



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

“Expresión de las invertasas INVA e INVB de *Zymomonas mobilis* en *Pichia pastoris*, bajo el control del promotor AOX1. Caracterización bioquímica e inmovilización de las enzimas recombinantes”

Tesis que presenta:

M. en B. Ara Itzel Pérez de los Santos Mondragón

Para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Directora de Tesis:

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

México, D.F. a 15 de julio de 2016

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN EL
LABORATORIO 51 DE INGENIERÍA DE PROTEÍNAS, DEL DEPARTAMENTO DE
BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE
ESTUDIOS AVANZADOS (CINVESTAV) DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
(IPN), BAJO LA ASESORÍA DE LOS DOCTORES: MARÍA EUGENIA HIDALGO
LARA, RODOLFO MARSCH MORENO, ROBERTO RUÍZ MEDRANO, AMELIA
FARRÉS GONZÁLEZ SARABIA, FLORINA RAMÍREZ VIVES, JORGE EDUARDO
CAMPOS CONTRERA Y ERIK LÓPEZ Y LÓPEZ.**

**AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS
(CONACYT) POR EL APOYO ECONÓMICO BRINDADO PARA LA REALIZACIÓN
DE ESTE TRABAJO.**

AGRADECIMIENTOS

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Por aceptarme en su laboratorio, confiar en mí, darme la libertad de desarrollar el proyecto resultante y por proporcionarme su apoyo en diversas situaciones. Gracias.

Doctores(as): Amelia Farrés González Sarabia, Florina Ramírez Vives, Rodolfo Marsch Moreno, Roberto Ruíz medrano, Jorge Eduardo Campos Contrera y Eric López y López

Por brindarme su tiempo y sus valiosos comentarios a lo largo de este proyecto.

M en C. Alejandro Santiago Hernández

Por ser de las personas más sinceras que conozco, es una cualidad única y valiosa que nunca debe ser menospreciada, por sus enseñanzas, tanto en el laboratorio como en la vida. Y por último pero no menos importante, por generar el mejor ambiente de laboratorio en el cual he trabajado (hasta ahora). Muchas gracias 😊

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Agradecer en esta sección a un solo puñado de personas sería como suponer que el carácter de una persona se forja con base en un solo modelo a seguir.

El resultado de este trabajo es, como mi forma de ser, la recopilación de muchas situaciones, experiencias y personas que de alguna u otra forma son y fueron muy significativas en mi vida, por lo tanto, no quisiera excluir a ninguna, aunque para nombrarlas a todas no me bastarían todas las páginas de éste documento. Por lo tanto, de forma muy general englobaré a toda esa gente en cuatro grupos:

Mi familia número 1: Mi Mamá, Papá y hermanos. Los cuales me dieron apoyo, unos desde que nací y otros en el trayecto, pero que siempre han confiado en mi, me han cuidado y demostrado (a su manera) lo mucho que me aman. Los amo como el valor del número pi, infinito.

Mi familia número 2: Cristian y todos mis bichines. Que me han dado muchas alegrías, experiencias gratas y un hogar, pero sobre todo a mi esposito, que me ha apoyado en diversos niveles como: intelectual, emocional y alentándome a seguir adelante a pesar de mis negativas. Este trabajo definitivo no hubiera avanzado y concluido sin ti <3.

Mi familia número 3: La familia que nunca esperé, pero que agradezco al Diosito por haberme adoptado. Con esta me refiero a mi familia política, que me ha aceptado como uno de ellos y que por su causa me dieron el empujoncito que me faltaba para concluir esto.

Mi familia número 4: A los amigos que con el paso del tiempo he podido conservar y que son una extensión de mi, aquí incluyo mi familia del labo **Labo 51**. Todos ustedes han contribuído en gran medida, no sólo con este trabajo, sino también en mi vida.

“Espero que el tiempo no borre, a esta gente, que tanto amo, todo ustedes, porque, sin ustedes no valgo nada, su alma es, mi alimento”.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	vi-xii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xiii-xvi
ÍNDICE DE TABLAS.....	xvii-xviii
ABREVIATURAS.....	xix
RESUMEN.....	xx-xxi
ABSTRACT.....	xxii-xxiii
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 La importancia del aislamiento de microorganismos a partir de sus fuentes naturales y la obtención de enzimas a partir de estos.....	1,2
1.2 <i>Zymomonas mobilis</i> y sus enzimas hidrolíticas.....	2
1.2.1 Metabolismo de la sacarosa.....	3-5
1.2.2 Características generales de las invertasas.....	5-9
1.2.3 Invertasa intracelular (INVA) de <i>Z. mobilis</i>	9-10
1.2.4 Invertasa extracelular (INVB) de <i>Z. mobilis</i>	10-11
1.2.5 Comparación de ambas invertasas.....	11-13
1.2.6 Invertasas en México.....	13
1.3. Sistemas heterólogos de expresión.....	14-15
1.3.1 Bacterias.....	15-16
1.3.2 Levaduras.....	16-18
1.3.3 Líneas celulares de mamíferos.....	19-20
1.3.4 Líneas celulares de insectos.....	20-21
1.3.4 Plantas.....	21-22
1.3.5 <i>Pichia pastoris</i>	22-23
1.3.5.1 Metabolismo del metanol.....	23-24
1.3.5.2 Promotor AOX y GAP.....	25-26
1.3.5.3 Método de expresión de proteínas heterólogas.....	27-31
1.3.5.4 Modificaciones post-traduccionales: Glicosilación.....	32-33
1.4 Purificación de proteínas.....	33-34
1.5 Inmovilización de enzimas.....	35-38

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios de invertasas heterólogas expresadas en <i>P. pastoris</i> mediante el uso del promotor AOX1.....	39-40
2.2 Inmovilización de invertasas por otros grupos de trabajo.....	41
2.3 Estudios relacionados con INVA e INVB de <i>Z. mobilis</i>	41-42
2.4 Antecedentes del grupo de trabajo.....	42
2.4.1 Expresión de INVA e INVB.....	42-43
2.4.2 Inmovilización de INVA e INVB.....	43-44

3. JUSTIFICACIÓN.....	44-45
-----------------------	-------

4. HIPÓTESIS GENERAL.....	46
---------------------------	----

5. OBJETIVOS.....	46
-------------------	----

5.1 Objetivo general.....	46
---------------------------	----

5.2 Objetivos particulares.....	46
---------------------------------	----

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Microorganismos.....	47
--------------------------	----

6.2 Medios de cultivo.....	47-52
----------------------------	-------

6.2.1 Medios de cultivo para bacterias.....	47-48
---	-------

6.2.1.1 Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	47-48
--	-------

6.2.1.2 Medio de cultivo para <i>Zymomonas mobilis</i>	48
--	----

6.2.2 Medios de cultivo para <i>Pichia pastoris</i>	49-52
---	-------

6.3 Expresión de las invertasas INVA e INVB de <i>Z. mobilis</i> en <i>P. pastoris</i> por inducción con metanol.....	52-54
---	-------

6.3.1 Técnicas de manipulación de ADN utilizadas.....	53-54
---	-------

6.3.1.1 Técnicas para extracción de ADN plasmídico.....	53
---	----

6.3.1.1.1 Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala en <i>E. coli</i>	53
---	----

6.3.1.1.2 Extracción de ADN plasmídico a gran escala en <i>E. coli</i>	54
--	----

6.3.1.2 Técnicas para extracción de ADN genómico.....	54-55
---	-------

6.3.1.2.1 Extracción de ADN de bacterias Gram negativas.....	54
--	----

6.3.1.2.2 Extracción de ADN de hongos y levaduras.....	55
--	----

6.3.1.3 Limpieza de ADN mediante fenolizaciones.....	56-57
--	-------

6.3.1.4 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa.....	57
--	----

6.3.1.5 Reacciones con endonucleasas de restricción.....	57
--	----

6.3.1.6 Procedimiento para ligar fragmento(s) de ADN con T4 ADN ligasa.....	58
---	----

6.3.1.7 Transfección de ADN en células hospederas.....	58-61
6.3.1.7.1 Transfección de ADN en células de <i>Escherichia coli</i>	59
6.3.1.7.1.1 Introducción de ADN por choque térmico.....	59-60
6.3.1.7.1.2 Introducción de ADN mediante electroporación.....	60-61
6.3.1.7.2 Transfección de ADN en células de <i>P. pastoris</i> por electroporación.....	62-63
6.3.1.8 Técnicas de amplificación por PCR para análisis de construcciones mutantes evaluadas.....	64-68
6.3.1.8.1 PCR de colonia para análisis de amplificadores.....	64-65
6.3.1.8.2 Comprobación de inserción de las construcciones en clonas de <i>E. coli DH5α</i>	66-67
6.3.1.8.3 Comprobación de integración de construcciones en genoma de clonas <i>P. pastoris</i>	67-68
6.3.2 Técnicas de selección de transformantes de <i>Pichia pastoris</i> con actividad invertasa.....	68-77
6.3.2.1 Bioensayo colorimétrico para detección de actividad invertasa en clonas de <i>P. pastoris</i>	68-72
6.3.2.2 Bioensayo de fenotipo para identificación de transformantes de <i>P. pastoris</i> Mut ⁺ y Mut ⁻	72-74
6.3.2.3 Cuantificación de azúcares reductores mediante ácido dinitrosalisílico.....	74-75
6.3.2.4 Identificación de transformantes con actividad invertasa. Medio líquido volumen de 50 mL.....	75-77
6.3.3 Construcción pPICZ α A- <i>invA</i> y pPICZ α A- <i>invB</i>	77-80
6.3.4 Construcción pPICZ α B- <i>invA</i> y pPICZ α B- <i>invB</i>	80-81
6.3.4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los genes <i>invA</i> e <i>invB</i> de <i>Z. mobilis</i>	81-83
6.3.4.2 Procedimiento para la construcción.....	83-87
6.4 Optimización las condiciones de cultivo para la expresión de INVA e INVB mediante inducción con metanol en <i>P. pastoris</i>	87-89
6.4.1 Fermentación en medio líquido volumen 250 mL.....	90
6.5 Comparación de la producción de invertasas nativas y recombinantes.....	90-92
6.5.1 Producción de las invertasas de <i>Z. mobilis</i>	91-92
6.5.1.1 Técnica de cuantificación de proteínas por método de Lowry.....	91
6.5.1.2 Técnica de cuantificación de biomasa por peso seco.....	91,92
6.5.2 Producción de las invertasas recombinantes expresadas constitutivamente por <i>P. pastoris</i>	92
6.5.3 Producción de las invertasas recombinantes expresadas por inducción con metanol en <i>P. pastoris</i>	93
6.6 Purificación y caracterización bioquímica de las invertasas recombinantes.....	93-97
6.6.1 Purificación de INVA _{AOX1}	94
6.6.2 Purificación de INVB _{AOX1}	95
6.6.3 Caracterización bioquímica de INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1}	95
6.6.3.1 Temperatura óptima.....	96
6.6.3.2 pH óptimo.....	96
6.6.3.3 Parámetros cinéticos.....	96
6.6.3.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	97
6.6.3.5 Termoestabilidad.....	97

6.6.4 Efecto de la glicosilación en las propiedades de INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1} purificadas.....	97
6.6.4.1 Tinción de glicoproteínas en geles de poliacrilamida.....	98-99
6.6.4.2 Desglicosilación de invertasas recombinantes.....	99
6.6.4.3 Análisis bioinformático.....	100
6.6.4.4 Elaboración de zimograma para la detección de actividad invertasa.....	100
6.7 Inmovilización de INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1}	101
6.7.1 Inmovilización por métodos químicos.....	102-107
6.7.1.1 Soporte: Nylon 6.....	102-104
6.7.1.2 Soporte: Quitosano.....	104-106
6.7.1.3 Soporte: Perlas de quitosano.....	106-107
6.8 Estudios de actividad fructosiltransferasa (transfructosilación) en INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1}	108-110
6.8.1 Análisis de la estructura primaria de INVA e INVB en <i>Z. mobilis</i>	110-111
6.8.2 Determinación de productos de hidrólisis.....	111-112

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de las invertasas INVA e INVB de <i>Z. mobilis</i> en <i>P. pastoris</i> mediada por el promotor AOX1.....	113-133
7.1.1 Vector de expresión pPICZαA.....	113-121
7.1.1.1 Obtención de construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i>	113-116
7.1.1.2 Análisis de construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i>	116-121
7.1.1.3 Transformación en <i>P. pastoris</i> con los plásmidos pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i>	122-123
7.1.1.4 Análisis de transformantes de <i>P. pastoris</i> resistentes a zeocina.....	123-126
7.1.1.5 Selección de clonas de <i>P. pastoris</i> con actividad invertasa mediante bioensayo colorimétrico.....	127-133
7.1.2 Vector de expresión pPICZαB.....	133-144
7.1.2.1 Obtención de las construcciones pPICZαB- <i>invA</i> y pPICZαB- <i>invB</i>	133-134
7.1.2.2 Análisis de las construcciones pPICZαB- <i>invA</i> y pPICZαB- <i>invB</i>	134-139
7.1.2.3 Transformación en <i>P. pastoris</i> GS115, KM71 y X-33 con los plásmidos de las cepas A31, B2 y C2.....	140
7.1.2.4 Selección y análisis de transformantes en <i>P. pastoris</i> resistentes a zeocina con actividad invertasa.....	141
7.1.2.4.1 Clonas de <i>P. pastoris</i> con el gen <i>invA</i> de <i>Z. mobilis</i>	141-143
7.1.2.4.2 Transformantes de <i>P. pastoris</i> con el gen <i>invB</i> de <i>Z. mobilis</i>	143-144
7.2 Optimización de las condiciones de cultivo para las cepas transformantes obtenidas de <i>P. pastoris</i> con los genes de interés (<i>invA</i> e <i>invB</i>).....	145-152
7.2.1 Clonas de <i>P. pastoris</i> con las construcciones pPICZαA- <i>invA/invB</i>	145
7.2.1.1 Efecto de la temperatura, agitación y concentración de metanol sobre la actividad invertasa.....	146-150
7.2.1.1.1 Medio BMM.....	146-148
7.2.1.1.2 Medio BMMY.....	148-150
7.2.1.1.3 Problemas relacionados con la expresión de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	150-152
7.2.2 Transformantes de <i>P. pastoris</i> con las construcciones pPICZαB- <i>invA/invB</i>	153-154

7.3 Comparación de la producción de las invertasas recombinantes INVA e INVB producidas por <i>P. pastoris</i> bajo el control del promotor GAP y AOX1.....	154-161
7.3.1 Producción de invertasas nativas por <i>Z. mobilis</i>	154-155
7.3.2 Producción de invertasas recombinantes intracelulares mediadas por el promotor GAP (INVA _{GAP}) y AOX1 (INVA _{AOX1}).....	156
7.3.2.1 Invertasa intracelular recombinante.....	156-158
7.3.2.2 Invertasa extracelular recombinante.....	158-161
7.4 Purificación y caracterización de invertasas recombinantes INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1}	
7.4.1 INVA _{AOX1}	161-175
7.4.1.1 Análisis de la glicosilación de INVA _{AOX1}	164-165
7.4.1.2 Desglicosilación de INVA _{AOX1}	165-166
7.4.1.3 Caracterización bioquímica de INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1}	166
7.4.1.3.1 Determinación de temperatura óptima.....	166-167
7.4.1.3.2 Determinación de pH óptimo.....	167-168
7.4.1.3.3 Determinación de parámetros cinéticos.....	168-170
7.4.1.3.4 Determinación de la termoestabilidad.....	170-172
7.4.1.3.5 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	173-174
7.4.1.3.6 Determinación del PI.....	174
7.4.2 INVB _{AOX1}	175-185
7.4.2.1 Análisis de la glicosilación de INVB _{AOX1}	177-178
7.4.2.2 Desglicosilación de INVB _{AOX1}	178-179
7.4.2.3 Caracterización bioquímica de INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1}	179
7.4.2.3.1 Determinación de temperatura óptima.....	179-180
7.4.2.3.2 Determinación de pH óptimo.....	180-181
7.4.2.3.3 Determinación de parámetros cinéticos.....	181-182
7.4.2.3.4 Determinación de la termoestabilidad.....	183-184
7.4.2.3.5 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	184-185
7.4.2.3.6 Determinación de actividad invertasa mediante Zimograma.....	185
7.5 Inmovilización de las invertasas INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1} mediante métodos físicos y químicos.....	186-191
7.5.1 Soporte de Nylon 6.....	186
7.5.1.1 INVA _{AOX1} -Nylon 6.....	186
7.5.1.1.1 Temperatura y pH óptimo.....	187
7.5.1.1.2 Consumo de sacarosa.....	187-188
7.5.1.1.3 Termoestabilidad.....	189
7.5.1.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	189-191
7.5.1.2 INVB _{AOX1} -Nylon 6.....	191
7.5.1.2.1 Temperatura y pH óptimo.....	192
7.5.1.2.2 Consumo de sacarosa.....	192-194
7.5.1.2.3 Termoestabilidad.....	194
7.5.1.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	195-197
7.5.2 Método químico: Soporte de Quitosano.....	197
7.5.2.1 INVA _{AOX1} -Quitosano.....	197-203
7.5.2.1.1 Temperatura y pH óptimos.....	199-200
7.5.2.1.2 Consumo de sacarosa.....	200
7.5.2.1.3 Termoestabilidad.....	201
7.5.2.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	202-203

7.5.2.2 INVB _{AOX1} -Quitosano.....	203-209
7.5.2.2.1 Temperatura y pH óptimos.....	204
7.5.2.2.2 Consumo de sacarosa.....	205-206
7.5.2.2.3 Termoestabilidad.....	206-207
7.5.2.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	207-209
7.5.3 Método químico: Soporte de Perlas de quitosano (PQ)	209-210
7.5.3.1 INVA _{AOX1} -Perlas de Quitosano.....	210-215
7.5.3.1.1 Temperatura y pH óptimo.....	210-211
7.5.3.1.2 Consumo de sacarosa.....	211-212
7.5.3.1.3 Termoestabilidad.....	212-213
7.5.3.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	213-215
7.5.3.2 INVB _{AOX1} -Perlas de Quitosano.....	216-220
7.5.3.2.1 Temperatura y pH óptimos.....	216-217
7.5.3.2.2 Consumo de sacarosa.....	217-218
7.5.3.2.3 Termoestabilidad.....	218
7.5.3.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.....	219-220
7.6 Evaluación de actividad fructosiltransferasa (transfructosilación) en INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1} ...	221
7.6.1 Análisis <i>in silico</i> a estructura primaria de INVA e INVB.....	221-222
7.6.2 Evaluación de los productos de hidrólisis.....	222-223
8. CONCLUSIONES	224-225
9. PERSPECTIVAS	226
10. BIBLIOGRAFÍA	227-238
11. ANEXO	239-261
11.1 Preparación de las soluciones.....	239-241
11.2 Mapa y características del vector de expresión pGAPZαA, B, C (INVITROGEN).....	241
11.3 Mapa y características del vector de expresión pPICZαA, B, C (INVITROGEN).....	242
11.4 Enzimas.....	242
11.4.1 Endonucleasas de restricción.....	242-244
11.4.2 Recomendaciones al utilizar endonucleasas de restricción.....	245
11.4.3 T4 ADN ligasa.....	245
11.4.4 ADN polimerasas.....	245
11.4.4.1 Amplificasa ADN polimerasa (BioTecMol®).....	245
11.4.4.2 <i>Pfu</i> ADN polimerasa (FERMENTAS®).....	246
11.5 Tabla de oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	247
11.6 Alineamiento múltiple de secuencias reportadas de invertasas intracelulares de <i>Z. mobilis</i> utilizando el programa Clustal W.....	248-250
11.7 Alineamiento múltiple de algunas secuencias reportadas de invertasas extracelulares de <i>Z. mobilis</i> utilizando el programa Clustal W.....	251-253
11.8 Alineamiento de la secuencia de <i>invA</i> de <i>Z. mobilis</i> cepa CDBB-B603 con el gen <i>sacA</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM1 reportado por Gunasekaran <i>et al.</i> 1990 utilizando el programa BLAST.....	254-255

11.9 Alineamiento de la secuencia de <i>invB</i> de <i>Z. mobilis</i> cepa CDBB-B603 con el gen <i>sacC</i> de <i>Z. mobilis</i> ZM1 reportado por Kannan <i>et al.</i> 1995 utilizando el programa BLAST.....	256-257
11.10 Resultados de la secuenciación del MCS de la construcción pPICZαB- <i>invA</i>	257-259
11.11 Resultados de la secuenciación del MCS de la construcción pPICZαB- <i>invB</i>	260-261
11.12 Conservación de células de bacteria.....	261

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de general de hidrólisis de sacarosa por la enzima invertasa.....	5
Figura 2. Fragmento de alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las INVA e INVB de <i>Z. mobilis</i>	11
Figura 3. Predicción de la estructura terciaria de la invertasa intracelular de <i>Z. mobilis</i> a partir de la estructura primaria depositada en PDB (gb AAO38865.1) utilizando el programa I-TASSER.....	12
Figura 4. Predicción de la estructura terciaria de la invertasa extracelular de <i>Z. mobilis</i> a partir de la estructura primaria depositada en PDB (P0DJA4) utilizando el programa I-TASSER.....	12
Figura 5. Diferencia entre la estructura de N-oligosacáridos adicionados por <i>S. cerevisiae</i> y por <i>P. pastoris</i>	18
Figura 6. Esquema de las alternativas y consideraciones antes de seleccionar el sistema adecuado de <i>P. pastoris</i> para la expresión de la proteína heteróloga de interés.....	23
Figura 7. Metabolismo de metanol de <i>P. pastoris</i>	24
Figura 8. Etapas de crecimiento de <i>P. pastoris</i> e inducción para la producción de proteínas heterólogas por alimentación mixta de glicerol-metanol.....	27
Figura 9. Efecto del tipo de unión sobre la inmovilización de enzimas.....	37
Figura 10. Reacción de reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC).....	69
Figura 11. Sitio múltiple de clonación (MCS) del vector de expresión pPICZαB utilizado para las nuevas construcciones con el codón de paro colocado al final del sitio de corte XbaI.....	81
Figura 12. Extremos 5' y 3' del alineamiento múltiple de diferentes secuencias de invertasas intracelulares reportadas y depositadas en EBI (European Bioinformatics Institute) de cepas de <i>Z. mobilis</i> para el diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen <i>invA</i> a partir del genoma de la cepa de <i>Z. mobilis</i> CDBB-B603.....	82
Figura 13. Extremos 5' y 3' del alineamiento múltiple de diferentes secuencias de invertasas extracelulares reportadas y depositadas en EBI (European Bioinformatics Institute) de cepas de <i>Z. mobilis</i> para el diseño de oligonucleótidos 36 y 37 para amplificar el gen <i>invB</i> a partir del genoma de <i>Z. mobilis</i> CDBB-B603.....	83
Figura 14. Estrategia de dos etapas de fermentación para inducción del promotor AOX1 para la expresión de proteínas recombinantes en <i>P. pastoris</i>	88
Figura 15. Detección y mecanismo de reacción de fructooligosacáridos.....	109
Figura 16. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de digestiones a partir del ADN plasmídico de: pGAPZαA- <i>invA</i> , pGAPZαA- <i>invB</i> y pPICZαA.....	113
Figura 17. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de ORF's <i>invA</i> e <i>invB</i> digeridos con EcoRI y SacII a partir de ADN plasmídico de las construcciones pGAPZαA- <i>invA</i> y pGAPZαA- <i>invB</i> y comprobación por PCR de presencia de insertos en las mismas construcciones.....	114
Figura 18. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de digestiones con EcoRI y SacII de clones de <i>E. coli</i> DH5α con el vector pPICZαA sin inserto.....	115
Figura 19. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de digestiones con EcoRI y SacII para liberación de inserto de clones de <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pPICZαA- <i>invA</i>	115
Figura 20. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de digestiones con EcoRI y SacII para liberación de inserto de clones de <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pPICZαA- <i>invB</i>	116
Figura 21. Análisis por secuenciación del MIC de la construcción pPICZαA- <i>invA</i> obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> A1.....	117
Figura 22. Análisis de la secuenciación ORF del gen <i>invA</i> de <i>Z. mobilis</i> en la pPICZαA- <i>invA</i> obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> A1.....	118
Figura 23. Alineamiento múltiple de la secuenciación ORF del gen <i>invA</i> de <i>Z. mobilis</i> en la pPICZαA- <i>invA</i> obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> A1.....	119
Figura 24. Análisis por secuenciación del MIC de la construcción pPICZαA- <i>invB</i> obtenida a	120

partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> B4.....	
Figura 25. Análisis de la secuenciación ORF del gen <i>invB</i> de <i>Z. mobilis</i> en la pPICZαA- <i>invB</i> obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> B4.....	120
Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuenciación ORF del gen <i>invB</i> de <i>Z. mobilis</i> en la pPICZαA- <i>invB</i> obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de <i>E. coli</i> B4.....	121
Figura 27. Transformantes aisladas <i>P. pastoris</i> X-33 de crecidas en medio YPD con 200 μg mL ⁻¹ de zeocina como marcador de selección.....	123
Figura 28. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de PCR de colonia de transformantes <i>P. pastoris</i> X-33 con la construcción pPICZαA- <i>invA</i> utilizando los oligonucleótidos GVIII y GVII.....	124
Figura 29. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de PCR de colonia de clones de <i>P. pastoris</i> X-33 con la construcción pPICZαA- <i>invB</i> utilizando los oligonucleótidos CVIII y CIX.....	124
Figura 30. Esquema de diseño de oligonucleótidos para comprobar integración de las construcciones pPICZα- <i>invA</i> y pPICZα- <i>invB</i> en el genoma de <i>P. pastoris</i> X-33.....	125
Figura 31. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% de integración de los cassettes de expresión de las construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i> en genoma de <i>P. pastoris</i> X-33.....	126
Figura 32. Bioensayo de placas indicadoras de TTC de 20 transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 con las construcciones pPICZαA- <i>invA</i> , pPICZαA- <i>invB</i> y controles.....	131
Figura 33. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % amplificación del gen <i>invA</i> en genoma de <i>P. pastoris</i> de transformantes con la construcción pPICZαA- <i>invA</i> utilizando los oligonucleótidos GVIII y GVII.....	132
Figura 34. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2% amplificación del gen <i>invB</i> en genoma de <i>P. pastoris</i> de transformantes con la construcción pPICZαA- <i>invB</i> utilizando los oligonucleótidos CVIII y CIX.....	133
Figura 35. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % del análisis de amplicones <i>invA</i> e <i>invB</i> del genoma de <i>Z. mobilis</i> CDBB-B603 empleando los oligonucleótidos 34-35 y 36-37 respectivamente.....	134
Figura 36. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con PstI y XbaI al ADN plasmídico de transformantes de <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pPICZαB- <i>invA</i>	135
Figura 37. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con PstI y XbaI al ADN plasmídico de transformantes de <i>E. coli</i> DH5α con la construcción pPICZαB- <i>invB</i>	136
Figura 38. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % para la comprobación de la construcción del pPICZαB- <i>invA</i> transformada en <i>E. coli</i> DH5α cepa A31.....	137
Figura 39. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de comprobación de la construcción del pPICZαB- <i>invB</i> transformada en <i>E. coli</i> DH5α cepa B2.....	138
Figura 40. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de control pPICZαB sin inserto transformada en <i>E. coli</i> DH5α cepa C2.....	139
Figura 41. Transformantes aisladas de <i>P. pastoris</i> KM71 (KM) y X-33 (X33) transformadas con la construcción pPICZαB- <i>invB</i> crecidas en medio YPD con 100 μg mL ⁻¹ de zeocina.....	140
Figura 42. Producción de invertasas intra (INVA) y extra (INVB) celulares en <i>Z. mobilis</i>	155
Figura 43. Producción de la invertasa intracelular recombinante regulada por el promotor inducido con methanol (AOX1) y constitutive (GAP) expresadas en cepas de <i>P. pastoris</i> X-33.....	157
Figura 44. Producción de la invertasa extracelular recombinante regulada por el promotor inducido con methanol (AOX1) y constitutive (GAP) expresadas en cepas de <i>P. pastoris</i> X-33.....	159
Figura 45. Perfil cromatográfico de la purificación de INVA _{AOX1} utilizando una columna de intercambio catiónico.....	161
Figura 46. Análisis electroforético de las fracciones con actividad invertasa obtenidas durante la purificación de INVA _{AOX1}	162
Figura 47. Análisis electroforético de los pasos de purificación empleados para obtener a INVA _{AOX1} homogénea.....	162
Figura 48. Análisis electroforético de la invertasa INVA _{AOX1} por medio de tinción de	

PAS.....	164
Figura 49. Análisis de la estructura primaria de la invertasa intracelular de <i>Z. mobilis</i> de posibles sitios de N-glicosilación.....	165
Figura 50. Análisis electroforético de la invertasa d-INVA _{AOX1}	166
Figura 51. Determinación de la temperatura óptima de la INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1}	167
Figura 52. Determinación del pH óptimo de INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1}	168
Figura 53. Consumo de sacarosa de INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1}	168
Figura 54. Termoestabilidad de INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1} a 35 y 45 °C	170
Figura 55. Termoestabilidad de INVA _{AOX1} y d-INVA _{AOX1} a 55 °C	172
Figura 56. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA _{AOX1} a concentraciones de 1, 5 y 10 mM.....	173
Figura 57. Isoelectroenfoco obtenido a partir del ultrafiltrado conteniendo a la proteína recombinante INVA.....	174
Figura 58. Perfil cromatográfico de la purificación de INVB _{AOX1} utilizando una columna de intercambio aniónico.....	175
Figura 59. Análisis electroforético de las fracciones con actividad invertasa obtenidas durante la purificación de la invertasa INVB _{AOX1}	176
Figura 60. Análisis electroforético de los pasos de purificación empleados para a INVB _{AOX1} homogénea.....	176
Figura 61. Análisis de la estructura primaria de la invertasa extracelular de <i>Z. mobilis</i> de posibles sitios de N-glicosilación.....	178
Figura 62. Análisis electroforético de la invertasa INVB _{AOX1} purificada mediante tinción de PAS.....	179
Figura 63. Determinación de la temperatura óptima de la INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1}	180
Figura 64. Determinación del pH óptimo de INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1}	181
Figura 65. Consumo de sacarosa de INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1}	181
Figura 66. Termoestabilidad de INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1} a 50 y 45 °C	183
Figura 67. Termoestabilidad de INVB _{AOX1} y d-INVB _{AOX1} a 40 y 35 °C	183
Figura 68. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB _{AOX1} a concentraciones de 1, 5 y 10 mM.....	184
Figura 69. Zimograma de actividad invertasa realizado a INVB _{AOX1} purificada.....	185
Figura 70. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVA _{AOX1} acoplada a Nylon-6 y su comparación con la enzima libre.....	187
Figura 71. Velocidad de hidrólisis de la INVA _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	188
Figura 72. Termoestabilidad a 50 y 45 °C de INVA _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	189
Figura 73. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	190
Figura 74. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVB _{AOX1} acoplada a Nylon-6 y su comparación con la enzima libre.....	192
Figura 75. Velocidad de hidrólisis de la INVB _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	193
Figura 76. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	194
Figura 77. Termoestabilidad a 50, 45 y 40 °C de INVB _{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre.....	195
Figura 78. Efecto de la concentración de metaperiodato de sodio sobre la actividad relativa de INVA _{AOX1}	198
Figura 79. Optimización del método de inmovilización para confinar a INVA _{AOX1} utilizando Nylon-6.....	198
Figura 80. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVA _{AOX1} acoplada a quitosano y su comparación con la enzima libre.....	199
Figura 81. Velocidad de hidrólisis de la INVA _{AOX1} acoplada a quitosano comparada con su homóloga libre.....	200
Figura 82. Termoestabilidad a 25, 30 y 35 °C de INVA _{AOX1} acoplada a quitosano	

comparada con su homóloga libre.....	201
Figura 83. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA _{AOX1} acoplada a Quitosano comparada con su homóloga libre.....	202
Figura 84. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVB _{AOX1} acoplada quitosano y su comparación con la enzima libre.....	204
Figura 85. Velocidad de hidrólisis de la INVB _{AOX1} acoplada a quitosano comparada con su homóloga libre.....	205
Figura 86. Termoestabilidad a 25, 30 y 35 °C de INVB _{AOX1} acoplada a quitosano y su comparación con su homóloga libre.....	206
Figura 87. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB _{AOX1} acoplada a Quitosano comparada con su homóloga libre.....	207
Figura 88. Etapas de formación de perlas de Quitosano.....	210
Figura 89. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVA _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano y su comparación con la enzima libre.....	211
Figura 90. Velocidad de hidrólisis de la INVA _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	212
Figura 91. Termoestabilidad a 35 y 45 °C de INVA _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	213
Figura 92. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	214
Figura 93. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	216
Figura 94. Velocidad de hidrólisis de la INVB _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	217
Figura 95. Termoestabilidad a 45 y 50 °C de INVB _{AOX1} acoplada a perlas quitosano y su comparación con su homóloga libre.....	218
Figura 96. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB _{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre.....	219
Figura 97. Alineamiento múltiple utilizando el programa Network Protein Sequence Analysis para identificar regiones conservadas de posible actividad transfructosilación.....	221
Figura 98. Cromatogramas de hidrólisis de sacarosa a los 30 minutos de incubación INVA _{AOX1} e INVB _{AOX1} en 1 M de sacarosa a temperatura ambiente.....	223

