato sintasa candidata para mutagenesis.

Para la elección del microorganismo del cual se extraerá la enzima se realizó un estudio exhaustivo en bibliografía relacionada con la síntesis de alcoholes de cadena ramificada a partir de la ruta de la valina y la ruta de Ehrlich.

4.2 Definir mutación a realizar.

Una vez determinado el microorganismo para trabajar se prosiguió a obtener el archivo PDB de la enzima en la base de datos Protein Data Bank, y mediante el software CHIMERA se realizaron diversas mutaciones *in silico* en distintos aminoácidos de interés.

Una vez realizadas las mutaciones se analizaron los efectos de estas tanto en la estructura como en la funcionalidad del sitio catalítico de la enzima mediante la herramienta de molecular docking proporcionado por el sitio <http://swissdock.ch> (Aurelien Grosdidier, 2011).

4.3 Extracción de DNA genómico del microorganismo

Se realizó la extracción del DNA genómico a dos cepas distintas del microorganismo: La primera cepa ATCC 700660 y la segunda cepa TM K27665 correspondiente a una muestra clínica aislada de un paciente del hospital Calvo Mackenna. Se inocularon las cepas en 5ml de medio LB en condiciones de esterilidad y se dejó creciendo por 16 horas a 37°C con agitación. Posterior a esto se le extrajo el DNA genómico a partir de 1 ml de inóculo utilizando el protocolo establecido en el Wizard Genomic DNA Purification Kit. Al finalizar la extracción del DNA genómico de ambas cepas estas se corrieron en un gel de agarosa 1% para analizar la integridad de estos.

4.4 Análisis filogenético del microorganismo

Para verificar que los microorganismos con los que se estaba trabajando correspondían efectivamente al encontrado en bibliografía se realizó un ensayo de filogenia mediante PCR con los partidores universales FD1 y RP2, partidores que amplifican la secuencia 16S RNA a partir de los DNA genómicos extraídos. Para este ensayo se utilizaron como templados los DNA genómicos de las cepas ATCC y TM, un control positivo correspondiente a *E. coli* y un control negativo sin templado. El ensayo además se realizó por duplicado utilizando en el primer ensayo la enzima Phusion polimerasa X7, producida en el mismo laboratorio, y en el segundo ensayo la enzima Phusión polimerasa comercial. Los resultados de PCR se mandaron a secuenciar para así

posteriormente mediante la herramienta BLAST determinar la cepa específica de cada microorganismo.

4.4 Amplificación del gen *ilvK*

Posterior a la amplificación del 16S DNA se realizó un ensayo PCR con los partidores *ilvKEc_FW* y *ilvKEc_RV* para amplificar el gen *ilvK* codificante de la enzima acetolactato sintasa. Para la amplificación de este gen se utilizó el DNA genómico de la cepa ATCC como templado. Los partidores fueron diseñados de tal forma que el producto de PCR pueda ser ligado posteriormente a un vector mediante la técnica de Gibson Assembly, por lo que estos partidores además de las secuencias complementarias al gen *ilvK* contienen además secuencias complementarias al sitio de inserción del vector.

4.5 Ligación en vector pET22b mediante Gibson Assembly

Una vez obtenido el gen *Ilvk* con colas para Gibson Assembly se procedió a la preparación del vector pET22b. Se digirió el vector dejándolo en presencia de la enzima EcoRV por 1 hora a 37°C, se desactivo la enzima subiendo la temperatura a 80°C por 20 minutos, se amplificó el vector backbone utilizando los partidores pET22b_FW y pET22b_RV cuyas descripciones se encuentran en el Anexo N°4, y finalmente se corrió la muestra en un gel de agarosa 1% para visualizar el vector digerido.

Para la ligación del gen *Ilvk* y el vector pET22b se utilizó la técnica de Gibson Assembly (Daniel Gibson, 2009). Para esto primero se calcularon la cantidad de moles tanto del gen como del vector linealizado en sus respectivas soluciones con el fin de que en el mix de ligación la cantidad de moles fuese la misma. Se prepararon 20ul del mix de ligación correspondiente a 10ul de *ilvK* + pET22b Backbone y a 10ul de buffer de ligación con las enzimas correspondientes (T5 Exonucleasa, Taq DNA Ligasa y Phusion DNA polimerasa) y se dejó reaccionar a 50°C por 1 hora. Cabe destacar que la enzima T5 Exonucleasa prepara los extremos cohesivos en el vector pET22b para permitir la complementariedad de bases con los extremos cohesivos del gen *ilvK* producidos por las colas de los partidores *IlvkEc_FW* e *IlvkEc_RV*.

4.6 Transformación de *E. coli* BL21 (DE3).

Se utilizó el mix de ligación resultante de Gibson Assembly para la quimiotransformación de bacterias *Escherichia coli* de la cepa BL21 (DE3), cepa utilizada preferentemente como plataforma de expresión de proteínas recombinantes. Para esto se pusieron 100ul de BL21 (DE3) quimiocompetentes en presencia de 5ul del mix de ligación. Se dejaron reposar durante 20 minutos en hielo para posteriormente producir el shock térmico dejándolas a 42°C por 1 minuto. Finalmente se agregaron 900 ul de medio LB y se incubaron a 37°C por 60 minutos.

Posterior a la quimiotransformación se sembraron las BL21 (DE3) en placas de Agar LB con 100 ug/ml de ampicilina a 37°C por 16 horas. Además de sembrar las BL21 (DE3) transformadas con el vector *ilvK*-pET22b se sembraron también un control positivo BL21 (DE3) pET22b(+) y un control negativo BL21 (DE3).

Para verificar la correcta inserción del vector se analizaron las colonias mediante PCR colonia. Para esto se tomaron las colonias crecidas en las placas y se prepararon alícuotas en 30ul de agua destilada. 15 ul fueron utilizados para el análisis de PCR colonia, poniéndolos a 100°C por 10 minutos y posteriormente utilizándolos como templado para el mix de reacción, finalmente se corrió el resultado de PCR en un gel de agarosa 1%.

Los 15 ul restantes de las colonias que presentaron el vector se crecieron en 10 ml de medio LB más ampicilina 100 ug/ml a 37°C durante 16 horas. A partir de estos inóculos se prosiguió a recuperar los vectores para secuenciación mediante el protocolo de Miniprep Plasmid Extraction. Previamente se tomaron 500 ul de los inóculos para la preparación de glicerol stock de las cepas.

4.7 Producción de la proteína recombinante

Para la producción de proteína recombinante se tomó una muestra de glicerol stock y se puso a crecer en 10 ml de medio LB más ampicilina 100 ug/ml. Se midió la OD₆₀₀ del inóculo y posterior a esto se inocularon 5 matraces con 50 ml de medio LB más Ampicilina 100 ug/ml y 2 matraces con 50 ml de medio TB más Ampicilina 100 ug/ml con tal de que la OD₆₀₀ inicial en los matraces fuese de 0,05. Se dejaron creciendo los matraces a 37°C con agitación hasta que la OD₆₀₀ fuese de 0,4-0,5. Llegado a este punto para inducir la producción de proteína recombinante se agregaron concentraciones de 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM y 1 mM de IPTG en los 5 matraces con medio LB y 0.4 mM y 1 mM de IPTG en los 2 matraces con medio TB y se dejaron produciendo a 25°C por 16 horas. Finalizado el proceso de producción se pasaron los 50 ml de cada matraz a un tubo falcón y se almacenaron a 4°C, pero previamente se tomó una muestra de 1 ml de cada matraz para visualizar mediante electroforesis de proteínas la proteína total producida. Para esto se centrifugaron a 4000 rpm por 10 minutos las muestras y el pellet de células se lavó 3 veces con solución PBS resuspendiendo las células en 200 ul de PBS en el último lavado, se agregaron 50 ul de buffer de carga 5X y se dejaron a 100°C por 10 minutos antes de cargar 12 ul de las muestras en la SDS PAGE. Se corrió la electroforesis por 45 minutos a 200 V y al terminar este proceso se dejó tiñendo la SDS PAGE en solución de coomassie blue para posteriormente visualizar.

4.8 Purificación de la proteína recombinante

Para la purificación de la proteína recombinante se utilizaron los 50 ml de inóculo crecido en medio TB e inducida con 1 mM de IPTG. Se centrifugo el cultivo a 4000 rpm por 10 minutos a 4°C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó el pellet de células con 30 ml de solución PBS un par de veces, finalmente se resuspendió el pellet en 50 ml de PBS. Se sonicó la

muestra para producir la lisis celular y se prosiguió a la realizar la precipitación de proteínas utilizando 30 gr de sulfato de amonio (saturación del 85%), la muestra se dejó precipitando por 8 horas a 4°C con agitación constante. Posteriormente se centrifugo la muestra a 11000 rpm por 10 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, el pellet de proteínas se resuspendió en 10 ml de PBS. Se tomaron 4 ml de muestra de proteína con sulfato de amonio y se cargó un cassette de diálisis con esta, el cassette se dejó dializando por 16 horas a 4°C con agitación constante en un stirring magnético.

Se mezclaron 500 ul del producto de diálisis con 500 ul de solución de lisis y 250 ul de resina NTA y se dejaron mezclar por 60 minutos a 4°C a 250 rpm. Se cargó la muestra en la columna de cromatografía por Gravity Flow y se recolectaron las fracciones de Lisis, posteriormente se lavó la resina utilizando 1 ml de solución de lavado y se recolectaron las fracciones de lavado y finalmente se eluyeron las proteínas que quedaron adheridas a la resina cargando 1 ml de solución de elución y recolectándose las fracciones de elución. Se cargaron todas las fracciones obtenidas y el producto de diálisis en una SDS-PAGE para analizarlas por electroforesis de proteínas.

5. Resultados y Discusiones

5.1 Elección del microorganismo para trabajar.

El análisis bibliográfico realizado para determinar el microorganismo del cual se va a extraer la enzima acetolactato sintasa para modificar se resume tanto en la tabla 9 como en la tabla 10. Se decidió utilizar la enzima acetolactato sintasa de *Klebsiella pneumoniae* tanto por su alta constante específica (k_{cat}/K_M), como por su fuerte preferencia por el piruvato como sustrato ($R=0.08$) y por el amplio conocimiento que se posee de su estructura (Siew Siew Pang, 2004). Esta acetolactato sintasa está compuesta por un total de 4 monómeros idénticos entre sí, cada uno conformado por 559 residuos aminoacídicos, además de necesitar de cofactores tales como Tiamina difosfato (TPP) e iones de Mg^{+2} para su correcto funcionamiento (Siew Siew Pang, 2004). En la Figura 17 se observan los aminoácidos que componen el sitio activo de la enzima.

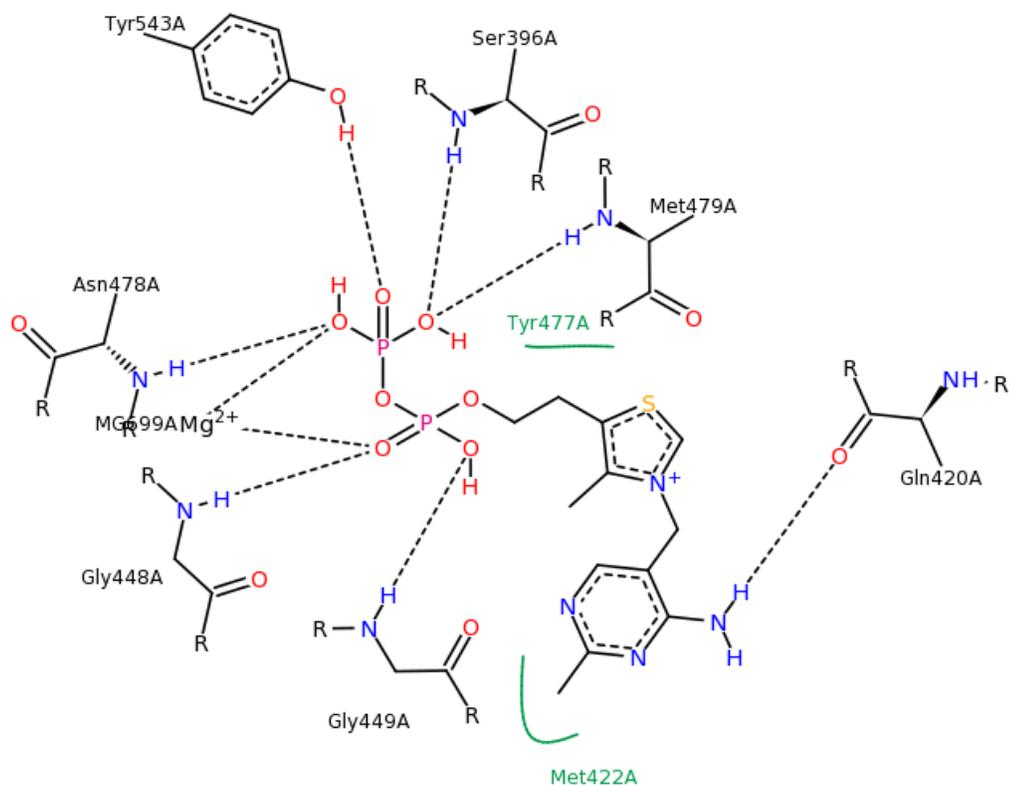


Figura 17. Aminoácidos que componen el sitio activo de la enzima acetolactato sintasa de *K. pneumoniae* y su interacción con el cofactor TPP donde posteriormente se une el ligando (Siew Siew Pang, 2004).

La mayoría de los aminoácidos que componen el sitio activo son aminoácidos polares a excepción de las metioninas que son apolares. No se observan aminoácidos ácidos o básicos.

5.2 Definir la mutación a realizar.

Estos aminoácidos se reconocieron como los principales candidatos para las mutaciones debido a su interacción directa con el sustrato y a su participación en la catálisis de la reacción. Cada aminoácido candidato se reemplazó por un aminoácido polar, uno no polar, uno ácido, uno básico y uno aromático. Los resultados se presentan en la tabla 11.

Tabla 8. Resultados del Molecular Docking de las mutaciones. Para cada mutación se entrega el valor de FullFitness [kcal/mol] y ΔG [kcal/mol] correspondiente. En amarillo el menor valor de ΔG , correspondiente al mejor acoplamiento enzima-sustrato. La enzima ALS de *K. pneumoniae* wild type posee valores FullFitness y ΔG de -2524,14 [kcal/mol] y -12,36 [kcal/mol] respectivamente.

Mutación	Ser396		Gln420	x	Met422		Gly448	x	Gly449	X	Tyr477	
	FullFitness	Delta G										
D (Asp)	-2513,76	-11,75	-2571,5	-12,36	-2544	-12,06	-2490,75	-10,82	-2518,3	-11,98	-2527,69	-11,71
G (Gly)	-2522,59	-12,24	-2523,39	-12,37	-2525,01	-12,3					-2523,35	-12,07
N (Asn)	-2525,74	-12,36	-2527,83	-12,37	-2528,31	-12,36	-2523,71	-12,09	-2525,13	-12,41	-2518,58	-12,19
R (Arg)	-2547,96	-12,77	-2547,45	-12,38	-2524,46	-12,32	-2525,84	-9,58	-2561,56	-12,34	-2556,63	-12,4
S (Ser)			-2522,51	-12,37	-2555,77	-12,5	-2513,07	-12	-2521,81	-12,39	-2520,2	-12,15
W (Trp)	-2521,11	-12,31	-2523,95	-12,37	-2510,77	-11,13	-2515,75	-12,32	-2523,64	-12,43	-2520,64	-12,39
K (Lys)	-2553,8	-12,81									-2564,08	-12,37
F (Phe)					-2521	-12,21						
Y (Tyr)					-2518,6	-12,21						
L (Leu)					-2524,38	-12,42						
M (Met)											-2522,42	-12,45

Mutación	Asn478		Met479		*Gln483	X	Tyr543	
	FullFitness	Delta G						
D (Asp)	-2530,08	-11,39	-2520,8	-11,86	-2530,1	-12,32	-2554,01	-11,92
G (Gly)	-2525,32	-12,03	-2524,4	-12,26	-2519,29	-12,36	-2527,56	-12,1
N (Asn)			-2525,84	-12,35	-2520,56	-12,37	-2532,88	-12,18
R (Arg)	-2549,81	-13,03	-2549,56	-11,28	-2550,04	-12,4	-2577,67	-13,87
S (Ser)	-2522,84	-12,06	-2520,84	-12,23	-2517,65	-12,37	-2526,56	-12,07
W (Trp)	-2524,57	-12,25	-2522,7	-12,37	-2515,23	-12,38	-2525,96	-12,33
K (Lys)	-2545,82	-12,76					-2586,19	-13,8
Q (Gln)	-2522,22	-12,18	-2523,13	-12,26				
Y (Tyr)	-2523,4	-12,26						
L (Leu)			-2526,4	-12,34				

Los resultados obtenidos a partir de los análisis de molecular docking se expresan en dos formas distintas: FullFitness y ΔG . El valor correspondiente a la energía libre (ΔG) es el parámetro que se utilizó para determinar la mutación más conveniente, esto debido a que este valor nos entrega un índice sobre la espontaneidad del proceso de unión entre el ligando y el sitio activo de la enzima, mientras menor sea el valor de la energía libre más espontáneo tenderá a ser el proceso y por ende se unirán más ligandos a sus correspondientes sitios activos por unidad de tiempo, esto favorecerá la capacidad catalítica de la enzima (K_M y v_{max}), sin embargo la expresión matemática explícita que correlaciona las variaciones en ΔG con las variaciones en la constante de Michaelis y la velocidad máxima es particular para cada caso dependiendo del tipo de catálisis y el tipo de enzima entre muchos otros factores, y en este caso particular no se logró calcular.

A partir de los resultados obtenidos en la tabla 11 se observa que la mayor afinidad enzima-sustrato se obtiene cuando se muta la tirosina en la posición 543 por un arginina, obteniéndose así un valor de ΔG de -13,87 [kcal/mol]. Otra mutación importante se obtiene al mutar el aminoácido 478, asparagina, por una arginina, en donde el valor del ΔG es de -13,07 [kcal/mol]. Se obtuvieron además casos en los que las mutaciones solamente disminuyeron la afinidad como es el caso la glicina ubicada en la posición 448 de la cadena aminoacídicas, pero en general en la mayoría de las mutaciones realizadas la afinidad no varía en gran medida. Se decidió entonces que la mutación con la cual se trabajara corresponde a la acetolactato sintasa Y543R. Es posible que al efectuar sobre la enzima todas las mutaciones que produjeron un aumento en la afinidad al mismo tiempo la afinidad neta sea superior a la de una sola mutación, pero esto también aumenta la probabilidad de que se produzcan fallas estructurales en la enzima debido al alto número de mutaciones, por lo que se decidió solamente trabajar con una.

Dentro de los distintos aminoácidos probados en la posición 543 aquellos que produjeron la mayor afinidad fueron la Arginina y la Lisina, ambos aminoácidos básicos, es decir, que tienden a estar cargados positivamente. El mismo fenómeno se da al momento de analizar las distintas mutaciones efectuadas en la posición 478 de la cadena aminoacídicas. Esto se puede deber a que el tipo de catálisis de la reacción de piruvato a acetolactato es una catálisis básica, y en esas posiciones originalmente se encuentran la asparagina (478) y la tirosina (543) que son aminoácidos polares sin carga. Otro resultado que apoya esta hipótesis radica en el bajo valor de ΔG al probar con ácido aspártico (Asp) en estas posiciones dado que es un aminoácido ácido y tiende a estar cargado negativamente.

5.3 Extracción del DNA genómico del microorganismo, amplificación del 16S DNA y amplificación del gen *ilvK*.

En la Figuras 18, 19 y 20 se presentan los resultados de extracción del DNA genómico de *Klebsiella pneumoniae*, la amplificación del 16S DNA y la amplificación del gen *ilvK* respectivamente. Como se observa en la Figura 18, la extracción del DNA genómico de la cepa

ATCC arroja una banda de aproximadamente 20000bp, mientras que para la cepa TM no se observó banda.

Posteriormente se prosiguió con el análisis filogenético de las cepas. En la figura 19 se observan los resultados de amplificación del 16S DNA utilizando los partidores universales FD1 y RP2. Como resultado se observan bandas en todos los carriles de 1500bp aproximadamente, lo que concuerda con los resultados esperados, sin embargo la intensidad de las bandas es más marcada en los ensayos hechos con la cepa ATCC y el control positivo, mientras que la intensidad de las bandas correspondientes a la cepa TM y al control negativo es significativamente menor.

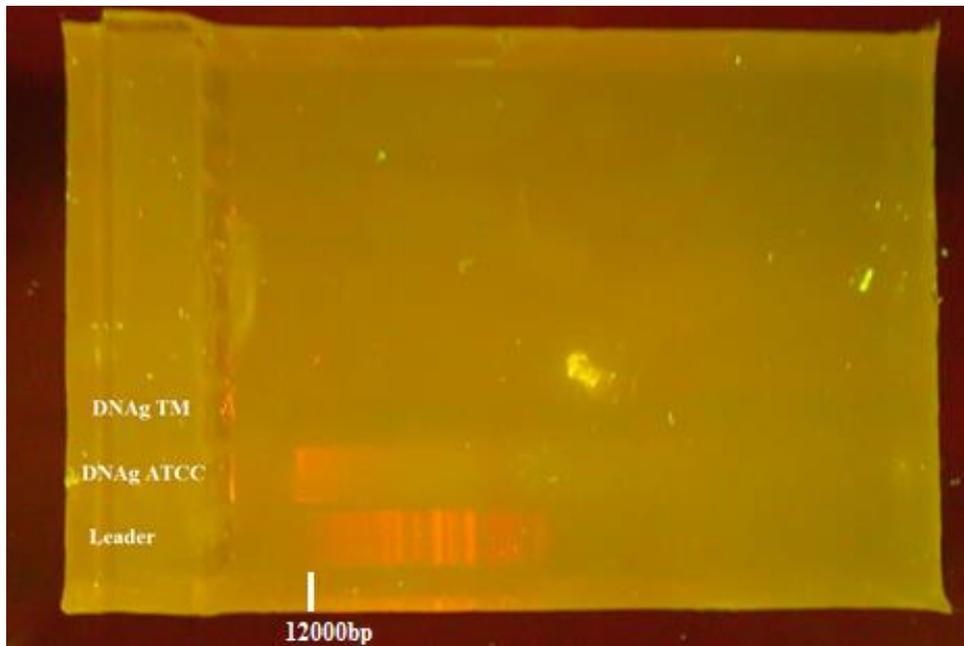


Figura 18. Electroforesis del DNA genómico de la cepa ATCC y TM. Se observa una banda de 20000bp aproximadamente para la cepa ATCC, para la cepa TM no se observa banda. Se utilizó el ladder 1k Plus DNA.

Debido a que la extracción del DNA genómico de la cepa TM no arrojó ninguna banda no se esperaba obtener una amplificación en ese carril, al igual que en el carril del control negativo. La obtención de banda en estos carriles puede deberse que la enzima phusion X7 utilizada para el PCR se extrae en el mismo laboratorio a partir de una bacteria, sin un correcto procedimiento de purificación, por lo que es probable que se tengan restos de 16S DNA del microorganismo en las alícuotas de la enzima. Se intentó eliminar este factor utilizando la versión comercial de la enzima que si viene correctamente purificada pero igual se obtuvieron bandas de poca intensidad en los carriles de TM y C-. Al comparar las bandas de estas dos muestras se observa que la banda del control negativo se encuentra menos marcada, mientras que la banda correspondiente a la muestra TM se encuentra un poco más marcada, esto puede deberse a una contaminación del control negativo, lo que produce de todas formas la expresión de una banda de 16S DNA, mientras que para la banda expresada en el carril de la muestra TM esta banda se presenta más marcada probablemente porque aunque la extracción del DNA genómico de la cepa TM no

resultado correctamente, de todas formas se extrajeron fragmentos de DNA más pequeños, a partir de los cuales también se pueden amplificar fragmentos de 16S DNA.

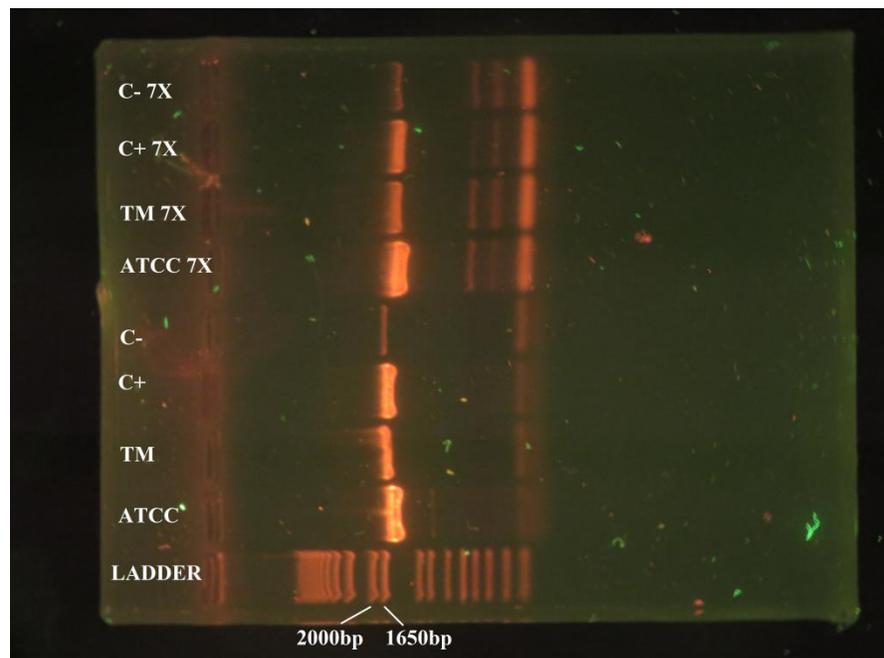


Figura 19. Amplificación del 16S DNA a la cepa *K. pneumoniae* ATCC, *K. pneumoniae* TM, *E. coli* (Control positivo) y control negativo. La amplificación fue hecha tanto con la enzima Phusion polimerasa producida en el laboratorio (phusion X7) como con la versión comercial. Se utilizó el ladder 1k Plus DNA.

Una vez realizado el estudio filogenético de las cepas se prosiguió a la amplificación del gen *ilvK*. Para la amplificación de este gen se utilizaron los partidores IlvEc_FW e IlvEC_RV, cuya secuencia y temperatura de annealing óptima se encuentran descritas en el Anexo N°4. Se utilizaron distintas temperaturas de annealing además de la calculada teóricamente (59,4°C) para verificar a que temperatura se observaba mejor la banda de interés. En la figura 20 se observa que para todas las temperaturas de annealing probadas se obtiene una banda bien determinada de tamaño aproximado de 1500bp, lo cual se acerca mucho al tamaño del gen *ilvK* (1680 bp).

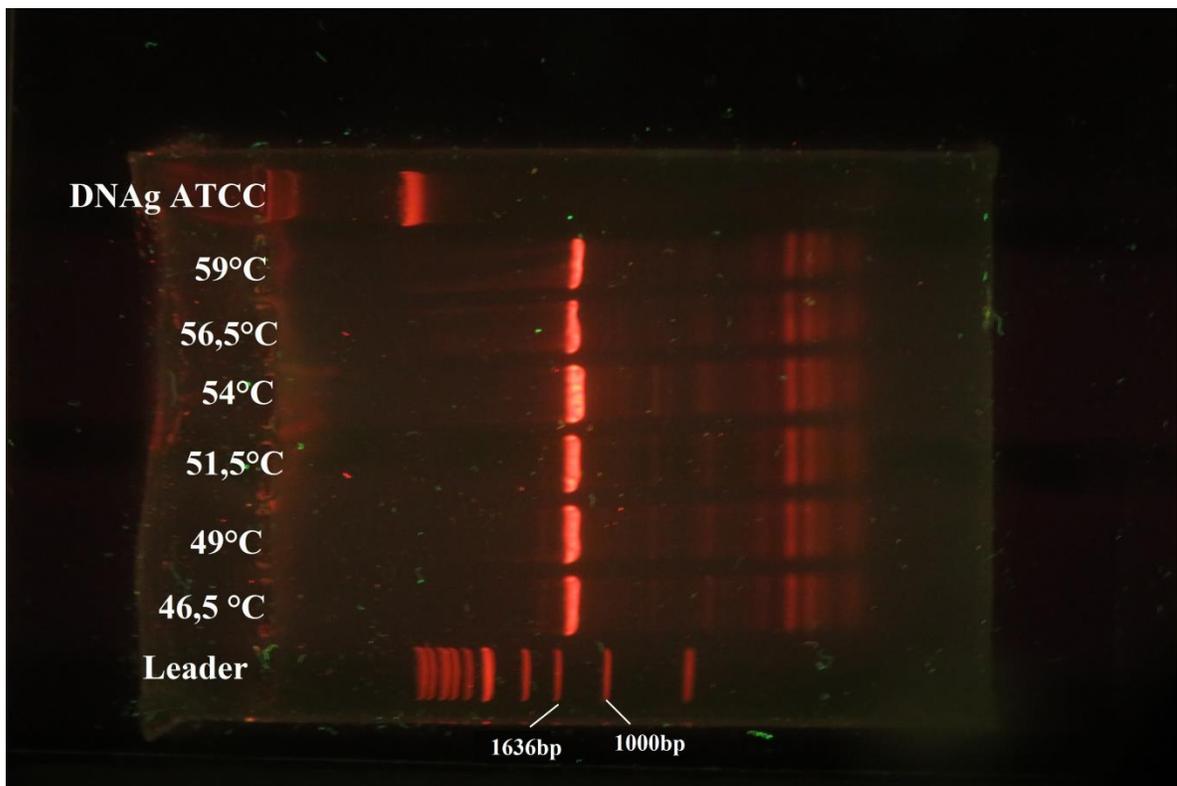


Figura 20. PCR gradiente para la amplificación del gen *ilvK*. Para todas las temperaturas de annealing probadas se obtiene la banda de interés de tamaño 1500bp aproximadamente. El Ladder utilizado fue 1kb DNA 1.