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución de algunas invertasas en diferentes organismos.....	8
Tabla 2. Características de invertasas de diferentes organismos eucarioticos comparados con las invertasas de este estudio.....	9
Tabla 3. Características de las invertasas producidas por <i>Z. mobilis</i> en comparación con la enzima comercial más utilizada (<i>S. cerevisiae</i>).....	13
Tabla 4. Comparación de los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas heterólogas.....	22
Tabla 5. Resumen de algunos trabajos utilizando <i>P. pastoris</i> para la expresión de proteínas heterólogas reguladas por el promotor AOX1.....	29
Tabla 6. Guía de posibles causas de problemas al expresar proteínas heterólogas en <i>P. pastoris</i> y posibles soluciones.....	31
Tabla 7. Trabajos de invertasas expresadas en <i>P. pastoris</i> mediante el control del promotor inducible alcohol deshidrogenasa (AOX1).....	40
Tabla 8. Trabajos realizados de inmovilización de invertasa por método de unión covalente y entrecruzamiento.....	41
Tabla 9. Trabajos de expresión de las invertasas de <i>Z. mobilis</i> utilizando diferentes estrategias en el uso de promotores y sistemas de expresión.....	42
Tabla 10. Estudios realizados por el grupo de trabajo referentes a la inmovilización INVA e INVB proveniente de <i>Z. mobilis</i> utilizando diferentes métodos de inmovilización.....	43
Tabla 11. Composición del medio de cultivo que influye en la respuesta de reducción del reactivo TTC en placas indicadoras de bioensayo colorimétrico cualitativo.....	70
Tabla 12. Diferentes fuentes de carbono útiles para realizar estudio de reducción en placas de TTC.....	71
Tabla 13. Diferentes formulaciones evaluadas para la realización de bioensayos en placas indicadoras de TTC para detectar actividad invertasa en transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 con los plásmidos integrados pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i>	128
Tabla 14. Efecto del medio de cultivo sobre la selección de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 con las construcciones pGAPαA- <i>invA</i> (GAP A), pGAPZαA- <i>invB</i> (GAP B), pPICZαA- <i>invA</i> (A's), pPICZαA- <i>invB</i> (B's) y pPICZαA (C2) en bioensayo de placas indicadoras utilizando como marcador TTC.....	130
Tabla 15. Resumen del escrutinio primario de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 (AX) y KM71 (AK) transformadas con la construcción pPICZαB- <i>invA</i> mediante bioensayos, PCR y fermentación a pequeña escala.....	142
Tabla 16. Resumen del escrutinio primario de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 (BX) y KM71 (BK) transformadas con la construcción pPICZαB- <i>invB</i> mediante bioensayos, PCR y fermentación a pequeña escala.....	144
Tabla 17. Efecto de la temperatura, agitación y concentración de amortiguador sobre la actividad invertasa de las transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 A9 y B4 con las construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i> respectivamente.....	147
Tabla 18. Efecto de temperatura, agitación y concentración de metanol sobre la actividad invertasa de las transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 A9 y B4 con las construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i> respectivamente.....	149
Tabla 19. Expresión de la invertasa intracelular (GAPA) y extracelular (GAPB) bajo el control del promotor constitutivo GAP en cepas de <i>P. pastoris</i> X-33 con las construcciones pGAPZαA- <i>invA</i> y pGAPZαA- <i>invB</i> respectivamente.....	150
Tabla 20. Optimización de las condiciones de operación (efecto del volumen del contenedor) sobre la actividad invertasa.....	154
Tabla 21. Resumen de los resultados más importantes obtenidos de la fermentación realizada por <i>Z. mobilis</i> en medio Bekers a a 30 °C durante 48 horas a sin a gitación en matraz de 1 L para evaluar la producción de la invertasa intra y extracelular.....	155
Tabla 22. Producción de la invertasa intracelular nativa comparada con la obtenida utilizando el sistema de <i>P. pastoris</i> con el promotor inducible (INVA _{AOX1}) y con el promotor constitutivo (INVA _{GAP}).....	157

Tabla 23. Diferentes trabajos comparando la expresión de proteínas recombinantes utilizando el promotor constitutivo GAP y el promotor AOX1. Obteniendo que el promotor GAP fue el más adecuado para el sistema probado.....	158
Tabla 24. Producción de la invertasa extracelular nativa comparada con la obtenida utilizando el sistema de <i>P. pastoris</i> con el promotor inducible (INVA _{AOX1}) y con el promotor constitutivo (INVA _{GAP}).....	159
Tabla 25. Diferentes trabajos comparando la expresión de proteínas recombinantes utilizando el promotor constitutivo GAP y el promotor AOX1. Obteniendo que el promotor AOX1 fue el más adecuado para el sistema probado.....	160
Tabla 26. Etapas de purificación para obtener a INVA _{AOX1} homogénea expresada por <i>P. pastoris</i> X-33 mediante inducción con metanol.....	163
Tabla 27. Constantes cinéticas de la INVA _{AOX1} e d-INVA _{AOX1} obtenidas mediante regresión lineal y su comparación con la invertasa nativa de <i>Z. mobilis</i>	169
Tabla 28. Pasos de purificación para obtener a INVB _{AOX1} homogénea expresada por <i>P. pastoris</i> X-33 mediante inducción con metanol.....	177
Tabla 29. Constantes cinéticas de la INVB _{AOX1} e d-INVB _{AOX1} obtenidas mediante regresión lineal y su comparación con la invertasa nativa de <i>Z. mobilis</i>	182
Tabla 30. Caracterización bioquímica de INVA _{AOX1} inmovilizada en Nylon 6 y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	191
Tabla 31. Caracterización bioquímica de INVB _{AOX1} inmovilizada en Nylon 6 y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	196
Tabla 32. Caracterización bioquímica de INVA _{AOX1} inmovilizada en Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	203
Tabla 33. Caracterización bioquímica de INVB _{AOX1} inmovilizada en Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	208
Tabla 34. Caracterización bioquímica de INVA _{AOX1} inmovilizada en Perlas de Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	215
Tabla 35. Caracterización bioquímica de INVB _{AOX1} inmovilizada en Perlas de Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.....	220

ABREVIATURAS

DO₆₀₀	Densidad óptica 600 nm de λ	mM	Milimolar
DO₂₈₀	Densidad óptica a 280 nm de λ	mV	Milivoltios
ADN	Ácido desoxirribonucleico	nm	Nanómetro
bp	Pares de bases	p/v	peso/volumen
BSA	Albúmina de suero bovino	rpm	Revoluciones por minuto
cm	Centímetro	U	Unidades
dNTPs	Mezcla de desoxirribonucleótidos	μg	Microgramo
g	Gramo	μL	Microlitro
min	minutos	μM	Micromolar
V_{max}	Velocidad máxima	λ	Longitud de onda
K_M	Constante de Michaelis	v/v	volumen/volumen
k_{cat}	Número de recambio	° C	Grados centígrados

RESUMEN

Las invertasas de *Zymomonas mobilis* representan una alternativa como nuevos biocatalizadores capaces de tolerar altas concentraciones de sacarosa y por lo tanto pueden ser empleadas en algunos procesos industriales. La desventaja que presentan estas enzimas es su baja estabilidad a pH y altas temperaturas, así como su baja producción de forma nativa.

El uso de sistemas heterólogos de expresión ha sido una alternativa dentro de la rama de la ingeniería de proteínas para poder solucionar algunos de estos inconvenientes. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha sido muy utilizada como sistema de expresión heterólogo en las últimas décadas por diversas ventajas, entre ellas que cuenta con el promotor fuerte AOX1 inducido por metanol en el medio de cultivo.

Estudios iniciales arrojaron que, en estas enzimas al menos, la cola de poli-histidinas y el epítipo myc afectaron el plegamiento y estabilidad de las proteínas producidas por ésta levadura, por lo que se decidió clonar los genes sin estas dos modificaciones que, para muchos autores, son útiles para identificación y separación de las proteínas heterólogas.

Una vez rediseñados los vectores y al optimizar las condiciones de fermentación en *P. pastoris* se consiguió aumentar la producción en 1.2 y 1.7 veces de las invertasas INVA_{AOX1} (invertasa intracelular) e INVB_{AOX1} (invertasa extracelular), comparadas con su producción en *Z. mobilis*. Además, las enzimas recombinantes presentaron mejores propiedades catalíticas como: velocidad de catálisis, eficiencia, termoestabilidad, entre otros.

INVB_{AOX1} presentó mejores propiedades catalíticas en comparación con INVA_{AOX1} con excepción de la termoestabilidad, parámetro que la segunda tolera en mayor medida. Por otro lado, INVA_{AOX1} presentó mayor estabilidad a sacarosa (400 mM) en comparación con la enzima nativa (300 mM).

Otra modificación importante que presentaron las enzimas recombinantes fue la adición de grupos N-glicosilo, parámetro no considerado en un principio, pero que nos ayudó a entender el efecto que tiene esta modificación sobre las propiedades de los biocatalizadores, debido a que al remover dichos grupos glicosilo, los parámetros cinéticos y bioquímicos se vieron afectados, sobre todo la estabilidad a temperaturas altas y actividad catalítica.

Con el objetivo de tener biocatalizadores más estables (operacionalmente hablando) se llevaron a cabo diversos métodos de inmovilización mediante métodos químicos utilizando diferentes soportes, resultando que a pesar de diferentes modificaciones que se llevaron a cabo a los procedimientos de inmovilización, en general $INVA_{AOX1}$ no presentó resultados interesantes en esta etapa, salvo el número de reúsos (44) y un aumento en la termoestabilidad al utilizar Nylon-6 como soporte.

Contrariamente, la invertasa intracelular, $INVB_{AOX1}$ presentó buenas características al ser inmovilizada en diferentes soportes, siendo el más exitoso al ser confinado en Perlas de Quitosano, consiguiendo mayor estabilidad térmica y aumento de reúsos.

Con estos resultados se consiguió modificar las propiedades catalíticas de los biocatalizadores nativos, sin embargo, sólo pueden ser utilizados en procesos que no requieran condiciones muy extremas de temperatura o pH dado que aún no se consiguió estabilizar dichas invertasas bajo esos estados, sugiriendo la utilización de estos biocatalizadores dentro del proceso de fermentación de melazas de caña.

Como perspectivas a este trabajo se tienen: (i) caracterizar la estructura terciaria de las proteínas para indagar más acerca de cuáles fueron las modificaciones que realizó *P. pastoris* para mejorar las propiedades catalíticas de estas enzimas, (ii) optimizar la producción de las proteínas heterólogas en biorreactor, (iii) optimizar las condiciones de inmovilización de ambas invertasas, sobre todo de la intracelular y (iv) buscar posible actividad de transfructosilación.

ABSTRACT

Zymomonas mobilis invertases represent an alternative and novel biocatalysts able to tolerate high concentrations of sucrose and therefore usable in some industrial processes. It is the disadvantage of poor stability to pH and high temperatures, and their low production of native.

The use of heterologous expression systems has been an alternative within the branch of protein engineering to solve some of these problems. The methylotrophic yeast *P. pastoris* has been widely used in recent decades by various advantages, including that it has the strong methanol-induced AOX1 promoter in culture medium.

Initial studies indicate that in these enzymes at least the poly-histidine tag and myc epitope affect the folding and stability of proteins produced by the yeast, so it was decided to clone the genes without these two amendments that many authors. They are useful for identification and separation of the heterologous proteins.

Once the recombinant constructions were redesigned, we optimized fermentation conditions in *P. pastoris* to increase the production of both of INVA_{AOX1} (intracellular invertase) and INVB_{AOX1} (extracellular invertase) in 1.2 and 1.7-folds compared with production of *Z. mobilis*. Furthermore, the recombinant enzymes showed better catalytic properties as: rate of catalysis, efficiency, thermostability, among others.

INVB_{AOX1} result that showed better catalytic properties compared to INVA_{AOX1} except thermostability, the second parameter tolerate a greater extent. Therefore, the recombinant intracellular invertase provided greater stability to sucrose (400 mM) compared to the native enzyme (300 mM).

Another major change present recombinant enzyme was the addition of N-glycosyl groups, parameter is not considered a principle of work, but that helped us understand the effect of this modification on the properties of biocatalysts, because by removing said glycosyl groups, biochemical and kinetic parameters, especially affected the stability at high temperatures and catalytic activity.

In order to have more stable catalysts (operationally speaking) were carried out different methods of immobilization by chemical methods using different materials, resulting that despite various modifications performed immobilization procedures generally $INVA_{AOX1}$. We did not show very good results at this stage, unless the number of reuses (44) and thermostability increase using Nylon-6 and support.

Unlike intracellular invertase, $INVB_{AOX1}$ presents new characteristics to be immobilized on various supports and procedures, the most successful being confined Chitosan beads, achieving higher thermal stability and increased reuses.

With these results the modification of the catalytic properties of native biocatalysts was achieved, however, they can only be used in processes that do not require extreme conditions of temperature or pH since it is still necessary to stabilize these invertases under those conditions, suggesting the use of these biocatalysts in the process of fermentation of cane molasses.

As prospects for this work are: (i) characterize the protein tertiary structure to find out more about what the changes were made *P. pastoris* to improve the catalytic properties of these enzymes, (ii) optimize the production of proteins heterologous bioreactor, (iii) optimize the conditions of detention of both invertases, especially intracellular and (iv) to seek possible transfructosylation activity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 La importancia de aislamiento de microorganismos a partir de sus fuentes naturales y la obtención de enzimas a partir de estos.

Desde hace más de 100 años con los primeros estudios de Winogradsky, al aislar bacterias de suelos para el estudio de la nitrificación, se determinó que al separar microorganismos de sus fuentes de origen es posible adquirir información no sólo de su interacción con el medio ambiente y la importancia biológica en la que participan, sino también se consigue conocimiento de sus rutas biosintéticas. Es en este ámbito, en donde una vez que se tienen los cultivos axénicos aislados de una fuente específica, se pueden identificar las enzimas que están involucradas en su metabolismo, proporcionando a su vez, diferentes biocatalizadores que pueden ser utilizados en diferentes procesos biotecnológicos (Lehninger 1995).

Las enzimas han tenido un papel preponderante, debido a que desde la antigua Grecia, han estado involucradas en la elaboración de pan, producción de alcohol, preparación de queso, entre otros. Una vez que se obtuvo mayor conocimiento y purificación de las mismas se incrementó el número de aplicaciones de ellas (Haki y Rakshit 2003).

Las enzimas pueden ser empleadas en la catálisis de diferentes procesos industriales, debido a que poseen características atractivas en comparación con los catalizadores químicos, debido a que tienen alta especificidad por su(s) sustrato(s), no generan subproductos no deseados en los procesos industriales y dependiendo de su fuente de aislamiento, pueden tolerar diferentes rangos de temperatura y pH, por lo que son robustas bajo diferentes condiciones industriales (Nigam PS, 2013).

La producción de enzimas como componente biotecnológico industrial crece rápidamente. Anualmente, las ventas a la industria se encuentran alrededor de los billones de dólares, incrementando el número de patentes y artículos, por lo que la mayoría de las enzimas industriales son producidas por microorganismos

recombinantes para mejorar sus propiedades o para aumentar su producción (Madhan *et al.*, 2010).

1.2 *Zymomonas mobilis* y sus enzimas hidrolíticas.

Zymomonas mobilis es una bacteria anaerobia facultativa Gram negativa, aislada de bebidas alcohólicas de países tropicales como el vino de palma proveniente de África, del agave utilizado para pulque Mexicano e inclusive es un contaminante de la sidra (enfermedad de la sidra) o cerveza en países Europeos (Panesar *et al.* 2006).

El principal interés en esta bacteria radica en su alta tasa específica de consumo de azúcares para la producción de bioetanol (1 mol de glucosa produce 1.9 moles de etanol teóricos), alta tolerancia a etanol y alta eficiencia de conversión de etanol comparada con levaduras. Por esta razón, ha sido un microorganismo muy atractivo para la producción de bioetanol en América del Norte y otras partes del mundo, así como de otros compuestos como sorbitol, levano y fenilacetilcarbinol. Por otro lado al ser considerada una bacteria segura, también ha tenido aplicaciones con fines medicinales (Song *et al.* 2005, Kouvelis *et al.* 2009).

Una desventaja de este microorganismo es su limitación para la producción de etanol a partir de residuos agrícolas. Debido a que sus únicas fuentes de carbono metabolizables son glucosa, fructosa y sacarosa, ya que no posee la ruta metabólica de las pentosas, necesaria para la fermentación de xilosa comúnmente encontrada en la hemicelulosa (Zhang *et al.* 1995, Aït-Abdelkader *et al.* 2000).

Su genoma se encuentra secuenciado y depositado (GenBank código de acceso: CP001722) para la cepa NCIMB 11163 conteniendo un solo cromosoma circular (2, 124,771 pb) y tres plásmidos (GenBank código de acceso: CP001723, CP001724 y CP001725), el contenido general de GC en el cromosoma es del 46.83 %. El genoma completo contiene 1,884 genes que codifican para proteínas, 51 ARNt y 9 ARNr (Kouvelis *et al.* 2009).

1.2.1 Metabolismo de la sacarosa.

Esta bacteria no posee un mecanismo de transporte de sacarosa al interior de la célula, por lo que esta primero es hidrolizada para liberar glucosa y fructosa en el medio de cultivo, posteriormente estos azúcares son transportados al interior de la célula por medio de difusión facilitada mediante un acarreador, son fosforiladas por una quinasa y se metabolizan por la vía de Enter-Doudoroff, siendo una de las pocas bacterias que utilizan esta ruta, la cual se encuentra en organismos aerobios estrictos (Yanase *et al.* 1998, Rogers *et al.* 2007)

Al utilizar sacarosa como fuente de carbono para la producción de bioetanol, el rendimiento es del 70%, siendo menor en comparación con dos fuentes mencionadas anteriormente con una producción superior al 94%. Este bajo rendimiento al utilizar sacarosa es debido a la formación de subproductos como el leván, sorbitol e incluso fructoligosacáridos como nistosa, 1-ketosa, 6-ketosa y neoketosa, estos últimos con gran valor agregado debido a que se clasifican como alimentos funcionales (Hernalsteens y Maugeri, 2010).

En la hidrólisis de sacarosa se han encontrado tres tipos de enzimas: invertasa intracelular (SacA, E1, INVA), invertasa extracelular (SacC, E3, INVB) y levansacarasa extracelular (SacB, E2), siendo sólo las dos últimas las que participan en la hidrólisis de sacarosa (Gunasekaran *et al.* 1990, Aït-Abdelkader *et al.* 2000).

De acuerdo a estudios realizados por Aït-Abdelkader *et al.* (2000), la invertasa intracelular, aunque si posee la capacidad de hidrolizar la sacarosa, no está involucrada en la hidrólisis de sacarosa en el medio de cultivo, debido a que no existe un sistema de transporte de sacarosa al interior de la célula por lo que la posible razón de la presencia de esta enzima la atribuyen a un ancestro de ésta bacteria, el cual poseía un sistema de transporte de tipo PTS ("phosphotransferase system") que se fue perdiendo a lo largo de la evolución.

En *Z. mobilis* no se conoce exactamente el mecanismo de expresión de estas enzimas hidrolíticas, sin embargo se sugiere que esto se lleva a cabo mediante inducción en presencia de sacarosa extracelular, la cual interactúa con receptores de membrana plasmática e inicia una señal intracelular que enciende la expresión de genes de las invertasas (Giraldo *et al.* 2012).

La secuencia de nucleótidos de las tres hidrolasas ha sido determinada, encontrando gran homología en el extremo N-terminal no siendo así en su extremo C-terminal. El extremo N-terminal tiene homología con secuencias de sacarosas, levanasas e invertasas de levaduras, así como con el gen *SUC2* de *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo no hay similitud en el extremo C-terminal comparadas con levansacarosas de otros organismos (Gunasekaran *et al.* 1990, Yanase *et al.* 1991).

En el caso de la invertasa intracelular, el extremo N-terminal posee una máxima homología con sacarosas de: *Streptococcus mutans*, *Vibrio alginolyticus*, *Salmonella typhimurium*, *S. cerevisiae*, la levanasa y levansacarasa de *Bacillus subtilis* (Gunasekaran *et al.* 1990).

La invertasa intracelular y la levansacarasa poseen alta homología entre sí, compartiendo estas características con la levansacarasa de *B. subtilis*, la sacarosa hidrolasa intracelular de *E. coli* y la invertasa extracelular de *S. cerevisiae* (Kyono *et al.* 1995).

Se ha observado que los genes *sacB* y *sacC* (*invB*) se encuentran en el mismo cromosoma y se ha encontrado que probablemente forman parte de un operón. Los cuales se encuentran separados por una pequeña región en donde se encuentra el sitio de terminación de la transcripción de *sacB* y el promotor y la secuencia Shine-Dalgarno de *invB* (Gunasekaran *et al.* 1995, Kyono *et al.* 1995, Yanase *et al.* 1998). La forma de regulación de *invA* sigue sin ser muy clara o estudiada.

Otros estudios indican sin embargo que la actividad de INV B y levansacarasa son muy baja cuando son inducidas en presencia de sacarosa y las colonias crecidas bajo este azúcar son pequeñas a comparación de las placas que contienen glucosa (Kondo *et al.* 1994, Kyono *et al.* 1995).

1.2.2 Características generales de las invertasas.

Las enzimas que hidrolizan la sacarosa se refieren comúnmente como invertasas o β -D-fructofuranosidasas (EC 3.2.1.26) las cuales catalizan la liberación de β -fructosa a partir del extremo no reductor de sustratos de tipo β -D-fructofuranosidos en el enlace O-glicosídico. La reacción empieza por un mecanismo de desplazamiento doble en el cual se forma un intermediario covalente glicosil-enzima. El nombre de invertasa fue acuñado debido a que esta enzima produce azúcares invertidos no cristalizados en una mezcla 1:1 de D-glucosa dextrarotatoria y una D-fructosa levonorotatoria (**Figura 1**) (Álvaro-Benito *et al.* 2007, Dipasquale *et al.* 2009).

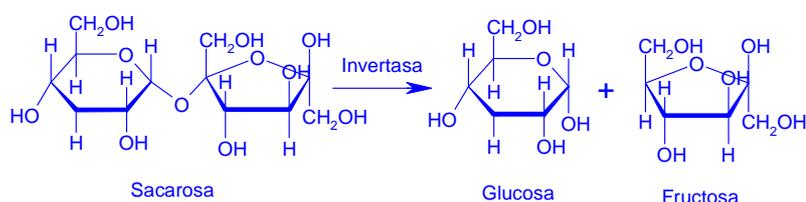


Figura 1. Mecanismo de general de hidrólisis de sacarosa por la enzima invertasa. La sacarosa es hidrolizada por la invertasa generando una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, glúcidos que no cristalizan en comparación con la sacarosa.

Además de la hidrólisis de la sacarosa, algunas invertasas tienen la actividad de transfructosilación o fructotransferasas, esto quiere decir operan con un mecanismo molecular permitiendo una retención total de la configuración anomérica y polimerizando monómeros de fructosa, generando sacáridos de dos o tres unidades denominados fructooligosacáridos (**FOS**), los cuales tienen alto valor agregado en la industria de alimentos debido a sus propiedades como nutracéuticos (Hirayama *et al.* 1989, Chavez *et al.* 1997, Dipasquale *et al.* 2009).

Los β -Fructofuranósidos pertenecen a la familia GH32 de las glicosil hidrolasas con más de 370 pertenecientes a plantas, hongos y bacterias (Guimaraes *et al.* 2007), dentro de esta familia se encuentran: inulinasas, levanasas, exoinulinasas, sacarosas, 1-fructosiltransferasas, fructan:fructan 1-fructosiltransferasas, 2,6- 2,6- β -fructan6-levanbiohidrolasa, fructan- β -(2,1) fructosidasa, fructan- β -(2,6) fructosidasa y la mayoría de las invertasas. Estas enzimas poseen una secuencia altamente conservada conocida como caja de unión a sacarosa la cual es: HXXPXXXXXNDPNG, donde "X" puede ser cualquier residuo. El aminoácido que funge como nucleófilo es el ácido aspártico y el protón donador es ácido glutámico.

Algunas otras de estas enzimas se agrupan en la familia 68, donde se concentran aproximadamente 64 de ellas y las conforman principalmente levansacarosas de bacterias y tres invertasas de bacterias incluyendo la INVb de *Z. mobilis*. Al igual que la familia 32, los aminoácidos que sirven como nucleófilos y protón donador son aspártico y glutámico, respectivamente. Esta familia tiene secuencias conservadas como EWSG, RDP y DXXER (Vásquez-Bahena 2007).

Aunque son de las enzimas más estudiadas, sólo cinco enzimas de ésta familia han sido cristalizadas y depositadas en la base de datos PDB: i) Invertasa de *Thermatoga maritima*, (ii) Exoinulinasas de *Aspergillus awamori*, (iii) Fructan 1-exohidrolasa IIa de *Cichorium intybus*, (iv) Invertasa de *Arabidopsis thaliana* e (v) Invertasa de *Schwanniomyces occidentalis* (Jedrzejczak *et al.* 2011).

Las invertasas son algunas de las enzimas más utilizadas en la industria debido a que se emplean en confitería, fermentación de melaza de caña a etanol, preparación de alimento para ganado, relleno de chocolates, manufactura de azúcares invertidos como alimento para abejas, producción de ácido láctico, glicerol, agente plastificante en cosméticos e industria del papel (Bhatti *et al.* 2006, Guimarães *et al.* 2007, Menendez *et al.* 2013).

En los últimos años, las invertasas han tenido gran atención en diferentes sectores de la industria de bebidas alimenticias, debido a que los azúcares que producen tienen mayor poder edulcorante en comparación con la sacarosa, los productos son incoloros en comparación con la hidrólisis ácida y son más estables que los azúcares de sacarosa, por último como ya se ha mencionado, algunas invertasas pueden producir los ya mencionados FOS (Shaheen *et al.* 2008, Giraldo *et al.* 2012, Menendez *et al.* 2013).

Estos biocatalizadores han sido obtenidos de diferentes organismos como procariotas (*Bifidobacterium infantis*), nuestro organismo de estudio (*Z. mobilis*) y de eucariotas como plantas, animales, hongos y levaduras entre otros (Giraldo *et al.* 2012). En algunos casos presentan isoformas y poseen diferentes clasificaciones dependiendo de su localización, pH óptimo y sus funciones dependen tanto de la fuente de carbono utilizada como del tipo de organismos, teniendo un espectro tanto de eucariontes como procariontes. Así las invertasas, pueden clasificarse con base a dos tipos de criterios:

- i) pH óptimo: Invertasas tipo ácidas y tipo básicas
- ii) Localización celular: Invertasas asociadas a la pared celular, asociadas a las vacuolas, intracelulares y extracelulares

En la **Tabla 1** se enlistan algunos ejemplos de esta clasificación y los organismos que las producen (Hsieh *et al.* 2006):

Tabla 1. Distribución de algunas invertasas en diferentes organismos. Ejemplos de algunas invertasas clasificadas por la localización y por la ionización de sus aminoácidos de acuerdo al potencial de hidrógeno.

Tipo de invertasa	Organismo	Nombre común
Invertasa ácida	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Tomate
Invertasa ácida Invertasa pared celular	<i>Nicotiana tabacum</i> <i>Oryza sativa</i>	Tabaco común Arroz
β -D-fructofuranosidasa	<i>Aspergillus niger</i>	
Invertasa ácida	<i>Fusarium solani</i>	Ascomiceto
β -D-fructofuranosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Invertasa intracelular Invertasa extracelular	<i>Zymomonas mobilis</i>	
Invertasa alcalina	<i>Bambusa edulis</i>	Bamboo
Invertasa vacuola	<i>Ipomoea batatas</i> <i>Zea mays</i>	Papa dulce Maíz

Comercialmente, las invertasas más utilizadas provienen de levaduras como *Aureobasidium spp*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces calshbergensis* y del hongo *Aspergillus niger* (Madhan *et al.* 2010), mientras que las invertasas más estudiadas provienen de organismos algunos mencionados anteriormente y otros como *Schwannionmyces occidentalus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia anomala*, *Candida utilis* y *Arxula adenivorans*. Todas estas invertasas comparten dos residuos ácidos los cuales son necesarios para el rompimiento del enlace glicosídico de sus sustratos (Bhatti *et al.* 2006, Álvaro-Benito *et al.* 2007).

Algunas características de estos biocatalizadores comparados con los que se presentan en este trabajo se muestran en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características de invertasas de diferentes organismos eucarióticos comparados con las invertasas de este estudio (Yanase *et al.* 1995, 1998, O'Mullan *et al.* 1992, Santiago-Hernández *et al.* 2006, Vásquez-Vahena 2007, Calixto-Romo 2008, Vallejo-Becerra *et al.* 2008).

	Hongos y levaduras		<i>Z. mobilis</i>	
	Intracelular	Extracelular	Extracelular	Intracelular
pH óptimo	4.5-5.5	3.5-5.5	5.5	6.0
Temperatura óptima (°C)	50-60	50-60	40	30
Peso molecular (kDa)	45-60	50-60	45	57
Glicosilación	No	Si	Negativa	Nd
Inhibición por sustrato	Nd	Si	300 mM	300 mM
Inhibición por producto	Nd	No	Nd	Nd
Inhibición por metales pesados	Si	Si	HgCl ₂ <i>p</i> -CMBA	HgCl ₂ <i>p</i> -CMBA
Regulación	Constitutiva	Represión por glucosa	Sacarosa	Nd

La enzima comercial más utilizada (*S. cerevisiae*) presenta ventajas como su actividad a 55-60 °C, alta eficiencia catalítica ($K_M = 38$ mM) y su estabilidad a pH (2.8-8.0); sin embargo, tiene baja tolerancia a su sustrato (150 mM), no resiste altas temperaturas de operación y al ser inmovilizada no tiene muchos reúsos a temperaturas de entre 40 a 45 °C (Arruda y Vitolo 1999, Gracida-Rodríguez 2002, Lafraya *et al.* 2011).

Por lo tanto para poder ofrecer nuevas invertasas con potencial industrial es necesario investigar nuevos microorganismos y entender la relación entre su estructura y su estabilidad así como sus características (Bhatti *et al.* 2006).

1.2.3 Invertasa intracelular (INVA) de *Z. mobilis*.

Los primeros estudios de INVA se llevaron a cabo por Gunasekaran *et al.* (1990), determinado que el gen de esta enzima tiene su propia región SD, promotor y no posee actividad de transfructosilación. Desde esa época ya se tenía indicios de que esta invertasa es diferente a la extracelular.

Posee alta homología con sacarosas de *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y *Vibrio alginolyticus*. El ORF (Open Reading Frame) del gen *invA* es de 1,536 pb y el peso molecular teórico de la proteína codificada es de 58.728 kDa en columna de filtración en gel Sephadex G-200. Yanase *et al.* (1991) reportaron un punto isoeléctrico (PI) de 8.5, sin embargo Aït-Abdelkader *et al.* (2000) registraron un PI de 7.3.

Es capaz de hidrolizar sacarosa, rafinosa, melibiosa e inulina, pero no cataliza la maltosa, melezitosa o levano. Se ha reportado que utilizando sacarosa como sustrato posee una actividad específica de 2, 290 U_{mg}⁻¹ (Yanase *et al.* 1991).

Presenta un pH óptimo de 6.5, estable en un rango de pH de 5.0 a 7.0 y se inhibe por compuestos con mercurio como HgCl₂, PCMB, acetato de mercurio y ácido mersalil, a una concentración 1 mM. La k_{cat} reportada es de 125 s⁻¹, K_M de 42 mM (Yanase *et al.* 1991, Yanase *et al.* 1995, Aït-Abdelkader *et al.* 2000).

1.2.4 Invertasa extracelular (INVB) de *Z. mobilis*.

En cuanto a la INVB, los estudios referidos a la caracterización e identificación son más numerosos que para INVA siendo el primer estudio realizado por Preziosi *et al.* 1990a, identificando por primera vez una bacteria capaz de tener actividad en el medio de cultivo. Con un peso molecular de 45-46 kDa y punto isoeléctrico de 5.0, es una enzima monomérica. El gen *invB* presenta un ORF de 1239 pb que codifican para 413 aminoácidos.

El gen *invB* no tiene mucha homología con *invA* pero si con *E2* (levansacarasa) de *Z. mobilis*, *SacB* (levansacarasa extracelular) de *B. subtilis* y a su vez no tiene homología con una levansacarasa intracelular (*SacA*) del mismo organismo, *sacC* (levanasa extracelular), *rafD* (sacarosa hidrolasa intracelular) de *E. coli* y con *suc2* (invertasa extracelular) de *S. cerevisiae*. Al contrario *invA* tiene homología con *sacA*, *sacC*, *rafD* y *suc2* (Kyono *et al.* 1995).

No hay reportes en cuanto a la estructura terciaria y cuaternaria de las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis*. Sin embargo, se realizó una simulación utilizando el programa I-TASSER para conocer un poco más acerca de las características de estas invertasas, tal como se muestra en las **Figuras 3 y 4**.

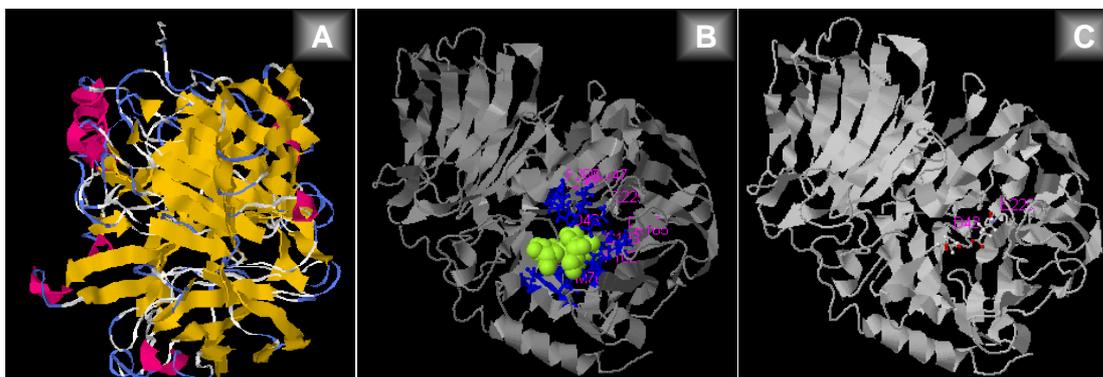


Figura 3. Predicción de la estructura terciaria de la invertasa intracelular de *Z. mobilis* a partir de la estructura primaria obtenida de PDB (gb|AAO38865.1) utilizando el programa I-TASSER. (A) Estructura terciaria. En amarillo se muestran las 37 hojas beta y en rosa 5 alfa hélices que posee esta enzima. (B) Posible sitio de unión de efectores. (C) Sitio catalítico conformado por un ácido aspártico en la posición 43 y un ácido glutámico en la posición 229.

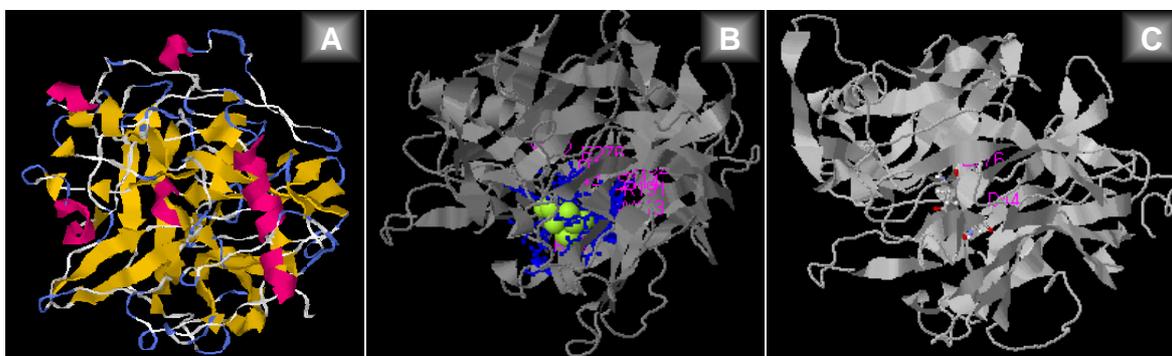


Figura 4. Predicción de la estructura terciaria de la invertasa extracelular de *Z. mobilis* a partir de la estructura primaria depositada en PDB (P0DJA4) utilizando el programa I-TASSER. (A) Estructura terciaria. En amarillo se muestran las 28 hojas beta y en rosa 5 alfa hélices que posee esta enzima. (B) Posible sitio de unión de efectores. (C) Sitio catalítico conformado por un ácido aspártico en la posición 44 y un ácido glutámico en la posición 276.

A pesar de sus limitantes en termoestabilidad y rangos de pH, como se ha mencionado anteriormente, estas invertasas poseen características atractivas en comparación con la invertasa comercial más utilizada de *S. cerevisiae*. En la **Tabla 3** se muestran algunas propiedades de ambas invertasas en comparación con la invertasa de esta levadura.

Tabla 3. Características de las invertasas producidas por *Z. mobilis* en comparación con la enzima comercial más utilizada (*S. cerevisiae*).

	<i>Z. mobilis</i>		<i>S. cerevisiae</i>
	INVA	INVB	SUC2
Localización	Intracelular ^I	Extracelular ^{I, II}	Extracelular ^{V, IX}
pH óptimo	6.0 ^{I, VII}	5.5 ^{VI- VIII}	4.0 ^{IX}
Temperatura óptima	30 °C ^{VII}	45 °C ^{VI- VIII}	25,50 °C ^{IV, IX}
PM (kDa)	58 ^{VII} (monomérica)	45 ^{II, VI- VIII} (monomérica)	61 ^{IV} (dimérica)
Glicosilación	Negativa ^{VII}	Negativa ^{VI}	Positiva ^{IX}
K_M (mM)	110 ^{VII}	86,98 ^{VI- VIII}	25,41 ^{IV, IX}
kcat (s-1)	57 ^{VII}	12000 ^{VI}	3438 ^{IV, IX}
kcat/K_M (s-1mM-1)	0.5 ^{VII}	122 ^{VI}	90.3 ^{IV, IX}
Inhibición por sacarosa	300 mM^{VII}	300 mM^{VI}	150 mM ^V

Yanase *et al.* 1995^I, 1998^{II}, O'Mullan *et al.* 1992^{III}, Arruda y Vitolo 1999^{IV}, Gracida-Rodríguez 2002^V, Santiago-Hernández *et al.* 2006^{VI}, Vásquez-Vahena *et al.* 2006^{VII}, Calixto-Romo *et al.* 2008^{VIII}, Vallejo-Becerra *et al.* 2008^{VIII}, Lafraya *et al.* 2011^{IX}.

1.2.6 Invertasas en México.

Una alternativa para la producción de jarabes invertidos a partir de sacarosa, implica solamente una enzima: la invertasa. México producen aproximadamente 5 millones de toneladas de sacarosa por año, por lo que tanto para México, como para otros países es importante la producción de sacarosa con la finalidad de obtener jarabes invertidos entre otros productos de consumo humano (Santiago-Hernández *et al.* 2006; Sagarpa 2009).

Así mismo, para la obtención de proteínas de interés industrial, sobre todo a nivel alimenticio, generalmente son necesarios diversos pasos de purificación, debido a que se requieren con un grado de pureza alto. Esto representa una desventaja ya que, conforme van aumentando los pasos de purificación a una proteína, los rendimientos de la misma disminuyen y aumentan los costos.

Por lo anterior, se han buscado nuevas alternativas empleando ingeniería genética mediante la expresión heteróloga de enzimas de interés, denominadas proteínas recombinantes, utilizando diferentes sistemas de expresión.

1.3. Sistemas heterólogos de expresión.

Desde el inicio del desarrollo de la ingeniería genética a mediados de los 1970s se ha buscado, mediante la tecnología de ADN recombinante, modificar genéticamente un organismo; de tal manera que funcione como productor de las proteínas que son de nuestro interés. Esta es una de las diferencias entre las proteínas de origen nativo y las proteínas recombinantes, así como, en algunos sistemas, más sencilla la purificación de las mismas.

En términos generales, la producción de proteínas recombinantes involucra dos pasos principales: **(I) Fase inicial (“upstream”)** Introducción del ADN externo a las células huésped: (a) Identificación y aislamiento del ADN a introducir, (b) Identificación del vector y construcción del vector recombinante, (c) Identificación de el sistema de expresión que recibirá el ADN recombinante. **(II) Fase inicial (“upstream”)** (a) Factores que afectan la expresión del ADN externo para la síntesis de proteína en el sistema de expresión seleccionado (b) Proceso de purificación y evaluación de la actividad de dicha proteína (Dragon-Serrano y Sainz-Espuñes 2006).

Existe una serie de vectores disponibles para portar el ADN dentro y fuera de las células: plásmidos, fago lambda, cósmidos, fásmidos, cromosomas artificiales de bacterias (BAC), levaduras (YAC) o de origen humano (HAC₃).

Los vectores pueden ser integrativos (formando parte del cromosoma del huésped) o extracromosomales. También puede haber de una a cientos de copias de las construcciones (Rai y Padh 2001).

En general los vectores de expresión poseen los siguientes atributos:

- 🧬 Ori: Secuencia que permite la replicación autónoma en la célula
- 🧬 Promotor: Una región reguladora que permita “encender” o “apagar” la expresión del ADN de interés a voluntad.
- 🧬 Marcador de selección: Secuencia que codifica un marcador de selección y que asegure mantener el vector en el huésped.
- 🧬 Terminador: Un terminador de la transcripción fuerte para asegurar que la ARN polimerasa se separe y no continúe transcribiendo río abajo los genes.
- 🧬 Sitio múltiple de clonación o “polylinker”: Sitio para inserción del gen heterólogo en una correcta orientación dentro del vector.

Las características que se enlistan en la parte superior correspondientes a los vectores utilizados en este estudio, pueden observarse más a detalle en el **ANEXO**.

Los dos tipos de sistemas generales de expresión son de eucariotas y procariotas, ambos tienen sus ventajas y sus desventajas. El sistema procariota es generalmente más sencillo de manejar, más barato (en cuanto a medios de cultivo y mantenimiento se refiere) y exitoso en la mayoría de los casos. Sin embargo, tienen ciertas limitantes para la producción de proteínas provenientes de eucariotas debido a que no pueden realizar el tipo de modificación post-traduccional que los segundos poseen como: puentes disulfuro, plegamiento adecuado, glicosilación, fosforilación. Sin embargo, el uso de los diferentes sistemas de expresión dependerá del tipo de proteína que se desea obtener (Rai y Padh 2001, Idiris *et al.* 2010).

1.3.1 Bacterias.

Para la expresión de proteínas recombinantes no glicosiladas suele emplearse un sistema basado en *E. coli* el cual ha sido muy empleado a nivel industrial utilizando medios químicamente definidos y medios sintéticos, facilitando así el aislamiento y purificación y por lo tanto, abaratando costos. Sin embargo, algunas desventajas del uso de éste sistema son:

- i) A nivel industrial, el uso de antibióticos para la conservación del plásmido, se traducen en altos costos, así como cuando se emplea el promotor *lac* el cual es inducido por IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido).
- ii) Incapacidad de llevar modificaciones post-traduccionales complejas como N- u O-glicosilación, las cuales son necesarias para la estabilidad y actividad biológica de la proteína heteróloga.
- iii) Producción de proteínas insolubles en forma de cuerpos de inclusión citoplasmática. Estas proteínas pueden ser recuperadas por solubilización en agentes desnaturalizantes seguido de una renaturalización; aunque la lisis celular ocasiona también la liberación de endotoxinas, las cuales deben ser removidas aumentando costos.
- iv) Es necesario tomar en cuenta el uso de codones de la batería para aumentar los rendimientos de la expresión de proteínas heterólogas por este sistema.
- v) *E. coli* posee una pared celular tóxica con pirógenos y por lo tanto los productos deben ser probados antes de ser utilizados.

Por tales motivo, las levaduras y otros sistemas superiores han tomado gran auge como vías para la producción de recombinantes (Jonasson *et al.* 2002, Rai y Padh 2001, Rathore *et al.* 2003, Böer *et al.* 2007).

1.3.2 Levaduras.

Para muchas aplicaciones el uso de levaduras ha sido el favorito para la expresión de proteínas a nivel industrial y de uso médico. Algunas son de uso alimenticio, por lo tanto son muy aceptadas para la producción de proteínas farmacéuticas, lo cual no sucede con las de *E. coli* por lo mencionado anteriormente e incluso con las células de mamíferos dado que pueden contener oncógenos o ADN viral (Friesen y An 1983, Daly y Hearn 2005).

En comparación con las células de mamífero, las levaduras pueden crecer relativamente rápido en medio simple y producir alta densidad celular, además de que en la mayoría de los casos se cuenta con el genoma completo, los plásmidos y la habilidad de secretar la proteína heteróloga al medio de cultivo. *Pichia pastoris* y *S. cerevisiae* son las dos principales exponentes para éste género de sistemas de expresión.

Los vectores de clonación empleados en levaduras generalmente tienen como promotores al gen PGK (3-fosfoglicerato cinasa), ADH1 (alcohol deshidrogenasa 1) AOX1/2 (alcohol oxidasa), fosfatasa ácida y genes del "cluster" GAL (galactosa) (Rai y Padh 2001).

Como se ha mencionado anteriormente las levaduras son capaces de realizar modificaciones postraduccionales, tal como la adición de carbohidratos a las proteínas secretadas, la cual es muy específica dependiendo de cada organismo (Goochee *et al.* 1991).

En el caso de *S. cerevisiae*, se ha demostrado que los oligosacáridos de N-asparagina unidos a la proteína secretada son extremadamente antigénicos cuando se introducen a mamíferos, por lo que, esta levadura ha sido descartada para la producción de proteínas recombinantes para uso terapéutico.

Comparando la invertasa secretada por *S. cerevisiae* y *P. pastoris* se han encontrado diferencias muy notables entre los oligosacáridos unidos a la estructura de la proteína secretada. En ambas especies, el mayor número de cadenas de oligosacáridos son de tipo de alta manosa; sin embargo, el tamaño de oligosacáridos añadidos a las cadenas son menores en las secretadas por *P. pastoris* en comparación con las producidas por *S. cerevisiae* (Tschopp *et al.* 1987).

En un estudio de expresión de invertasa en *P. pastoris*, se encontró un porcentaje elevado de cadenas con un tamaño de $\text{Man}_{8-14}\text{GlcNAc}_2$ (Man=manosa; GlcNAc= N-

acetilglucosamina); mientras que, sólo el 20% de las cadenas de *S. cerevisiae* fueron de ese tamaño (Trimble *et al.* 1991).

Análisis realizados a las proteínas secretadas por *P. pastoris* han determinado que esta levadura adiciona aproximadamente 30 residuos de manosa, los cuales son significativamente más cortos que los 50 a 150 residuos de manosa que se observan típicamente en glicoproteínas expresadas en *S. cerevisiae* (Kukuruzinska *et al.* 1987). Estos tipos de glicosilación se ejemplifican en la **Figura 5**.

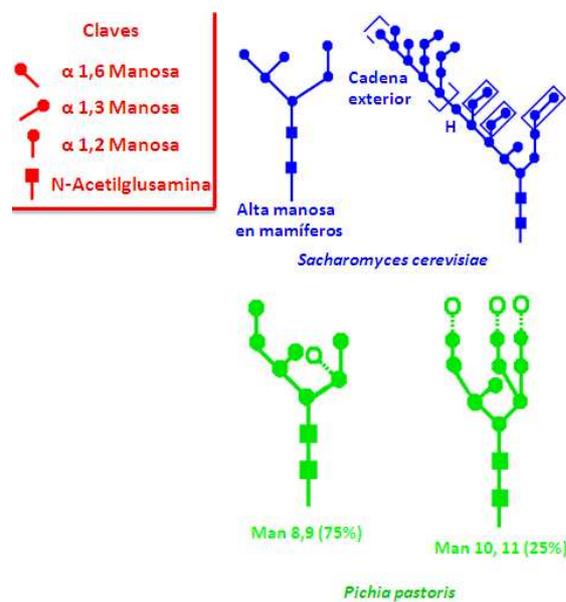


Figura 5. Diferencia entre la estructura de N-oligosacáridos adicionados por *S. cerevisiae* y por *P. pastoris*. Los círculos abiertos con líneas punteadas representan las posiciones más frecuentes observadas en las últimas manosa en *P. pastoris*. El extremo de unión α 1,3 de manosa en *S. cerevisiae* corresponde a los rectángulos rellenos (Cregg *et al.* 1993).

1.3.3 Líneas celulares de mamíferos.

Para la producción de proteínas glicosiladas se emplean cultivos derivados de líneas celulares de mamíferos como la línea celular BHK (Baby Hamster Kidney), HEK293 (Human Embryonic Kidney) y principalmente la línea celular CHO (Chinese Hamster Ovary). Los requerimientos generales básicos de un vector de clonación para células eucariotes son muy similares a los utilizados normalmente para bacterias y levaduras, a continuación se enlistan los requisitos que debe de tener:

- 🧬 Promotor eucarionte generalmente de origen viral
- 🧬 Sitio de clonación múltiple
- 🧬 Secuencia de poliadenilación
- 🧬 Origen de replicación bacteriano
- 🧬 Marcador de selección

A nivel industrial, los genes de selección más utilizados son el gen que codifica a la enzima glutamina sintetasa (GS) y el gen que codifica a la dihidrofolato reductasa (DHFR), que está implicada en el metabolismo de nucleótidos. Por tal motivo, usualmente se adiciona un agente tóxico como el metotrexato (MTX) para la selección de las células resistentes receptoras del gen de selección (Tomas y Smart 2005).

Generalmente las líneas celulares expresan mezclas heterogéneas de proteínas con patrones diferentes de glicosilación (glicoformas), por lo que se ha recurrido a estrategias de ingeniería genética enfocadas a la regulación de rutas de glicosilación. Lo anterior, para modificar el procesamiento postraducciona l de proteínas recombinantes para mejorar su actividad (Hooker y James 2000).

Como se puede observar, el uso de líneas celulares es una herramienta efectiva para la obtención de proteínas cuyo grado de glicosilación deba ser exacto al de la proteína nativa; ya que, de otra forma puede empezar a perder especificidad o producir efectos adversos si son de uso terapéutico. Sin embargo, una desventaja de estos sistemas es que son muy costosos y el cultivo de células lleva mayor tiempo y es un proceso más controlado a diferencia de utilizar sistemas de expresión más sencillos. Es por este motivo que generalmente este tipo de líneas se utiliza principalmente para la obtención de proteínas recombinantes bioterapéuticas, siendo entre el 50 y 60% obtenidas mediante células inmortales de ovario de hámster chino (CHO) (Wurm 2004).

1.3.4 Líneas celulares de insectos.

Los baculovirus son los sistemas más utilizados para la sobreproducción de proteínas recombinantes en eucariontes. Al igual que los organismos superiores, ese sistema es capaz de hacer todas las modificaciones, procesamiento y sistemas de transporte. Las proteínas recombinantes usualmente son expresadas en un compartimiento apropiado de la célula; por ejemplo, las proteínas de membrana, usualmente se localizan en la membrana, las proteínas nucleares en el núcleo y las proteínas secretadas se excretan al medio de cultivo. La mayoría de las proteínas permanecen solubles en las células de insecto.

Estas células no son infecciosas para vertebrados y sus promotores han mostrado ser inactivos en células de mamífero, lo cual confiere cierta ventaja sobre otros sistemas de expresión cuando se expresan oncogenes o proteínas con potencial tóxico.

Otra ventaja es que el proceso se lleva a cabo en un periodo corto de tiempo. Sin embargo, también presenta algunas limitaciones, ya que mientras los baculovirus infecten invertebrados, existe la posibilidad de que el procesamiento de proteínas sea diferente y que provoque algunas modificaciones postraduccionales. Un ejemplo de esto, son los cortes internos proteolíticos en sitios ricos en arginina o lisina.

La capacidad de glicosilación también es una limitante debido a que sólo se producen glicosilaciones de tipo alta manosa y no son capaces de procesar oligosacáridos de tipo complejo que contengan fucosa, galactosa y ácido siálico (Rai & Padh 2001).

1.3.4 Plantas.

Las plantas son utilizadas sobre todo para la producción de proteínas heterólogas de uso terapéutico, aunque la mayoría de estas proteínas se producen mediante líneas celulares de mamíferos o bacterias. Sin embargo, en algunos de los sistemas de expresión mencionados anteriormente, se ha hablado sobre las desventajas relacionadas con costos, manipulación, purificación y modificaciones postraduccionales. Por esta razón, se han desarrollado sistemas de expresión alternativos, los cuales consisten en el desarrollo de plantas y animales transgénicos.

Las plantas transgénicas poseen la ventaja de menor costo de producción y menor capital de inversión en cuanto a infraestructura y con apropiadas modificaciones post-traduccionales. Sin embargo, los sistemas de expresión basados en plantas y animales transgénicos aún no son suficientemente atractivos debido a su bajo nivel de expresión.

Por lo anterior, y debido a que la proteína que deseamos expresar no requiere modificaciones postraduccionales complejas; así como también por la facilidad de manipulación de los cultivos, bajos costos y alta productividad, el sistema de expresión que utilizaremos en este estudio será de tipo microbiano, perteneciente al género de las levaduras. En la **Tabla 4** se resumen las ventajas y desventajas de los diferentes sistemas de expresión (Desai *et al.* 2010).

Tabla 4. Comparación de los sistemas de expresión más utilizados para la producción de proteínas heterólogas (Desai et al. 2010).

Sistema	Costo/Tiempo producción	Capacidad para escalamiento	Nivel expresión	Glicosilación
Bacterias	Bajo/Cortos	Alta	Alto	Ausente
Levaduras	Medio/Medianos	Alta	Bajo-Alto	Alta manosa
Células de insecto	Alto/Medianos	Media	Bajo-Alto	Alta manosa
Células de mamífero	Alto/Largos	Muy baja	Bajo-Moderado	Similar a humanos
Animales transgénicos	Alto/Muy largos	Baja	Moderado-Alto	Similar a humanos
Células de plantas	Bajo/Cortos	Alta	Moderado-Alto	Diferencias menores
Plantas transgénicas	Muy bajo/Largos	Muy alta	Moderado-Alto	Diferencias menores

1.3.5 *Pichia pastoris*.

Entre estos sistemas de expresión basados en levaduras, uno de los más empleados tanto a nivel básico como industrial es la levadura metilotrópica *Pichia pastoris*, reclasificada como *Komagataella pastoris* (Gellissen et al. 1992, Cereghino et al. 2002, Ahmad et al. 2014). Este microorganismo es de fácil mantenimiento y manipulación, rápido en crecimiento, menos caro y proporcionan un buen nivel de expresión, en comparación con otros sistemas de expresión. Es por esto que *P. pastoris* ha muy útil para la expresión de una serie de diferentes tipos de proteínas desde hace más de dos décadas. (Higgins 1995, Balamurugan et al. 2007).

La expresión de la proteína de interés puede ser escalada, produciendo niveles de 10 a 100 veces más en comparación con *E. coli*, es por esta razón que en muchos casos es superior a *S. cerevisiae* como sistema de expresión y por tal motivo desde 1984 se han clonado y expresado más de 1000 proteínas (Damasceno et al. 2012).

Actualmente existe una versatilidad de vectores, promotores, marcadores de selección, tipo de integración y vías de secreción de la proteína heteróloga, lo que se resume en la **Figura 6**.

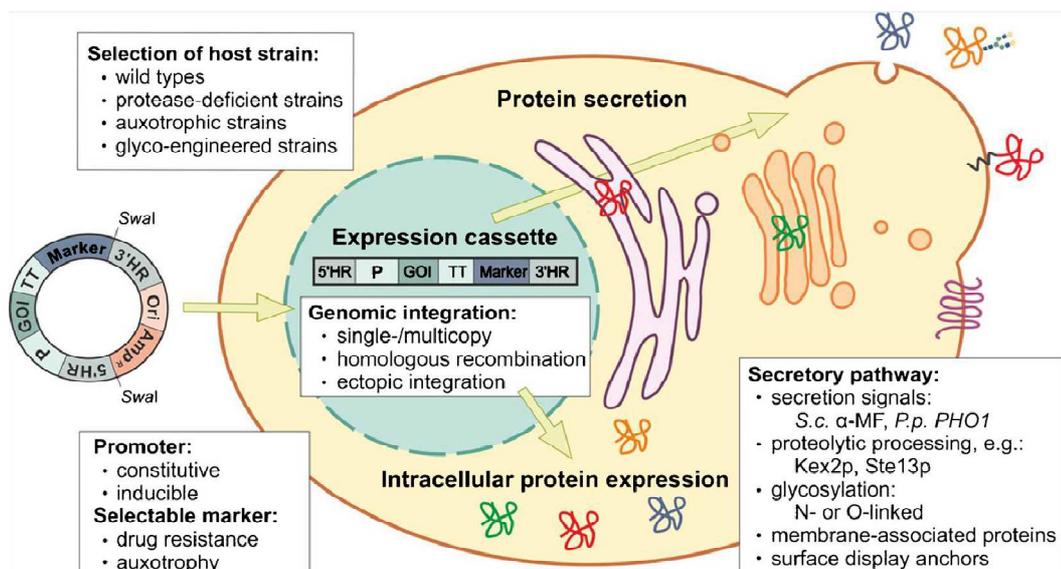


Figura 6. Esquema de las alternativas y consideraciones antes de seleccionar el sistema adecuado de *P. pastoris* para expresión de la proteína heteróloga de interés (Ahmad *et al.* 2014).

1.3.5.1 Metabolismo del metanol.

La ruta metabólica que utiliza esta levadura en presencia de metanol se muestra en la **Figura 7**, en donde el oxígeno molecular no es usado sólo para la respiración, sino también para iniciar la oxidación del metanol al formaldehído. Cabe destacar que se producen dos tóxicos potencialmente peligrosos para el metabolismo, uno es el formaldehído el cual se puede acumular en la célula y provocar un efecto perjudicial cuando la célula se encuentra expuesta a limitación de oxígeno y el otro es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Charoenrat *et al.* 2005).

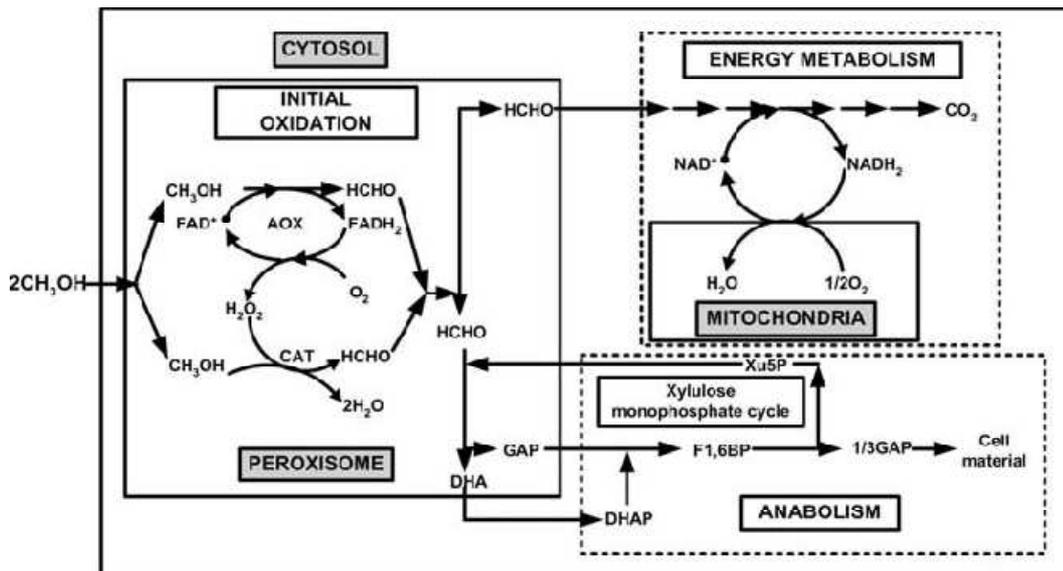


Figura 7. Metabolismo de metanol de *P. pastoris*. AOX (alcohol oxidasa); CAT (catalasa), GAP (gliceraldehído-3-fosfato); DHA (dihidroxiacetona); DHAP (dihidroxiacetona fosfato); F1,6BP (fructosa-1,6-bifosfato); Xu5P (xilulosa-5-fosfato) (Charoenrat *et al.* 2005).

Un factor importante a considerar es que aunque esta levadura puede asimilar el metanol, no puede tolerar grandes concentraciones, siendo ésta de aproximadamente 10 g L^{-1} y una inhibición total a 30 g L^{-1} de éste (Charoenrat *et al.* 2005), debido a la acumulación de formaldehído y peróxido de hidrógeno dentro de la célula, los cuales, como ya se mencionó son tóxicos para la célula (Cregg & Madden, 1988). Por tanto, se requieren de estrategias para la adición de metanol, la cual se realiza con base en la tasa específica de crecimiento (Zhang *et al.* 2000, Daly & Hearn 2005).

Adicionalmente, otra limitante de este sistema es que el metanol es potencialmente peligroso debido a que es altamente inflamable y no puede ser ocupado para la producción en la industria alimentaria.

1.3.5.2 Promotor AOX y GAP.

Un sistema muy eficiente para la expresión de genes heterólogos en *P. pastoris* fue encontrado por Cregg *et al.* (1987) cuando realizaron la expresión de una β -galactosidasa la cual se encontraba regulada por el promotor del gen alcohol oxidasa (EC 1. 1.3.B AOX). La AOX es la primera enzima que participa en el metabolismo de conversión de metanol a formaldehído (**Figura 7**), siendo inducida en presencia de dicho alcohol. Dada la importancia de este gen, cuando *P. pastoris* es crecida con metanol, AOX representa el 30% del total de proteínas en la célula. (Couderc y Baratti, 1980, Rodriguez *et al.* 1996).

Existen dos tipos de genes AOX en *P. pastoris*: AOX1 y AOX2, cada uno con su propio promotor, genes estructurales y terminadores en sus cromosomas. Los genes estructurales tiene alta homología entre ellos y cada uno codifica a las AOX teniendo actividades específicas similares. Sin embargo, éstos tiene notables diferencias de actividades transcripcionales (promotor AOX1 > promotor AOX2) y por tanto, se produce mayormente el gen AOX1.

Una cepa que contiene el gen que codifica la proteína heteróloga de interés insertado río abajo (“downstream”) del lugar estructural del gen del promotor AOX1, el cual tiene una alta actividad promotora, tenderá a presentar una mayor eficiencia de transcripción.

Es importante destacar que la enzima AOX1 tiene poca afinidad por oxígeno, por lo que *P. pastoris* compensa esto regulando positivamente el promotor AOX1 para dirigir la expresión del gen AOX1 y producir grandes cantidades de esta enzima (Daly y Hearn 2005).

Aún más, se ha encontrado que los promotores AOX están sujetos a represión catabólica causada por glucosa en el medio. Esto es, la actividad de transcripción de los promotores AOX es reprimida en presencia de glucosa en el medio, resultando una falla de la expresión en el gen AOX y en el gen de la proteína heteróloga, la cual está bajo el control de los promotores mencionados anteriormente.

Aunque la cepa sintetiza su proteína constitutiva y puede crecer con glucosa como fuente de carbono, no produce AOX ni la proteína heteróloga. En ese caso, no es sino hasta que la glucosa se ha consumido completamente que los promotores AOX empiezan a actuar y producen AOX y la proteína heteróloga (Okabayashi *et al.* 1997).

Por otro lado, *P. pastoris* carece de promotores moderados para la expresión, por lo que altos niveles de los promotores AOX1, FLD1 (formaldehído deshidrogenasa) y GAP (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) son perjudiciales en algunos casos y pueden disminuir la maquinaria de la manipulación de proteínas, provocando mal plegamiento o procesamiento incorrecto de una porción de la proteína (Balamuruga *et al.* 2007). Es por ese motivo que la expresión de proteínas en *P. pastoris* dependerá de las mejores condiciones de medio de cultivo, pH, oxígeno disuelto, entre otros, factores que serán diferentes dependiendo de la cepa utilizada o el gen que se desee expresar (Sanches Peres *et al.* 2010).

Una alternativa a este promotor es el uso del promotor constitutivo GAP aislado del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *P. pastoris*, el cual puede usar glucosa, glicerol, ácido oléico y metanol como fuentes de carbono, obteniendo en la mayoría de los casos mayores niveles de expresión al utilizar glucosa (Daly y Hearn 2005).

La ventaja del uso de este promotor es que al ser constitutivo no requiere un cambio de fuente de carbono para realizar la inducción de la proteína de interés, sin embargo esta opción no es viable si la proteína a expresar es tóxica para *P. pastoris* (Li *et al.* 2007).

Algunos autores refiere que el uso de este promotor es más eficiente que al emplear el promotor AOX1 (Zhang *et al.* 2009), sin embargo en ocasiones no ha sido la mejor selección, esto dependerá del tipo de proteína que se desee expresar, así como el método de producción de las mismas.

1.3.5.3 Método de expresión de proteínas heterólogas.

Usualmente para la producción de proteínas heterólogas por fermentación, se ha seguido la estrategia de dos etapas: una de alta densidad celular (HCD) y una segunda de inducción con metanol. En la primera etapa se utilizan medios salinos definidos con una fuente de carbono no fermentable como el glicerol, sorbitol y manitol. Una vez que se agote el glicerol, la segunda fase inicia con adición de metanol, lo cual induce la producción de la proteína.

Algunos autores incluyen una tercera etapa (fase de transición), la cual corresponde a una fase de crecimiento y fase de producción. En esta tercera etapa, el cultivo es alimentado con glicerol en una tasa limitante que depende del crecimiento de *P.pastoris*. En la **Figura 8** se esquematizan las tres fases de alimentación de fuente de carbono, y el efecto que tiene sobre el crecimiento de *P. pastoris* y sobre la expresión de AOX.

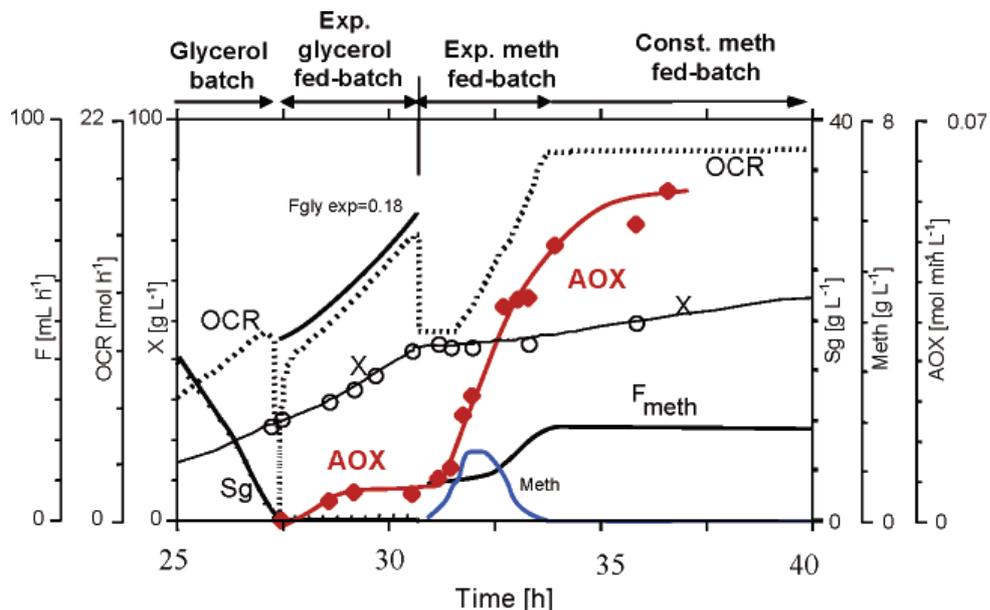


Figura 8. Etapas de crecimiento de *P. pastoris* e inducción para la producción de proteínas heterólogas por alimentación mixta de glicerol-metanol. Inicio de etapa de alimentación de metanol limitado (MLFB). Concentración de biomasa (línea sólida, círculos abiertos, x) Concentración de glicerol (Línea sólida, Sg), actividad de alcohol oxidasa (línea sólida, diamantes rellenos, AOX), tasa de consumo de oxígeno (línea punteada, OCR), tasa de alimentación de glicerol (línea sólida Fgly); tasa de alimentación de metanol (línea sólida, Fmeth) (Jahic *et al.* 2006).