Dado que la electroforesis es una técnica de estimación de tamaños no tan robusta, la alta especificidad de la complementariedad de bases en el diseño de partidores y la gran similitud entre el tamaño de las bandas obtenidas con el tamaño teórico del gen *ilvK* (1680bp) se estima una alta probabilidad de que las bandas resultantes correspondan efectivamente a la amplificación del gen *ilvK*.

Se observan además de las bandas de interés bandas de menor intensidad correspondientes a amplificaciones inespecíficas dadas por las distintas temperaturas de annealing. Para seguir trabajando sin la interrupción de amplificaciones inespecíficas se determinó establecer la temperatura teórica (59°C) como la temperatura a utilizar en experimentos de amplificación posteriores. Todos los ladders utilizados en estos ensayos se encuentran en el Anexo N°5.

5.4 Ligación del gen *ilvK* en vector pET22b y transformación de *E. coli* BL21 (DE3).

Posterior a la purificación del gen *IlvK* se prosiguió con la obtención del vector pET22b linealizado. En la figura 21 se aprecia la electroforesis realizada con el pET22b Backbone, se observa que el tamaño del fragmento se encuentra entre los 5000bp y las 6000bp, lo cual concuerda con el tamaño esperado del vector backbone (5493bp).

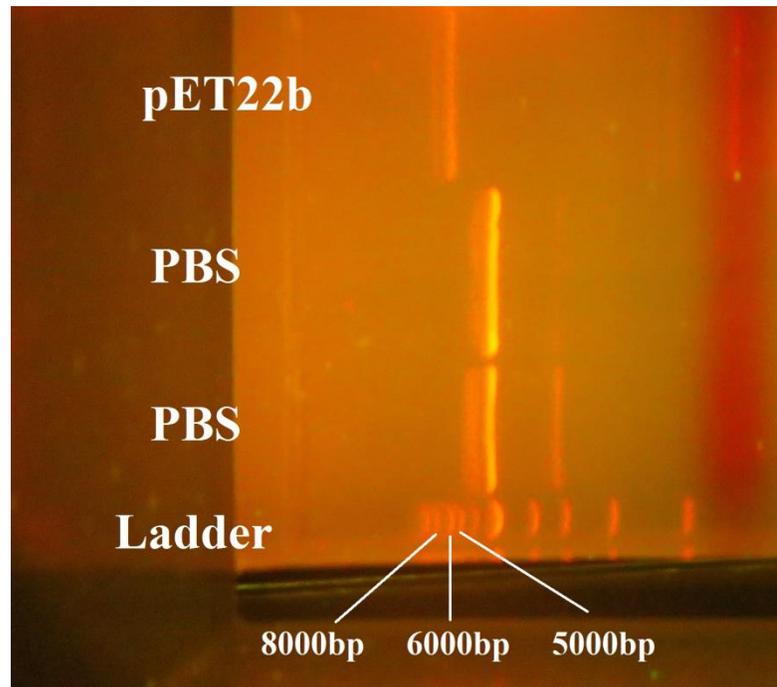


Figura 21. Electroforesis del pET22b Backbone. El ladder utilizado corresponde a 1kb DNA 2.

A partir de aquí se prosiguió con la ligación del gen *ilvK* y el vector utilizando la técnica de Gibson Assembly tal como se describe en la sección 4.5 de Metodologías. Posterior a la ligación se transformaron las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) con el vector pET22b-*ilvK* y se sembraron en LB agar con 100 ug/ml de Ampicilina. En las Figuras 22, 23, 24 y 25 se presentan los resultados de las siembras.

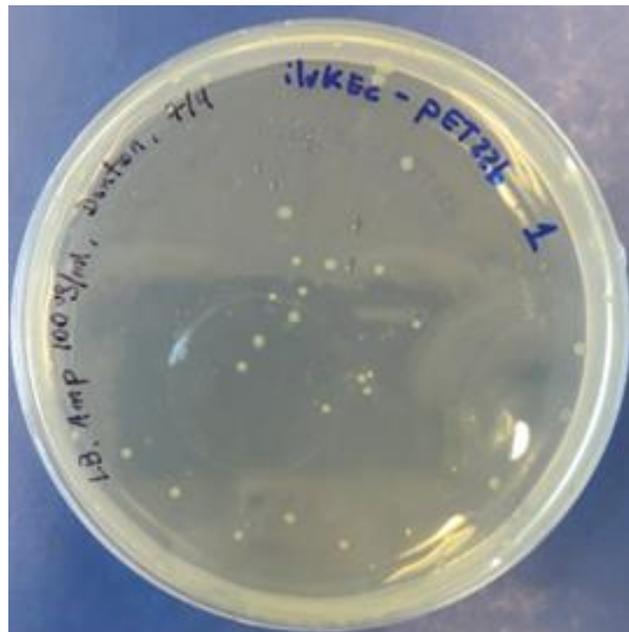


Figura 22. Resultado de la siembra de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b-*ilvK*. Placa N°1.

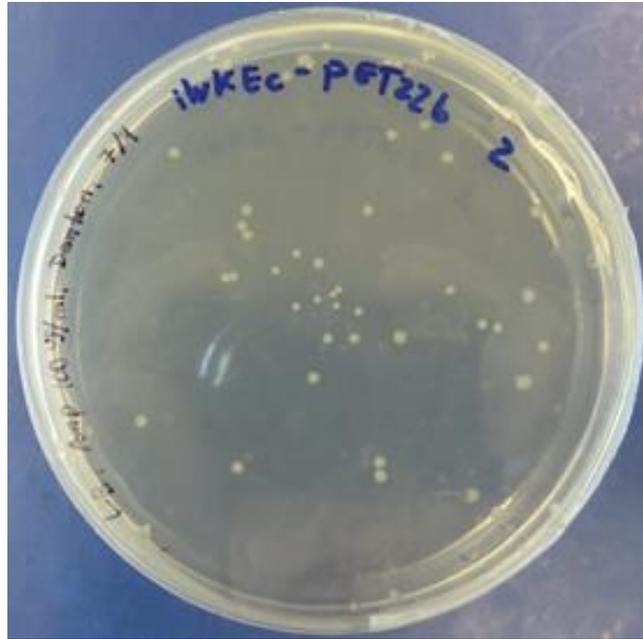


Figura 23. Resultado de la siembra de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b-*ilvK*. Placa N°2.

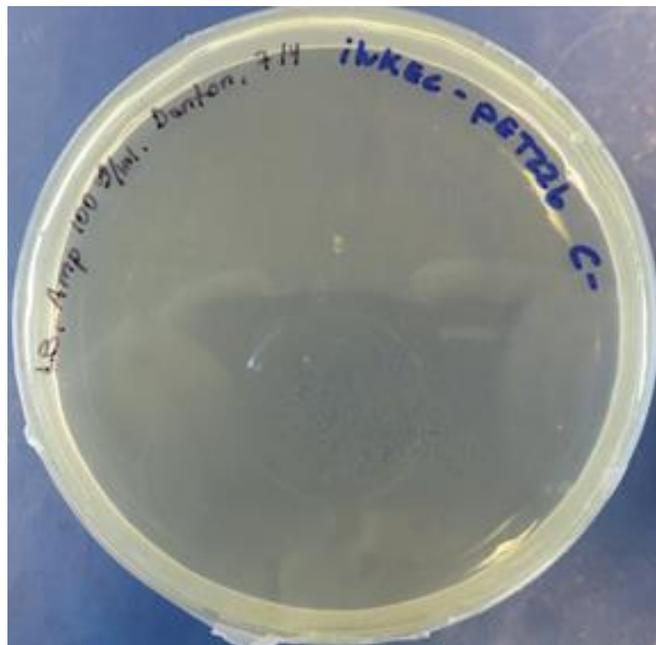


Figura 24. Resultado de la siembra de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) sin quimiotransformar (control negativo).

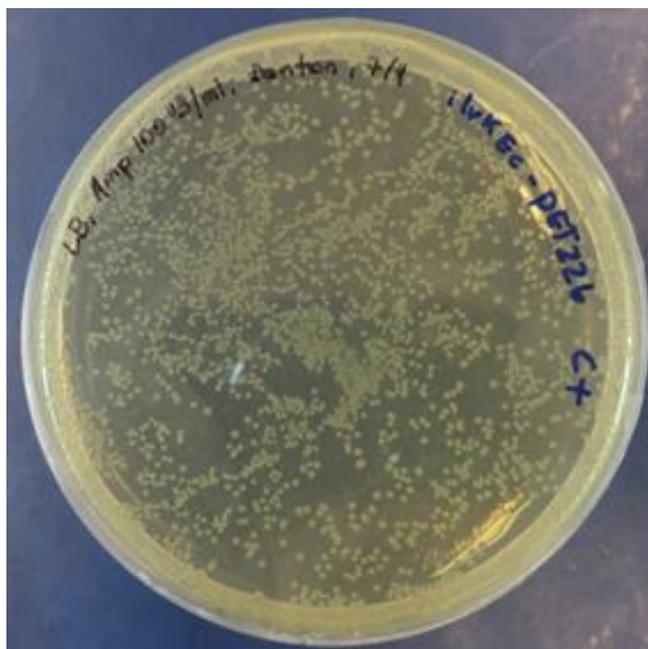


Figura 25. Resultado de la siembra de las bacterias *E. coli* BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b (control positivo).

Se observa que crecieron colonias tanto en la placa N°1 como en la placa N°2 correspondientes a bacterias quimiotransformadas con el vector pET22b-*ilvK*. No hubo crecimiento de colonias en el control negativo, mientras que en el control positivo se observó un gran crecimiento de colonias pET22b(+). La aparición de colonias tanto en las muestras como en el control positivo indican que el proceso de quimiotransformación funcionó correctamente. Aunque tanto en las muestras 1 y 2 como en el control positivo se sembraron inóculos con resistencia a ampicilina se observa que el crecimiento en el control positivo fue mucho mayor que en las muestras, esto se puede deber a que en el control positivo las BL21 (DE3) fueron transformadas exclusivamente con el vector pET22b circularizado, sin gen inserto, a diferencia de las BL21 (DE3) sembradas en las placas de muestra 1 y 2, que fueron transformadas con el vector pET22b más el gen *ilvK* de interés. Esto provoca que la carga metabólica en las muestras sea mayor y por ende se retrasa el crecimiento celular.

Para verificar si ligación por Gibson Assembly funcionó correctamente y por ende que las colonias crecidas en las placas 1 y 2 se encuentran efectivamente transformadas con el vector pET22b-*ilvK* se prosiguió a realizar un PCR colonia con cinco colonias de la placa 1 y cinco colonias de la placa 2. En las Figuras 26 y 27 se observan los resultados de estos ensayos.

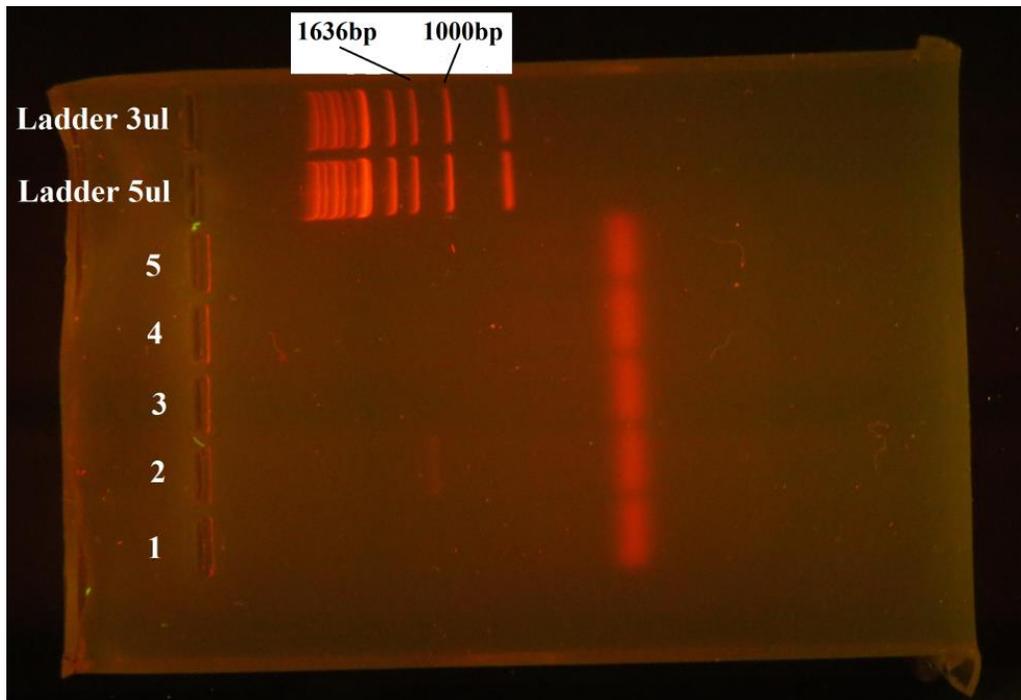


Figura 26. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°1. El ladder utilizado corresponde a 1kb DNA 1.