Se ha reportado que la adición de una fase de transición reduce el tiempo total de inducción a 15 h en el caso de las mutantes Mut⁺, las cuales son muy sensibles a metanol (Chiruvolu *et al.* 1999, Inan *et al.* 1999).

Existen tres fenotipos diferentes en cuanto a la utilización de metanol se refiere en *P. pastoris*: Mut⁺, Mut^S y Mut⁻. La inserción de un cassette de expresión en el locus del promotor AOX1 genera cepas Mut⁺ (“methanol utilization plus”), un fenotipo que no se puede distinguir del tipo silvestre. Cuando el cassette de expresión es insertado fuera del locus AOX se genera un fenotipo Mut^S (“methanol utilization slow”). Otra forma de obtener dicho fenotipo es por interrupción del gen AOX1 por inserción del gen. Por último, la cepa Mut⁻ (“methanol utilization negative”) se produce cuando hay una interrupción de los genes AOX1 y AOX2.

La inducción de expresión de proteínas por el promotor AOX1 es controlada por crecimiento de células en metanol como única fuente de carbono y energía para Mut⁺ y Mut^S. Sin embargo, la ventaja de utilizar Mut⁻ es la reducción del uso de metanol (Innan y Meagher 2001).

Por otro lado, cabe mencionar que existen diferentes grupos de cepas de *P. pastoris*, las cuales son seleccionadas dependiendo del estudio que se desea realizar. Estas cepas se pueden dividir en: i) cepas silvestres (X-33, Y-11430), ii) mutantes auxotróficas deficientes en histidinol deshidrogenasa (GS115), iii) mutantes deficientes en el gen involucrado en utilización de metanol (KM71, MC 100-3) y iv) cepas deficientes en proteasas (SMD1163M SMD1165, SMD1168) (Jahic *et al.* 2006).

En la **Tabla 5** se resumen algunos trabajos sobre expresión de diferentes proteínas recombinantes y las condiciones bajo las cuales consiguieron la proteína, así como las diferentes cepas de *P. pastoris* que se emplearon reguladas por el promotor AOX1.

Tabla 5. Resumen de algunos trabajos utilizando *P. pastoris* para la expresión de proteínas heterólogas reguladas por el promotor AOX1.

Cepa	Proteína estudiada	Resultados	Vector	Condición operación	Medio de cultivo	Referencia
GS115 (his ⁻)	Péptido anticoagulante (rAcAP-5) (3)	Efecto de glicerol sobre actividad específica pH afecta producción y actividad 11.5 mg g ⁻¹ peso seco	pYAM7SP8	200 rpm 30°C	MGY YNB con 2% glicerol	Inan <i>et al.</i> 1999
GS115 His ⁺ Mut ^S	Anticuerpo de cadena sencilla Fv (A33scFv)	4 g L ⁻¹ rendimiento a valores de pH bajos	pPIC9K	200 rpm 30°C 1000 rpm 25°C	BMG BMS- PTM1	Damasceno <i>et al.</i> 2004
X-33	β-galactosidasa	Alanina, sorbitol, manitol y trealosa pueden ser utilizados por <i>P. pastoris</i> como única fuente de C y energía.	pSAOH5	250 rpm 30°C	BMG BMS- PTM4	Inan <i>et al.</i> 2004
Y-11430	β-glucosidasa	A mayor aereación, aumenta tasa de consumo de metanol La limitación de oxígeno no afectó la acumulación de la enzima	pPICZα B	200 rpm 30°C	YPD BMGY GBS- PTM1	Charoenrat <i>et al.</i> 2005
GS115 (his ⁻)	Caseínomacro-péptido humano	Con reactor de lote alimentado: 2.5 gL ⁻¹	pGAPZαA pPICZαA		YPD YPG	Kim <i>et al.</i> 2005
X-33	Anticuerpo ScFv contra <i>H. pylori</i>	50 μg mL ⁻¹ de proteína recombinante a las 72	pPICZ	250 rpm 30 °C	BMGY BMMY	Alonso-Ochoa <i>et al.</i> 2007
GS115 (his4)	Gen precursor de la síntesis de insulina (ILP)	En 16L fermentador, 3.6 g/L.	pPIC9Ky pPIC9	250 rpm 30°C	PTM1- BMS MGY PTM1- BMS	Xie <i>et al.</i> 2008
GS115	Factor de crecimiento vascular endotelial (rrVEGF-164)	Producción de 124 mg L ⁻¹ <i>P. pastoris</i> bueno para producir proteínas diméricas o multiméricas	pPIC9	200 rpm 30°C	BMGY BMMY BSM- PTM1	Geutjes <i>et al.</i> 2010

Por último cabe destacar que a pesar de que este sistema cuenta incluso con vectores comerciales, debido a la gran eficiencia que esta levadura es capaz de realizar en la producción de proteínas heterólogas, no todos los autores han conseguido expresar adecuadamente las proteínas de interés, por lo tanto antes de expresar la proteína en *P. pastoris* es necesario considerar lo siguiente (Burrowes *et al.* 2005, Bazan *et al.* 2009).

- ✍ Optimización de uso de codones.
- ✍ Si se trabaja con un vector de integración, este debe linealizarse antes de la transfección.
- ✍ Hacer un análisis *in silico* respecto a posibles sitios proteolíticos por enzimas de *P. pastoris*.
- ✍ Revisar que *P. pastoris* tenga el sistema apropiado de plegamiento para la proteína de interés.
- ✍ En ocasiones *P. pastoris* tiene limitación para expresar péptidos bioactivos pequeños (~ 10 kDa).

Higgins (1995) describe algunas estrategias que se pueden seguir para determinar posibles problemas en la expresión de proteínas por *P.pastoris*, lo cual se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Guía de posibles causas de problemas al expresar proteínas heterólogas en *P. pastoris* y posibles soluciones (Higgins 1995).

Posible causa del problema	Solución
No se encuentra presente el cassette de expresión	Demostrar que la clona contenga el gen de interés por PCR o Southern blot
No se transcribe el gen	Realizar RT-PCR o northern blot Revisar si el gen tiene regiones ricas en AT que pueden estar ocasionando terminación temprana dentro de la región codificante del gen expresado.
No hay traducción del ARNm	Revisar estructura secundaria buscando posibles regiones 5'UTR en el ARNm
Proteína inestable	Utilizar cepas deficientes en proteasas para prevenir proteólisis Cambiar el medio o el pH del medio a el óptimo de la proteína
Problemas de secreción: Incompleta, retenida en vía de secreción, procesamiento inapropiado, modificaciones inadecuadas	Revisar proteína en el paquete celular Determinar peso molecular aparente de la proteína
Baja expresión	Aumentar el número de copias del gen de interés o aumentar escala de fermentación
Proteína deletada por las células	Revisar tiempos tempranos en la fermentación

1.3.5.4 Modificaciones post-traduccionales. Glicosilación.

Como se ha mencionado anteriormente, los sistemas de expresión eucarióticos son capaces de llevar a cabo diferentes modificaciones una vez que la proteína terminó de traducirse.

Uno de los más estudiados es la adición de grupos glicosilo a la proteína naciente, este tipo de modificación es la más utilizada en las células eucariotas y se lleva a cabo en el Retículo endoplásmico y/o en el Aparato de Golgi antes de la secreción o en la superficie celular.

La glicosilación puede influir en la secreción, solubilidad, estabilidad e incluso en la producción de anticuerpos, siendo un factor alérgeno en algunas ocasiones.

Existen una serie de estructuras de oligosacáridos, sin embargo las más estudiadas o usuales son:

- i) N-glicosilación. Oligosacáridos que se unen al grupo amino de residuos de asparagina dentro de la secuencia Asn-X-Ser/Thr (X puede ser cualquier aminoácido, excepto Prolina).
- ii) O-glicosilación. Monosacáridos de manosa, que se unen a serina o treonina, los cuales se van elongando en residuos de α -1,2-manosa y al final estos se cubren de residuos β - o fosfo- manosas unidos a residuos de Serina o Treonina.
- iii) Residuos de manosa y glucosamina. Residuos de oligosacáridos que se incorporan a anclas GPI (glicosilfosfatidilinositol).

P. pastoris es capaz de realizar las dos primeras modificaciones descritas anteriormente, adicionando de 8 a 14 residuos de manosa por cadena, siendo estos mucho menores a los que adiciona *S. cerevisiae* (50-150 residuos de manosa) y que en ocasiones resulta una ventaja, adicionalmente el núcleo de los oligosacáridos tiene una unión terminal de

los glicanos tipo α -1,3, el cual es el hiper-antígeno natural haciendo las proteínas incapaces de ser utilizadas para fines terapéuticos.

Aún más, actualmente se ha desarrollado una glico-ingeniería en esta levadura usando una tecnología denominada como GlycoSwitch®, la cual permite la producción de biofármacos con características de N-glicosilación más parecidas a las del ser humano (Higgins 1995, Flickinger y Drew 1999, Balamurugan *et al.* 2007, Ahmad *et al.* 2014).

1.4 Purificación de proteínas.

Una vez que se realizaron las etapas de selección de las transformantes de *P. pastoris* que expresan la proteína de interés, en ocasiones el objetivo final es tener una proteína altamente purificada, por lo que se tienen que considerar los métodos de purificación.

La purificación se lleva a cabo con el fin de remover los restos celulares y medio de cultivo del producto final, que es la proteína de interés, tomando en cuenta que hay proteínas que pueden ser sensibles a cambios de pH y/o concentración de sales.

De acuerdo al manual de Purificación de Proteínas (Amersham Pharmacia Biotech 1999), es necesario considerar ciertas preguntas antes de empezar a purificar una proteína:

- 👉 ¿Cuál es el uso que se le dará a la proteína?
- 👉 ¿Con qué material se cuenta y cómo se debe de manejar?
- 👉 ¿Qué es lo que debemos de remover?
- 👉 ¿Qué se debe de remover completamente?
- 👉 ¿Cuál es la escala de la purificación? ¿Cómo afecta?

Generalmente son necesarios más de un paso de purificación y por cada una de estas etapas se pierde cierta cantidad de proteína, por lo tanto es deseable que las etapas sean sencillas y en la menor cantidad posible. Por lo anterior, se considera que cuatro

fases bien elegidas y optimizadas son suficientes, aunque también es posible repetir algún paso.

Generalmente se pueden seguir tres etapas globales:

- i) Fase de retención de la proteína: La muestra se debe de aislar, concentrar y estabilizar.
- ii) Fase de purificación intermedia: Tiene como objetivo remover la mayor cantidad posible de impurezas, como otras proteínas, ácidos nucleicos, endotoxinas y virus.
- iii) Fase de “pulido”: El objetivo es conseguir la mayor purificación posible removiendo lo que pudo haber quedado de la fase anterior.

Durante el proceso de purificación es necesario realizar una tabla de purificación en donde se resuman los pasos que se están llevando a cabo y tomar en cuenta conceptos como pureza, rendimiento y nivel de concentración.

La **pureza** se puede medir con la actividad específica ($U\ mg\ proteína^{-1}$). La división entre la actividad específica final e inicial, en el extracto crudo, se denomina factor de purificación.

El **rendimiento** se refiere al porcentaje de proteína en la etapa de purificación respectiva comparada con la cantidad de la misma contenida en el extracto crudo, después de ser homogeneizada. Este parámetro también puede ser determinado con la actividad enzimática.

Los **niveles de concentración** son importantes debido a que la complejidad, duración y costos de proceso son directamente proporcionales a la diferencia entre la concentración inicial y final de la proteína obtenida (Amersham Pharmacia Biotech 1999, Flickinger y Drew 1999, Bommarius y Riebel 2004).

1.5 Inmovilización de enzimas.

La inmovilización de enzimas para aplicación industrial surgió en 1972, utilizando la D-glucosa isomerasa para la producción fructosa a partir de jarabes de maíz (Muzzarelli 1980). La inmovilización de enzimas se define como la preparación de un derivado biocatalítico insoluble en agua e involucra la unión de una enzima con un soporte sólido (Kumari y Kayastha 2011). La definición clásica se refiere al confinamiento físico de una enzima en una determinada región del espacio de manera que su actividad catalítica se retenga y pueda ser reutilizado.

La inmovilización de enzimas ha sido adoptada por la ingeniería de proteínas, la cual es una rama que ha tomado mucho auge sobre todo para la aplicación en la industria biotecnológica, biomedicina y en química analítica. Existen diversas formas de mejorar las características de las enzimas, una de ellas es la inmovilización de enzimas, la cual, si se realiza adecuadamente puede conferirle estabilidad, reducción de inhibición, selectividad, aumentar la actividad específica, pero sobre todo la reutilización de la misma.

Con esto es posible disminuir costos en el proceso y abre la puerta a la posibilidad de diseñar reactores enzimáticos para facilitar el manejo y control, lo cual sería el objetivo mayor de la inmovilización (Mateo *et al.* 2006).

Algunas otras ventajas de la inmovilización de enzimas en comparación con la utilización de enzimas libres se enlistan a continuación:

-  Se puede recuperar la enzima inmovilizada y la separación de ella de su(s) sustrato(s) y su(s) producto(s).
-  Se puede trabajar bajo una operación continua.
-  Se favorece la resistencia a cambios en el ambiente.
-  Se puede presentar una terminación rápida de la reacción.

Sin embargo, pese a todo lo anterior, también tiene diversas desventajas, entre ellas se encuentran:

- ✍ La enzima debe ser muy estable para soportar el proceso de inmovilización, de lo contrario perderá su actividad.
- ✍ Se pueden presentar cambios conformacionales con respecto al estado nativo de la enzima.
- ✍ Los soportes pueden ser costosos o en ocasiones ser tóxicos para aplicación.
- ✍ Se pueden presentar problemas de transferencia de materia en la matriz (Krajewska 2004, Gomez *et al.* 2006, Mateo *et al.* 2006, Kumari y Kayastha 2011).

Existen diversos métodos de inmovilización, los cuales se pueden clasificar en (i) físicos, los cuales poseen interacción débil entre el soporte–enzima y (ii) químicos donde se forman enlaces covalentes con la enzima.

Entre los **métodos físicos** se tienen los siguientes tipos de inmovilización:

- ✍ Contener la enzima dentro de una membrana.
- ✍ Absorción, física o iónica, en una matriz insoluble en agua.
- ✍ Inclusión por atrapamiento en gel.
- ✍ Microencapsulación utilizando una membrana sólida.
- ✍ Microencapsulación utilizando una membrana líquida.
- ✍ Formación de una película enzimática Langmuir-Blodgett.

Los **métodos químicos** incluyen técnicas como:

- ✍ Unión covalente a una matriz insoluble en agua.
- ✍ Entrecruzamiento utilizando un reactivo multifuncional de bajo peso molecular.
- ✍ Co-entrecruzamiento utilizando otra sustancia neutra, por ejemplo, otras proteínas.

Además de los métodos enlistados arriba también pueden llevarse a cabo combinaciones de los anteriores, generalmente los métodos físicos son más baratos además de ser reversibles. Esto puede ser una desventaja porque en ocasiones la enzima puede desprenderse de la matriz involuntariamente, aunque también existe la ventaja de que las propiedades de la enzima, así como su configuración no se ve afectada (Arrollo 1998, Kotwal y Shankar 2009).

Los métodos químicos generalmente son más costosos, pero la unión entre la enzima-soporte es más estable; sin embargo, en ocasiones esto puede ser una desventaja debido a que la enzima puede presentar un cambio conformacional, modificando la actividad y características del biocatalizador. Aunado a esto, es necesario tomar en cuenta que el sistema no sea muy rígido, esto se refiere a una unión multipuntual de la enzima con el soporte (**Figura 9**), lo cual puede afectar la estructura de la enzima. La estrategia en este caso es colocar un brazo espaciador entre el soporte y la enzima para que esta unión sea monopuntual y la inmovilización le permita tener su configuración sin alterar. Esto ocurre con el método de inmovilización con Nylon 6 tal como se muestra en la **Figura 9**.

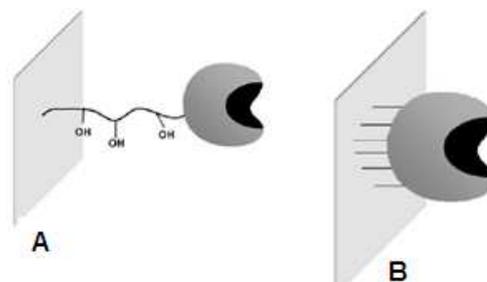


Figura 9. Efecto del tipo de unión sobre la inmovilización de enzimas. (A) Enzima inmovilizada de forma monopuntual (no rígida). (B) Enzima inmovilizada de forma multipuntual (rígida) (Mateo *et al.* 2007).

Ningún método o soporte es 100% aplicable a todos los biocatalizadores con los mismos resultados, lo cual no quiere decir que la inmovilización no sea un método robusto, al menos para la misma enzima. Esto se debe a que existe una variedad de características químicas y composición de las enzimas, además de diferentes propiedades de los sustratos y los productos y las aplicaciones para las cuales se quiere llevar a cabo este confinamiento. Aunado a esto, todos los métodos presentan desventajas y ventajas.

Por lo tanto, la regla para optimizar las condiciones de inmovilización y su aplicación es un proceso empírico de prueba y error, de tal manera que se garantice una máxima retención posible de la actividad, su estabilidad operacional y su durabilidad.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios de invertasas heterólogas expresadas en *P. pastoris* mediante el uso del promotor AOX1.

Como se ha mencionado anteriormente, el promotor AOX1 fue de los primeros sistemas utilizados para la producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*. En la **Tabla 7** se resumen algunos trabajos similares a los realizados en éste proyecto utilizando el promotor de la alcohol deshidrogenasa para la expresión de invertasas de diferentes organismos.

Algo que es importante destacar en estos estudios es que la mayoría de las invertasas recombinantes reportadas producidas por *P. pastoris* se encuentran glicosiladas, modificación post-traducciona importante ya discutida anteriormente y que se ha visto por diversos autores puede modificar las propiedades funcionales.

Tabla 7. Trabajos de invertasas expresadas en *P. pastoris* mediante el control del promotor inducible alcohol deshidrogenasa (AOX1).

Organismo Enzima	Vector	PM (kDa)	K_M (mM)	pH/Temp óptima (°C)	Iones Activ/ Inhib	AE (U/mg)	Referencia
<i>S. cerevisiae</i> SUC2	pYJ30, pTSU1, pSR1	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Sreekrishna <i>et al.</i> 1987
<i>S. cerevisiae</i> SUC2	pGS102	85-90 (G)	Nd	Nd	Nd	3000	Tschopp <i>et al.</i> 1987
<i>S. cerevisiae</i> SUC2	pGS102	85 (G)	Nd	Nd	Nd	~ 4000	Trimble <i>et al.</i> 1991
<i>S. cerevisiae</i> SUC2	Nd	85 (G)	Nd	6.0, 55	Nd	3400	Acosta <i>et al.</i> 2000
<i>O. sativa L.</i> Os β fruct3	pPICZ α A	67	Nd	4.5, 30	Nd	Nd	Fu <i>et al.</i> 2003
<i>I. batatas L</i> Ib β fruct1	pPICZ α B	72 (G)	10.7	5.0, 40	Nd	1.08	Huang <i>et al.</i> 2003
<i>B. vulgaris L.</i> 6-FEH	pPICZ α A	75	77	5.0, 30	Nd	12.5	Van den Ende <i>et al.</i> 2003
<i>A. thaliana</i> AtcwINV1	pPICZ α A-B	Nd	< 1	Nd	Nd	Nd	De Coninck <i>et al.</i> 2005
<i>H. vulgare L.</i> HvINV1	pPICZ α A	61.1	14	40	Nd	Nd	Nagaraj <i>et al.</i> 2005
<i>I. batatas L</i> Ib β fruct2 Ib β fruct3	pPICZ α C	82 (G) 87 (G)	4.97 10.1	5.0 5.0	Nd	553 70	Wang <i>et al.</i> 2005
<i>B. oldhamii</i> Bo β fruct2 Bo β fruct3	pPICZ α B	77 (G) 77 (G)	0.42 22.9	3.0, 60 4.0, 50	Ca ²⁺ Co ²⁺ Hg ²⁺ N/ Hg ²⁺	884.3 1694.5	Hsieh <i>et al.</i> 2006
<i>O. sativa L.</i> OsVIN1 OsVIN2	pPICZ α A AOX1	75 (G) 75 (G)	22.6 13.2	Nd	Nd	Nd	Ji <i>et al.</i> 2007
<i>A. cepa</i> GFT-INV INV	pPICZ α C	Nd	16	Nd	Nd	45 4.3	Ritsema <i>et al.</i> 2006
<i>U. fabae</i> INV1p	pPIC9	84	27.1	4.6, 40	N/ Cu ²⁺	Nd	Voegelé <i>et al.</i> 2006
<i>P. trichocarpa</i> PaxgINV1 PaxgINV2	pPIC9K	Nd	1.7 1.6	4.8, 45 5.6, 40	N/ Cu ²⁺ Zn ²⁺ Hg ²⁺ N/N	Nd	Canam <i>et al.</i> 2008
<i>A. thaliana</i> AtcwINV1	No mostrado	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Lammens <i>et al.</i> 2008
<i>A. cepa</i> acINV w440Y	pPICZ α C	Nd	5.8 8.8	Nd	Nd	Nd	Altenbach <i>et al.</i> 2009
<i>A. thaliana</i> AtcwINV1 W159F W159L E316Q C317A	pPICZ α C	Nd	53.7 213 142 140	5.0 5.0 5.0 5.0	Nd	109.7 512.3 12.8 73.9 271.7	Chen <i>et al.</i> 2009
<i>A. tequila</i> AtqCwinv-1	pPICZ α A	64.2	Nd	Nd	Nd	Nd	Cortés- Romero <i>et al.</i> 2012

Las diferentes abreviaturas en la tabla corresponden a: PM: Peso molecular, (g): Glicosilada, N: Ninguno, Nd: No determinado, Ne: No hay efecto, Activ: Activador y Inhib: Inhibidor, AE: Actividad específica.

2.2 Inmovilización de invertasas por otros grupos de trabajo.

Diversos autores han conseguido inmovilización de invertasas de diferentes fuentes, utilizando una serie de métodos, para mayor información consultar artículo de Kotwal y Shankar 2009, algunos trabajos que se han hecho utilizando los métodos de unión covalente y entrecruzamiento son los que se resumen en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Trabajos realizados de inmovilización de invertasa por método de unión covalente y entrecruzamiento.

Tipo de inmovili.	Material	Resultados	Referencia
Unión covalente	Silica gel amino-químicamente modificada	Alta capacidad de inmovilización No pérdida de actividad catalítica Disminución pH óptimo Disminución de K_M	David <i>et al.</i> 2006
	Cuentas de poliestireno con copolímeros de Phe y Lys	pH y temperatura constantes Disminución de K_M Disminución de V_{max} Rendimiento máximo de 24%	Mutlu <i>et al.</i> 1996
Entrecruzamiento o Atrapamiento	Polimetil metacrilato co-polimetil tienil metracrialato	Incremento de pH óptimo Disminución de temperatura óptima Disminución de K_M Disminución de V_{max}	Yildiz <i>et al.</i> 2005
	Alginato de sodio	pH constante Mayor estabilidad térmica Disminución de K_M Disminución de V_{max}	Arruda y Vitolo, 1999

2.3. Estudios relacionados con INVA e INVB de *Z. mobilis*.

Las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* han sido considerablemente estudiadas. La invertasa INVA ha sido clonada en *E. coli* por Gunasekaran *et al.* (1990), Yanase *et al.* (1991), Aït- Abdelkader *et al.* (2000) y Calixto-Romo *et al.* (2008); secuenciada por Yanase *et al.* (1991); purificada y caracterizada por Yanase *et al.* (1991, 1995), Aït- Abdelkader *et al.* (2000) y Calixto-Romo *et al.* (2008) e inmovilizada en Nylon-6 y Avicel por Calixto-Romo *et al.* (2008) una vez que se expresó en *E. coli*.

La invertasa extracelular, INVB fue caracterizada y purificada por primera vez por Preziosi *et al.* (1990) y O'Mullan *et al.* (1992). Posteriormente fue clonada en *E. coli*, caracterizada y secuenciada por Gunasekaran *et al.* (1995), Kannan *et al.* (1995), Kyono *et al.* (1995) y Yanase *et al.* (1995). Los estudios más recientes han sido de expresión, producción por Yanase *et al.* (1998), Vásquez-Bahena *et al.* (2006), Santiago-Hernández *et al.* (2006) y Vallejo-Becerra *et al.* (2008) e inmovilización en Avicel realizada por Santiago-Hernández *et al.* (2006) y en Nylon-6 por Vallejo-Becerra *et al.* (2008) utilizando *E. coli* como sistema de expresión en todos los casos.

2.4 Antecedentes del grupo de trabajo.

2.4.1 Expresión de INVA e INVB.

El estudio de invertasas recombinantes obtenidas a partir de los genes *invA* (invertasa intracelular) e *invB* (invertasa extracelular) de *Z. mobilis* dentro del grupo de trabajo ha sido diversas, entre las cuales se han seguido diversas estrategias en cuanto al uso de diversos promotores así como una serie de microorganismos para llevar a cabo la expresión de éstas proteínas, dichos trabajos se encuentran resumidos en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Trabajos de expresión de las invertasas de *Z. mobilis* utilizando diferentes estrategias en el uso de promotores y sistemas de expresión.

Estudio	Promotor	Sistema expresión	Resultados	Referencias
Purificación e inmovilización de INVA en celulosa	T7	<i>E. coli</i>	Purificación e inmovilización en una sola etapa ↓ 36 veces V_{max} ↓ 3 veces K_M	Calixto-Romo (2004)
Purificación y cristalización de INVB	T7 T5	<i>E. coli</i>	40% enzima soluble 60% enzima en cuerpos inclusión	Vásquez (2007)
Expresión de INVB	Lac4	<i>K. lactis</i>	↓ 4 veces K_M ↑ 5 veces V_{max}	Leyva –Castillo (2007)
Expresión de INVA e INVB	GAP	<i>P. pastoris</i>	↑ 11 veces V_{max} INVA e INVB ↑ Temperatura óptima de 10 y 15 °C INVA e INVB, respectivamente	Calixto-Romo (2009)

Conforme lo que se muestra en la **Tabla 9**, el uso de *E. coli* como sistema heterólogo de expresión de ambas invertasas implica una pérdida de las propiedades catalíticas, parámetro que se ve reflejado en la K_M y V_{max} , así como el inconveniente ya mencionado anteriormente el cual son los cuerpos de inclusión generados por esta bacteria.

2.4.2 Inmovilización de INVA e INVB.

Por otro lado, en los estudios de inmovilización de las invertasas, tanto intracelular como extracelular, se han empleado los soportes Avicel y Nylon-6, utilizando en ellos métodos químicos de inmovilización. En la **Tabla 10** se resumen los resultados más importantes y el tipo de soporte utilizado para estos análisis.

Tabla 10. Estudios realizados por el grupo de trabajo referentes a la inmovilización INVA e INVB proveniente de *Z. mobilis* utilizando diferentes métodos de inmovilización.

Enzima	Sistema expresión	Soporte	K_M (mM)	V_{max} ($\mu\text{mol}/\mu\text{g mL}$)	pH/T. óptimo	Referencia
INVA-CBD	<i>E. coli</i>	Avicel	↓ 3 veces	↓ 36 veces	Sin cambio	Calixto-Romo 2004, 2008
INVA	<i>E. coli</i>	Nylon 6	↑ 2 veces	↑ 6 veces	Sin cambio	
INVB-CBD	<i>E. coli</i>	Avicel	↓ 2 veces	↓ 3 veces	↓ 10°C	Santiago-Hernández et al. 2006
INVB	<i>E. coli</i>	Nylon 6	↓ 1 vez	↑ 10 veces	↓ 5°C	Vallejo-Becerra et al. 2008

En la **tabla 10** se observa que al emplear Avicel como soporte, tanto para la INVA como para INVB hay una disminución de la velocidad máxima de la enzima inmovilizada, no siendo así empleando Nylon-6. Sin embargo, en los estudios realizados por

Calixto-Romo *et al.* (2008), se ven efectos negativos al inmovilizar INVA expresada por *E. coli* e inmovilizada en Nylon 6.

3. JUSTIFICACIÓN

Entre las enzimas más utilizadas como modelo para otros estudios o en la industria de bioproductos se encuentra la invertasa (β -D-fructofuranosidasas EC 3.2.1.26). Se trata de un biocatalizador capaz de producir una mezcla equimolar de azúcares no cristalizables (glucosa y fructosa), y en algunos casos con actividad de polimerización (transfructosilación).

La invertasa más estudiada y que se utiliza comercialmente proviene de la levadura *S. cerevisiae*, teniendo la característica de ser extracelular, termoestable, tolerante a concentraciones de sacarosa de 150 mM y presentando alto grado de glicosilación. A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente, la invertasa de *S. cerevisiae* no puede ser utilizada en procesos industriales con temperaturas mayores a 75 °C.

Teniendo en cuenta estos inconvenientes, existe una brecha que abre la posibilidad de ofrecer al mercado biocatalizadores diferentes que puedan ser atractivos para su uso en la industria alimenticia, principalmente. Tal es el caso de las invertasas que produce *Z. mobilis*, bacteria que le han dado el uso principal de producir bioetanol, dados sus rendimientos de casi 1.9 moles de etanol por mol de glucosa.

Dichas invertasas tienen la ventaja de tolerar concentraciones de 300 mM de sacarosa, así como propiedades catalíticas comparables con las invertasas de otros organismos procarióticos. Sin embargo, la principal desventaja que presentan las invertasas de *Z. mobilis* es su baja estabilidad a pH alcalino y a temperaturas superiores a 55 °C, además de su baja producción de forma nativa.

Actualmente, no existe una invertasa comercial proveniente de bacterias, por lo que si se consigue mejorar las propiedades de estos biocatalizadores, podemos ofrecer una alternativa a las enzimas que se utilizan comúnmente.

Por lo anterior, es importante continuar el estudio de las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* con la finalidad de poder producirlas en mayor cantidad, en comparación con las obtenidas de manera nativa, utilizando el sistema de expresión heterólogo *Pichia pastoris*, así como mejorar las propiedades catalíticas de éstas con el objetivo de que puedan ser utilizadas en algún proceso industrial.

4. HIPÓTESIS GENERAL

H1: La expresión de las invertasas INVA e INVB de *Zymomonas mobilis* en *Pichia pastoris*, mediada por el promotor fuerte AOX1, incrementará su producción, con respecto al promotor GAP.

H2: La inmovilización de las enzimas recombinantes expresadas en levadura mejorará sus propiedades catalíticas en comparación con las observadas en las invertasas libres.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general.

- ✍ Expresar las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* en *P. pastoris*, bajo el control del promotor AOX1 y evaluar su producción mediante inducción con metanol.
- ✍ Purificar e inmovilizar las invertasas INVA e INVB recombinantes.

5.2 Objetivos particulares.

- ✍ Expresar las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* en *P. pastoris* por inducción con metanol.
- ✍ Optimizar las condiciones de cultivo para las cepas transformantes obtenidas de *P. pastoris* con los genes de interés (*invA* e *invB*).
- ✍ Comparar la producción de invertasa utilizando diferentes promotores (Promotor AOX1, Promotor GAP).
- ✍ Purificar y caracterizar bioquímicamente las invertasas recombinantes producidas por *P. pastoris*.
- ✍ Inmovilizar las invertasas recombinantes INVA e INVB mediante un método químico.

6. MATERIALES Y METODOS

6. 1 Microorganismos.

- 🧫 *Zymomonas mobilis* cepa CDBB-B603 proporcionada por la colección Mexicana de cultivos microbianos del CINVESTAV-IPN Unidad Zacatenco.
- 🧫 *Escherichia coli* DH5 α .
- 🧫 *Pichia pastoris* X-33 (silvestre, Mut⁺).
- 🧫 *Pichia pastoris* GS115 (*his4*, Mut⁺).
- 🧫 *Pichia pastoris* KM71 (*arg4 his4 aox1::ARG4*, Mut^S Arg⁺).

6.2 Medios de cultivo.

6.2.1 Medios de cultivo para bacterias.

6.2.1.1 Medios de cultivo para *Escherichia coli*.

Medio Luria Bertani (LB) bajo en sales (Miller JH 1972) (g L⁻¹).

Medio para crecimiento u obtención de biomasa.

Triptona/Peptona	10
NaCl	5
Extracto de levadura	5
Agar	15

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.

Medio TB (Sambrook y Rusell 2001) (g L⁻¹).

Medio para obtener ADN plasmídico.

Extracto de levadura	24
Triptona/Peptona	10
Glicerol anhidro	4 mL

Añadir agua destilada hasta 900 mL y esterilizar en autoclave. Añadir 100 mL de solución estéril de KH₂PO₄ 170 mM y K₂HPO₄ 720 mM.

Medio GYT (Sambrook y Rusell 2001) (g L⁻¹).

Medio para almacenamiento o posterior a electroporación.

Extracto de levadura	1.25
Bactotriptona/Peptona	2.5
Glicerol	100 mL

6.2.1.2 Medio de cultivo para *Zymomonas mobilis*.

Medio Bekers (Bekers *et al.* 2000) (g L⁻¹).

Medio de cultivo para crecimiento y producción de invertasas.

Sacarosa	100
Extracto de levadura	7
KH ₂ PO ₄	2.5
MgSO ₄ 7H ₂ O	1
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.6

Ajustar el pH a 4.9 con HCl. Para el mantenimiento de la cepa se puede hacer con una concentración de 50 gL⁻¹ de sacarosa.

6.2.2 Medios de cultivo para *Pichia pastoris*.

Medio YPDS (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium with Sorbitol, Invitrogen 2014) (g L⁻¹).

Medio para crecimiento después de transformación.

Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Sorbitol 1M	182.2
Agar	20

1. Disolver Extracto de levadura, sorbitol y peptona en 900 mL de H₂O_d
2. Añadir 20 g de agar
3. Esterilizar a 120 psi por 20 minutos.
4. Añadir solución 100 mL de dextrosa al 20% estéril
5. Añadir antibiótico de resistencia (zeocina) cuando el medio se encuentre aproximadamente a 60 °C.

Medio YPD (Yest Extract Peptone Dextrose Medium, Invitrogen 2014) (g L⁻¹).

Medio para crecimiento u obtención de biomasa.

Extracto de levadura	10
Peptona	20
Dextrosa	20
Agar	20

1. Disolver Extracto de levadura y peptona en 900 mL de H₂O_d.
2. Añadir 20 g de agar.
3. Esterilizar a 120 psi por 20 minutos.
4. Añadir solución 100 mL de dextrosa al 20% estéril.
5. Añadir antibiótico de resistencia (zeocina) cuando el medio se encuentre aproximadamente a 60 °C.

Medio para bioensayo de actividad invertasa (placas indicadoras con sal de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC). Bochner y Savageau 1977, Yanase et al. 1991) (g L⁻¹).

Medios para bioensayo cualitativo colorimétrico útil en identificación de transformantes de *P. pastoris* con actividad invertasa.

	Medio E	Medio BMMY modificado
Agar	15	15
Peptona	1.25	-----
K ₂ HPO ₄	7	*
KH ₂ PO ₄	3	*
MgSO ₄	0.1	-----
YNB 13.4% (10x)	-----	100 mL
TTC 0.0025% (10x)	100 mL	100 mL
Metanol 10% (10X)	100 mL	100 mL
Sacarosa 20% (10x)	100 mL	100 mL

1. Disolver y mezclar todos los reactivos con excepción del TTC, metanol y YNB (Medio BMMY) en 700 mL y 500 mL de H₂O_d respectivamente. La sacarosa puede adicionarse en este paso.

* En el caso del medio BMMY modificado se adicionaron 100 mL de solución 10x amortiguador de fosfatos 1 M pH 6.0 para tener una concentración final de 100 mM.

2. Esterilizar a 120 psi por 20 minutos.

3. Añadir las soluciones estériles por filtración de TTC (preparada el mismo día), metanol y YNB (BMMY) cuando el medio se encuentre aproximadamente a 60 °C.

4. Verter aproximadamente 30 mL de medio completo en placas de Petri y dejar solidificar. Preferentemente usar el mismo día ya que si se dejan las placas por más tiempo puede ocasionar falsos negativos.

MD/MM (Minimal Dextrose/Methanol Medium, Invitrogen 2014) (g L⁻¹).

Medio de cultivo para determinación de fenotipos Mut⁺ y Mut^S en mutantes de *P. pastoris*.

YNB (yeast nitrogen base)	13.4
Biotina	0.0004
Glucosa	20

1. Disolver la glucosa en 900 mL de agua.
2. Esterilizar a 120 psi por 20 minutos.
3. Enfriar a temperatura ambiente hasta aproximadamente 60 °C y añadir
100 mL de solución YNB 10x esterilizada con filtro
2 mL de solución de biotina 500x esterilizada con filtro
4. Para realizar placas añadir 15 g de agar en el paso 1.
5. Puede almacenarse el medio o las cajas a 4 °C y tiene un periodo de vida de varios meses.
6. Para el medio MM en lugar de adicionar glucosa, se adiciona una solución 10x de metanol al 0.5% después del paso 2.

BMGY/BMMY (Buffered Glycerol-complex Medium/Buffered Methanol-complex Medium, Invitrogen 2014) (g L⁻¹).

Medios para expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* mediado por el promotor AOX1.

Extracto de levadura	10
Bactotripton/Peptona	20
YNB (yeast nitrogen base)1	3.4
Biotina	0.0004
Glicerol/Metanol	10 mL
Amortiguador de fosfato de potasio 100 mM pH 6.0	

1. Disolver el extracto de levadura y peptona en 700 mL de agua.
2. Esterilizar a 120 psi por 20 minutos.
3. Enfriar a temperatura ambiente y añadir
 - 100 mL de amortiguador fosfato de potasio 1 M pH 6.0
 - 100 mL de solución YNB 10x esterilizada con filtro
 - 2 mL de solución de biotina 500x esterilizada con filtro
 - 100 mL de solución de glicerol o metanol 10 x
4. Para el medio BMMY adicionar la solución 10x de metanol en lugar del glicerol.
5. Puede almacenarse el medio a 4 °C y tiene un periodo de vida de aproximadamente dos meses.

BMG/BMM (Buffered Minimal **G**lycerol /Buffered Minimal **M**ethanol, Invitrogen 2014) (g L⁻¹).

Medios para expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* mediado por el promotor AOX1.

Para los medios BMG y BMM se sigue el mismo procedimiento que el mencionado anteriormente para los medios BMGY y BMMY pero sin peptona y extracto de levadura.

6.3 Expresión de las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* en *P. pastoris* por inducción con metanol.

Se realizaron cuatro construcciones utilizando los vectores comerciales de INVITROGEN® (pPICZαA-B) los cuales contienen el gen del promotor AOX1 (Ver Anexo), el cual es inducido cuando existe metanol en el medio de cultivo. Los genes *invA* e *invB* fueron obtenidos mediante dos procedimientos: (i) construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* (Calixto-Romo 2008) (ii) a partir del ADN genómico de *Z. mobilis*.

6.3.1 Técnicas de manipulación de ADN utilizadas.

6.3.1.1 Técnicas para extracción de ADN plasmídico.

6.3.1.1.1 Extracción de ADN plasmídico a pequeña escala en *E. coli*. (Fernández 1997).

Este método fue descrito y modificado por Holmes y Quigley en 1981 y consiste en lo siguiente:

1. Picar una colonia con palillo estéril e incubar en tubo Corny de 15 mL con un volumen de medio TB de 5 mL con el antibiótico adecuado para el mantenimiento del plásmido dentro de la bacteria. Incubar a 37 °C a 250 rpm durante un mínimo de 6 horas.
2. Recoger las células por centrifugación a 5000 rpm durante 3 minutos. Resuspender pastilla en 350 mL de STET (Ver Anexo) y añadir 10 µL de solución de lisozima con una concentración de 10 mg mL⁻¹ en agua o en Tris-HCl pH 8.0 10 mM.
3. Mezclar por 30 segundos y hervir durante 45 segundos. Las proteínas, restos celulares y ADN cromosómico bacteriano se precipitan por centrifugación a 14 000 rpm durante 10 minutos y se eliminan con un palillo estéril.
4. Precipitar el ADN plasmídico añadiendo 40 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol absoluto. Mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70%. Secar la pastilla y resuspender en 30 µL de H₂O_d o TE.

6.3.1.1.2 Extracción de ADN plasmídico a gran escala en *E. coli*.

(Fernández 1997).

En ocasiones el ADN plasmídico obtenido por lisis alcalina presenta desventajas cuando se realizan digestiones con endonucleasas, esto se debe a la presencia de sales del ADN aislado. Cuando se realiza extracción de ADN a pequeña escala no se presenta éste problema.

1. Inocular 100 mL de medio TB con una colonia con el plásmido de interés e incubar 37 °C a 250 rpm durante un mínimo de 6 horas.
2. Centrifugar células a 5000 rpm durante 3 minutos. Resuspender el pellet en 6 mL de STET y repartir en alícuotas de 350 µL. Añadir 20 µL de solución de lisozima a una concentración de 10 mg mL⁻¹.
3. Mezclar durante 30 segundos y hervir por 45 segundos. Centrifugar a 14 000 rpm por 15 minutos y eliminar restos con palillo estéril.
4. Precipitar ADN plasmídico con 40 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 600 µL de isopropanol absoluto. Mezclar y mantener a temperatura ambiente durante 15 minutos.
5. Centrifugar a 14 000 rpm durante 5 minutos y el precipitado se lava con etanol al 70%. Secar la pastilla y resuspender en 30 µL de H₂O o TE.

6.3.1.2 Técnicas para extracción de ADN genómico.

6.3.1.2.1 Extracción de ADN de bacterias Gram negativas.

El método utilizado para la extracción del ADN genómico fue utilizando el kit YeaStar™ Genomic DNA Kit (Zymo Research) para bacterias Gram negativas a partir de la cepa de *Z. mobilis* crecida durante 24 horas en el medio LB (Ver sección 6.2.1.1).

6.3.1.2.2 Extracción de ADN de hongos y levaduras

Esta metodología puede ser utilizada para extracción de ADN genómico de hongos y levaduras, sin embargo, para hongos, la pared celular es más rígida que en el caso de las levaduras, por lo que se requiere un paso de trituración del micelio (Cenis 1992).

1. Colocar trozo de agar, o medio de cultivo con células crecidas del microorganismo entre 16 a 18 horas y centrifugar para obtener el paquete celular. Este tiempo puede variar dependiendo del tiempo en donde se desea observar los amplificados.
2. Adicionar 500 μ L de TE y resuspender células.
3. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos.
4. Decantar el TE y adicionar 200 μ L de amortiguador de extracción, resuspender y añadir 100 μ L adicionales del mismo amortiguador.
5. Triturar micelio con pistilo (Este paso se puede omitir en el caso de levaduras).
6. Mezclar por vortex la suspensión y adicionar 150 μ L de acetato de sodio 3 M pH 5.2.
7. Colocar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos (o en hielo seco).
8. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
9. Retirar el sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y añadir un volumen de isopropanol absoluto.
10. Colocar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos (o en hielo seco).
11. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 minutos.
12. Decantar y limpiar pastilla con 500 μ L de etanol al 70%, mezclar suavemente por inmersión.
13. Eliminar etanol, sin afectar la pastilla, secar la pastilla a temperatura ambiente y una vez seca añadir 50 μ L de TE o H_2O .
14. Observar producto en gel de agarosa (Ver *Anexo*) para comprobar integridad de extracción.

6.3.1.3 Limpieza de ADN mediante fenolizaciones.

(Fernández 1997).

El ADN plasmídico obtenido a partir de miniprep o megaprep tiene ARN y restos de algunas proteínas de ADN, por lo que una vez que se realiza éste procedimiento se tiene que tratar con una solución de ARNasa para limpiar el ADN extraído. Este procedimiento también es utilizado para limpiar ADN que ha sido digerido con endonucleasas de restricción o ADN genómico que se extrajo con kit.

El método convencional es el llamado de fenolización, aunque también se pueden utilizar columnas de intercambio para la eliminación de éstos restos.

A continuación se describen dos métodos dependiendo de los reactivos con los que se cuenten y que ambos son efectivos para la limpieza.

Procedimiento 1:

1. Tratar el ADNp (ADN genómico o fragmentos digeridos) obtenido con ARNasa A (concentración final de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) incubando a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ o temperatura ambiente durante 60 a 90 minutos.
2. Añadir un volumen de fenol neutro, mezclar y centrifugar a temperatura ambiente a 14 000 rpm por 5 minutos.
3. Recoger la fase acuosa cuidadosamente y homogeneizar con un volumen de fenol-CIA, centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Repetir el paso 3 hasta obtener una fase cristalina. Regularmente no se requieren más de 2 extracciones de este paso.
5. Realizar un tratamiento con un volumen de CIA y precipitar a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 16 a 18 horas con 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío.
6. Centrifugar a 14 000 rpm durante 20 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y la pastilla resultante se lava con etanol al 70%, centrifugar a 14 000 rpm por 5 minutos y dejar secar la pastilla a temperatura ambiente.
7. Resuspender pastilla seca con H_2O o TE.

Procedimiento 2:

Este procedimiento es una pequeña modificación del método enlistado anteriormente descrito por Fernández FJ (1997), con la diferencia de que se utiliza el reactivo: Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico (25/24/1 SIGMA).

Se realizan los mismos pasos descritos sin embargo en vez de utilizar el fenol, fenol-CIA y CIA, se sustituye por lavados con un volumen de Fenol/Cloroformo/Alcohol isoamílico hasta fase cristalina y al final el pellet se resuspende en H₂O o TE.

6.3.1.4 Purificación de productos de PCR a partir de geles de agarosa.

Este método es útil para limpiar un fragmento (o fragmentos) a partir de una PCR, para la secuenciación de un fragmento o para obtener ADN molde para una nueva reacción de amplificación. Se utilizó el kit QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) con ligeras modificaciones.

6.3.1.5 Reacciones con endonucleasas de restricción.

Se llevaron a cabo reacciones con enzimas de restricción (endonucleasas), todas realizan un corte generando extremos cohesivos conforme las especificaciones que se pueden consultar en el *Anexo*. Todas las endonucleasas utilizadas fueron de New England Biolabs (NEB).

Estos procedimientos se realizaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor de acuerdo a las características de cada enzima y se llevaron a cabo en productos de amplificación por PCR, en plásmidos circulares y/o para el análisis de restricción para verificar las construcciones plasmídicas.

Todas estas reacciones dependen de la concentración de ADN a cortar, se puede utilizar 0.5 µL de las endonucleasas o dilución de esta misma. Para ver más información respecto a precauciones y cuidados al realizar éstos procedimientos consultar Anexo.

6.3.1.6 Procedimiento para ligar fragmento(s) de ADN con T4 ADN ligasa.

La T4 ADN ligasa cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre juxtaposición 5' fosfato y 3' hidroxilo terminal en ADN o ARN dúplex. Puede unir extremos romos o cohesivos así como reparar cadenas sencillas o averiadas de ADN, ARN o ADN/ARN híbridos. El procedimiento descrito a continuación se siguió a partir de las indicaciones del proveedor New England Biolabs (Ver Anexo).

1. Preparar la mezcla de reacción:

Vector digerido	1 μL^*
Fragmento de ADN digerido	3.0 μL^*
T4 ADN ligasa	1 μL
Amortiguador 10 x T4 ADN ligasa	1 μL
H ₂ O	4 μL^{**}
Volumen total	10 μL

* Se pueden probar relaciones de concentración 1:3, 1:6 y 1:9 inserto vector.

** c.b.p volumen final de 10 μL

2. Incubar mezcla de reacción a 16 °C por 16 a 18 horas.

6.3.1.7 Transfección de ADN en células hospederas.

El procedimiento de transfección de ADN a un hospedero requiere de dos elementos:

- i) Células “competentes”, es decir, células que facilite el paso de las moléculas de ADN a través de las barreras externas de la célula. Existen diferentes tipos de éstas células: (a) Químico-competentes, (b) Electrocompetentes y (c) Ultracompetentes, clasificadas dependiendo de la eficiencia de transformación, es decir, de la cantidad de clonas o transformantes obtenidas después de introducir el material genético.

- ii) Método de introducción del material genético que dependerá del tipo de célula competente que se puede obtener, del tipo de organismo hospedero y del material genético a introducir.

6.3.1.7.1 Transfección de ADN en células de *E. coli*.

6.3.1.7.1.1 Introducción de ADN por choque térmico.

Para llevar a cabo éste procedimiento es necesario obtener células químico competentes, el procedimiento que se describe a continuación es para utilizando cloruro de calcio (Fernández 1997).

Elaboración de células competentes:

1. Picar una colonia de células DH5 α , JM109 o la cepa de *E. coli* a utilizar (sin plásmido) crecida previamente en platas de LB e inocular tubo cónico de 50 mL con 5 mL de medio LB, incubar a 37 °C durante 16 a 18 horas.
2. Tomar 50 μ L del preinóculo crecido e inocular a 50 mL de medio LB en matraz de 250 mL. Incubar a 37 °C hasta DO_{600nm}= 0.5-0.8.
3. Centrifugar medio de cultivo a 4 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C.
4. Decantar sobrenadante sin alterar el pellet y adicionar 25 mL de solución de CaCl₂ 50 mM frio, mantener durante 15 minutos a 4 °C.
5. Centrifugar a 4 000 rpm durante 5 minutos a 4 °C .
6. Resuspender en 2.5 mL de solución de CaCl₂ 50 mM.
7. Repartir en alícuotas de 50 μ L, congelar inmediatamente con hielo seco y almacenar a -70 °C.

Procedimientos de choque térmico:

Este procedimiento de transformación de células de *E. coli* fue descrito por Hanahan en 1983:

1. Descongelar alícuota de células competentes *E. coli* DH5 α en hielo. Agregar 2 a 5 μ L de mezcla de ligación. Para vector solo 0.5 μ L si es directo del proveedor. El volumen de la solución que contiene al ADN no debe superar el 5% del volumen de células bacterianas utilizadas.
2. Incubar en hielo por 30 minutos.
3. Incubar a 42 $^{\circ}$ C durante 90 segundos.
4. Incubar inmediatamente en hielo por 2 minutos.
5. Agregar 250 μ L de medio LB bajo en sales e incubar a 37 $^{\circ}$ C por 1 hora 30 minutos (Puede ser con o sin agitación 250 rpm), con el objetivo de que las células que incorporen el plásmido expresen la resistencia al antibiótico utilizado como marcador de selección.
6. Plaquear mezcla en cajas Petri con medio LB y antibiótico de selección dependiendo del vector a ocupar (zeocina 25 μ g mL $^{-1}$).
7. Incubar a 37 $^{\circ}$ C por 16-18 horas.

6.3.1.7.1.2 Introducción de ADN mediante electroporación.

Elaboración de células electrocompetentes (Fernández 1997):

1. De placas de LB con colonias aisladas DH5 α de *E. coli* inocular una colonia en 50 mL de LB en matraz de 250 mL, incubar a 37 $^{\circ}$ C y 250 rpm durante 12-14 horas.
2. Tomar una alícuota de 3 mL e inocular en 125 mL de medio fresco LB (en matraz de 500 mL) e incubar a 37 $^{\circ}$ C y 250 rpm hasta DO_{600nm} = 0.4.
3. Colocar el cultivo durante 30 minutos en hielo.

4. Recoger células por centrifugación a 4 °C a 2 500 rpm durante 20 minutos. Decantar sobrenadante cuidadosamente y resuspender la biomasa en 16 mL de glicerol al 10% (v/v) estéril y frío.
5. Centrifugar 4 °C a 2 500 rpm durante 20 minutos, descartar sobrenadante y resuspender en 6 mL de glicerol al 10%. Volver a centrifugar a las mismas condiciones ya mencionadas y resuspender en 600 µL de medio GYT estéril frío y volver a centrifugar.
8. Resuspender en 500 µL de medio GYT. Homogeneizar suavemente con pipeta y repartir en alícuotas de 40 µL. Congelar inmediatamente con hielo seco o nitrógeno líquido y almacenar a -70 °C.

Procedimientos de electroporación:

El procedimiento de transformación de ADN hospedero por ésta técnica, es considerada para algunos autores como más eficiente que realizar transformación de un vector utilizando choque térmico:

1. Descongelar alícuota de células electrocompetentes en hielo.
2. Mezclar con 1 µL de plásmido o 5 µL de mezcla de ligación.
3. Mezclar suavemente con pipeta y transferir la mezcla en una cubeta de electroporación previamente enfriadas a -20 °C.
4. Aplicar voltaje de 2.5 volts durante 5 milisegundos.
5. Añadir 1 mL de medio LB, mezclar por inversión.
6. Incubar la mezcla en tubo Eppendorf a 37 °C a 250 rpm durante 1 hora.
7. Plaquear alícuotas de la mezcla de transformación en medio LB con el antibiótico de selección.

6.3.1.7.2 Transfección de ADN en células de *P. pastoris* por electroporación.

Existen diversos métodos para realizar transformación en *P. pastoris*, entre las que se encuentran: Transformación por protoplastos, Electroporación, Biobalística, y utilizando LiCl. Si se desea utilizar zeocina como marcador de resistencia, la elaboración de protoplastos no es recomendada debido a que esta técnica involucra la remoción de la pared celular para introducir el ADN en la célula y regeneración de la misma célula antes de que sea capaz de expresar el gen de resistencia a zeocina y por lo tanto no se obtienen transformantes (Higgins y Cregg 1998).

Es por ese motivo que se utilizó el método de electroporación para este trabajo. Además de que se pueden obtener rendimientos altos de transformación generando de 10^3 a 10^4 transformantes por μg de ADN linealizado.

Elaboración de células electrocompetentes (Barral *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006, Invitrogen 2014):

1. Picar una colonia fresca (1 o 2 días de crecimiento) de *P. pastoris* (X-33, GS115 o KM71) con palillo estéril y transferirla en tubo cónico con 5 mL de medio YPD, incubar a 30 °C por 16 a 18 horas a 200 rpm.
2. El preinóculo resultante (1%) es utilizado para inocular medio de 500 mL de medio fresco YPD en matraz de 2L (o 2 matraces de 1 L con 250 mL de medio YPD). Crecer hasta $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.3-1.5$.
3. Centrifugar células a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Resuspender el pellet con 500 mL de H_2O estéril helada (0 °C).
4. Centrifugar células a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Resuspender el pellet con 250 mL de H_2O estéril helada (0 °C).
5. Centrifugar células a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Resuspender el pellet con 20 mL de Sorbitol 1 M estéril helada (0 °C).

6. Centrifugar células a 4000 rpm por 5 minutos a 4 °C. Resuspender el pellet con 1 mL de Sorbitol 1 M estéril helada (0 °C) para un volumen final de 1.5 mL. Mantener células en hielo y utilizar el mismo día.

Procedimiento de electroporación (Barral *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006, Invitrogen 2014):

1. Mezclar de 60 a 80 µL de alícuota de células electrocompetentes con 15 µL de ADNp previamente linealizado con SacI con una concentración aproximada de 8 a 10 µg de las construcciones o el vector pPICZα (control negativo) y transferir a cubeta de electroporación fría (0°C).
2. Incubar la cubeta con células y vectores en hielo por 5 minutos.
3. Transferir cubeta seca a electroporador y dar un pulso eléctrico de 1.5 kV por aproximadamente 10 ms (éste tiempo es variado dependiendo de la condición de las células). Si no es posible programar éstas condiciones, se puede utilizar el programa de electroporación para *S. cerevisiae*.
4. Añadir inmediatamente 1 mL de sorbitol 1M estéril y helado a la cubeta de electroporación, posteriormente, transferir la mezcla a un tubo estéril de 15 mL.
5. Añadir 300 µL de medio YPD sin antibiótico e incubar a 30 °C sin agitación por 20 horas.
6. Plaquear la mezcla incubada en volúmenes de 10 a 200 µL en placas de medio YPDS con 100 µg mL⁻¹ de zeocina.
7. Incubar placas por 2 a 4 días a 30 °C o hasta formación de colonias.
8. Resembrar de 10 a 20 colonias para separarlas en placas de YPD o YPDS con zeocina para posteriores estudios.

Nota: Como control de transformación se utilizan células de *P. pastoris* sin vectores o inserto y se plaquea en medio YPDS o YPD.

Como control negativo para expresión de gen de interés se utiliza *P. pastoris* (X-33, GS115 o KM71) con vector linealizado y digerido pero sin ORF de gen a expresar.

6.3.1.8 Técnicas de amplificación por PCR para analizar las construcciones en las transformantes evaluadas

6.3.1.8.1 PCR de colonia para análisis de amplificados.

Este protocolo se utiliza con clonas de bacterias o levaduras que poseen el gen de interés y se desea hacer un escrutino rápido de muchas colonias sin tener que realizar extracción de ADN genómico. El ADN molde para la PCR pueden ser obtenidas directamente de una colonia en medio sólido (caja de Petri) o cultivos en líquido (Calixto-Romo 2009). Esta técnica puede ser empleado para:

- i) Para verificar manipulación en organismo transformante (inserción o disrupción de genes).
- ii) Amplificación por PCR de genes de interés. Importante: Es necesario usar un control negativo el cual puede la cepa silvestre sin la modificación o inserción del gen de interés o la cepa silvestre con el vector sin inserto).
- iii) Cuando las secuencias de interés están en YACs.

1. A partir de una caja de Petri con medio LB/YPD con la colonia de interés, picar una colonia y transferir a un tubo de PCR.
2. Añadir la mezcla de reacción en el siguiente orden:

Mezcla de reacción:

Amortiguador 10x	2 μ L
Solución de MgCl ₂	1 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
ADN	-----
Oligo directo*	1 μ L
Oligo reverso*	1 μ L
H ₂ O	13.5 μ L
Amplificasa	1 μ L
Total de reacción	20 μ L

*Oligonucleótidos que se utilizaron para realizar las construcciones.

3. Mezclar perfectamente y transferir tubos de PCR a termociclador con el programa de PCR dependiendo de la polimerasa a utilizar.

Programa utilizando ADN polimerasa (Amplificasa, BioTecMol):

1 ciclo	94 °C	1 minuto 30 segundos
30 ciclos	94 °C	15 segundos
	64 °C <i>invA</i>	1 minuto 30 segundos
	67 °C <i>invB</i>	
	72 °C	1 minuto 30 segundos
1 ciclo	72 °C	10 minutos

4. Comprobar producto de PCR mediante gel de agarosa al 1.2%

- 🔬 Si la amplificación es débil o errática se puede repetir la reacción utilizando la temperatura de polimerización 2-3 °C por debajo de la temperatura de fusión calculada a partir de los oligonucleótidos más ricos en A+T.
- 🔬 Si el resultado sigue siendo dudoso, se pueden producir esferoplastos, añadiendo solución de Zymolasa 100 T antes de empezar el protocolo y con esto se remueve la pared celular de la levadura.
- 🔬 Esta técnica puede dar un falso negativo si se utiliza demasiada biomasa obtenida de la colonia seleccionada.

6.3.1.8.2 Comprobación de inserción de construcciones en clonas de *E. coli* DH5 α .

Esta PCR es utilizada para determinar si la inserción del ORF fue correcta. Generalmente se utiliza el **factor α** (39) el cual hibridiza dentro de la región del factor alfa que se encuentra en sitio múltiple de clonación (MCS) y permite la determinación del 5' del extremo terminal del gen de interés, como oligonucleótido directo y como oligo reverso se puede utilizar **3' AOX1** (38) hibridiza justo en el 3' del MCS en la región 3' del terminador AOX1 (Ver Anexo. Mapa de vector de expresión pPICZ α B) o el oligonucleótido reverso con el cual se amplificó el gen.

Por lo tanto, si la PCR utilizando este par de oligos es positiva, amplifica el gen de interés más aproximadamente 350 bp que corresponden a parte del vector (Bai *et al.* 2006).

El procedimiento se puede utilizar a partir de una transformante de *E. coli*, del ADN plasmídico de la misma o utilizando una colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1).

Mezcla de reacción:

Amortiguador 10x	2 μ L
Solución de MgCl ₂	1 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
ADNp	1 μ L
Oligo directo 39	1 μ L
Oligo reverso 38	1 μ L
H ₂ O	12.5 μ L
Amplificasa	1 μ L
Total de reacción	20 μ L

Mezclar perfectamente y transferir a tubos de PCR al termociclador con el programa de PCR dependiendo de la polimerasa a utilizar.

Programa utilizando ADN polimerasa Amplificasa:

1 ciclo	94 °C	1 minuto 30 segundos
30 ciclos	94 °C	15 segundos
	60 °C	1 minuto 30 segundos
	72 °C	1 minuto 30 segundos
1 ciclo	72 °C	10 minutos

Comprobar producto de PCR mediante gel de agarosa al 1.2%.

6.3.1.8.3 Comprobación de integración de construcciones en genoma de clonas de *P. pastoris*.

La integración de la construcción en el genoma de *P.pastoris* es una prueba que se realiza con el objetivo de seleccionar las clonas que tienen mayor probabilidad de expresar la proteína heteróloga de interés.

Los vectores de integración generalmente son más estables que los vectores de replicación episomal o de replicación autónoma (PARS) debido a que se requiere la selección continua del antibiótico para contener el plásmido en el hospedero (Bazan *et al.* 2009).

Por otro lado, algunos autores sugieren que la cantidad de proteína recombinante está en función del número de copias integradas en el genoma de esta levadura. Este tipo de integración se da por medio de recombinación en regiones homólogas del vector con el genoma de *P. pastoris*. La mayoría de ellos se da por eventos de recombinación sencilla y se incorporan en el sitio específico por inserción (en vez de reemplazamiento), por lo que es necesario hacer la selección de transformantes Mut⁺ (Ver. Sección 6.3.2.2), debido a que estas se caracterizan por presentar inserción y no Mut^S donde se presenta una interrupción del promotor AOX1 y por lo tanto los niveles de expresión serán diferentes de acuerdo a la concentración de metanol en el medio de cultivo para la inducción (Burrowes *et al.* 2005).

Se utilizó la amplificasa para realizar este análisis por lo que la mezcla de reacción es la misma que las mencionadas anteriormente (Ver. Sección 6.3.1.8.3). Los oligonucleótidos utilizados fueron 32 y 33 (Ver Anexo).

Programa para la ADN polimerasa Amplificasa:

1 ciclo	94 °C	1 minuto 30 segundos
30 ciclos	94 °C	15 segundos
	47 °C	1 minuto 30 segundos
	72 °C	1 minuto 30 segundos
1 ciclo	72 °C	10 minutos

6.3.2 Técnicas de selección de transformantes de *P. pastoris* con actividad invertasa.

6.3.2.1 Bioensayo colorimétrico para detección de actividad invertasa en transformantes de *P. pastoris*.

El escrutinio de transformantes de *P. pastoris* con el gen de interés se puede realizar de diferentes formas:

- a) PCR de colonia del fragmento de interés.
- b) PCR del fragmento de interés utilizando como ADN molde el ADN genómico de *P. pastoris*.
- c) Western Blot usando los anticuerpos c-myc (si la proteína recombinante los tiene).
- d) Ensayos de actividad cualitativos. Entre otros.

Para este trabajo se estandarizó un bioensayo cualitativo colorimétrico utilizando la sal de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) considerado como una subclase de sal de tetrazolio, la cual en su estado oxidado es incolora, soluble en agua y en solución es ligeramente amarilla descrito por Bochner y Savageau 1977, Yanase *et al.* 1991.

El fundamento de esta técnica consiste en que cuando esta sal es reducida, se convierte a formazán, de una coloración rojo intenso (**Figura 10**). Este formazán es insoluble en agua, por lo que la reducción es irreversible. Por lo tanto si las clonas presentan coloración roja, será por la presencia de la sal oxidada, la cual es reducida con algunas fuentes de carbono (**Tabla 11**) como la glucosa, producto de la hidrólisis de sacarosa realizada por la invertasa. Por consiguiente las clonas que no posean la actividad invertasa, no producirán dicha hexosa, quedando sólo la sacarosa en las placas indicadoras, disacárido que no reduce el TTC y cuyas clonas resultantes no presentan la coloración rojo intenso.

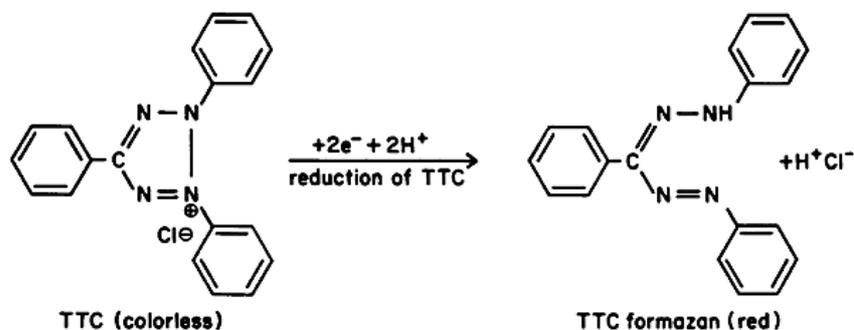


Figura 10. Reacción de reducción del cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) (Bochner y Savageau 1977).

Para la realización de este bioensayo es necesario considerar una serie de factores importantes de tal forma que la prueba no de “falsos positivos” o “falso negativos” entre los que cabe destacar:

- ◆ pH
- ◆ Concentración de TTC
- ◆ Concentración de sustrato o fuente de carbono

En la **Tabla 11** se enlistan la composición sugerida del medio de cultivo, concentraciones y rangos probados por Bochner y Savageau 1977 en los que se deben hacer una estandarización del bioensayo considerando las características propias del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de cada microorganismo, de tal manera de que el bioensayo sea confiable:

Tabla 11. Composición del medio de cultivo que influye en la respuesta de reducción del reactivo TTC en placas indicadoras de bioensayo colorimétrico cualitativo (Bochner y Savageau 1977).

Concentración (%)	Componente	Función
1.5	Agar	
0.0025	TTC	Indicador
0.7 0.3 0.01	K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄	Amortiguador mineral
0.2	Peptona y/o fuente(s) de nitrógeno	Nutriente para crecimiento
0.1-1.0*	Fuente de carbono	Sustrato prueba

* Si las concentraciones de fuente de carbono no se encuentran dentro de éstos intervalos pueden generar falsos positivos o falsos negativos

Algunas otras fuentes de carbono que pueden ser empleadas para la realización de esta prueba se enlista en la **Tabla 12**.

Tabla 12 Diferentes fuentes de carbono útiles para realizar estudio de reducción en placas de TTC. Estudio evaluado en *S. typhimurium* LT2 (Bochner y Savageau 1977).