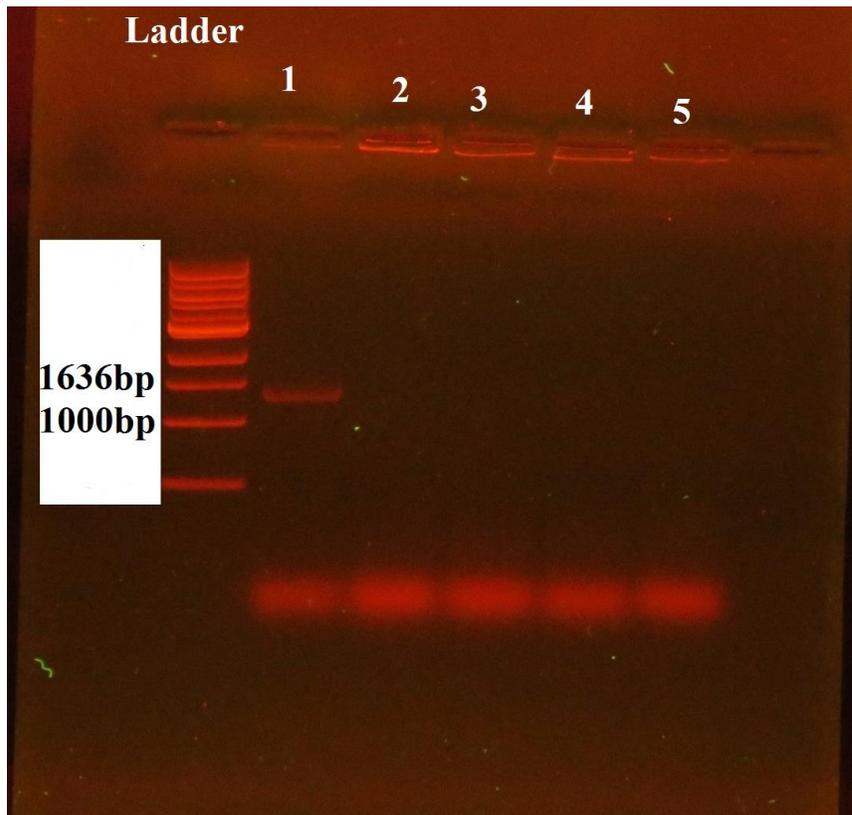


Figura 27. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°2. El ladder utilizado corresponde a 1kb DNA 1.

Se puede apreciar del ensayo PCR colonia de la Placa N°1 que solamente la colonia #2 presenta el gen *ilvK* insertado correctamente. Mientras que en el ensayo PCR de la Placa N°2 solamente la colonia #1 presenta el gen, pero a diferencia de la colonia de la Placa N°1 esta banda presenta mayor intensidad. La no expresión del gen en las otras colonias se puede deber a que las colonias son falsos positivos que crecieron debido a la degradación de la ampicilina luego de transcurrido el tiempo o a que el vector se recircularizo en el mix de ligación de Gibson Assembly sin integrar el gen, lo cual le otorgo resistencia a ampicilina a algunas colonias.

Se tomó la colonia #1 de la placa N°2 para preparar 10 ml de inóculo con el fin de extraer el vector pET22b-*ilvK* para secuenciación y además se preparó un glicerol stock de la colonia.

5.5 Producción de la proteína recombinante.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en la producción de proteína recombinante. Los resultados de las diversas inducciones realizadas se cargaron en dos electroforesis de proteína por separado. En la primera electroforesis (Figura 28) se cargaron las muestras inducidas con concentraciones de entre 0.1 mM y 0.4 mM de IPTG en medio LB, además de un control negativo sin inducir, mientras que en la segunda electroforesis (Figura 29) se cargaron los resultados de producción de proteína recombinante inducidos con 0.4 mM y 1 mM de IPTG tanto en medio LB como en medio TB.

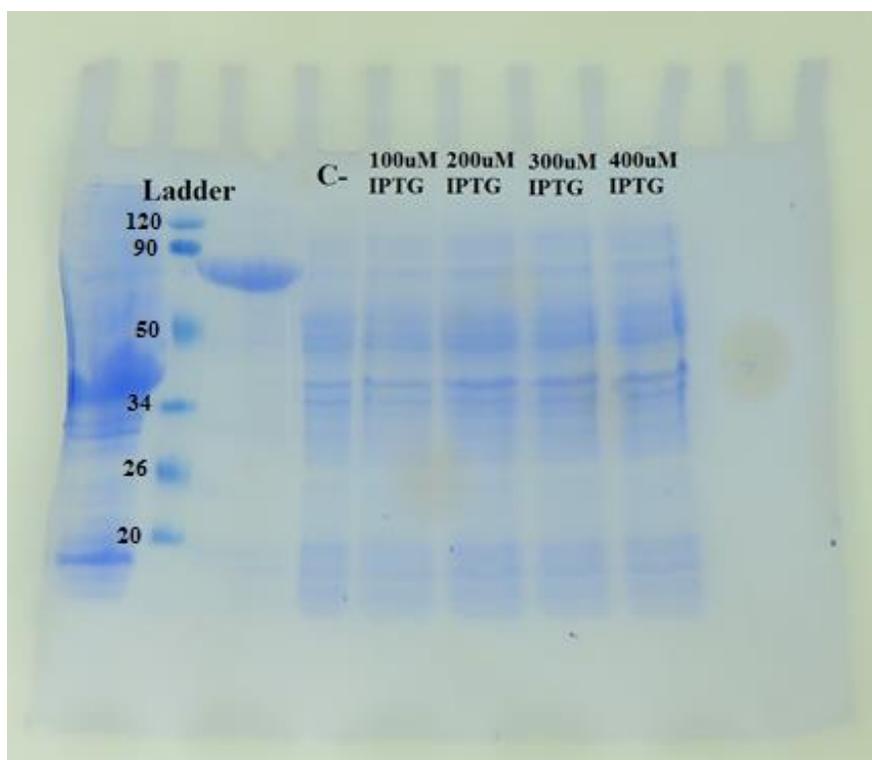


Figura 28. SDS PAGE de la primera electroforesis. De izquierda a derecha se observan: ladder, proteoma del control negativo sin inducir y consecutivamente las inducciones realizadas con concentración de 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM y 0.4 mM de IPTG en medio LB.

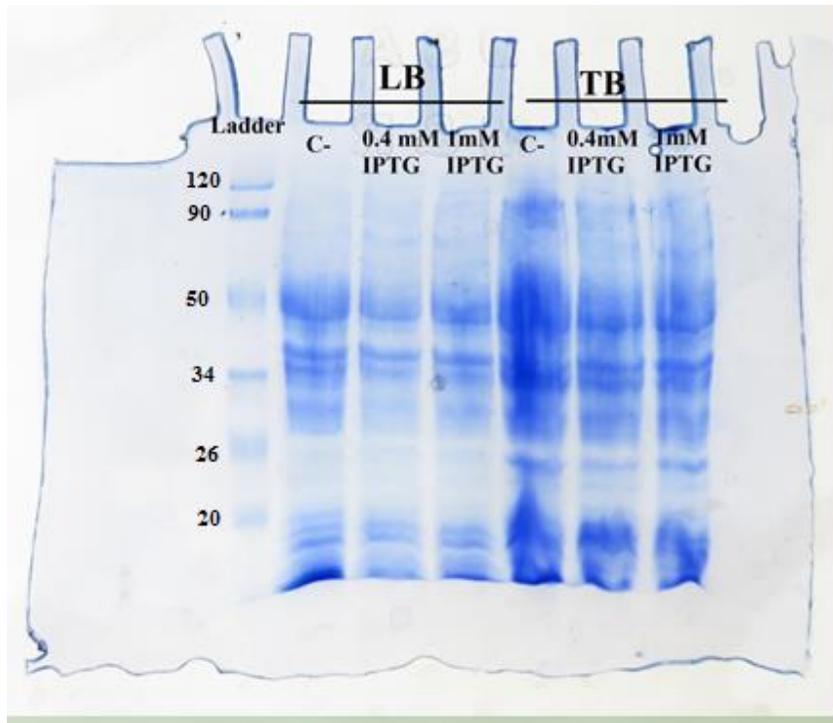


Figura 29. SDS PAGE de la segunda electroforesis. De izquierda a derecha se observan: ladder, lisado celular del control negativo sin inducir en medio LB, inducciones con concentraciones de 0.4 mM y 1 mM de IPTG en medio LB, lisado celular del control negativo sin inducir en medio TB e inducciones con concentraciones de 0.4 mM y 1 mM de IPTG en medio TB.

Se observa a partir de las electroforesis que aunque efectivamente la inducción con IPTG produce una mayor cantidad de proteína recombinante del tamaño que se esperaba (60 kDa), sin embargo este aumento no es de una magnitud tan significativa. Esto puede deberse a que las muestras de proteína cargadas se encontraban previamente diluidas, por lo que se dificulta una apreciación más clara de las bandas.

La elección de medio LB o TB parece fundamental, ya que la cantidad de proteína total producida en medio TB es claramente mayor a la cantidad producida en medio LB, esto puede deberse a que el medio TB ofrece una mayor cantidad de nutrientes para la célula y por ende existe una mayor fuente de recursos para la síntesis de proteínas.

Finalmente se observa que tanto en medio LB como en el TB se aprecia que la cantidad de proteína total producida por los controles negativos es mayor que la producida en las muestras inducidas. Esto puede deberse a que los controles negativos al no poseer el vector de expresión poseen menor carga metabólica y por ende una mayor capacidad de crecimiento que las bacterias transformadas con el vector. Esto provoca que en tiempos de crecimiento iguales la cantidad de microorganismos en los inóculos sea mayor en los controles negativos y por ende se tendrá también una mayor cantidad de proteína total (Jan Kostal, 2004).

Para verificar la expresión de la proteína recombinante se decidió realizar la purificación de la proteína mediante columna de cromatografía por “Gravity Flow”, tal como se describe en la sección 4.8 de Metodologías.

5.6 Purificación de proteína recombinante.

Se presenta en la Figura 30 la SDS PAGE con los resultados de la electroforesis de proteína realizada con las fracciones de lisis, lavado y elución de la columna de cromatografía.

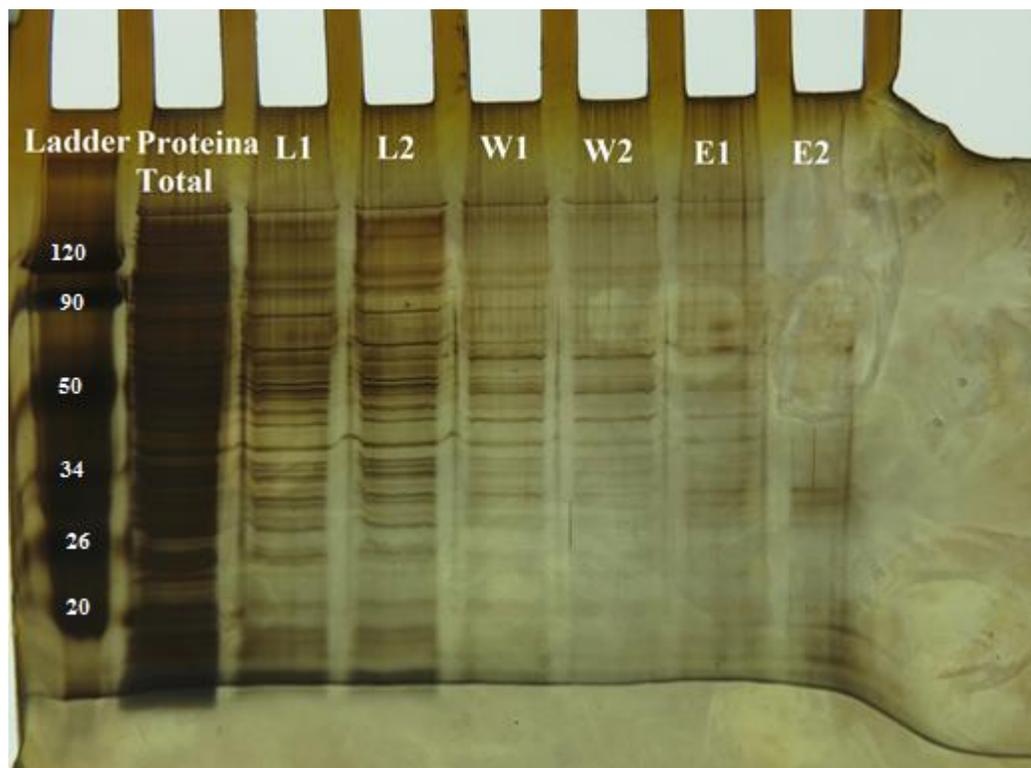


Figura 30. SDS PAGE de la electroforesis realizada con las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía. De izquierda a derecha: ladder, proteína total, fracciones 1 y 2 de lisis (L1 y L2), fracciones 1 y 2 de lavado (W1 y W2) y fracciones 1 y 2 de elución (E1 y E2).

Se obtuvieron 6 fracciones en total a partir de la cromatografía en la columna de Ni-NTA: dos fracciones de la solución de lisis, dos fracciones de la solución de lavado y dos fracciones de la solución de elución.

Se observa que en las fracciones de eluidas con solución de lisis se encuentra la gran mayoría de la proteína total cargada en la columna, mientras que en las fracciones de lavado la cantidad de proteína eluida es apreciablemente menor. Se puede apreciar también la similitud entre la segunda fracción de lavado y la primera fracción de elución, lo cual se debe probablemente a que al aumentar la concentración de imidazol al cargar el buffer de elución terminan por eluir las proteínas sin marcador His-Tag que no eluyeron con el buffer de lavado.

Finalmente se aprecia en la fracción E2 de elución una concentración de bandas de tamaños que rondan los 30 kDa. La intensidad de esta banda va en aumento desde la fracción W1 hasta la E2, lo cual indica que probablemente se trata de la proteína recombinante producida. Al observar las

Figuras 28 y 29 también se puede apreciar un aumento en la intensidad en la banda de 30 kDa a medida que la concentración de inducción con IPTG va en aumento, sin embargo este resultado no concuerda con lo esperado ya que el tamaño de la acetolactato sintasa es de 60 kDa aproximadamente.

5.6 Resultados de Secuenciación

Los resultados de secuenciación se encuentran en el Anexo N°6.

Se hizo un análisis BLAST con las secuencias 16S DNA resultante de las secuenciaciones y se corroboró que efectivamente el microorganismo correspondía a *Klebsiella pneumoniae* cepa ATCC 700660.

Al momento de analizar la secuencia del gen inserto en el vector pET22b se observó que esta no correspondía a la secuencia nucleotídica que codifica la acetolactato sintasa. Para determinar a qué gen correspondía la secuencia se realizó un análisis BLAST entre el gen inserto y el genoma del microorganismo y el resultado arrojó que el gen inserto corresponde a una enzima oxidoreductasa con un 98% de similitud, tal como se muestra en la Figura 31.