Clase de compuesto	Fuentes de carbono que genera colonias rojas en placas de TTC (Recomendadas)	Fuentes de carbono que generan colonias blancas en placas de TTC (No recomendadas)
Disacáridos Hexosas	Maltosa D-Glucosa	Lactosa α -Metil glucosido
Metil pentosa Pentosa	L-Fucosa D-Ribosa	D-fucosa Ribitol
Cadenas ácidas C4	Fumarato	Maleato
Ácidos grasos de cadena larga	Oleato	Caproato
Ácidos grasos de cadena corta	Propionato	Butirato
Aminoácidos	L-Aspartato L- Alanina D- o L- Serina L- Prolina	L- Glutamato β - Alanina L- Glicina Hidroxi-L-prolina
Otros	D- Galactosa D- Manitol D- Gluconato D- Gluconolactona D- Glucosa-6-P L- Ramnosa i-Inositol D- Xilosa Glicerol Lactato Citrato Malato Succinato Acetato	L-Valina L-Lisina L-Histidina L-Arginina

Por otro lado, en cuanto al pH de las placas de TTC, si este es inferior a 6, la reducción del formazán tendrá como resultados productos incoloros en vez de los rojos. De forma contraria, si el pH es muy alcalino, la formación del formazán es espontánea generando falsos positivos. Es por estas razones que el cuidado del pH en las placas es fundamental para no generar resultados equivocados.

Respecto a la fuente de nitrógeno, la adición de peptona en grandes cantidades también afecta el grado de coloración de las colonias. Esto se puede deber a una competencia entre nutrientes y la reducción del TTC la cual es estimulada por la abundancia de nutrientes y suprimida por la limitación de los mismos. Conforme a este mismo razonamiento se debe tener cuidado en que la cantidad de fuente de carbono no debe superar el 1% de la concentración en las placas indicadoras.

Una vez que se tienen las transformantes de *P. pastoris* resembradas varias veces (como mínimo tres pases) en concentraciones elevadas de zeocina (mayor a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) es recomendable realizar este sondeo el cual consiste en lo siguiente:

1. Preparación de placas indicadoras de TTC (Ver. Sección 6.3.2.1). Estas placas preferentemente tienen que ser preparadas y utilizadas el mismo día.
2. Transferir con un palillo estéril la colonia de *P. pastoris* crecida en medio YPD con zeocina.
3. Incubar placas a 30 °C por 2 o 3 días o hasta aparición de color rojo en las transformantes del control positivo.
4. Si se desea incrementar el color rojo de las transformantes positivas se pueden dejar las placas en refrigeración por uno o dos días.

6.3.2.2 Bioensayo de fenotipo para identificación de transformantes de *P. pastoris* Mut⁺ y Mut^S.

La producción de la proteína heteróloga de interés utilizando *P. pastoris* empleando metanol está regulada por el promotor AOX1 como se ha mencionado anteriormente y el tipo de alimentación de ésta fuente de carbono dependerá en gran medida del número de copias viables de la alcohol oxidasa el cual se ve reflejado en el fenotipo de las mutantes huéspedes.

La mayoría de las cepas de *P. pastoris* de tipo silvestre son de tipo Mut⁺ (Methanol utilization plus phenotype) el cual tiene completas las dos copias de la alcohol oxidasa AOX1 y AOX2, sin embargo también se puede presentar otro tipo de fenotipo el cual es el Mut^S (Methanol utilization type Slow) el cual sólo tiene completa la copia del gen AOX2 (Cereghino y Cregg 2000).

Dependiendo del locus de inserción del cassette de expresión es la manera en cómo se dan éstos dos fenotipos. Las cepas Mut⁺ tienen una tasa de crecimiento mayor a las Mut^S sin embargo las cepas con mutaciones en AOX pueden ser mejores productoras que las de tipo silvestre o con las copias completas de los genes AOX y algunos autores como Kupcsulik y Sevela 2004 sugieren que incluso puede ser mejor utilizar cepas Mut^S debido que al tener un metabolismo más lento permite que las modificaciones post-traduccionales se lleven a cabo más adecuadamente, además de que en el caso de la producción muy rápida de las proteínas recombinantes en ocasiones puede haber una secreción incompleta del total de las proteínas producidas quedando el exceso en el citosol como proteínas agregadas.

Para las cepas de fenotipo Mut^S se tiene que utilizar una menor concentración de metanol para la inducción y un tipo de alimentación mixto de glicerol y metanol, en donde el glicerol funciona eficientemente para el crecimiento celular, mientras que el metanol funge como inductor. Diversos autores como Sreekrishna *et al.* (1989), Brierley *et al.* (1990), Loewen *et al.* (1997), d'Anjou y Daugulis (2001), han obtenido altos niveles de proteínas recombinantes utilizando éste tipo de fenotipo.

En el caso de las cepas con fenotipo Mut⁺, la forma más eficiente de obtención de proteínas recombinantes es únicamente utilizar el metanol como fuente de carbono y energía en la etapa de inducción además de que en ocasiones el periodo de inducción suele ser diferente al del fenotipo Mut^S, este fenotipo también ha sido utilizado por un mayor número de autores, prefiriéndolo sobre el Mut^S ya que en ocasiones se obtiene mayor producción de la proteína de interés (Zhang *et al.* 2003, Burrowes *et al.* 2005, Bai *et al.* 2006, Bhanot *et al.* 2007).

Por esta razón se decidió trabajar con el fenotipo Mut⁺ para éste trabajo, procedimiento que se describe a continuación:

1. Las transformantes de *P. pastoris* X-33 con las construcciones integradas pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB* crecidas previamente en medio YPD con o sin zeocina se transfieren con un palillo estéril en placas con medio MD y MM (Ver. Sección 6.2.2) utilizando un palillo diferente para cada placa. Se pueden sembrar hasta 100 transformantes de esta etapa.
2. Incubar las placas a 30 °C durante 48 horas.
3. Pasado éste periodo de tiempo revisar crecimiento en ambas placas. Las Mut⁺ crecen normal en ambos medios, mientras que las Mut^S crecen normal sólo en el medio MD pero se observa menor crecimiento en el medio MM.
4. Marcar las cepas Mut⁺ y utilizarlas para realizar el escrutinio de mayor actividad invertasa o para el resto de los ensayos de selección (Burrowes *et al.* 2004, Invitrogen 2014).

6.3.2.3 Cuantificación de azúcares reductores mediante ácido dinitrosalisílico.

Este método fue publicado por Miller en 1959, el cual es utilizado para detectar grupos carbonilo (C=O) y por tal motivo es denominado de azúcares reductores. Esta técnica consiste en la oxidación de grupos funcionales aldehído presentes en azúcares como glucosa y grupos funcionales como cetonas presentes en fructosa.

El ácido 3,5-dinitrosalisílico (DNS) se reduce a ácido 3-amino, 5-nitrosalisílico en condiciones alcalinas. Debido a que el oxígeno disuelto puede interferir en la oxidación de la glucosa se adiciona un sulfito el cual no interviene en la reacción de coloración pero que al añadirlo absorbe el oxígeno disuelto.

La reacción general indica que un mol de azúcar reacciona con 1 mol de DNS, sin embargo se ha considerado que puede haber otras reacciones involucradas. El número de reacciones dependerá de la naturaleza del azúcar reductor, generando diferentes

intensidades de coloración, por lo que es necesario hacer una curva patrón para calibrar estos efectos dependiendo del azúcar a utilizar.

Otro efecto que puede tener ésta oxidación de grupos carbonilo en el azúcar es la descomposición del mismo por el DNS, por ejemplo la carboximetilcelulosa (CMC) puede afectar la curva de calibración aumentando la intensidad del color desarrollado. A pesar de estos inconvenientes este método muy sencillo y no requiere equipo especializado ha sido una de las técnicas más empleadas para la determinación de actividad de diferentes enzimas, teniendo más de 9000 citas en diferentes bases de datos divulgación científica.

Procedimiento para cuantificación de la muestra problema:

1. Realizar mezcla de reacción que se utilizó fue la siguiente: amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5, solución enzimática (INVA o INVB), H₂O_d en un volumen final de 500 µL. Mezclar.
2. Incubar mezcla anterior a la temperatura óptima de la enzima de interés durante 1 a 5 minutos dependiendo del tratamiento.
3. Detener la reacción con 500 µL de DNS y hervir por 5 minutos en agua hirviendo.
4. Después de enfriados los tubos adicionar 5 mL de H₂O_d.
5. Medir a 540 nm.

6.3.2.4 Identificación de transformantes con actividad invertasa. Medio líquido volumen de 50 mL.

El procedimiento puede ser utilizado para realizar un escrutinio de cepas previamente seleccionadas que presentan mejor crecimiento, mayor resistencia a zeocina o que fueron preseleccionadas de bioensayos enzimáticos.

Este procedimiento es útil para detectar niveles de proteína recombinante en diferentes cepas de *P. pastoris* y/o cuando se tiene un gran número de transformantes. Para

cepas de *P. pastoris* KM71 es aconsejable utilizar 0.5% de metanol, mientras que para cepas de X-33 se puede emplear 1% de metanol para ver mayor respuesta.

Es importante señalar que este tipo de fermentación ha sido una herramienta muy útil para este fin, pero no siempre son exitosas debido a factores que ya se han mencionado como son: aereación, agitación adecuada, poca uniformidad en transferencia de materia en los contenedores, crecimiento limitado por disponibilidad de nutrientes, entre otros (Burrowes *et al.* 2004). Por lo tanto es necesario encontrar la metodología más adecuada para detectar niveles de expresión dependiendo del sistema utilizado.

También es importante destacar que los niveles de expresión de la proteína de interés no siempre son directamente proporcionales conforme el tamaño del contenedor. Sin embargo en muchos casos, los niveles de proteína a nivel matraz son diez veces menores que en un fermentador.

La consideración más importante a tomar en cuenta para la elección de un método adecuado de fermentación en pequeña escala es una generación de biomasa adecuada antes seguir con la fase de inducción (Daly y Hearn 2005), por lo que con esta consideración se eligió seguir la metodología propuesta por Calik *et al.* 2008 y Bazan *et al.* 2009 con ligeras modificaciones, las cuales se describen a continuación:

1. A partir de una mutante aislada con resistencia a zeocina (preferentemente de mutantes resistentes a 500-1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$), transferir colonia con un palillo estéril en placas de YPD, esta placa no necesita zeocina (Ver. Sección 6.2.2) y crecerla durante 2 días a 30 °C.
2. Tomar la colonia entera crecida durante el tiempo mencionado en el paso 1 y transferirla a tubo Corny con 5 mL medio YPD estéril. Incubar por 2 días a 30 °C a 250 rpm.
3. Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos y resuspender el pellet obtenido en medio BMGY (Ver. Sección 6.2.2). El resuspendido servirá como preinóculo para transferir a otro tubo Corny con medio BMMY (Ver. Sección 6.2.2) fresco estéril con un volumen final de 5 mL asegurándose que la $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$.

4. Incubar los tubos a 28 °C a 180 rpm por tres días, adicionando metanol al 1% cada 24 horas.
5. Centrifugar a 5000 rpm por 5 minutos y utilizar sobrenadante para realizar pruebas de determinación de actividad enzimática (Ver. Sección 6.3.2.3).

Nota: Se puede resuspender el pellet en amortiguador de acetatos para determinar actividad y si esta es superior al sobrenadante disminuir la temperatura en el paso 4.

6.3.3 Construcción pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*.

Estas construcciones se realizaron a partir de la construcción pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* respectivamente proporcionada por Calixto-Romo (2009) de acuerdo al siguiente procedimiento.

1. Extraer de ADN plasmídico (Ver. Sección 6.3.1.1.2) de las clonas de *E. coli* JM109 conteniendo ambas construcciones.
2. Digerir de ADN plasmídico extraído para obtener los ORFs de *invA* e *invB* así como 0.5 µL de vector pPICZαA (Invitrogen®) con endonucleasas EcoRI y SacII (Para obtener más información respecto a usos de endonucleasas de restricción, consultar Anexo) conforme lo que se muestra a continuación:

EcoRI

3 µL de ADNp *invA/invB*
1 µL EcoRI
2 µL amortiguador 10x NE EcoRI
14 µL H₂O
20 µL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas y media. Inactivar la enzima para digestión con SacII.

Sac II

3 µL de ADNp *invA/invB*

1 μ L SacII
2 μ L amortiguador 10x NE 4
14 μ L H₂O
20 μ L de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas y media. Inactivar la enzima.

3. Limpiar las digestiones por fenolización (Ver. Sección 6.3.1.3) de las digestiones.
4. Comprobar la concentración después de fenolización en gel de agarosa al 1.2% y ligar cada ORF al vector de expresión linealizado utilizando proporciones de inserto vector 1:3 y 1:6 (Ver. Sección 6.3.1.6).
5. Comprobar construcciones pPICZ α A-*invA* y pPICZ α A-*invB* mediante tamaño (5.1 kb y 4.8 kb respectivamente), doble digestión con EcoRI-SacII y amplificación del ORF de acuerdo las condiciones mostradas a continuación:

Mezcla de reacción:

Amortiguador 10x	2 μ L
Solución de MgCl ₂	1 μ L
dNTP's 10 mM	0.5 μ L
ADNp <i>invA/invB</i>	1 μ L
Oligo GVIII/CVII	1 μ L
Oligo GVII/CIX	1 μ L
H ₂ O	12.5 μ L
Amplificasa	1 μ L
Total de reacción	20 μ L

Programa de PCR con ADN polimerasa Amplificasa (Ver Anexo):

1 ciclo 94 °C 1 minuto 30 segundos

30 ciclos	94 °C	15 segundos
	64 /67 °C	1 minuto 30 segundos
	72 °C	1 minuto 30 segundos
1 ciclo	72 °C	10 minutos

Doble digestión con EcoRI y SacII (únicamente para comprobar liberación de inserto en transformantes).

1 µL de ADNp
 0.5 µL EcoRI
 0.5 µL SacII
 1 µL amortiguador 10x NE EcoRI
 7 µL H₂O
 10 µL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 3 horas. No es necesaria la inactivación.

6. Introducir las construcciones a células de *E. coli* DH5α para propagación y conservación de los vectores (Ver. Sección 6.3.1.7.1.2).
7. Seleccionar las transformantes resultantes por medio de: resistencia a zeocina, PCR de colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1) fase de la construcción (Ver. Sección 6.3.1.8.2) y secuenciación de construcción.
8. Extraer el ADN plasmídico (Ver. Sección 6.3.1.1.2) de clona seleccionada con la construcción y linealizar mediante endonucleasa SacI de acuerdo a las siguientes condiciones:

Sac I

40 µL ADNp

4 μL SacI
10 μL amortiguador 1x NE 1
10 μL BSA (10 mg mL⁻¹)
36 μL H₂O
100 μL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 3 horas. Inactivar enzima y limpiar la digestión (Ver. Sección 6.3.1.3).

9. Introducir la construcción linealizada (aproximadamente 8 μg) en células competentes de *P. pastoris* X-33 (Ver. Sección 6.3.1.7.2).
10. Seleccionar transformantes obtenidas mediante resistencia a zeocina (100 a 1000 μg mL⁻¹), PCR de colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1), integración de construcción en genoma de *P. pastoris* (Ver. Sección 6.3.1.8.3), bioensayo colorimétrico (Ver. Sección 6.3.2.1), bioensayo de fenotipo (Ver. Sección 6.3.2.2) y mediante fermentaciones a pequeña escala (Ver. Sección 6.3.2.4).

6.3.4 Construcción pPICZ α B-*invA* y pPICZ α B-*invB*.

Se realizaron dos construcciones más utilizando el mismo promotor (AOX1) pero amplificando los genes *invA* en *invB* a partir del genoma de *Z. mobilis*. El diseño de oligonucleótidos para la amplificación de ambos genes se realizó quitando la metionina inicial y adicionando un codón de paro antes de la traducción del epítopo c-myc y la cola de poli-histidinas en ambos casos.

Se colocó un codón de paro después del sitio de corte XbaI (**Figura 11**) de tal forma que no se tradujera la cola de poli-histidinas y el epítopo c-myc debido a que se ha reportado que en ocasiones afecta los procesos celulares de síntesis, plegamiento y secreción adecuada de las proteínas (Kwon *et al.* 2009), aunque también se ha mencionado que cambiando la cola de poli-His en el extremo opuesto se puede solucionar éste problema (Terpe 2003).

Por último se utilizaron las endonucleasas PstI y XbaI para flanquear el MCS del vector de expresión del vector pPICZ α B.

α-factor signal sequence

```

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
    Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
    Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
    Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GC TGCAG GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGA
    Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

1243 TCGGTACCTC GAGCCGCGGC GGCCGCCAGC TTCTCTA GAA TAA AAA CTC ATC TCA GAA
    Asp718 | Kpn I Xho I      Sac II Not I      Xba I      c-myc epitope
    Glu Lys Lys Leu Ile Ser Glu

1300 GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTA
    Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1352 GCCTTAGACA TGACTGTTC TCAGTTCAAG TTGGGCACTT ACGAGAAGAC CGGTCTTGCT

1412 AGATTCTAAT CAAGAGGATG TCAGAATGCC ATTTGCCTGA GAGATGCAGG CTCATTTTT
    3' AOX1 priming site

```

Figura 11. Sitio múltiple de clonación (MCS) del vector de expresión pPICZαB utilizado para las nuevas construcciones con el codón de paro colocado al final del sitio de corte XbaI. Los rectángulos verdes muestran los sitios de corte que flanquean los ORFs de la invertasa intracelular y extracelular en las nuevas construcciones pPICZαB-*invA* y pPICZαB-*invB* (Imagen tomada de *Pichia* Expression Kit INVITROGEN).

6.3.4.1 Diseño de oligonucleótidos para amplificar los genes *invA* e *invB* de *Z. mobilis*.

Se realizó un alineamiento múltiple utilizando las secuencias de otras invertasas intracelulares reportadas en diferentes cepas de *Z. mobilis* depositadas en las bases de datos como The european bioinformatics institute (<http://www.ebi.ac.uk/>).

Para la comparación de estas secuencias se empleó el programa Clustal W (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) de la base de datos EXPASY (<http://www.expasy.org/>) con los siguientes códigos de las invertasas:

- 🔗 AAA27701.1 *Zymomonas mobilis* hypothetical protein (Gunasekaran *et al.* 1990).
- 🔗 BAA01258.1 *Zymomonas mobilis* invertase (Yanase *et al.* 1991).

- AAO38865.1 *Zymomonas mobilis* invertase A (O'Mullan *et al.* 2002).
- AAV89566.1 *Zymomonas mobilis* subsp. *Mobilis* (Seo *et al.* 2005).

Los resultados del alineamiento nos revelaron que las secuencias son muy conservadas entre sí, presentando un porcentaje de similitud de entre 100 y 97% (Para ver alineamiento completo consultar en Anexo), por lo que se tomaron las regiones sin variación de los extremos 5' y 3' (Figura 12) para el diseño de los oligonucleótidos 34 y 35 (Ver Anexo. Tabla de oligonucleótidos).

```

ENA | AAA27701 | AAA27701 .1 | ATGGAATCCCCCTCTTATAAAAA | TTTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA | BAA01258 | BAA01258 .1 | ATGGAATCCCCCTCTTATAAAAA | TCTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA | AAO38865 | AAO38865 .1 | ATGGAATCCCCCTCTTATAAAAA | TTTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA | AAV89566 | AAV89566 .1 | ATGGAATCCCCCTCTTATAAAAA | TTTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
*****

ENA | AAA27701 | AAA27701 .1 | AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTT | CAAGCGATGCCTGTTAA
ENA | BAA01258 | BAA01258 .1 | AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTT | TAAGCGATGCCTGTTAA
ENA | AAO38865 | AAO38865 .1 | AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTT | CAAGCGATGCCTGTTAA
ENA | AAV89566 | AAV89566 .1 | AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTT | CAAGCGATGCCTGTTAA
*****

```

Figura 12. Extremos 5' y 3' del alineamiento múltiple de diferentes secuencias de invertasas intracelulares reportadas y depositadas en EBI (European Bioinformatics Institute) de cepas de *Z. mobilis* para el diseño de oligonucleótidos para amplificar el gen *invA* a partir del genoma de la cepa de *Z. mobilis* CDBB-B603. Extremo 5' (Texto amarillo) utilizado para diseñar el oligonucleótido directo. Extremo 3' (Texto verde) empleado para el diseño del oligonucleótido reverso para la amplificación del ORF del gen *invA*.

De igual forma, para el diseño de los oligonucleótidos que nos permitieran amplificar el gen *invB*, se realizó otro alineamiento múltiple de las siguientes invertasas extracelulares depositadas en bases de datos:

- AAA61488.1 *Zymomonas mobilis* extracelular sucrase (Song *et al.* 1993).
- BAA04476.1 *Zymomonas mobilis* invertase (Kyono *et al.* 1995).
- AAC36942.1 *Zymomonas mobilis* extracelular sucrose (Kannan *et al.* 1995).
- AAG29871.1 *Zymomonas mobilis* extracelular sucrose (Ahn y Kang 2000).
- AAV88999.2 *Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4 (Seo *et al.* 2005).

En este alineamiento se obtuvo entre 100 y 99% de similitud entre las secuencias analizadas anteriormente (Para ver alineamiento completo Ver Anexo), por lo que de igual forma que para el diseños de los oligonucleótidos directo y reverso de la invertasa

extracelular, se tomaron los extremos 5' y 3' para la síntesis de los mismos a partir de regiones altamente conservadas en las 4 secuencias con los nucleótidos más similares, como se muestra en la **Figura 13** para tener el marco de lectura abierto gen *invB*.

```

ENA|AAA61488|AAA61488.1      ATGTTTAATTTTAATGCCAGT CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|BAA04476|BAA04476.1     ATGTTTAATTTTAATGCCAGT CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAC36942|AAC36942.1     ATGTTTAATTTTAATGCCAGT CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAG29871|AAG29871.1     ATGTTTAATTTTAATGCCAGT CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAV88999|AAV88999.2     -----ATGAAAGT
                               *****

ENA|AAA61488|AAA61488.1      TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTCCCT GATCGTCGCAAATAA
ENA|BAA04476|BAA04476.1     TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTCCCG GATCGTCGCAAATAA
ENA|AAC36942|AAC36942.1     TATGCTTGGCTCGGTATGGC-TTCCCT GATCGTCGCAAATAA
ENA|AAG29871|AAG29871.1     TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTCCCT GATCGTCGCAAATAA
ENA|AAV88999|AAV88999.2     TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTCCCT GATCGTCGCAAATAA
                               *****

```

Figura 13. Extremos 5' y 3' del alineamiento múltiple de diferentes secuencias de invertasas extracelulares reportadas y depositadas en EBI (European Bioinformatics Institute) de cepas de *Z. mobilis* para el diseño de oligonucleótidos 36 y 37 para amplificar el gen *invB* a partir del genoma de *Z. mobilis* CDBB-B603. Extremo 5' (Texto amarillo) utilizado para diseñar el oligonucleótido directo. Extremo 3' (Texto verde) empleado para el diseño del oligonucleótido reverso para la amplificación del ORF del gen *invB*.

6.3.4.2 Procedimiento para la construcción.

El procedimiento para dichas construcciones se describe a continuación:

1. A partir de ADN genómico de alta calidad de *Z. mobilis* (Ver. Sección 6.3.1.2.1) realizar la siguiente mezcla de reacción (en ese orden) utilizando la enzima de alta fidelidad *Pfu* ADN polimerasa de Fermentas® (Ver especificaciones en Anexo).

Mezcla de reacción:

H₂O libre de nucleasas 36.5 µL
 Amortiguador *Pfu* con MgSO₄ 10x 5 µL

dNTP's 10 mM	1 µL
Oligo directo*	1 µL
Oligo reverso**	1 µL
ADN molde (genómico)	1 µL
<i>Pfu</i> ADN polimerasa	1 µL
Total de reacción	50 µL

* Para gen *invA* oligonucleótido **34**, para el gen *invB* **36**

** Para el gen *invA* oligonucleótido **35**, para el gen *invB* **37**

- Mezclar a homogenidad y transferir a tubos de PCR a termociclador con el siguiente programa de PCR:

Programa utilizando la ADN polimerasa *Pfu*:

1 ciclo	95 °C	3 minutos
(Desnaturalización inicial)		
30 ciclos		
Desnaturalización	95 °C	30 segundos
Alineamiento	70 °C <i>invA</i>	30 segundos
	73 °C <i>invB</i>	
Extensión	72 °C	2 minuto 30 segundos
1 ciclo	72 °C	10 minutos

- Comprobar la secuencia de los amplificados mediante secuenciación y utilizar los programas Chromas Pro 1.5 (<http://chromaspro.software.informer.com/1.5/>) BLAST de NCBI (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) para el ensamblado y análisis de las secuencias de los genes *invA* e *invB*.
- Comprobar secuencia de los genes amplificados mediante endonucleasas de restricción BspHI mediante las condiciones siguientes:

BspHI

1 µL de ADN *invA/invB*

1 μL BspHI
1 μL amortiguador 10x NE 4
6 μL H_2O
10 μL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas y media. No es necesaria la inactivación.

5. Digerir de los productos de PCR (*invA* e *invB*) purificados así como 0.5 μL de vector pPICZ α B (Invitrogen®) con endonucleasas PstI y XbaI (Para obtener más información respecto a usos de endonucleasas de restricción, consultar Anexo) conforme lo que se muestra a continuación:

PstI

15 μL de *invA/invB*
3 μL PstI
5 μL amortiguador 10x NE 3
26.5 μL H_2O
50 μL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas. Inactivar PstI 80 °C por 20 minutos.

XbaI

15 μL de ADNp
3 μL XbaI
5 μL amortiguador 10x NE 4
1 μL BSA (10 mg mL^{-1})
26.5 μL H_2O
10 μL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas y media. Inactivación de XbaI a 65 °C por 20 minutos.

6. Limpiar mediante fenolización de las digestiones (Ver. Sección 6.3.1.3).

7. Comprobar la concentración después de fenolización en gel de agarosa al 1.2% y ligar cada ORF al vector de expresión linealizado utilizando proporciones de inserto vector 1:3 y 1:6 (Ver. Sección 6.3.1.6).
8. Comprobar construcciones pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB* mediante tamaño (5.1 kb y 4.8 kb respectivamente), doble digestión con PstI-XbaI y amplificación del ORF de acuerdo las condiciones mostradas a continuación:

Doble digestión con PstI y XbaI (únicamente para comprobar liberación de inserto en transformantes).

1 µL de ADNp

0.5 µL PstI

0.5 µL XbaI

1 µL amortiguador 10x NE 3

1 µL BSA (10 mg mL⁻¹)

6 µL H₂O

10 µL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 3 horas. No es necesaria la inactivación.

9. Introducir las construcciones a células de *E. coli* DH5α para propagación y conservación de los vectores (Ver. Sección 6.3.1.7.1).
10. Seleccionar las transformantes resultantes por medio de: resistencia a zeocina, PCR de colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1), fase de la construcción (Ver. Sección 6.3.1.8.2), secuenciación de construcción y análisis de restricción con BglII conforme las siguientes condiciones:

BglII

1 µL de ADNp

1 µL BglII

1 µL amortiguador 10x NE 3

7 µL H₂O

10 µL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 2 horas. No es necesaria la inactivación.

11. Extraer el ADN plasmídico (Ver. Sección 6.3.1.1.2) de clona seleccionada con la construcción y linealizar mediante endonucleasa SacI de acuerdo a las siguientes condiciones:

Sac I

40 µL ADNp

4 µL SacI

10 µL amortiguador 1x NE 1

10 µL BSA (10 mg mL⁻¹)

36 µL H₂O_d

100 µL de reacción total

Incubar a 37 °C durante 3 horas. Inactivar enzima y limpiar la digestión (Ver. Sección 6.3.1.3).

12. Introducir la construcción linealizada (aproximadamente 10 µg) en células competentes de *P. pastoris* X-33, KM71 y GS115 (Ver. Sección 6.3.1.7.2).

13. Seleccionar transformantes obtenidas mediante resistencia a zeocina (100 a 1000 µg mL⁻¹), PCR de colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1), integración de construcción en genoma de *P. pastoris* (Ver. Sección 6.3.1.8.3), bioensayo colorimétrico (Ver. Sección 6.3.2.1), bioensayo de fenotipo (Ver. Sección 6.3.2.2) y mediante fermentaciones a pequeña escala (Ver. Sección 6.3.2.4).

6.4 Optimización las condiciones de cultivo para la expresión de INVA e INVB mediante inducción con metanol en *P. pastoris*.

La obtención de proteínas heterólogas mediadas por el promotor fuerte AOX1 generalmente es llevada a cabo en dos etapas. La primer etapa consiste en un ciclo de acondicionamiento y crecimiento de la transformante de *P. pastoris* con el objetivo de obtener suficiente biomasa o densidad celular.

En esta etapa las fuentes de carbono y energía más empleadas son glucosa o glicerol, sin embargo Inan y Meagher 2001 refieren al uso de otras fuentes como D-alanina, sorbitol, manitol y trealosa.

Todos estos compuestos señalados anteriormente, junto con etanol y acetato son represores del promotor AOX1, por lo que hasta que esta fuente se agote completamente y se adicione metanol comenzará la activación del promotor AOX1 y por lo tanto la expresión de la proteína recombinante (segunda etapa o periodo de inducción).

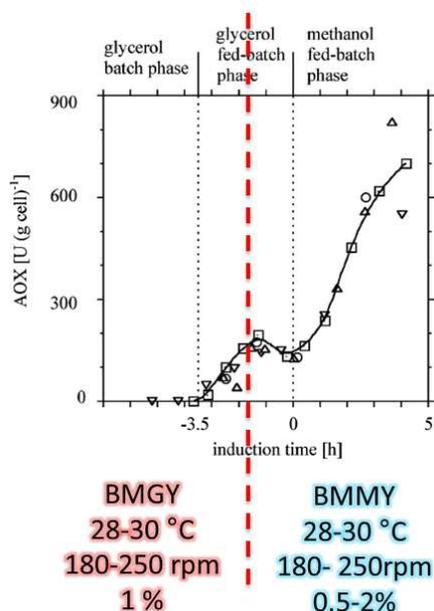


Figura 14. Estrategia de dos etapas de fermentación para inducción del promotor AOX1 para la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. La primer etapa consiste en una fase de crecimiento utilizando glicerol o glucosa (separación con línea punteada) y la segunda etapa corresponde a la inducción de la proteína de interés utilizando metanol como única fuente de carbono y energía (Imagen tomada de Jahic *et al.* 2006).

En biorreactor (Figura 14), se puede llevar a cabo una etapa intermedia entre las dos mencionadas anteriormente, la cual consiste en un periodo de alimentación con glicerol posterior a la etapa de obtención de biomasa, hasta que la cepa de *P. pastoris* alcance una fase exponencial de crecimiento y una vez que el glicerol en el medio de cultivo se agote, comienza la adición de metanol (Inan y Meagher 2001, Jahic *et al.* 2003, Zhang *et al.* 2003, Poutou *et al.* 2005, Cos *et al.* 2006).

Es importante mencionar que para poder obtener mayor cantidad de proteína recombinante es necesario optimizar el proceso de fermentación durante la expresión de la proteína recombinante de interés, evaluando diferentes condiciones de crecimiento las cuales son:

- 🔗 Medio de cultivo a utilizar (Mínimo y complejo).
- 🔗 Agitación (120-300 rpm).
- 🔗 Temperatura (20- 30 °C).
- 🔗 Concentración de metanol (0.5 a 2%).

Cada proteína heteróloga reportada expresada en *P. pastoris* ha tenido condiciones diferentes de expresión, sin embargo una gran mayoría de autores utilizan los medios BMG/BMM, BMMG/BMMY (Ver. Sección 6.2.2), 180 y 250 rpm, 28 y 30 °C y concentraciones de metanol de 0.5% y como máximo 3 % debido a que *P. pastoris* tolera concentraciones de 10 g L⁻¹ y a concentraciones superiores a 30 g L⁻¹ de metanol el crecimiento se ve totalmente inhibido (Charoenrat *et al.* 2005).

Otro factor importante es la configuración del matraz. Villate *et al.* 2001 evaluaron diferentes diseños de matraces en donde incluían matraces sin indentación, una, dos, tres y cinco indentaciones, encontrando que un sistema con triple indentación mejoraba la producción de biomasa comparada con otros diseños. Así mismo, utilizando los matraces con este tipo de diseño, aumentaban los niveles de expresión de la proteína recombinante a pequeña (mediana) escala debido a que aumentan la transferencia de oxígeno en el sistema.

6.4.1 Fermentación en medio líquido volumen 250 mL.

Este procedimiento también es denominado como fermentación a mediana escala debido a que generalmente se compara con la producción en bioreactores o contenedores mayores a 2 litros, siendo esta la denominada fermentación a gran escala.

El procedimiento consiste en los siguientes pasos:

1. Tomar una colonia resemebrada al menos dos veces con $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina e inocular matraz con triple indentación de 250 mL con 25 mL de medio YPD durante 48 horas con agitación de 250 rpm a $30 \text{ }^\circ\text{C}$.
2. Centrifugar células a 3000 g por 5 minutos.
3. Resuspender pellet en medio BMG o BMGY (10-15 mL) y medir $\text{DO}_{600\text{nm}}$.
4. Llevar a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1$ en 25 mL de medio BMM o BMMY (10% de volumen de operación Inan y Meagher 2001, Li *et al.* 2009), e incubar en matraces de 250 mL con triple indentación a $20 \text{ }^\circ\text{C}$, a 180 rpm, durante aproximadamente 120 horas o hasta detectar el mayor nivel de expresión de la proteína de interés. Los matraces pueden ser cubiertos con gasa quirúrgica estéril con doble capa en lugar de tapones de algodón.
5. Añadir metanol (10x) para una concentración de 1% en el volumen de operación cada 6, 12 o 24 horas dependiendo del comportamiento en la expresión de la proteína de interés para mantener la inducción.
6. Tomar una alícuota de 1 mL del sobrenadante de cultivo (en cada tiempo de inducción), centrifugar a 3000 g por 5 minutos y utilizar el sobrenadante para la detección de la proteína de interés por SDS-PAGE, cuantificación de actividad (Ver. Sección 6.3.2.3) y cantidad de proteína (Ver. Sección 6.5.1.1) (Cregg y Higgins 1995, Bhanot *et al.* 2007, Cregg *et al.* 2009, Invitrogen 2014).

6.5 Comparación de la producción de invertasas nativas y recombinantes.

Para poder llevar a cabo esta etapa fue necesario conocer cuál era la producción de invertasas nativas (intra y extracelular) producidas por *Z. mobilis* por lo que antes de hacer la comparación entre los promotores, se decidió montar un experimento para evaluar la producción de dichas enzimas.

6.5.1 Producción de las invertasas de *Z. mobilis*.

6.5.1.1 Técnica de cuantificación de proteínas por método de Lowry.

6.5.1.2 Técnica de cuantificación de biomasa por peso seco.

Se realizó una fermentación mediada utilizando la cepa de *Z. mobilis* CDBB-B603 la cual consistió en dos etapas. La primera consistió en el crecimiento del preinóculo de la bacteria en el medio descrito como de mantenimiento, inóculo y fermentación propuesto por Bekers *et al.* 2000 (Ver. Sección 6.2.1.2).

1. Preinóculo: Crecer cepa de *Z. mobilis* en 100 mL medio Bekers a 30 °C durante 10 horas sin agitación en matraz de 1 L
2. Tomar el preinóculo y llevarlo a una concentración del 10% en un volumen total de 100 mL de medio Bekers nuevo (o D.O.₆₀₀= 1). Incubar a 30 °C sin agitación durante 24 horas tomando muestra cada 2 horas en las primeras 12 horas. Pasado este tiempo, muestras tomadas cada 6 horas.
3. Centrifugar muestras a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. Separar sobrenadante de biomasa y determinar actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3) y cantidad de proteína por el método de Lowry *et al.* (1951) el que se describe a continuación:

- Mezclar 100 μ L de muestra con 2.5 mL de reactivo C (Ver Anexo).
 - Agitar vigorosamente y esperar de 5 a 10 minutos. Pasado este tiempo agregar 0.25 mL de reactivo D (Ver Anexo).
 - Agitar vigorosamente y esperar de 20 a 30 minutos
 - Leer a 600 nm. Nota: El tiempo entre el paso (iii) y (iv) no debe superar 60 minutos.
4. Determinar cantidad de biomasa por el método de peso seco como se describe a continuación:
- Llevar a peso constante charolas de aluminio en mufla con una temperatura de 60-70 $^{\circ}$ C.
 - Anotar peso inicial (t_0) e introducir la biomasa o restos celulares previamente centrifugados de las fermentaciones.
 - Introducir en mufla y secar completamente biomasa y anotar el peso obtenido de éste paso (t_1).
 - La diferencia de de los pesos corresponde a la biomasa cuantificada.

6.5.2 Producción de las invertasas recombinantes expresadas constitutivamente por *P. pastoris*.

En esta etapa se consultaron las condiciones sugeridas por Calixto-Romo (2009) y las evaluadas en éste trabajo, tomando en cuenta que estas construcciones fueron utilizadas como controles positivos en los ensayos de optimización para la expresión de las invertasas reguladas por el promotor inducible (AOX1).

El procedimiento es el mismo realizado para la fermentación utilizando matraces indentados de 250 mL (Ver. Sección 6.3.2.4) pero empleando matraces de 1 L y medio YPD. Evaluar la fermentación durante 132 horas sin adición de glucosa tomando muestra cada 12 horas y evaluar actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3), cantidad de proteína (Ver. Sección 6.5.1.1) ambas en el sobrenadante de cultivo y biomasa (Ver. Sección 6.5.1.2).

6.5.3 Producción de las invertasas recombinantes expresadas por inducción con metanol en *P. pastoris*.

Este procedimiento se realiza de la misma forma a las anteriores descritas, es decir, a partir de la metodología de la fermentación usando matraces de 250 mL (Ver. Sección 6.3.2.4), cambiando el volumen del matraz por uno de 1 L con volumen de operación de 100 mL (10% Volumen de operación). Tomar muestra cada 12 horas y adicionar 1% de metanol (concentración final) cada vez que se tome la muestra. Al sobrenadante de cultivo se le realizan los siguientes análisis: Cuantificación de proteína (Ver. Sección 6.5.1.1), Actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3) y determinación de Biomasa (Ver. Sección 6.5.1.2).

6.6 Purificación y caracterización bioquímica de las invertasas recombinantes.

Las enzimas pueden utilizarse purificadas, semi-purificadas o sin purificar, dependiendo de su uso o aplicación. En diversos procesos industriales generalmente las enzimas puede utilizarse semipurificadas o a partir de extractos celulares. Sin embargo para procesos de uso farmacéutico o alimenticio el grado de pureza del biocatalizador debe aumentar.

Conforme se aumenta el número de etapas de purificación el proceso se considera más costos y conlleva más tiempo, por lo tanto industrialmente hablando deja de ser tan atractivo.

Tomando en cuenta lo anterior, el objetivo de este proyecto fue purificar un biocatalizador útil para procesos industriales relacionados con la industria de alimentos, por lo tanto el producto debe de tener alto grado de pureza y a su vez utilizar el menor número de etapas de purificación.

Esta etapa se realizó tomando en cuenta que las enzimas a purificar, es decir la invertasa recombinante intracelular (INVA_{AOX1}) y extracelular (INVB_{AOX1}) producidas por *P. pastoris* inducidas por metanol no cuentan con la cola de poli-histidinas (Ver Sección 6.3.4) además que su estabilidad a pH es baja.

6.6.1 Purificación de INVA_{AOX1}.

El proceso de purificación de esta invertasa fue diferente a la invertasa recombinante extracelular (INVB_{AOX1}) consistiendo en los siguientes pasos:

1. A partir de un cultivo de 300 mL de células de *P. pastoris* (cepa AX24) con la construcción pPICZ α B-*invA*, crecidas bajo las condiciones mencionadas anteriormente (Ver. Sección 6.5.3) durante 84 horas, se concentró a 4°C por ultrafiltración, usando una membrana de polietilensulfona con un tamaño de poro de 30,000 Da (PALL®).
2. Una vez que se obtiene una concentración de 30 veces, se dializó el concentrado por toda la noche a 4 °C contra amortiguador A (Amortiguador de acetatos 25 mM pH 5.2, 25 mM de KCl, 0.1 mM PMSF y 5% de glicerol).
3. Se inyectó 5 mL del dializado en columna UNOsphere™ S (9.5x1.6 cm, Bio-Rad) con un volumen de empaque de 17 mL equilibrada con amortiguador A.
4. Se eluyeron las proteínas absorbidas con un gradiente de KCl (0.025-1 M) en amortiguador A con un flujo constante de 2 mL min⁻¹.
5. Se colectaron fracciones de aproximadamente 2 mL. A las fracciones colectadas medir proteína a 280 mM y actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3).
6. Las fracciones que presentan actividad invertasa se analizaron para ver pureza en gel SDS-PAGE al 10% y se almacenaron a 4 °C para estudios de caracterización bioquímica.

6.6.2 Purificación de INVBAOX1.

Este proceso se llevó conforme a lo que se describe a continuación.

1. 300 mL de sobrenadante obtenido a partir de fermentación por 84 horas de células de *P. pastoris* con la construcción pPICZαB-*invB* (cepa BX26), crecidas bajo las condiciones mencionadas anteriormente (Ver. Sección 6.5.3), se concentraron por precipitación al 60% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 4 °C toda la noche.
2. Se recuperó el material insoluble por centrifugación (8000 rpm a 4 °C durante 1 hora) y se resuspendió el pellet obtenido en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5.
3. Se eliminaron las sales por medio de diálisis a 4 °C contra amortiguador B (Amortiguador de L-Histidina 25 mM pH 5.5, 25 mM KCl, 0.1 mM de PMSF y 5% glicerol) por toda la noche.
7. Se inyectaron 5 mL del dializado a columna UNOsphere™ Q (19.5x1.6 cm, Bio-Rad) con un volumen de empaque de 12.5 mL equilibrada con amortiguador B.
4. Eluir las proteínas absorbidas en gradiente lineal de KCl (0.025-1 M) de amortiguador B con un flujo constante de 2 mLmin⁻¹.
5. Se colectaron fracciones de aproximadamente 2 mL. A las fracciones colectadas se midió la proteína a 280 mM y actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3).
6. Las fracciones que presentaron actividad invertasa se analizaron para ver pureza en gel SDS-PAGE al 10% y se guardaron a 4 °C para estudios de caracterización bioquímica.

6.6.3 Caracterización bioquímica de INVAOX1 e INVBAOX1.

Una vez purificados los biocatalizadores es necesario determinar las características que presentan, estos atributos serán comparados con las condiciones que se utilizan en otros bioprocesos o con otros biocatalizadores utilizados con el objetivo de intentar hacer dichos procesos más eficientes. Los parámetros que se midieron en éste trabajo se describen a continuación.

6.6.3.1 Temperatura óptima.

Tanto para $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$ se realizó el ensayo el cual consiste en probar un rango de temperaturas desde 20 a 55 °C en una solución de sacarosa 50 mM preparada en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5. La mezcla de la reacción se incuba durante 5 minutos y se determina la actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3).

6.6.3.2 pH óptimo.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se realizó el mismo procedimiento para ambas enzimas recombinantes en donde se evalúa un rango de pH de 4.0 a 7.5, usando sacarosa como sustrato (solución a 50 mM) preparada en amortiguador de acetatos 50 mM (4.0 a 5.5), amortiguador de citratos 50 mM (6.0 a 7.0) y amortiguador de fosfato de sodio 50 mM (7.5). La reacción se mezcló y se incubó por 5 minutos a la temperatura óptima de cada enzima ($INVA_{AOX1}$, 35 °C e $INVB_{AOX1}$, 40 °C), pasado este tiempo se mide actividad invertasa (Ver. Sección 6.3.2.3).

6.6.3.3 Parámetros cinéticos.

Esta determinación se debe de hacer cuanto ya se tienen establecidos el pH y temperatura de las enzimas recombinantes. La tasa de hidrólisis se estima incubando la enzima a diferentes concentraciones de sacarosa (0.01 a 2 M) y se evalúa el grado de hidrólisis del sustrato a su temperatura y pH óptimo.

Para $INVA_{AOX1}$ son 35 °C pH 5.5 mientras que para $INVB_{AOX1}$ son 40 °C pH 5.5. Los valores de K_M y V_{max} son determinados mediante gráficamente por método de regresión lineal (Lineweaver-Burk 1934 y Hanes-Wolf 1942).

6.6.3.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.

Para evaluar el efecto de diferentes iones metálicos y EDTA, las invertasas purificadas se mezclaron con una solución de sacarosa 50 mM y se preparó el amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 conteniendo alguno de estos iones siguientes: NiCl₂, MgCl₂, CuSO₄, ZnSO₄, FeSO₄, MnCl₂, HgCl₂, CaCl₂, o EDTA a concentraciones finales de 1, 5 y 10 mM cada uno.

Las reacciones se incubaron a 35 °C (INVA_{AOX1}) y 40 °C (INVB_{AOX1}) por 5 minutos. La actividad enzimática sin metal (Ver. Sección 6.3.2.3) se considera como el valor de referencia (100%).

6.6.3.5 Termoestabilidad.

En éste estudio, las preparaciones de enzimas purificadas se incuban a diferentes temperaturas (35-55 °C) y se toma muestra cada determinado periodo de tiempo para establecer la vida media ($t_{1/2}$) de la enzima (50% de la actividad inicial). A la muestra tomada se le determina la actividad remanente con solución de sacarosa 50 mM preparada en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 y se cuantifican los azúcares reductores (Ver. Sección 6.3.2.3).

6.6.4 Efecto de la glicosilación en las propiedades de INVA_{AOX1} e INVB_{AOX1} purificadas.

Como se ha mencionado anteriormente la glicosilación puede modificar las características de la proteína que tiene esta modificación post-traducciona, por lo tanto, se utilizar un método sencillo para la detección de grupos glicosilo y posteriormente se decidió remover estos grupos de las invertasas recombinantes expresadas en *P. pastoris* con el fin de evaluar el efecto que tenían estos sobre sus propiedades bioquímicas.

6.6.4.1 Tinción de glicoproteínas en geles de poliacrilamida.

La levadura *P. pastoris* tiende a glicosilar las proteínas que expresa, esto en ocasiones puede ser una desventaja debido a:

-  Modificaciones en su solubilidad.
-  Secreción.
-  Estabilidad.
-  Producción de anticuerpos (Jenkins y Curling 1994).

Por tal motivo es importante determinar el grado de glicosilación que tienen las enzimas recombinantes (o si lo presentan) expresadas por esta levadura.

Una prueba sencilla para determinar si una proteína tiene glúcidos en su estructura es la tinción de Schiff, en la cual los carbohidratos son oxidados a aldehídos por medio del ácido peryódico y posteriormente son visibles con el reactivo de Schiff (Zacharius *et al.* 1969).

Esta técnica se ha utilizado con diferentes soportes como geles de poliacrilamida o acetato de celulosa y se necesita por lo menos 1 μg de glicoproteína para ser visible después de la tinción de PAS (ácido peryódico-Schiff). Se han descrito algunos métodos para aumentar la sensibilidad de PAS como la condensación de dansil hidracina con los grupos aldehído producidos por la oxidación del periodato, sin embargo en ocasiones puede tener mucho ruido de fondo (Trivedi *et al.* 1983).

El método que se describe a continuación fue descrito por Segrest y Jackson (1972) con ligeras modificaciones tomando en cuenta las características de las invertasas recombinantes obtenidas:

1. Correr gel SDS-PAGE al 10% con la glicoproteína y control positivo (Invertasa de *S. cerevisiae*).
2. Después de este paso, sumergir el gel en agua unos minutos con agitación para quitar exceso de amortiguador de corrida.
3. Sumergir gel en ácido tricloroacético al 10% de 2 a 4 horas con agitación suave.
4. Continuar la fijación sumergiendo el gen en solución de isopropanol: acético: agua (25:10:65) de 8 a 12 horas con agitación suave.
5. Adicionar ácido acético al 7.5% a 4 °C durante 30 minutos.
6. Incubar en ácido peryódico al 0.2% a 4 °C por un a hora.
7. Incubar en reactivo de Schiff a 4 °C por una hora.
8. Colocar el gel en ácido acético al 7.5% hasta aparición de bandas.
9. Entre cada paso se pueden hacer lavados con H₂O.

6.6.4.2 Desglicosilación de invertasas recombinantes.

Para obtener las formas activas desglicosiladas de INVA_{AOX1} e INVB_{AOX1} se trataron bajo condiciones no desnaturizantes con la enzima Endoglicosidasa H (**Endo H**, Roche Diagnostics GmbH) de acuerdo a las condiciones de proveedor.

1. Adicionar 1 µL de Endo H a 0.77 mg mL⁻¹ in 50 mM acetate amortiguador pH 5.0 de INVA_{AOX1} purificada y 0.76 mg mL⁻¹ in 50 mM L-Histidine amortiguador pH 5.5 INVB_{AOX1} purificada a 4 °C durante toda la noche (la temperatura es con el objetivo de que la enzima no se desnaturalice por calor).
2. Analizar alícuotas de muestras desglicosiladas (d-INVA_{AOX1} and d-INVB_{AOX1}) en geles de SDS-PAGE al 10% y caracterizar el resto de las muestras con los análisis mencionados en las secciones superiores (temperatura óptima, pH óptimo, parámetros cinéticos y termoestabilidad).

6.6.4.3 Análisis bioinformático.

Para la predicción de los sitios potenciales de N-glicosilación en la secuencia de las invertasas nativas intra (Yanase *et al.* 1991) y extracelular (Kyono *et al.* 1995) de *Z. mobilis*, se utilizó el servidor Ensemble Gly <http://turing.cs.iastate.edu/EnsembleGly/> (Menendez *et al.* 2013) el cual permite conocer a partir de un algoritmo los sitios probables en donde de acuerdo a la secuencia de aminoácidos *P. pastoris* llevará acabo N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr) u O-glicosilación (Ser/Thr) (Daly y Hearn 2005, Macauley-Patrick *et al.* 2005, Li *et al.* 2007).

6.6.4.4 Elaboración de zimograma para la detección de actividad invertasa.

El uso de zimogramas para detección de proteínas con actividad invertasa es otro método de escrutinio rápido para encontrar cepas o clonas con actividad.

El método que se describe a continuación es el reportado por Gabriel y Wang en 1969 con ligeras modificaciones.

1. Realizar el gel de poliacrilamida al 10% sin SDS y bajo condiciones nativas (muestras sin hervir y sin β -Mercaptoetanol).
2. Correr la electroforésis en hielo o a 4 °C a 80 volts máximo.
3. Una vez que termina la electroforesis enjuagar por 1 hora el gel con amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 con agitación a 4 °C (hacer 2 recambios cada media hora). (Etapa de "renaturalización")
4. Sumergir el gel en solución de sacarosa al 10% en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 por 30 min a 40 °C.
5. Una vez que pase ese tiempo, remover solución, dar un lavado con agua destilada por 5 min y pasado ese tiempo sumergir en solución de TCC al 0.1% en 1 N NaOH en oscuridad (no necesita agitación) a temperatura ambiente hasta aparición de bandas (5 a 10 min).

6.7 Inmovilización de $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$.

Para llevar a cabo la inmovilización de un biocatalizador es necesario tomar en cuenta ciertos requisitos:

- i) Esquema de la reacción
- ii) Conocer las características de la enzima
- iii) Determinar el tipo de soporte y sus características
- iv) Establecer el método a emplear para la inmovilización
- v) Preparación de biocatalizador
- vi) Estandarizar las condiciones para la inmovilización
- vii) Determinar el método para evaluar la eficiencia de inmovilización

En este trabajo se buscó evaluar los dos métodos para inmovilización de enzimas mediante el uso de diferentes soportes: Nylon 6 y Quitosano. La selección del soporte debe ser tomada en cuenta en base a los siguientes criterios (Mateo *et al.* 2007):

- ✿ Superficie suficientemente larga y geoméricamente congruente con el tamaño de la enzima.
- ✿ Alta densidad de grupos reactivos en la superficie.
- ✿ Los grupos funcionales entre la enzima y el soporte deben presentar el mínimo impedimento estérico en la reacción (si se desea una unión multipuntual).
- ✿ Los grupos reactivos del soporte deben reaccionar con los grupos funcionales de la superficie de la enzima.
- ✿ La unión por medio de grupos funcionales debe ser estable para que permita por mucho tiempo la reacción enzima-soporte.
- ✿ Debe ser fácil volver a tener la superficie del soporte de forma inerte después de la inmovilización, ya sea bloqueando o destruyendo los grupos reactivos remanentes sin que afecte a la enzima.

6.7.1 Inmovilización por métodos químicos.

6.7.1.1 Soporte: Nylon 6.

Como se ha mencionado con anterioridad, este método tiene sus ventajas y sus desventajas, por lo tanto la selección del mismo se realizó por estudios realizados en el laboratorio mostrando buenos resultados en otros trabajos (datos no publicados).

El procedimiento para llevar a cabo esta inmovilización consiste en tres etapas globales, la *activación* del soporte, adición del *brazo espaciador* y el *acoplamiento*, técnica fue descrita anteriormente por Ortega-López *et al.* (1993) pero fue estandarizada para las enzimas utilizadas en el grupo de trabajo por Santiago-Hernández (comunicación personal) y reportada por Amaya-Delgado *et al.* (2006), Calixto-Romo *et al.* (2008):

Activación:

1. A 1g de Nylon 6 adicionar 10 mL de glutaraldehído (9.25%) en amortiguador de boratos 0.2 M pH 9 a 70 °C con agitación por 20 minutos. Realizar de una serie de lavados con agua destilada por filtración (100 mL).

Brazo espaciador:

2. Incubar el Nylon-6 en 5 mL de Polietilenglicol al 5% en amortiguador de boratos por 3 horas en agitación a 25 °C. Transcurrido el tiempo hacer lavados por filtración con agua destilada.
3. Reactivar el Nylon en amortiguador de acetatos 0.05 M pH 5.5 con 0.4 mL de glutaraldehído al 1% durante 15 minutos a 25 °C. Pasado este tiempo, se realizaron lavados por filtración con agua destilada

Acoplamiento:

4. Adicionar 10 mL de solución enzimática (INVA_{AOX1} o INVB_{AOX1}) con concentración conocida de enzima (se recomiendan 10 mg de enzima purificada) en amortiguador de acetatos 0.05 M, 20 mM KCl, 10 mM MgCl, 5 mM de cisteína y 5% glicerol, pH 5.5 a 4°C por un periodo de 16 horas sin agitación.
5. Centrifugar el inmovilizado a 14,000 rpm por 15 minutos, resuspendiendo la pastilla en amortiguador de acetatos 0.05 M, pH 5.5.
6. Medir la cantidad de proteína presente en el sobrenadante y en la suspensión del inmovilizado enzima-Nylon por método de Lowry (Ver. Sección 6.5.1.1) y la actividad enzimática por el método de cuantificación de azúcares reductores liberados, utilizando DNS (Ver. Sección 6.3.2.3).
7. Medir la eficiencia de inmovilización mediante el factor de eficiencia ($F\varepsilon$) el cual se define como (Amaya-Delgado *et al.* 2006):

$$F\varepsilon = \frac{A_i}{A_o - A_e}$$

Donde:

A_i= Actividad enzima libre

A_o= Actividad enzima inmovilizada

A_e= Actividad enzima residual

8. Utilizar la suspensión de enzima inmovilizada-Nylon para determinaciones de parámetros cinéticos, bioquímicos y efecto de iones metálicos y EDTA.

Estabilidad operacional:

Esta etapa se refiere al número de reúsos que es capaz de tener la enzima inmovilizada en el soporte, la cual se determina pasando una cantidad específica de solución de sacarosa, el procedimiento que se sigue se describe a continuación.

1. Medir el volumen del empaque (Enzima inmovilizada) y el volumen aproximado de tuberías (mangueras y accesorios) dado que este es el “volumen muerto” antes de que la enzima empiece a llevar a cabo su catálisis.
2. Equilibrar la columna con amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 (o el amortiguador bajo el cual trabaja la enzima), aproximadamente 15 mL.
3. Pasar solución de sacarosa al 10% (25 mL) dejando correr primero el “volumen muerto” antes de coleccionar la fracción que corresponde al hidrolizado.
4. Medir actividad enzimática de la solución hidrolizada (Ver. Sección 6.3.2.3) el cual será el tiempo 1 (el tiempo cero y el 100% de actividad debe medirse antes de empacar la enzima en la columna).
5. Lavar la columna con 3 volúmenes de amortiguador de acetatos.
6. Todo esto se realizó a temperatura ambiente (25 °C) pero puede realizarse a la temperatura óptima de la enzima para aumentar eficiencia.
7. Guardar la columna a 4 °C o seguir midiendo los subsecuentes reusos hasta que la actividad enzimática llegue al 50%.

6.7.1.2 Soporte: Quitosano.

La glicosilación en enzimas no sólo puede darle estabilidad, resistencia hacia altas temperaturas o inactivación por proteólisis (esto puede ser en sus condiciones normales de operación o en presencia de surfactantes y sustratos caotrópicos), sino que en ocasiones ésta puede ser una ventaja para llevar la inmovilización (Gómez *et al.* 2006).

La inmovilización modificando los grupos funcionales de los carbohidratos es una estrategia que puede proteger el sitio activo de la glicoproteína, el cual se localiza generalmente como grupo funcional de la proteína, el tipo de unión es de tipo covalente pero en grupos no esenciales de la proteína, que son los grupos glicosilo que forman parte de la glicosilación de la enzima.

Sin embargo esta técnica no siempre es 100% eficiente, debido a que en ocasiones la enzima inmovilizada pierde actividad debido a modificaciones en el sitio activo como consecuencia de la formación de enlaces o cambios conformacionales (Melo y D'Souza 1991). Una vez que se lleva a cabo la modificación de los grupos en los glúcidos lo siguiente es unirla a un soporte.

Dada la gran cantidad de soportes con los que actualmente se cuenta para llevar a cabo los procesos de inmovilización es difícil la selección de soportes apropiados y que tengan buenos resultados. Entre la nueva generación de soportes se encuentran los biopolímeros, siendo uno de ellos el quitosano el cual proviene de la N-desacetilación de la quitina, el segundo biopolímero más abundante de la naturaleza (después de la celulosa) y que puede ser obtenido de desechos de crustáceos o algunos moluscos como el calamar por métodos químicos y/o enzimáticos.

Entre las ventajas que posee este biopolímero se encuentran las siguientes (Klein *et al.* 2012):

- ✦ Alta afinidad por la proteína.
- ✦ Hidrofobicidad.
- ✦ Buena compatibilidad.
- ✦ Reduce la interacción no específica.
- ✦ Resistencia a degradación química.
- ✦ Propiedades antibacteriales.
- ✦ Fácil preparación para tener diferentes formas físicas.

El quitosano ocupado para estos primeros estudios fue proporcionado amablemente por la Dra. Keiko Shirai Matsumoto, de la UAM-I. El quitosano antes mencionado fue obtenido de cangrejo y con peso molecular medio (75-85% desacetilación).

Se siguieron diferentes métodos para la incorporación de las enzimas recombinantes a quitosano, sin embargo el método con el que mejor resultados se obtuvo fue siguiendo el procedimiento descrito por Hsieh *et al.* (2000), con ligeras modificaciones, tal como se describe a continuación:

1. Mezclar 10 mg de invertasa recombinante purificada en 10 mL de amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.0 con 1 mL de periodato de sodio 30 mM con agitación constante a 4 °C durante 5 horas (este tiempo puede cambiar de 3 a 6 horas).
2. Posterior a este tiempo, adicionar 200 µL de etilenglicol, dejando la reacción a 4 °C por 40 minutos (este tiempo también puede variar de 30 a 40 minutos).
3. Pasado este tiempo, dializar la mezcla en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.0 durante 18 horas.
4. Finalizado el dializado, adicionar 1 g de quitosano (disuelto en ácido acético 3% v/v) y dejar en agitación suave durante toda la noche (12-16 horas) a 4 °C.
5. Centrifugar a 8500 rpm durante 15 minutos a 4 °C y se mide la actividad invertasa en el sobrenadante y en la suspensión de enzima-Quitosano así como la cantidad de proteína por la técnica de Lowry (Ver. Sección 6.3.2.3 y 6.5.1.1).

6.7.1.3 Soporte: Perlas de quitosano.

El quitosano tiene una naturaleza catiónica, esto le permite realizar interacciones electrostáticas con glucosaminoglicanos catiónicos y otras moléculas de carga negativa.

Es por ésta razón que el glutaraldehído, agente entrecruzador, es empleado para unir los grupos amino libres del quitosano con la enzima. El procedimiento utilizado fue descrito por Kumari y Kayastha (2011) con pequeñas modificaciones.

El método consiste en tres etapas principales: *Formación de perlas, activación e inmovilización.*

Formación de perlas:

1. Formar una mezcla homogénea con 1.5% de quitosano en 1.5% de ácido acético agitando a 45 °C.
2. Utilizando una jeringa de 1 mL, adicionar por goteo la solución de quitosano del paso anterior en solución de coagulación (1M de KOH).
3. Agitar por 2 horas a temperatura ambiente para obtener las partículas.
4. Filtrar con agua destilada las perlas obtenidas hasta neutralidad en el filtrado.

Activación:

5. Activar perlas del paso 4 con solución de glutaraldehído al 2% dejando la reacción por 3 horas a temperatura ambiente.
6. Lavar las perlas del paso anterior con amortiguador de acetato de sodio 50 mM pH 5.5 de dos a tres veces para eliminar el glutaraldehído.
7. Las perlas activadas se pueden almacenar a 4 °C en amortiguador Tris 50 mM al pH óptimo de la enzima.

Inmovilización:

8. Incubar las perlas activadas con 10 mg de la enzima purificada durante 24 horas a 4 °C con agitación las primeras 2 horas.
9. Las perlas se lavan de 4 a 5 veces para remover la proteína que no se unió.

6.8 Estudios de actividad fructosiltransferasa (transfructosilación) en $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$.

Como se ha mencionado anteriormente, algunas invertasas tienen la capacidad de utilizar la sacarosa y formar polímeros denominados fructooligosacáridos (FOS) y esto incluye algunas invertasas producidas por plantas principalmente como *Allium cepa*, *Sorghum bicolor* y *Brachypodium distachyon*.

Existe una amplia gama de organismos que se han reportado son productores de enzimas con actividad FT se ellos encuentran ascomicetos como: *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus niger*, *Aureobasidium pullulans*; basidiomicetos como: *Cryptococcus laurentii*, oomicetos como: *Phytophthora parasitica*; levaduras como: *Schwanniomyces occidentalis*, *Saccharomyces cerevisiae* y bacterias como: *Lactobacillum reuteri*, *Paenibacillus polymyxa*, *Streptococcus mutans* y *Gluconobacter diazotrophicus* entre otros (Hankin *et al.* 1980, Farine *et al.* 2001, Martínez- Fleites *et al.* 2005, Dudikova *et al.* 2007, Goosen *et al.* 2007, Alvaro-Benito *et al.* 2007, 2012, Antosova *et al.* 2008, Chuankhayan *et al.* 2010, Guilarte *et al.* 2010).

Z. mobilis es capaz de producir dichos FOS como son: nistosa, 1-ketosa, 6-ketosa y neoketosa (Hernalsteens *et al.* 2010) y esta actividad se ha atribuído exclusivamente a la levansacarasa que secreta esta bacteria dado que en estudios previos no se detectó dicha actividad para las dos invertasas (Yanase *et al.* 1995).

Las invertasas con actividad de fructosiltransferasa (FT) se caracterizan por poseer alta tolerancia a sacarosa y al medir los productos de hidrólisis, la relación glucosa y fructosa no es equimolar, esto se debe a que los residuos de fructosa se transfieren a otra sacarosa para empezar la síntesis de fructanos (**Figura 15**).

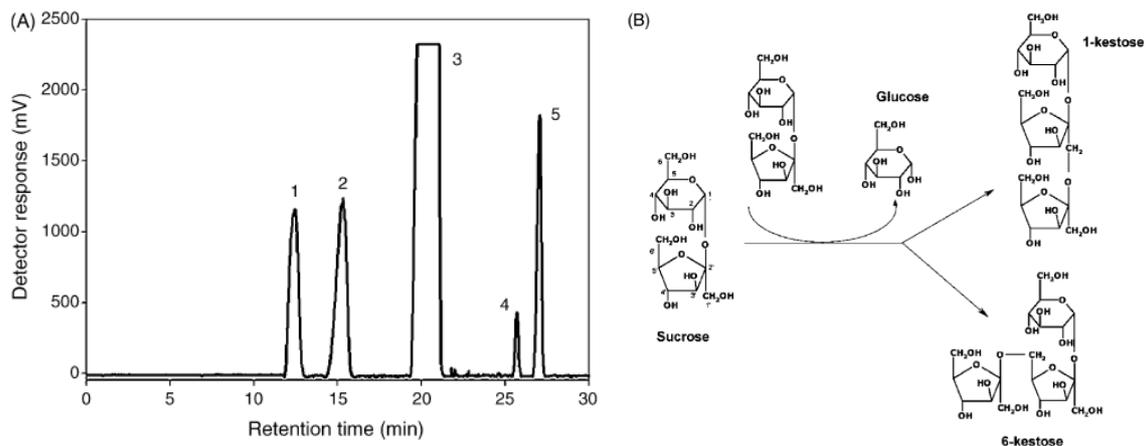


Figura 15. Detección y mecanismo de reacción de fructooligosacáridos. (A) Cromatograma obtenido mediante HPLC correspondiente a la reacción de hidrólisis de sacarosa y formación de fructooligosacáridos de *Sw. occidentalis* (1) fructosa, (2) glucosa, (3) sacarosa, (4) 1-kestosa, (5) 6-kestosa. (B) Reacción de transfructosilación (Alvaro-Benito *et al.* 2007).

El mecanismo enzimático es una unión covalente de un intermediario enzima-glicosil, el cual libera glucosa mientras que la fructosa se queda unida a la enzima. En el caso de la hidrólisis de invertasas, requiere la liberación de la fructosa por una reacción en presencia de agua (Ritsema *et al.* 2006).

Esas reacciones han sido descritas de manera extensiva en plantas, determinando que filogenéticamente las FTs evolucionaron de las invertasas vacuolares por lo tanto existe una región altamente conservada.

Esta región consta de un mini-exón de 9 pb que codifica para tres aminoácidos (DPN) los cuales constituyen parte del fragmento **WMNDPNG** que determina la especificidad del sustrato. Este exón es muy conservado en algunas FTs e invertasas.

Si en esta secuencia se encuentra una Asp/Arg (D/R) entonces la sacarosa funciona como sustrato donador. Por otro lado, si tiene una Ser/Asn (S/N) en ésta posición, se sugiere que la sacarosa no es utilizado como sustrato donador (Cortes-Romero *et al.* 2012).

Otros autores mencionan que la caja de unión a sacarosa tiene una secuencia diferente a la descrita anteriormente, siendo esta más específica debido a que el nucleófilo debe de estar presente en el loop N-terminal y en la primer hoja β . La caja de unión de actividad FT es la siguiente: H-[FY]-[QR]-[PT]-X-X-[HNY]-[FY]-[IMQ]-[NSAYG]-D-P-[NDS]- [GA] .

Mientras que para las invertasas la caja de unión es: H-F-Q- [PT]-X-X-[MN]-W-M-N-D-P-N- G. Un cambio en la secuencia de aminoácidos puede implicar que las invertasas no tengan actividad FT (Ritsema *et al.* 2006).