Klebsiella quasipneumoniae strain ATCC 700603, complete genome

Sequence ID: [CP014696.2](#) Length: 5284734 Number of Matches: 1

Range 1: 1196899 to 1198153 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
2191 bits(1186)	0.0	1235/1257(98%)	10/1257(0%)	Plus/Plus

Features: [oxidoreductase](#)
[FAD/NAD\(P\) binding domain-containing protein](#)

Query	7	ATCCACCCACAGGAAGGGAGAGAATCATGAAGAGAATCGCCATCGTCGGCGCCGGGCCGA	66
Sbjct	1196899	ATCCACCCACAGGAAGGGAGAGAATCATGAAGAGAATCGCCATCGTCGGCGCCGGGCCGA	1196958
Query	67	CGGGGATTTACACCTTGTATGAACTGGTGAAGCGTGGTGAGCCGCTATCGATCGCGCTGT	126
Sbjct	1196959	CGGGGATTTACACCTTGTATGAACTGGTGAAGCGTGGTGAGCCGCTATCGATCGCGCTGT	1197018
Query	127	TTGAAAAAGAGGCGCAGGCCGGGGTGGGTATGCCCTATAGCGACGATAAATACCGCGGCGC	186
Sbjct	1197019	TTGAAAAAGAGGCGCAGGCCGGGGTGGGTATGCCCTATAGCGACGATAAATACCGCGGCGC	1197078
Query	187	AGATGCTGGCCAATATTGCCAGCATTGAGATCCCCCTATTGACCTGACCTATCTGCAAT	246
Sbjct	1197079	AGATGCTGGCCAATATTGCCAGCATTGAGATCCCCCTATTGACCTGACCTATCTGCAAT	1197138
Query	247	GGCTGCAGCAGCAGAGCGACGACTGGCTGGCGGCGCGGCTTGAACGGCAGGCTCTGC	306
Sbjct	1197139	GGCTGCAGCAGCAGAGCGACGACTGGCTGGCGGCGCGGCTTGAACGGCAGGCTCTGC	1197198
Query	307	ATGAGCGCCAGTTTCTGCCGCGGGTGGTATCCTCGGCGAGTACTACCGCGACCGCTTTCTAT	366
Sbjct	1197199	ATGAGCGCCAGTTTCTGCCGCGGGTGGTATCCTCGGCGAGTACTACCGCGACCGCTTTCTAT	1197258
Query	367	ATCTTGTGCAACGGGCCAGAGACGCCGGCTTCGTGGTGAGCGTCTGCGAGTCTGTGAGG	426
Sbjct	1197259	ATCTTGTGCAACGGGCCAGAGACGCCGGCTTCGTGGTGAGCGTCTGCGAGTCTGTGAGG	1197318
Query	427	TCACAGATATTGCGGTGCAGCCCGTGGGATCGCCATCCACACCGACGGCGCGGCACAGC	486
Sbjct	1197319	TCACAGATATTGCGGTGCAGCCCGTGGGATCGCCATCCACACCGACGGCGCGGCACAGC	1197378

```

Query 487      CGGTAATGGTCGATCTGGTGGTGATTGCCACCGGCCATTTGTGGCCTGAAGAAGAACGCG 546
Sbjct 1197379 CGGTAATGGTCGATCTGGTGGTGATTGCCACCGGCCATTTGTGGCCTGAAGAAGAACGCG 1197438
Query 547      CCAGCCGGCAGTACTTCCCCAGTCCGTGGACCGCCTGATGGAGGCCCGCATCGCCCCCT 606
Sbjct 1197439  CCAGCCGGCAGTACTTCCCCAGTCCGTGGACCGCCTGATGGAGGCCCGCATCGCCCCCT 1197498
Query 607      GTCGGGTCGGGATCCTCGGGACCTCCTTAAGCGCGATTGATGCCGCCGTGGCGGTGGTGG 666
Sbjct 1197499  GTCGGGTCGGGATCCTCGGGACCTCCTTAAGCGCGATTGATGCCGCCGTGGCGGTGGTGG 1197558
Query 667      CCGGCCACGGCGTTTTCCATACTGAGCACGACAAAACCACCCATTTTTCCCTGCATCCCG 726
Sbjct 1197559  CCGGCCACGGCGTTTTCCATACTGAGCACGACAAAACCACCCATTTTTCCCTGCATCCCG 1197618
Query 727      GCAGCGACGCGCTGGAGATCACGCTGATGTCACGCAACGGCGTGCTGCCGGAGGCCGATT 786
Sbjct 1197619  GCAGCGACGCGCTGGAGATCACGCTGATGTCACGCAACGGCGTGCTGCCGGAGGCCGATT 1197678
Query 787      TTTACTGCCCGATCCCCTGGGAGCCGCTGGAGATCGCCACCCCCGCCGCCCTTGAAGGCG 846
Sbjct 1197679  TTTACTGCCCGATCCCCTGGGAGCCGCTGGAGATCGCCACCCCCGCCGCCCTTG-AGGCG 1197737
Query 847      GCCGTCGCTGAGGGCAGCGACGGCCTGCTGGATCGGGTGTTCAGCTGATCGTCCATGAG 906
Sbjct 1197738  GCCGTCGCTGAGGGCAGCGACGGCCTGCTGGATCGGGTGTTCAGCTGATCGTCCATGAG 1197797
Query 907      CTGGAATATGCCGCCCCGGCCTGGTGCAGGGCGACGGGGCTGCGCCAGCTGACGCCTGAC 966
Sbjct 1197798  CTGGAATATGCCGCCCCGGCCTGGTGCAGGGCGACGGGGCTGCGCCAGCTGACGCCTGAC 1197857
Query 967      AGCATCGCCGACGCCTGGTTTGCCGACCGTCTCACCCATGACCCCTTCCAGTGGGCGCAG 1026
Sbjct 1197858  AGCATCGCCGACGCCTGGTTTGCCGACCGTCTCACCCATGACCCCTTCCAGTGGGCGCAG 1197917
Query 1027     CACAATCTGCAGGAGGTGGAGCGCAATAAGCGCGAGCGCCACACGGTGCCCTGGCGCTAT 1086
Sbjct 1197918  CACAATCTGCAGGAGGTGGAGCGCAATAAGCGCGAGCGCCACACGGTGCCCTGGCGCTAT 1197977
Query 1087     GCCATTCTCCGCTGCACGAGGCGATTGAAACTGTGGTGCC-CAACTCAACGACGAGGAC 1145
Sbjct 1197978  GCCATTCTCCGCTGCACGAGGCGATTGAAACTGTGGTGCCCAACTCAACGACGAGGAC 1198037
Query 1146     AGCCGTCGCTTCCGCCAGGGG-TCCCCCGCGTGTT-ATTGA-AACTACCCTGCGATCCCG 1202
Sbjct 1198038  AGCCGTCGCTTCCGCCAGGGGCTCGCCCGCGTGTTATTGATAACTACGCTGCGATCCCG 1198097
Query 1203     C-GGAATCATTTT-CCGGGTGGTGGTTCTG-ACCggggggg-ATTCTTCAATATTGT 1255
Sbjct 1198098  CCGGAGTCCATTGCGCGCTGCTGGCTCTGCACCGGGCGGGCATTCTGCGA-ATTGT 1198153

```

Figura 31. Análisis BLAST hecho entre la secuencia del inserto y el DNA genómico de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700660. Se observa una correspondencia del 98% entre la secuencia del inserto y un gen codificante para una enzima oxido-reductasa.

El tamaño del gen que codifica esta enzima oxido-reductasa es de 1608bp, mientras que el tamaño del inserto es de 1257bp, por lo que se concluye que el gen se sintetizó de forma incompleta. Al observar las electroforesis realizadas en las Figuras 20, 26 y 27 se puede ver que el tamaño del gen inserto concuerda con el tamaño de las bandas obtenidas.

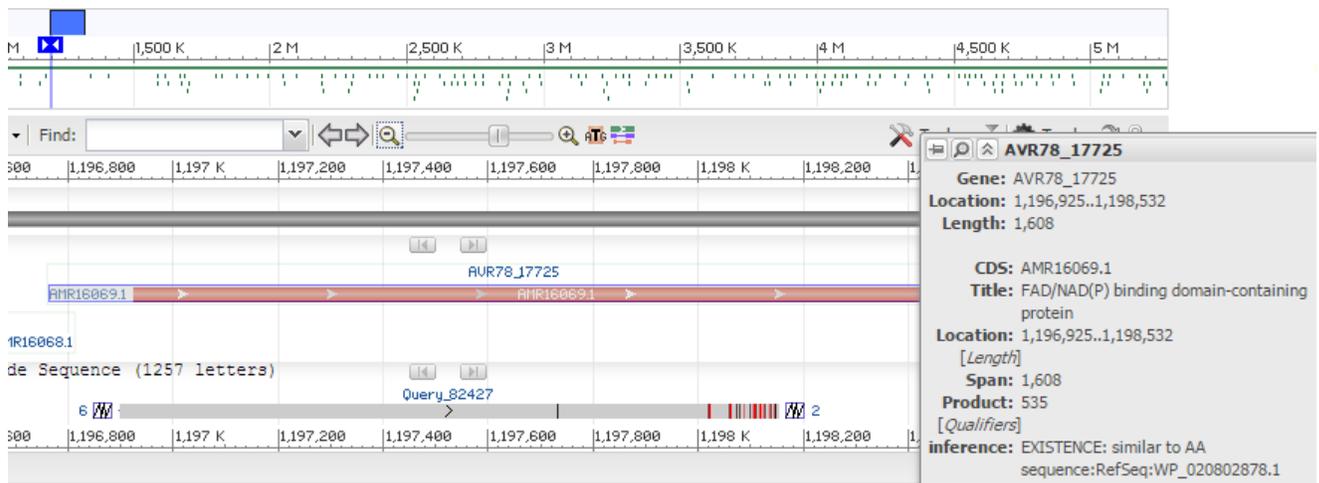


Figura 32. Ubicación del gen codificante de la enzima oxido-reductasa en el genoma de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700660. Se observa que el largo total del gen es de 1608bp.

Se analizaron las secuencias nucleotídicas tanto al inicio como al final del inserto para verificar la complementariedad con los partidores *ilvEc_FW* y *ilvEc_RV* y se obtuvo que las secuencias coinciden en un 52,3% con *ilvEc_RV* y en un 55% con *ilvEc_FW*. Esto explica por qué a 54°C la banda es más marcada que a 59°C que es la temperatura de annealing teórica de los partidores (Figura 20), a partir de aquí al ir disminuyendo la temperatura se favorecen un mayor número de amplificaciones inespecíficas por lo que la intensidad de la banda empieza a ser menor.

```

ilvEc_RV: ATGGACAAACAGTATCCGGTA
          ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
1196899: ATCCACCCACAGGAAGGGAGA
          11/21 Matches

```

```

ilvEc_FW: TTACAGAATCTGACTCAGATGC
          ||  ||  ||  ||  ||  ||  ||
1198149: TCGCAGAATGCCCGCCCGGTGC
          12/22 Matches

```

Figura 33. Análisis de complementariedad entre los partidores *IlvEc_FW* e *IlvEc_RV* con las secuencias complementarias del inserto. Se observan una complementariedad del 52.3% para el partidor *IlvEc_RV* y del 55% para el partidor *IlvEc_FW*.

Dado que el inserto se sintetizó de forma incompleta se analizó la secuencia con un traductor de nucleótidos para ver la proteína que se sintetizaba. Se observa un codón de inicio (ATG) en la posición N° 33 del inserto, por lo que se espera que la transcripción empiece desde este punto. Como resultado de este análisis se obtuvo una proteína de 274 residuos y 30.18 kDa de tamaño. Aunque la secuencia nucleotídica del inserto es de 1257bp al momento de copiar el gen se produjeron mutaciones que determinaron la aparición de un codón de termino en la posición 855 de la secuencia, es por esto que en la fracción de elución E2 se obtiene una banda de tamaño cercano a los 30kDa. Al momento de analizar las electroforesis de proteínas en las Figuras 28 y 29 también se logra apreciar un aumento en la intensidad de las bandas de 30 kDa de tamaño.

```

MKRIAIVGAGPTGIYTLVELVKRGEPLSIALFEKEAQAGVG MPYSDDNTAAQ
MLANIASIEIPPIDLTYLQWLQQQSDDWLAARGLERQALHERQFLPRVILGE
YYRDRFLYLVQRARDAGFVVSVCESCEVTDIAVQPVGIAIHTDGAAQPV MV
DLVVIATGHLWPEEERASRQYFSPWTGL MEARIAPCRVGILGTSLSAIDA
AVAVVARHGVFHTTEHDKTTHFSLHPGSDALEITL MSRNGVLPEADFYCPIP
WEPLEIATPAALEGGRR Stop G QRRPAGSGVPADRP Stop A GICRPGLVRGDG
AAPADA Stop Q HRRRLVCRPSHP Stop P LPVGAAQSAGGGAQ Stop A RAPHGAL
ALCHSPARGD Stop N CGAQLNDEDSRRFRQGSPACY Stop N YPAIPRNHFP
GGGSDRGGFFNIV

```

Figura 34. Secuencia aminoacídica obtenida a partir de la traducción de la secuencia nucleotídica del inserto. Se obtienen en total 274 residuos aminoacídicos.

Finalmente para entender el por qué los partidores no amplificaron el gen *ilvK* se analizaron distintas secuencias nucleotídicas de la enzima acetolactato sintasa en distintas cepas de *Klebsiella pneumoniae* y se observó que las secuencias variaban mucho entre unas y otras (Resultados no disponibles), por lo que probablemente la secuencia a partir de la cual se realizó el diseño de partidores y la secuencia con la que se trabajó en el laboratorio no eran las mismas. Sin embargo, en la Figura 20 en los carriles correspondientes a 46,5°C y 49°C se logra apreciar una banda muy tenue, cuyo tamaño se encuentra entre los 2000bp y los 1636bp. Esta banda probablemente corresponda al gen *ilvK*, por lo que para corroborar esta hipótesis se propone un ensayo de NESTED PCR para trabajos futuros.

6. Conclusiones y Recomendaciones

- Se determinó trabajar con la enzima acetolactato sintasa de *Klebsiella pneumoniae*, esto debido a su alta constante específica ($k_{cat} / K_M = 15.6$), su preferencia por el piruvato como sustrato ($R=0.08$) y el amplio conocimiento que se posee de su estructura y funcionamiento.
- De todos los ensayos de mutagenesis *in silico* realizados se propone la mutación Y543R para realizarse experimentalmente. Esto debido a que esta mutación produce una disminución del 12,2% en la energía libre (ΔG) en comparación a la estructura original, por lo que se esperaría que la espontaneidad del proceso de catálisis se viese favorecido obteniendo valores más altos de constante específica. Se obtuvieron otros resultados prometedores en los ensayos de mutagenesis, pero se escogió realizar solamente la mutación mencionada debido a que un mayor número de mutaciones podría alterar la estructura de la enzima.
- No se logró obtener satisfactoriamente el gen *ilvK* que codifica la enzima acetolactato sintasa de interés, y por ende tampoco se logró la expresión de la proteína recombinante. Un error en el diseño de primarios dio paso a que en los ensayos de laboratorio se obtuviera un gen codificante para una enzima oxido-reductasa de tamaño similar al gen *ilvK*, sin embargo existe una alta probabilidad de que la banda correspondiente al gen *ilvK* se encuentre presente en los ensayos de PCR a temperaturas más bajas (46.5°C y 49°C), en donde se ven favorecidas las amplificaciones inespecíficas.
- Se propone para futuros trabajos un ensayo de NESTED PCR para la correcta obtención del gen *ilvK*. Se propone además la expresión de la enzima acetolactato sintasa con la mutación seleccionada a partir de los análisis *in silico* para así poder comparar la actividad catalítica de esta con la de la enzima sin mutaciones.

7. Bibliografía

- Artinaid Organization*. (2013). Recuperado el 26 de 12 de 2016, de Carbon Mineral: www.artinaid.com
- Aurelien Grosdidier, V. Z. (2011). SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acid Research*, 270-277.
- Bridgewater, T. (2006). Biomass for energy. *SCI*, 1755-1768.
- D. Leyval, D. U. (2003). Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in avaline-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology*, 241-252.
- Daniel Gibson, L. Y.-Y. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 343-345.
- Database, *Saccharomyces Genome*. (2016). *Saccharomyces cerevisiae Pathway: superpathway of leucine, isoleucine, and valine biosynthesis*. Recuperado el 24 de 12 de 2016, de <http://pathway.yeastgenome.org/YEAST/NEW-IMAGE?type=PATHWAY&object=BRANCHED-CHAIN-AA-SYN-PWY&detail-level=2>
- David Chipman, Z. B. (1998). Biosynthesis of 2-aceto-2-hydroxy acids: acetolactate synthases and acetohydroxyacid sintases. *biochimica et biophysica*, 401-419.
- Dennis Flint, M. E. (1987). Dehydroxiacid Dehydratasa from Spinach contain a [2Fe-2S] Cluster. *The journal of biological chemistry*, 3558-3564.
- Dennis Flint, M. E. (1993). The role and properties of the iron-sulfur cluster in *Escherichia coli* Dihydroxyacid Dehydratasa. *The journal of biological chemistry*, 14732-14742.
- Energy Information Administration*. (2005). Recuperado el 26 de 12 de 2016, de <https://www.eia.gov/>
- Eric Pettersen, T. G. (2004). UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *Journal of Cumputer Chemistry*, 1605-1612.
- Festel, G. (2008). Biofuels - Economics Aspects. *Chem. Eng. Technol.*, 715-720.
- Generadoras de Chile*. (2017). Recuperado el 3 de 1 de 2017, de <http://generadoras.cl/media/page-files/274/Bolet%C3%ADn%20Generaci%C3%B3n%20Enero%202017.pdf>
- Goldemberg, J. (2009). Biomassa e Energía.
- Hackenberg, N. (2003). *Árboles y Los Biocombustibles de Segunda Generación*. Recuperado el 23 de 5 de 2017, de <http://www.arbolesymedioambiente.es/bios-segunda-generacion.html>
- Inna Belenky, A. S. (2012). Many of the functional differences between acetohydroxyacid synthase (AHAS) isozyme I and other AHASs are a result of the rapid formation and

- breakdown of the covalent acetolactate–thiamin diphosphate adduct in AHAS I. *the FEBS journal*.
- James Liao, S. A. (2016). *Patente n° 0138051*. Estados Unidos.
- Jan Kostal, R. Y. (2004). Enhanced Arsenic Accumulation in Engineered Bacterial Cells Expressing ArsR. *Applied and environmental microbiology*, 4582-4587.
- John Hofler, C. D. (1975). The Subunit Structure of a alpha-Acetohydroxyacid Isomeroreductase from Salmonella typhimurium. *The journal of Biological Chemistry*, 877-882.
- Jorg Durner, O. K. (1999). Ketol-Acid reductoisomerase from Barley. *Plant Physiology*, 903-910.
- Kazuyoshi Kiritani, S. N. (1965). The Dihydroxy Acid Dehydratase of Neurospora crassa. *The journal of Biological Chemistry*.
- Kazuyoshi Kiritani, S. N. (1966). the reductoisomerase of neurospora crassa. *The journal of biological chemistry*.
- Lucie Hazelwood, J.-M. D. (2008). The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on Saccharomyces cerevisiae Metabolism. *applied and environmental microbiology*, 2259-2266.
- Natan Gollop, B. D. (1990). Physiological Implications of the Substrate Specificities of Acetohydroxy Acid Synthases from Varied Organisms. *Journal of Bacteriology*, 3444-3449.
- Nicolaas Buijs, V. S. (2013). Advanced biofuel production by the yeast Saccharomyces. *Current opinion in Chemical Biology*, 480-488.
- Patricia Latorre, R. F. (2004). *El mercado internacional de algas para consumo humano*. Recuperado el 29 de 12 de 2016, de <http://www.i-mar.cl/extension/documentos/62-67.pdf>
- Rachna Bhatnara, R. D. (2015). Algae as biofuel. *Biofuels Magazine*.
- Ronald Duggleby, S. S. (2000). Acetohydroxyacid Synthase. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 1-36.
- Sabine Bastian, X. L. (2011). Engineered ketol-acid reductoisomerase and alcohol dehydrogenase enable anaerobic 2-methylpropan-1-ol production at theoretical yield in Escherichia coli. *Metabolic Engineering*, 345-352.
- Seonghun Kim, S. B. (2006). Catalytic Promiscuity in Dihydroxy-Acid Dehydratase from the Thermoacidophilic Archaeon Sulfolobus solfataricus. *Journal of Biological Chemistry*, 591-596.
- Siew Siew Pang, R. D. (2004). The Crystal Structures of Klebsiella pneumoniae Acetolactate Synthase with Enzyme-bound Cofactor and with an Unusual Intermediate. *The journal of biological chemistry*, 2242-2253.
- Takahiro Shimosaka, H. T. (2016). Regulation of coenzyme A biosynthesis in the hyperthermophilic bacterium Thermotoga maritima. *Journal of Bacteriology*.

wikipedia. (2016). *Valina*. Recuperado el 29 de 12 de 2016, de <https://es.wikipedia.org/wiki/Valina>

Yadi Liu, Y. L. (2016). Acetohydroxyacid synthases: evolution, structure, and function. *Applicated Microbiology in Biotech*.

Zertuche, J. (2014). *SITUACION ACTUAL DEL CULTIVO DE ALGAS AGAROFITAS EN AMERICA LATINA Y EL CARIBE*. Recuperado el 28 de 12 de 2016, de <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB483S/AB483S01.htm#ch1>

8. Anexos

Anexo N°1: Secuencia nucleotídica gen *ilvK* (1680bp)

ATGGACAAACAGTATCCGGTACGCCAGTGGGCGCACGGCGCCGATCTCGTCGTCAGTCAGCT
GGAAGCTCAGGGAGTACGCCAGGTGTTTCGGCATCCCCGGCGCCAAAATCGACAAGGTCTTTG
ATTCAGTGTGGATTCCCTCCATTCGCATTATTCCGGTACGCCACGAAGCCAACGCCGCATTTA
TGGCCGCCCGCGTTCGGACGCATTACCGGCAAAGCGGGCGTGGCGCTGGTACCTCCGGTCCG
GGCTGTTCCAACCTGATCACCGGCATGGCCACCGCGAACAGCGAAGGCGACCCGGTGGTGGC
CCTGGGCGGCGCGGTAAAACGCGCCGATAAAGCGAAGCAGGTCCACCAGAGTATGGATACG
GTGGCGATGTTACGCCCGGTACCAAATACGCCATCGAGGTGACGGCGCCGGATGCGCTGGC
GGAAGTGGTCTCCAACGCCTTCCGCGCCGCCGAGCAGGGCCGGCCGGGCGAGCGCGTTCGTTA
GCCTGCCGCAGGATGTGGTCGATGGCCCGGTTCAGCGGCAAAGTGCTGCCGGCCAGCGGGGC
CCCGCAGATGGGCGCCGCGCCGGATGATGCCATCGACCAGGTGGCGAAGCTTATCGCCCAGG
CGAAGAACCCGATCTTCTGCTCGGCCTGATGGCCAGCCAGCCGAAACAGCAAGGCGCTG
CGCCGTTTGTGGAGACCAGCCATATTCCAGTACCAGCACCTATCAGGCCGCCGGAGCGGT
GAATCAGGATAACTTCTCTCGCTTCGCCGGCCGGGTTGGGCTGTTTAACAACCAGGCCGGGG
ACCGTCTGCTGCAGCTCGCCGACCTGGTGTATCTGCATCGGCTACAGCCCGGTGGAATACGAA
CCGGCGATGTGGAACAGCGGCAACGCGACGCTGGTGCACATCGACGTGCTGCCCGCCTATGA
AGAGCGCAACTACACCCCGGATGTTCGAGCTGGTGGGCGATATCGCCGGCACTCTCAACAAGC
TGGCGCAAATATCGATCATCGGCTGGTGTCTCCCCGCAGGCGGCGGAGATCCTCCGCGAC
CGCCAGCACCAGCGCGAGCTGCTGGACCGCCGCGGCGCGCAGCTCAACCAGTTTGCCTGCA
TCCCCTGCGCATCGTTCGCGCCATGCAGGATATCGTCAACAGCGACGTCACGTTGACCGTGG
ACATGGGCAGCTTCCATATCTGGATTGCCCGCTACCTGTACACGTTCCGCGCCCCGTCAGGTGA
TGATCTCCAACGGCCAGCAGACCATGGGCGTTCGCCCTGCCCTGGGCTATCGGCGCCTGGCTG
GTCAATCCTGAGCGCAAAGTGGTCTCCGTCTCCGGCGACGGCGGCTTCCCTGCAGTCGAGCAT
GGAGCTGGAGACCGCCGTCCGCCTGAAAGCCAACGTGCTGCATCTTATCTGGGTCGATAACG
GCTACAACATGGTTCGCTATCCAGGAAGAGAAAAAATATCAGCGCCTGTCCGGCGTCGAGTTT
GGGCCGATGGATTTTAAAGCCTATGCCGAATCCTTCGGCGCGAAAGGGTTTGCCGTGGAAAG
CGCCGAGGCGCTGGAGCCGACCCTGCGCGCGGCGATGGACGTCGACGGCCCCGGCGGTAGTG
GCCATCCCGGTGGATTATCGCGATAACCCGCTGCTGATGGGCCAGCTGCATCTGAGTCAGAT
TCTGTAA

Anexos N°2: Secuencia aminoacídica enzima acetolactato sintasa.

10 20 30 40 50
MDKQYPVRQW AHGADLVVSQ LEAQGVRQVF GIPGAKIDKV FDSLDDSSIR

60 70 80 90 100
IIPVRHEANA AFMAAAVGRITGKAGVALVT SGPGCSNLIT GMATANSEGD

110 120 130 140 150
PVVALGGAVK RADKAKQVHQ SMDTVAMFSP VTKYAVEVTA PDALAEVVSN

160 170 180 190 200
AFRAAEQGRP GSAFVSLPQD VVDGPVSGKV LPASGAPQMG AAPDDAIDQV

210 220 230 240 250
AKLIAQAKNP IFLGLMASQ PENSKALRRL LETSHIPVTS TYQAAGAVNQ

260 270 280 290 300
DNFSRFAGRV GLFNNQAGDR LLQLADLVIC IGYSPVEYEP AMWNSGNATL

310 320 330 340 350
VHIDVLPAYE ERNYTPDVEL VGDIAGTLNK LAQNIDHRLV LSPQAAEILR

360 370 380 390 400
DRQHORELLD RRG AQLNQFA LHPLRIVRAM QDIVNSDVTL TVDMGSFHIW

410 420 430 440 450
IARYLYSFRA RQVMISNGQQ TMGVALPWAIGAWLVNPERK VVSVSGDGGF

460 470 480 490 500
LQSSMELETA VRLKANVLHL IWVDNGYNMV AIQEEKKYQR LSGVEFGPMD

510 520 530 540 550
FKAYAESFGA KGFAVESAEA LEPTLRAAMD VDGPAVVAIP VDYRDNPLLM

559
GQLHLSQIL

Anexo N°3: Mapa vector pET22b

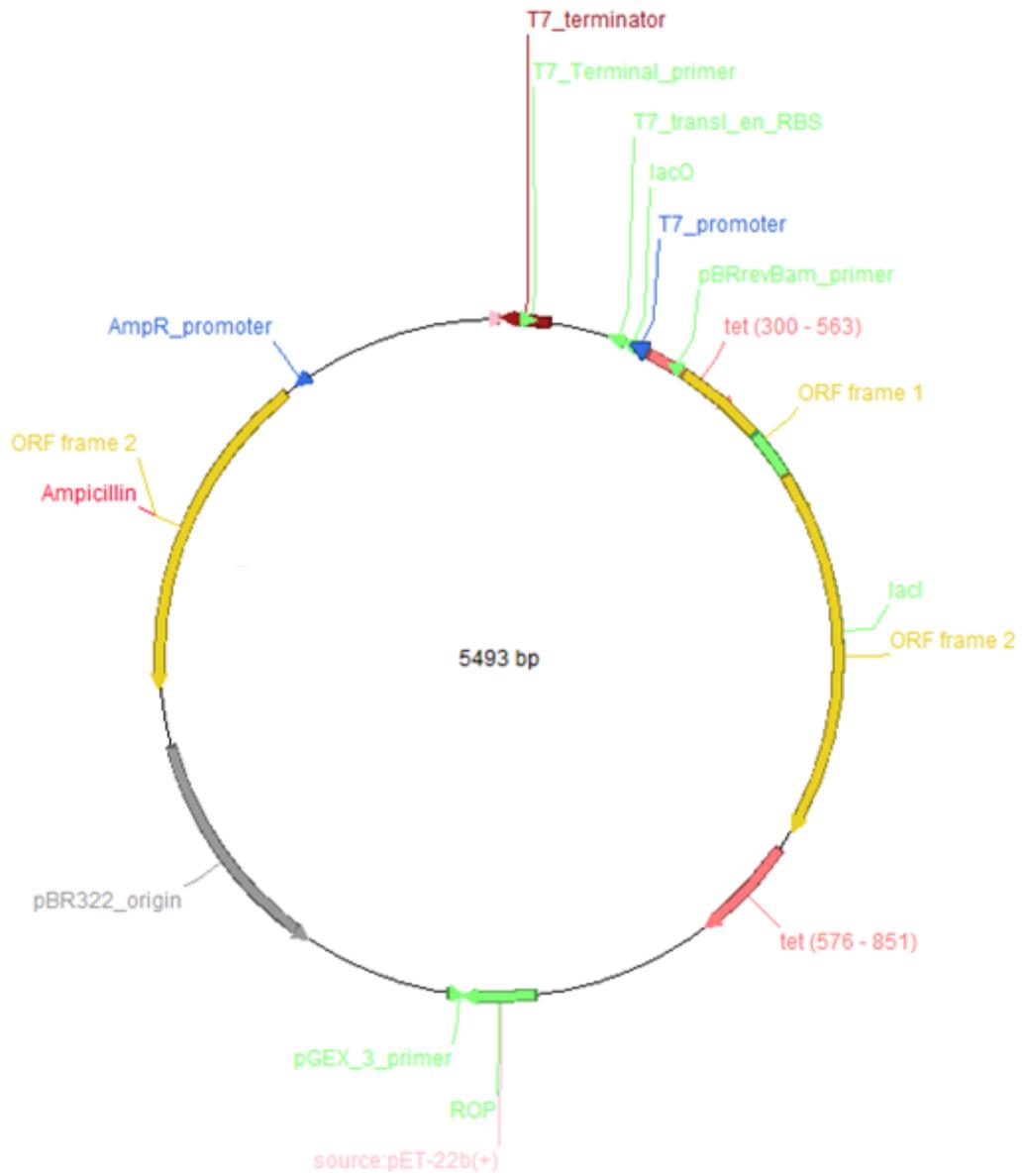


Figura 35. Mapa del vector pET22b.

Anexo N°4: Diseño de partidores

Tabla 9. Tabla resumen de los partidores utilizados en el presente trabajo de tesis. Se Presentan los nombres de los partidores, la secuencia nucleotídica de 5' a 3' y la temperatura de annealing teórica calculada.

Nombre del partidor	Secuencia 5' -> 3'	T° annealing teórica [°C]
FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	58,4
RP2	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	59,5
IlvkEc_FW	cgaattaattccgatatccatTTACAGAATCTGACTCAGATGC	58,4
IlvkEc_RV	agccggcgatggccATGGACAAACAGTATCCGGTA	57,5
pET22b_FW	GGCCATCGCCGGCTG	57
pET22b_RV	ATGGATATCGGAATTAATTTCGG	56,4

Anexo N°5: DNA & Protein Ladders.

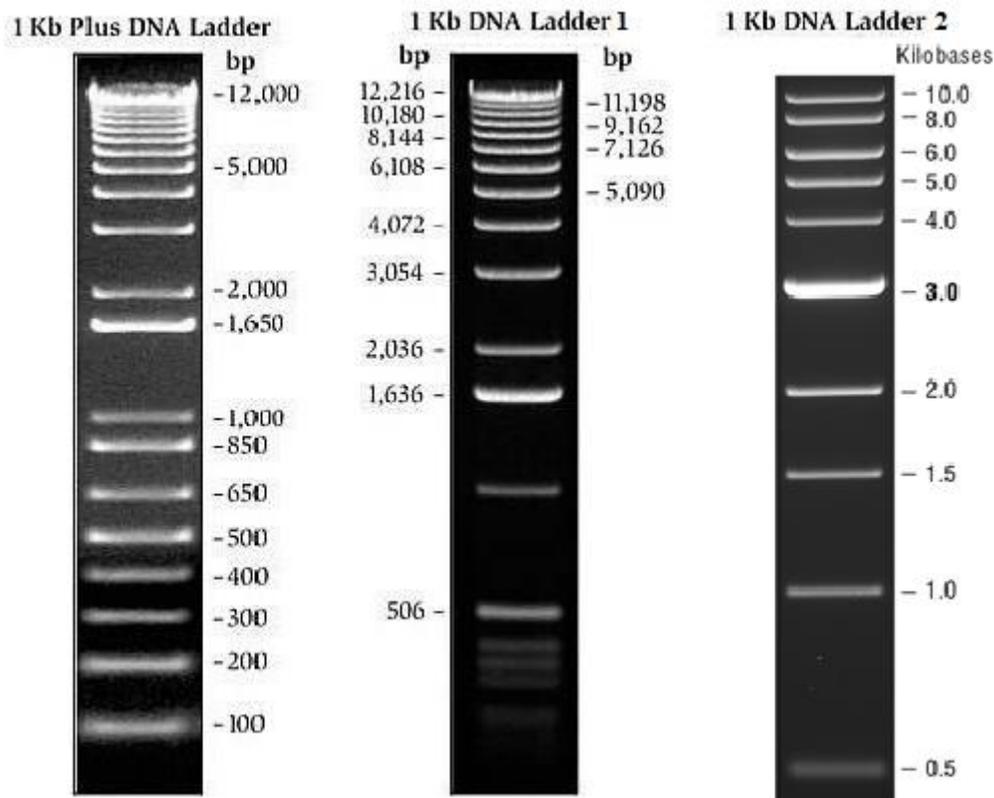


Figura 36. Ladders utilizados en el presente trabajo de tesis. Se detallan los nombres en la parte superior de cada ladder y las distintas bandas presentes en cada ladder con sus respectivos tamaños en kilobases (kb).

Protein Molecular Weight Marker

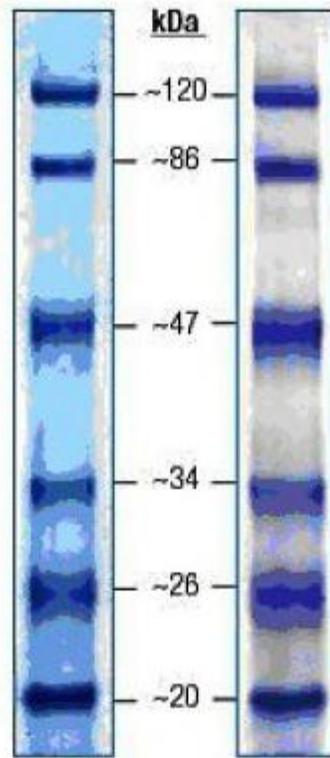
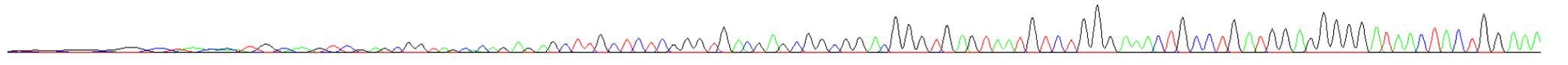


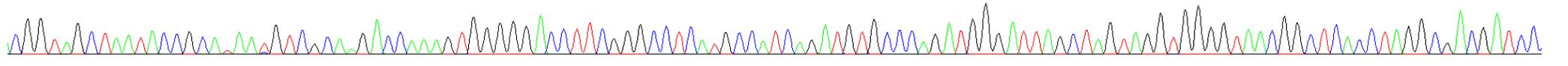
Figura 37. Ladder de proteína utilizado en el presente trabajo de tesis.

Anexo N°6: Resultados de las secuenciaciones de los DNA 16S (DIFF1) y el inserto (DIFF6).

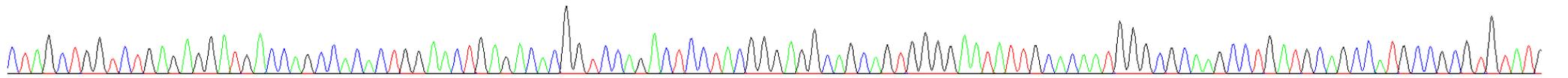
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120
AGGGCGGCA GGCCTAA CACAT GCAAGT C GAGCGGTAGCACAG AGAGCTTGCCTCGGGTG ACGAGCG GCGG ACGGGTG AGTAATGTCTGGAAACTG CCTGATGGAGGGG ATAACTACTGG AAA



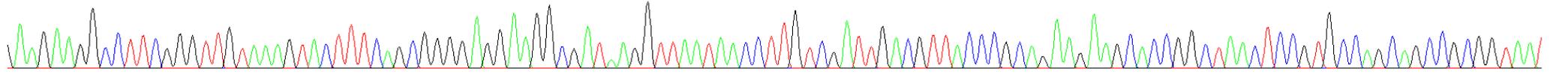
130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240
CGGTAGCTAATACCGCATAATGTCGCAAGACCAAAGTGGGGACCTTCGGGCTCATGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCC



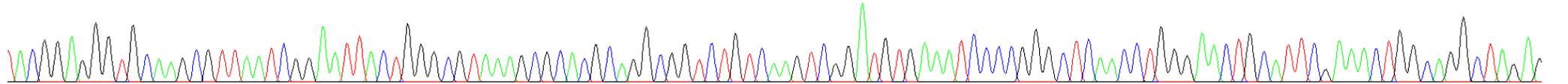
250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370
CTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAAATTGACAAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCTGTATG



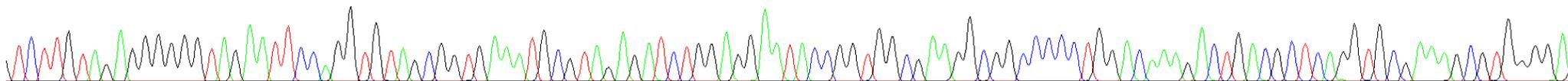
380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGAGGAAGGCATAAAGTTAATAAACCTTGTGATTGACGTTACCCG CAG AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA



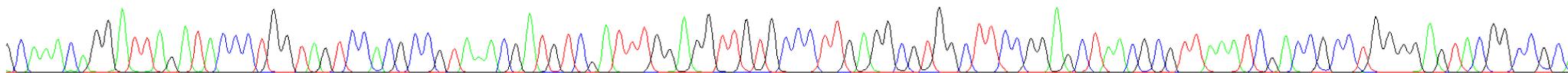
500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620
TACGGAGGGTGC AAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGCTCTGTCAAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTCGAACTGGCAGGCTAGAG



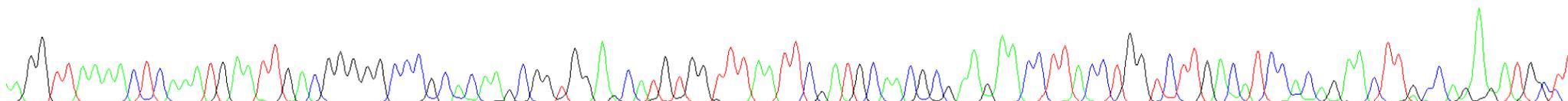
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
TCTTTG TAGAGGGGGGTAG AATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGA



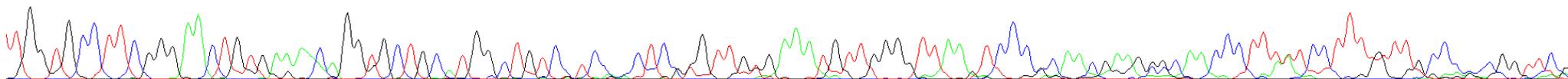
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
GCAAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAAGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA



870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980
AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTGCCAGAGATGCTT

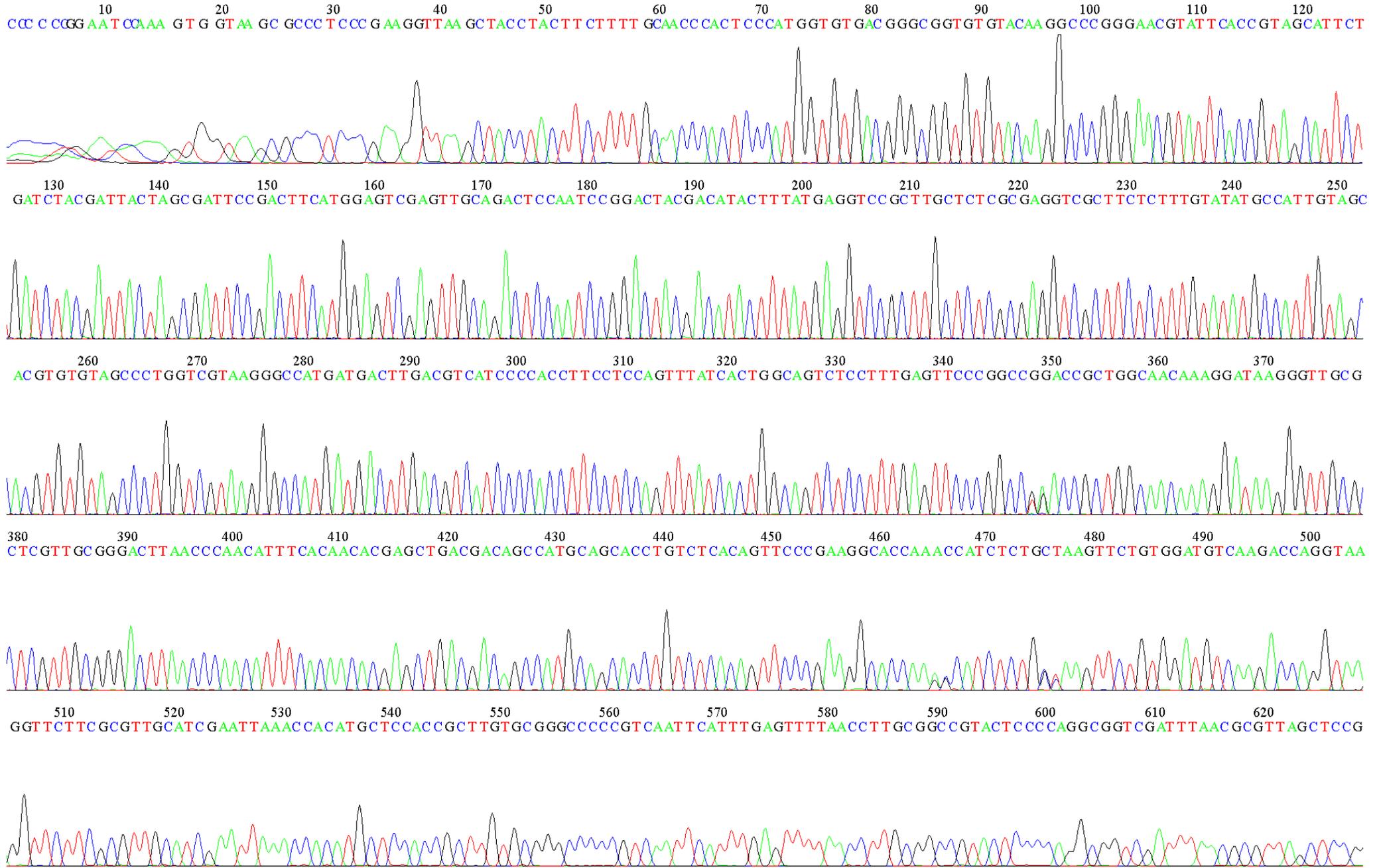


990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100
TGGTGCCCTTCGGGAACTGTGAAA CAGGTGCTGCATGGCTGTCC TCA CCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGGTTAAGTCCCGC AACGAA GGC AA CCC TTATCCTTT GTTGCCCA CGGTTCCG

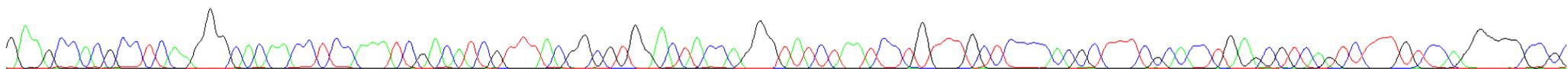


G





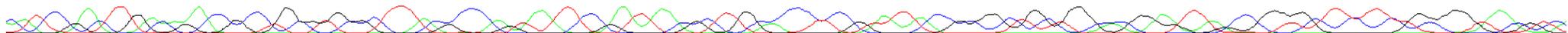
630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
 G A A G C C A C G C C T C A A G G G C A C A A C C T C C A A A T C G A C A T C G T T T A C G G C G T G G A C T A C C A G G G T A T C T A A T C C T G T T T G C T C C C C A C G C T T T C G C A C C T G A G C G T C A G T C T T T G T C C A G G G G C C G



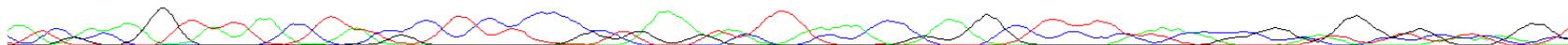
760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880
 C C T T C G C C A C C G G T A T T C C T C C A G A T C T C T A C G C A T T T C A C C G C T A C A C C T G G A A T T C T A C C C C C C T C T A C A G A C T C T A G C C T G C C A G T T T C G A A T G C A G T T C C C A G G T T G A G C C C G G G G A T T T C A



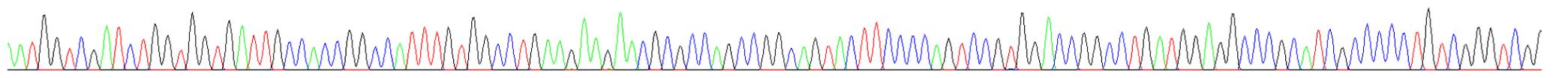
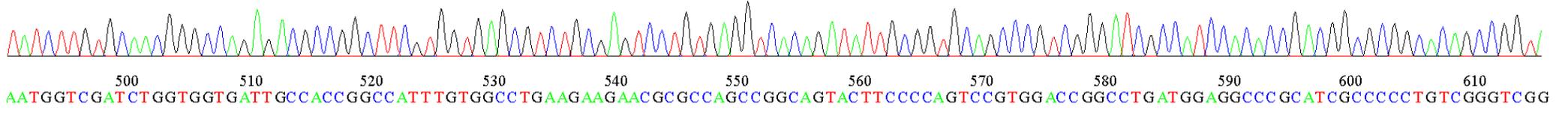
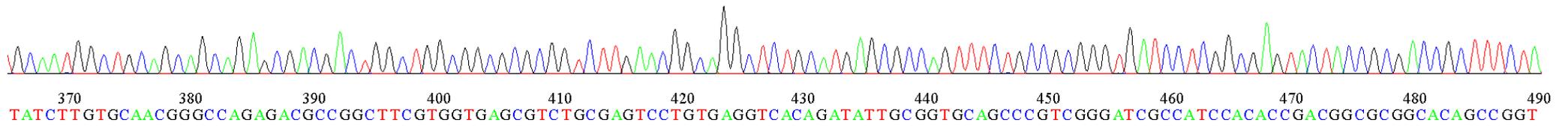
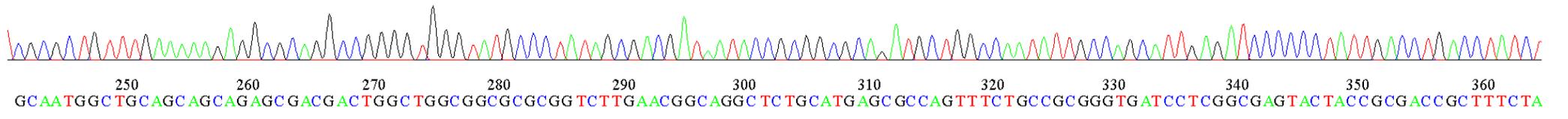
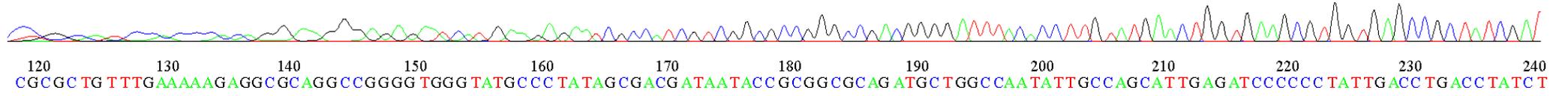
890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
 C A T C C G A C T T G A C A G A C C G C C T G C G T G C G C T T T A C G C C C A G T A A T T C C G A T A C G C T T G C A C C C T C C G T A T T A C C G C G G C T G C T G C A C G G A G T A G C C G G T G C T C T C T G C G G T A C G T C



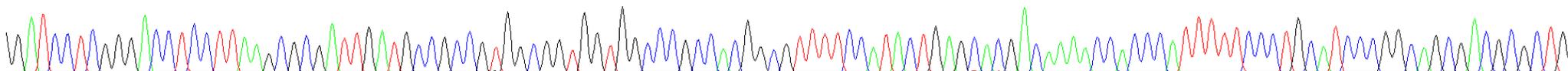
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070
 A T C G A C A G T A T A C T A T C G C T C T C C C C G C T G A A A G T A C T T A C A C C C G A G C T T T T T C A T A C A C G C G G C A T G C T G C A T C A G C



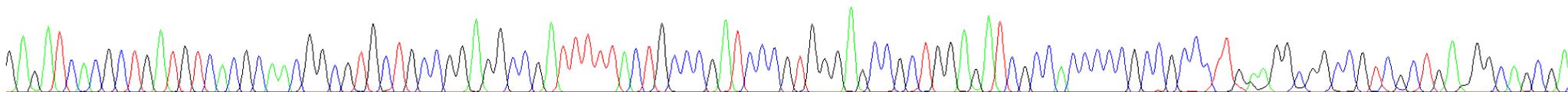
ACT G C A T C C A C C C A C A G G A A G G G A G A G A A T C A T G A A G A G A A T C G C C A T C G T C G G C G C C G G G C C G A C G G G G A T T T A C A C C T T G T A T G A A C T G G T G A A G C G T G G T G A G C C G C T A T C G A T



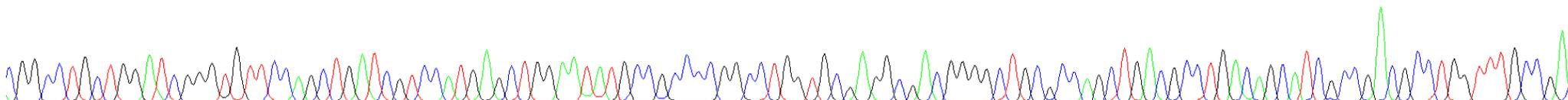
620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740
GATCCTCGGGACCTCCTTAAGCGCGATTGATGCCGCCGTGGCGGTGGTGGCCCGCCACGGCGTTTTCCTACTGAGCACGACAAAACCACCCATTTTTCCCTGCATCCCGGCAGCGACGGCGTGG



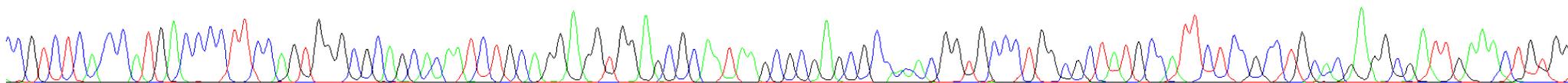
750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860
GAGATCACGCTGATGTCACGCAACGGCGTGTGCTGCCGGAGGCCGATTTTTTACTGCCCGATCCCGTGGGAGCCGCTGGAGATCGCCACCCCGCCGCCCTTGAAAGCGGCCGTTCGCTGAGGGCAGCGA



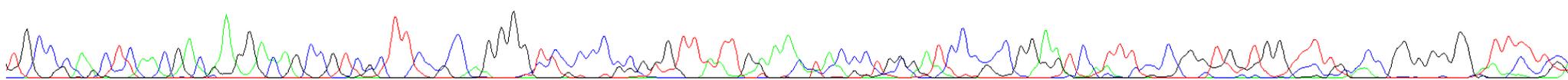
870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990
CGGCCTGCTGGATCGGGTGTTCCAGCTGATCGTCCATGAGCTGGAATATGCCGCCCGGCCCTGGTGCAGGGCGACGGGGCTGCCAGCTGACGCCTGACAGCATCGCCGACGCCCTGGTTT GCCGA



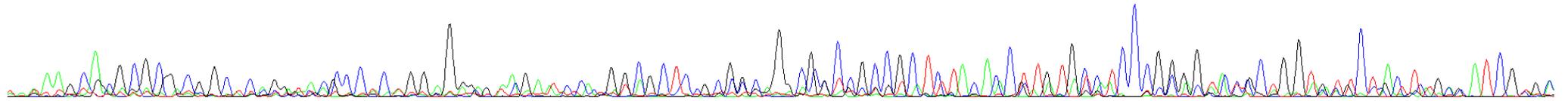
1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120
CCGTCTCAACATGACCCCTTCCAGTGGGCGCAGCACAATCTGCA GGAAGGTGGAGCGCAATAAAGCGCGAGCGCCACACGGTGCCCTGGCGCTATGCCATTCTCCGCC TGCACGAGGCGATTGAAACTGTGG



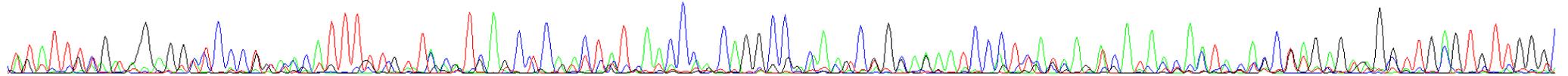
1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240
TGCCCAACTCAACGACGAGGACAGCCGTGCGTTCGCCAGGGGTCCCGCCGCTGTTATTGAAACTACCCTGCATCCCGCGGAATCATTTCCTCCGGGTGGTGGTTC TG ACCGGGGGGATTCTTCA



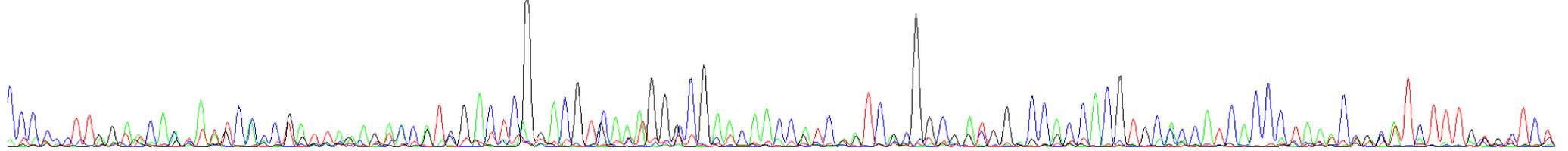
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140
AAAAAGCAGGCGCCAGCCCAAAAAACGCACAAAGAGGAA AAAATC CCGG CGCTC CCCCC CAGG C C CCCCCGATTTACACCTTATGCGCTCCCGGGTCCGCTGGTATTCCATTTTACATCGTTC



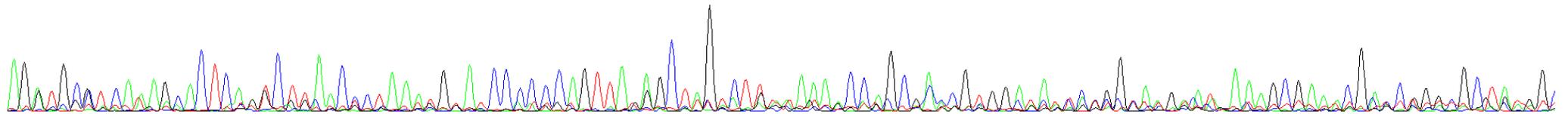
150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260
TTATTTTGTAGAGGATCCCTGACCAATTTTTCTTACATCAATCTCAACTTTTAAACC TCAGGCC AAAATCTG CAAAATCCATCATAAGACATAAA TACTTTACCTTAAATAGGCTTGACTTTTGGT



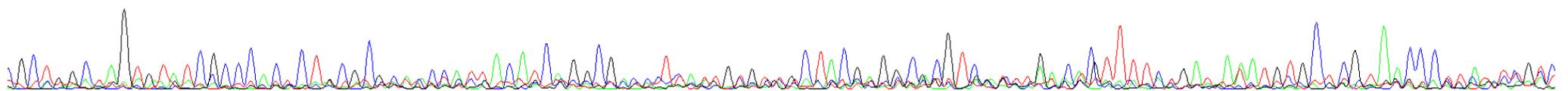
270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380
CCCCCTTGATCACTATTC CCTATTC CAG ACC ATGG ACTCG GACGTCAA TTGCCG AAC AACC ATCC ATCCGGCG ATGG ACCAC CACGTGC ACCATCACCC TAATCCCTTCTTTGTGTCT



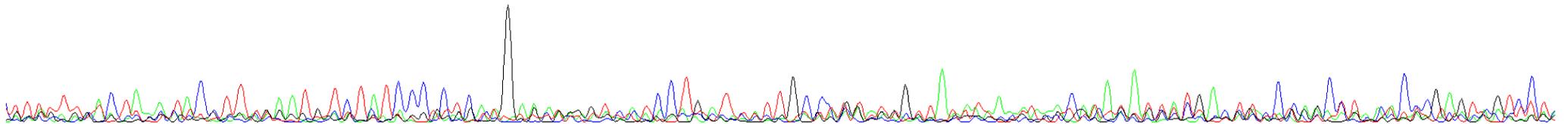
390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500
AGATGCGTCAAAGCAC TC AATC TTAACCCTA AATGGATCC CCCCAGTTA GAGC TAGTCTTT AAAAAACC AGCGAACGTGGAT AAC CAG GAAA GAAAG AAA GCGAA AC GACC GGGCGC TAAGG



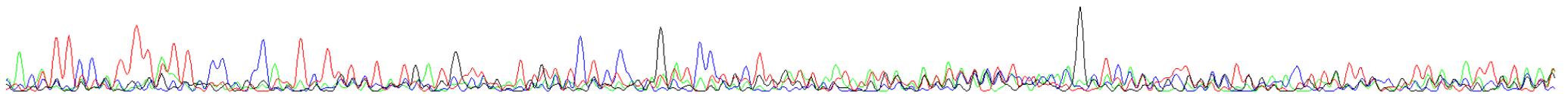
510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620
CGCTGGCTAGTGATCGCCACGC TGC GCGCA ACCA TTACATCA G GCGAGCTCAATGCGTTGCTACGAGG CACGTGACGTGACAC TTTTCTGAT AAATGTGCTCGTAAACCCTTAGTTGTC



630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750
TTATTTGACTAAATACCTTTGAATGTCTATCCCCTCAAGAAAAGGTCATCCTGATTATTGCCTGTATGGTTAAATAAAA AAAACGAAGATTATG AAGTCCGGACCTAAACGCTAGTAGTCCT



760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870
AACATTCCATTTATTACCA CCAATCTGTGTATGATGTAGATGTATCTCCGTGATCCTGCTTATAAATAA GAAAAAAGGTACACCGCTCAACGCTGCGTGGAACGTATTACGTTAGATTATAAA



880
TGAAC TCCCAACC G