6.8.1 Análisis de la estructura primaria de INVA e INVB en *Z.mobilis*.

Tomando en cuenta lo anterior se realizó un análisis *in silico* por medio de un alineamiento múltiple de invertasas de la familia GH32 que se conocen poseen la actividad de transfructosilación y algunas levansacarosas (Familia GH68) debido a que la invertasa extracelular de *Z. mobilis* presenta alta homología con levansacarosas, el alineamiento múltiple se realizó con las siguientes invertasas:

	CÓDIGO
🌩 INVA <i>Zymomonas mobilis</i>	(SCR_ZYMMO)
🌩 INVB <i>Zymomonas mobilis</i>	(INVB_ZYMMO)
🌩 SACB <i>Zymomonas mobilis</i>	(SACB_ZYMMO)
🌩 INV vacuolar <i>Brachypodium distachyon</i>	(C6KFA0_BRADI)
🌩 INV <i>Allium cepa</i>	(O81083_ALLCE)
🌩 INV soluble ácida <i>Sorghum bicolor</i>	(D3U5C0_SORBI)
🌩 Fructosiltransferasa <i>Lactobacillum reuteri</i>	(Q683P2_LACRE)
🌩 Fructosiltransferasa <i>Paenibacillus polymyxa</i>	(Q45372_PAEPO)
🌩 Levansacarasa <i>Streptococcus mutans</i>	(SACB_STRMU)

Para este fin se consultaron secuencias de aminoácidos mediante la base de datos Uniprot y se utilizaron dos programas de libre acceso disponibles en Expsy denominados: Network Protein Sequence Analysis (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_multalin.html) y TCOFFE (<http://tcoffee.vital-it.ch/apps/tcoffee/index.html>).

6.8.2 Determinación de productos de hidrólisis.

Las condiciones para la producción de FOS son muy variables siendo algunos factores importantes a considerar:

- ✍ Concentración de sacarosa. Con un rango de 0.25 a 2 M.
- ✍ Temperatura y amortiguador de mezcla de reacción. Las cuales no siempre es la temperatura óptima de la enzima.
- ✍ Tiempo de incubación en la mezcla de reacción. Teniendo un tiempo desde 30 minutos hasta 3 días. Aunque algunos autores reportan que los tiempos deben ser tempranos debido (en el caso de que tengan actividad hidrolasa).
- ✍ Inactivación de la enzima. Usualmente se pone a ebullición o se trata con NaOH.

Por otro lado existen diferentes formas de medir la presencia de FOS producidos por FTs, entre los métodos más empleados se encuentra la cromatografía de capa fina (TLC) y HPLC, en este trabajo se estandarizó un método para identificar los productos de hidrólisis: glucosa y fructosa con el objetivo de detectar diferencias en la concentración de estos y con ello, posible actividad de FT.

La reacción para determinar los productos de hidrólisis de ambas invertasas se llevó a cabo de la siguiente forma (Chen *et al.* 2011, Batista-Fialho *et al.* 2013):

1. Mezclar 50 μL de cada invertasa, 150 μL amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 y 300 μL solución de sacarosa 1 M, a temperatura ambiente, con agitación de 650 rpm durante 30 minutos, 1 hora, 2 horas, 12 horas, 16 horas, 24 horas y 48 horas, tomando una alícuota de 40 μL
2. Pasados estos tiempos inactivar la muestra hirviendo (o a 90 $^{\circ}\text{C}$) durante 5 minutos, este tiempo puede ser variable dependiendo de la enzima, para las invertasas recombinates este fue el tiempo óptimo.
3. Realizar una dilución 1:500 de las muestras inactivadas e inyectar a HPLC.
4. El tipo de columna utilizada es: RPM-Monosaccharide Pb^{+2} (8%), 300x7.80 mm, con una temperatura la columna 68 $^{\circ}\text{C}$, Flujo de 0.6 mL min^{-1} , fase móvil agua desionizada, utilizando un detector de índice de refracción.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Expresión de las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* en *P. pastoris* mediadas por el promotor AOX1.

7.1.1 Vector de expresión pPICZαA.

7.1.1.1 Obtención de construcciones pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*.

Se obtuvo el ADN plasmídico (Ver. Sección 6.3.1.1.1) de las construcciones *pGAPZαA-invA* y *pGAPZαA-invB* mediadas por el promotor fuerte GAP (Gliceraldehído 3 fosfato) a partir de clonas de *E. coli* JM109. Se comprobó los tamaños de las construcciones y liberación de inserto mediante *EcoRI* y *SacII* en ambos casos y la concentración del vector de expresión (pPICZαA) mediante gel de agarosa (Ver anexo), como se muestra en la siguiente figura:

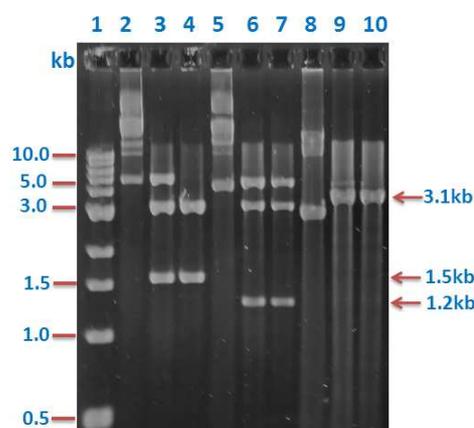


FIGURA 16. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones a partir del ADN plasmídico de: pGAPZαA-*invA*, pGAPZαA-*invB* y pPICZαA. Carril 1: Marcadores de tamaño molecular. **Carriles 2, 5 y 8:** pGAPZαA-*invA*, pGAPZαA-*invB* y pPICZαA sin digerir. **Carriles 3, 6 y 9:** Digestiones con *EcoRI* y *SacII* de vectores pGAPZαA-*invA*, pGAPZαA-*B* y pPICZαA. **Carriles 4, 7 y 10:** Digestiones con *SacII* y *EcoRI* de vectores pGAPZαA-*invA*, pGAPZαA-*invB* y pPICZαA.

Los carriles 2 y 5 correspondieron al peso esperado del vector de expresión con el promotor constitutivo (3.1 kb) más las invertasas intra (1.5 kb) o extracelular (1.2 kb).

En los carriles 3-4 y 6-7 se comprobó la liberación de ambos fragmentos, indistintamente digiriendo primero con EcoRI o con SacII (**Figura 16**). Ambos fragmentos digeridos fueron limpiados con fenol (Ver. Sección 6.3.1.3) de igual forma que el vector pPICZαA digerido con las mismas enzimas (**Figura 16** carril 9 y 10)

Como control positivo de purificación y de digestión se utilizaron los productos de PCR obtenido a partir de ADN plasmídico de las construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* los pares de oligonucleótidos GVIII-GVII (*invA*) y CVIII-CIX (*invB*). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 17**.

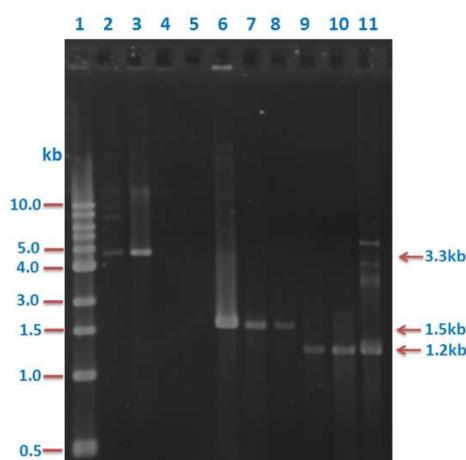


Figura 17. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de ORF's *invA* e *invB* digeridos con EcoRI y SacII a partir de ADN plasmídico de las construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* y comprobación por PCR de presencia de insertos en las mismas construcciones. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. **Carril 2 y 3:** ADNp pPICZαA digerido con EcoRI y SacII. **Carril 4 y 5:** PCR a partir de ADNp de vector pPICZαA utilizando los GVIII y GVII (control negativo). **Carril 6 y 11:** PCR a partir de ADNp de construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* (control positivo) utilizando los GVIII y GVII (*invA*) y CVIII y CIX (*invB*). **Carril 7-8 y 9-10:** ORF's de *invA* e *invB* purificados y digeridos con EcoRI y SacII.

Con los fragmentos digeridos y purificados (**Figura 17**), se realizó la ligación de cada gen en el vector pPICZαA utilizando la T4 ADN ligasa (Ver. Sección 6.3.1.6) y se transformaron células de *E. coli* DH5α mediante choque térmico (Ver. Sección 6.3.1.7.1.1) utilizando como marcador de selección zeocina a una concentración 25 µg mL⁻¹.

De las todas las transformantes obtenidas se aislaron 6 y 10 transformantes de *E. coli* DH5 α con las construcciones pPICZ α A-*invA* y pPICZ α A-*invB* respectivamente y se extrajo su ADNp (Ver. Sección 6.3.1.1.1) para comprobar por análisis de digestión la presencia de ambos insertos, utilizando las enzimas EcoRI y SacII conforme lo mostrado en las **Figura 15** y **Figura 16** respectivamente. De igual forma se seleccionaron y aislaron 8 clonas de *E. coli* transformadas con el vector pPICZ α A sin insertos, como control negativo de presencia de los ORF de *invA* e *invB* (**Figura 18**).

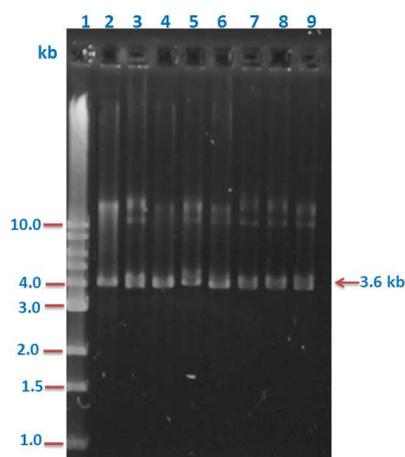


Figura 18. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con EcoRI y SacII de clonas de *E. coli* DH5 α con el vector pPICZ α A sin inserto. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2-9:** Clonas C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7 y C8 sin insertos.

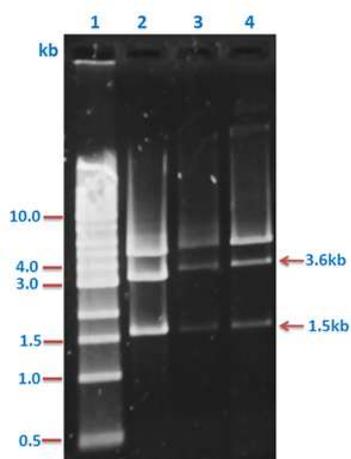


Figura 19. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con EcoRI y SacII para liberación de inserto de clonas de *E. coli* DH5 α con la construcción pPICZ α A-*invA*. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2 y 4:** Clonas A1, A2 y A4 con la construcción pPICZ α A-*invA*.

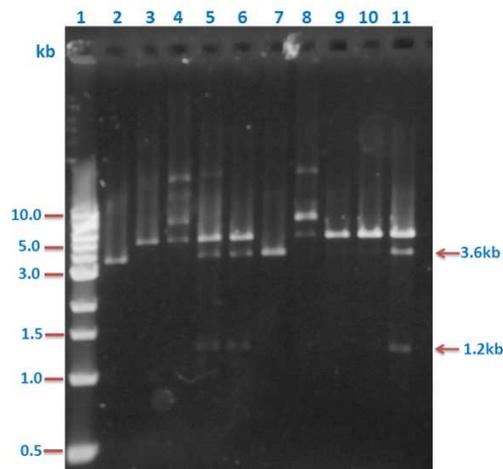


Figura 20. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con *EcoRI* y *SacII* para liberación de inserto de clonas de *E. coli* DH5 α con la construcción pPICZ α A-*invB*. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2-11:** Clonas B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 y B10 con la construcción pPICZ α A-*invB*.

De acuerdo a lo que se muestran en la **Figura 18** ninguna de las clonas con el vector pPICZ α liberan los fragmentos *invA* o *invB* al hacer la digestión con *EcoRI* y *SacII*. Por otro lado, de las 6 clonas de *E. coli* DH5 α con la construcción pPICZ α A-*invA* sólo 3 clonas liberaron el ORF de la invertasa intracelular proveniente de *Z. mobilis*, denominadas A1, A2 y A4 (**Figura 19**). Así mismo, de 10 transformantes de *E. coli* conteniendo la construcción pPICZ α A-*invB*, las clonas B4, B5 y B10 liberaron el fragmento de 1.5 kb correspondiente a la invertasa extracelular de *Z. mobilis* (**Figura 20**).

7.1.1.2 Análisis de construcciones pPICZ α A-*invA* y pPICZ α A-*invB*.

La etapa final de esta parte consistió en un análisis de secuenciación del Sitio múltiple de clonación (MIC) de ambas construcciones para asegurarnos que no existiera alguna mutación en los marcos de lectura abiertos y que posteriormente afectara la funcionalidad de las proteínas transcritas.

Con éste propósito se diseñó un oligonucleótido interno a partir de secuencia del vector pPICZ α A para tener una secuencia de empalme entre el vector y los ORFs de ambos genes (Ver Anexo. Tabla de oligonucleótidos. Oligo 45).

ATAAGGAACGGCGTAGAATTATACGACACTTGAGAGACAAAAACAACCTAATTATTGAAACGATGAG
 ATTTCTTCAAACCTTACTGCTGTTTTATTCGCGAGCATCTCCGCATTAGTGTGCCCAAGTCAACTACAA
 CAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGATTTG
 GATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGTTATTGTTTATAAACTACTATTGCCA
 GCATTGCTGCTAAAGAAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCATCGATGAATTGATG
 GAATCCCCCTTTATAAAAATTAATCAAGCCGAGGATGCACAGAAAAAGCTGGAAAAACGGCTTCTA
 TCTTCTGAATGGTATCTGGATTCATGTAACGCCTTAACTGGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTG
 ATTTTTTCAAGGGGGAATACCATCTTTTTATCAACTATCTTTTTGACCTGTCTGGGGCCGATGC
 ATTGGGGACATCGGAAAAGCCGTGATTTAGTTCAATGGGAAACTCCCTGTTGCCCTTGTCCAGGGG
 ATTCATTTGATCGCGACGGCTGTTTCTCAGGATGCGCTGTGATAATAITGGCGTTTTGACTCTGATCTA
 TACGGGGCATATGTTTTATCAACGATAGCCCTGATGCCATTCGTGAAGTGCAGTGTATGGCGACAAG
 CATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGCATCGCTTGAAAAAGCACCCATGCCACAGGTGCGCCA
 TTTCAGAGACCTCGCTTTTGAAGGAGAATGACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAACAGATG
 ATAAGAAACATCAAGGAATCGGACATGCTGCTTATACAGAACGAAAAATCAAAAAACTGGATTTTTGT
 CAAACTGCTGGGGGAaAATTCTCAATTACCGCTGAAAAACGGTCTTGATTAGATCTAGCAGACCG
 GTCTTCTCaAAGTGCCAACTTGAACCTGtGGAAcAGTCATGTCaAAGGCTCAAACTCAATGATGATG
 ATGATGATGGTcGACGGGCTATTcAGATCTCTTCTGcGATGAGTTTTTGTCTAtAATACAGGCATC
 GCTTGAAAAAGCGGCTAGATTAcCATCTGTAATGTCCATCTCTaAAAAGAATCAAAAAACGGCATAGCC
 TTCGATAtCGAATAAACGGCCTTaAAGGCTGTCCTTATCGGGAAATATTCGACTACTTATGCTGTAGAG
 CCTTGGGTCTGATCATCGCCGACAAAAATTTCTATAcATGATCGGTCAAGGAATATATGCAAGTcGCTT
 TGGAGGTGTTGGAAAGCGGACAGCTTCaAATCCCTTTTACATTTTGCCCGGAGCGATTTGGTCAAGAA
 TgcTACGATTCTGGCTTCTATCGATATAAAGAAGCGTTTTCTGCCCTTGGCATTACAGCGCAAAGCCAA
 ACCAGCTTGATAAGCATTGCTTTTTTCCAAGTCAAAGATCAGCTCTATTTCTTGcAGGGGAGAGTCCATC
 GAAAAGGGATGCTCGGCATCGAAAGCGTTACGACAGATTCAATTTTTCCGATTGTCGTAATAATCTCC
 ATTTCTCaAACAGGGCTATCACAATTTATTTATCAATTAATCAAGCTTGCGGGGCAACGTCATACAGC
 CAGCCCATCCATCTCGTTGGGCTGGGTTTTTgTTTTCCACATATCAAAACATGCAATTAATATTTGtCG
 ACCATCTTTAGCTTCAAACGTTGTGCTGCATAGAAATCATGACCATAGTCTAGTCTTGGAAAGGATGTTT
 CCGGGGAATTAAGCTTGCCATTTCAAATATCGCGGCGGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCAT
 CTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACATCATCATCATCATTTGAGTTTGTAGCCTTAGACA
 TGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTA

Figura 21. Análisis por secuenciación del MIC de la construcción pPICZaA-*invA* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* A1. Sombreado amarillo: Secuencia de nucleótidos del fragmento pre-pro del factor alfa de secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo **Sombreado en verde:** Sitios de restricción EcoRI y SacII **Sombreado en azul:** Secuencia nucleótidos correspondientes al epítopo c-myc **Sombreado en morado:** Secuencia codificante a la cola de poli-histidinas **Letras en morado:** Marco de lectura abierto de la invertasa intracelular de *Z. mobilis*.

Conforme a lo mostrado en la **Figura 21**, no hubo corrimiento del marco de lectura del gen de la invertasa intracelular. Sin embargo, algunos nucleótidos (letras en minúsculas) fueron diferentes a la secuencia virtual que se tiene en bases de datos (P0DJA7|SCR_ZYMMO Sucrose-6-phosphate, UNIPROT <http://www.uniprot.org/>), como se muestra en la **Figura 22**:

```

atgagatttccttcaatccttactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgcc
M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
ccagtcaactacaacagaagatgaaacggcacaattccggctgaagctgtcatcggg
P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
tactcagatttagaaggggatttcgatggttgctgttttgccattttccaacagcacaat
Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N
aacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggta
N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V
tctctcgagaagagagaggctgaagcattcgat
S L E K R E A E A S

```

Figura 22. Análisis de la secuenciación ORF del gen *invA* de *Z. mobilis* en la pPICZαA-*invA* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* A1. Sombreado amarillo: Triplete donde se localizan los nucleótidos modificados **Letras rojas: Nucleótidos específicos que fueron modificados.**

Sin embargo a pesar de que estos nucleótidos fueron diferentes a los reportados en las bases de datos, el triplete donde están contenidos codifican al mismo aminoácido, por lo que pueden ser considerados como mutaciones silenciosas realizadas por *E. coli* y que no afectan la funcionalidad de la proteína resultante o variaciones del gen entre una cepa de *Z. mobilis* y otra.

Realizando un alineamiento múltiple utilizando el programa Clustal W (<http://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>), podemos observar que existe una similitud con otras secuencias depositadas en las bases de datos electrónicas de 95% como se muestra en la **Figura 23**.

```

VIRT5148                                MESPSYKNIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    MESPSYKNIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                MESPSYKNIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
*****

VIRT5148                                KGEYHLFYQYYPFAPVWGFPMHWGHAKSRDLVHWETLFWALAPGDSFDRDG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    KGEYHLFYQYYPFAPVWGFPMHWGHAKSRDLVHWETLFWALAPGDSFDRDG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                KGEYHLFYQYYPFAPVWGFPMHWGHAKSRDLVHWETLFWALAPGDSFDRDG
*****

VIRT5148                                CFSGCAVDNIGVLTLYTGHIVLSNDSFDAIREVQCMATSIDGIHFQKEG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    CFSGCAVDNIGVLTLYTGHIVLSNDSFDAIREVQCMATSIDGIHFQKEG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                CFSGCAVDNIGVLTLYTGHIVLSNDSFDAIREVQCMATSIDGIHFQKEG
*****

VIRT5148                                IVLEKAFMPQVAHFRDPRVWKENDHWFVVGYRTDDKKHQGIGHVALYRT
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    IVLEKAFMPQVAHFRDPRVWKENDHWFVVGYRTDDKKHQGIGHVALYRS
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                IVLEKAFMPQVAHFRDPRVWKENDHWFVVGYRTDDKKHQGIGHVALYRS
*****

VIRT5148                                ENLKDWFLSKTLGDNSQLPLGKVLFRSSRPVFFSLGNRSVLMFSPQGLK
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    ENLKDWFVFKTLGDNSQLPLGKRAFMEWCPDFSLGNRSVLMFSPQGLK
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                ENLKDWFVFKTLGDNSQLPLGKRAFMEWCPDFSLGNRSVLMFSPQGLK
*****

VIRT5148                                ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPESTFQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPESTFQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPESTFQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
*****

VIRT5042                                RQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    RQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
sp|P0DJA7|SCR_ZYMAO                    RQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                RQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
*****

VIRT5042                                KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
sp|P0DJA7|SCR_ZYMAO                    KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
*****

VIRT5042                                SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRIFFDKDSLKGRLEFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRIFFDKDSLKGRLEFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
sp|P0DJA7|SCR_ZYMAO                    SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRIFFDKDSLKGRLEFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRIFFDKDSLKGRLEFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
*****

VIRT5042                                DANLAAFSSDAC
sp|F8DVG5|SCR_ZYMAA                    DANLAAFSSDAC
sp|P0DJA7|SCR_ZYMAO                    DANLAAFSSDAC
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMAN                DANLAAFSSDTC
*****

```

Figura 23. Alineamiento múltiple de la secuenciación del ORF del gen *invA* de *Z. mobilis* en la pPICZαA-*invA* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* A1. VIRT5042 corresponde a la secuencia del gen *invA* en el vector de expresión, mientras que las otras secuencias corresponden a otros genes de invertasas intracelulares provenientes de cepas diferentes de *Z. mobilis* estudiada en este trabajo.

De igual forma que para el gen *invA* subclonado en el vector pPICZαA se realizó el análisis de secuenciación para el ORF de *invB*, resultados que se muestran a continuación:

NNNTAAGACAAATTTCCCGTACGATTCTACGACACTTGAGAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAAC
 GATGAGATTTCTTCAACTTTTTACTGCTGTTTTATTGCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAAC
 ACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATCCGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGG
 GGATTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTCCAACAGCACACATAACGGGTTATTGTTATAAATACTACTA
 TTGCCAGCATTTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCaTCGATGAA
 TCGATGTTAATTTAATGCCAGTCGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGTGAATAAATTTGATTTGA
 CGACCTATGCGCGAAATCGGCACTGATTTTCCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTT
 GGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTACGCTTAAAGGCTGGAATGTTATTTCTTTGGTCCG
 TGACCGCAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGGCTATTTCTATTCCAAGATGGT
 AAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATCGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGGTCGG
 GCGGCACGATTATGGCACCCGGTTCCTCCGTAATCAGGTCGAAACCTTTTACCTCGACTTTATTTCGAT
 CAAGATGGCGTCAGAAAAACCCGTTGCTGCTGTACGAAATGGCCGATTTTGGGATAGCTGAAGG
 CGTTTGGGTCCAAGGGTTTTGTACCAAGTACCGGATATCGTTTCAGGCTGATGGGCTGTTTCAACACAA
 ATAATGCAAAAAAFGATCCCTGGGAATTTCCGGGATCCTACAGGCTATCCCTCAATCCCTGAAGATG
 GATGAGACATTTGTTTTGTTCAAAAAACCAAGGTTGACCTGTCCAGTGAAAAAAGAATAAAGCA
 AGGATAATATGTGCCACTGTCCAGCCAGACNTCATATGATCAGCGAGTCACATGCGATGCGAGTGAAT
 AAATTTGATTGACGACCTCTATGCCGAAATCGGCACTGATTTTCCATTATGCGTGATGACTTGTGGC
 TGTGGGATACTTGGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTACGCTTAAAGGCTGGAATGTTATTT
 TCTCTTGGTCTGCTGACCGCAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGGCTATTCTA
 TTCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGG
 CAGAATGGTCCGGCGGCACGATTATGGCACCCGGTTCCTGTAATCAGGTCGAAACCTTTTACCTCGA
 CTTTATTCGACAAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGTGTACGAAAAGGCCGCAATTTATGCGGAT
 AGTGAAGGCGTTTGGTCAAGGGTTTTGACCAGTCAACGGATTGTTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTAT
 CGGCGGCCCGCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCAT
 CATCATCATCATCATGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTACGAGA
 AGACCGGTCTGCTAGATTTAACGTAG

Figura 24. Análisis por secuenciación del MIC de la construcción pPICZαA-*invB* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* B4. Sombreado amarillo: Secuencia de nucleótidos del fragmento pre-pro del factor alfa de secreción de la proteína recombinante al medio de cultivo **Sombreado en verde:** Sitios de restricción EcoRI y SacII **Sombreado en azul:** Secuencia nucleótidos correspondientes al epítopo c-myc **Sombreado en morado:** Secuencia codificante a la cola de poli-histidinas **Letras en azul:** Marco de lectura abierto de la invertasa extracelular de *Z. mobilis*.

Conforme a lo mostrado en la **Figura 24**, no hubo corrimiento del marco de lectura del gen de la invertasa extracelular, sin embargo, algunos nucleótidos fueron diferentes a la secuencia virtual que se tiene en bases de datos (P0DJ44|INVB_ZYMMO Extracelular sucrase, UNIPROT), como se muestra en la **Figura 25**.

```

atgagatttccttcaactttttactgctgTTTTATTGCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCT
M R F P S T F Y C C F I R S I L R I S C
tccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaatttccggctgaagctgtcatcgg
S S Q H Y N R R E N G T N S G A S C H R
ttactcagattttagaaggggatttccgatgTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAA
L L R F R R G F R C C C F A I F Q Q H T
taaagggttattgTTTTATAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGT
N R V I V Y K Y Y C Q H C C E R R R G
      ↓
atctctcgagaagagagaggctgaagcatcgat
I S R K E R G L A I D
  
```

Figura 25. Análisis de la secuenciación del ORF del gen *invB* de *Z. mobilis* en la pPICZαA-*invB* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* B4. Sombreado amarillo: Triplete donde se localizan los nucleótidos modificados **Letras rojas:** Nucleótidos específicos que fueron modificados.

En este caso sólo hubo dos nucleótidos diferentes a los reportados en las bases de datos, y de igual forma que con la invertasa intracelular, el triplete donde están contenidos codifican al mismo aminoácido. Al realizar el alineamiento múltiple, podemos observar que existe una similitud con otras secuencias depositadas en las bases de datos electrónicas de 98%, como se muestra en la **Figura 26**.

```

VIRT551                MFNFNASMISE SHAMQVKNKFDLT TSMPEIGTDFFIMRDDLLWLDTWPLRDLINGNPFVSFKG
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  MFNFNASRWTRAQAMKVNKFDLT TSMPEIGTDFFIMRDDLLWLDTWPLRDLINGNPFVSFKG
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   MFNFNASRWTRAQAMKVNKFDLT TSMPEIGTDFFIMRDDLLWLDTWPLRDLINGNPFVSFKG
*****:;:;:*****

VIRT551                WNVIIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGGHLLQESANTRTAEWSGGTIMA
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  WNVIIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGGHLLQESANTRTAEWSGGTIMA
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   WNVIIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGGHLLQESANTRTAEWSGGTIMA
*****

VIRT551                PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGRIYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGRIYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGRIYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
*****

VIRT551                NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGEDDI GEDEIGFVPANTVVPK DAN
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGEDDI GEDEIGFVPANTVVPK DAN
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGEDDI GEDEIGFVPANTVVPK DAN
*****

VIRT551                LCSASIGIARCLSPDRTEWELL PPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLTYLFTI SHDSTYAD
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  LCSASIGIARCLSPDRTEWELL PPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLTYLFTI SHDSTYAD
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   LCSASIGIARCLSPDRTEWELL PPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLTYLFTI SHDSTYAD
*****

VIRT551                GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEP LINGSGLV LGGPASQPT EAYAHYIMNGLVESFINE II
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEP LINGSGLV LGGPASQPT EAYAHYIMNGLVESFINE II
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEP LINGSGLV LGGPASQPT EAYAHYIMNGLVESFINE II
*****

VIRT551                DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAWFVW PFPDRRK
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO  DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAWFVW PFPDRRK
sp|F8DT27|INVB_ZYMA   DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAWFVW PFPDRRK
*****

```

Figura 26. Alineamiento múltiple de la secuenciación del ORF del gen *invB* de *Z. mobilis* en la pICZαA-*invB* obtenida a partir del ADN plasmídico de la cepa de *E. coli* B4. VIRT551 corresponde a la secuencia del gen *invB* en el vector de expresión, mientras que las otras secuencias corresponden a otros genes de invertasas intracelulares provenientes de cepas diferentes de *Z. mobilis* estudiada en este trabajo.

Debido a que se mantuvieron conservadas la mayoría de las secuencias subclonadas en los vectores pICZαA se decidió utilizar las transformantes de *E. coli* DH5α A1 y B4. Para el proceso de transfección de las construcciones en *P. pastoris*.

7.1.1.3 Transformación en *P. pastoris* con los plásmidos pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*.

Las clonas A1, B4 y C2 fueron seleccionadas para extracción de ADN plasmídico a gran escala (Ver. Sección 6.3.1.1.2), con el objetivo de obtener suficiente cantidad de material genético para su introducción en células de *P. pastoris* X-33, debido a que son necesarios de 5 a 10 µg de material genético para una transformación más eficiente (Barral *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006). Una vez obtenido el material genético necesario, se introdujo en la levadura por medio de electroporación (Ver. Sección 6.3.1.7.2) y se seleccionaron las clonas que crecieron en medio YPD (Ver. Sección 6.2.2) suplementado con zeocina (100 µg mL⁻¹).

Las transformantes resultantes fueron aisladas y resembradas en diferentes concentraciones de zeocina, que fueron de 100 a 500 µg mL⁻¹ (Figura 27), debido a que la resistencia a altas concentraciones de zeocina es una manera de detectar eventos de integración múltiple en el genoma de *P. pastoris* (Arjmand *et al.* 2012), y por lo tanto asegurar al menos se encuentre una copia de el gen a expresar en la clona.

Vassileva *et al.* (2001) mencionan que las transformantes con resistencia de 100 µg mL⁻¹ de zeocina generalmente contienen una copia del nuevo cassette integrado en el genoma de *P. pastoris*, y clonas resistentes a 500, 1000 y 2000 µg mL⁻¹ de zeocina tienen 2, 3 y 4 copias, respectivamente. Esto no ocurre en todos los casos, sin embargo es importante la comprobación de integración de las construcciones, ya que es una manera de asegurar que se está expresando la proteína de interés. Otras técnicas que se pueden realizar para comprobar la integración son Southern blot o PCR tiempo real.

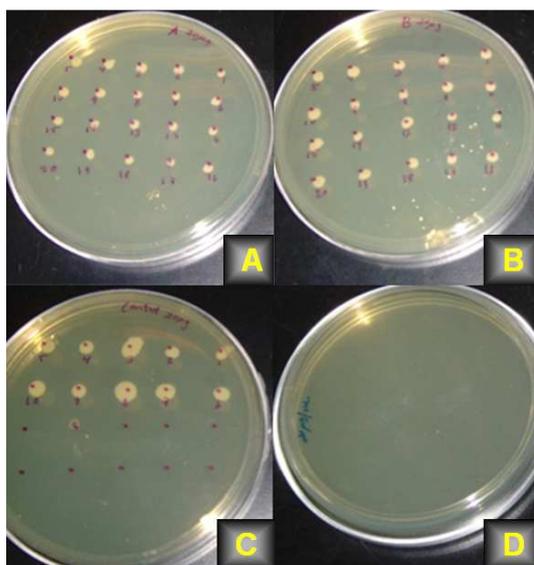


Figura 27. Transformantes aisladas *P. pastoris* X-33 crecidas en medio YPD con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina como marcador de selección. **A.** *P. pastoris* / pPICZ α A-*invA* **B.** *P. pastoris* / pPICZ α A-*invB* **C.** *P. pastoris* / vector pPICZ α A (control positivo) **D.** *Pichia pastoris* X33 sin vector (control negativo).

7.1.1.4 Análisis de transformantes de *P. pastoris* resistentes a zeocina

Posterior a la selección con zeocina, se aislaron 20 transformantes de *P. pastoris* X-33 conteniendo cada construcción y 10 transformantes sólo con el vector pPICZ α A (control negativo de actividad invertasa y presencia de insertos). Se tomaron 5 clonas al azar para análisis de presencia de insertos mediante PCR colonia (Ver. Sección 6.3.1.8.1), así como 2 transformantes que con el vector sin inserto (control negativo), utilizando para este análisis los pares de oligonucleótidos GVIII-GVII (*invA*) y CVIII-CIX (*invB*) (Ver Anexo Tabla de oligonucleótidos).

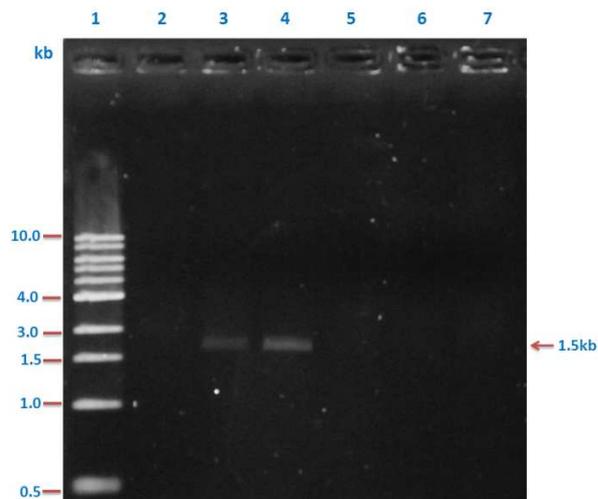


Figura 28. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de PCR colonia de transformantes *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZαA-*invA*, utilizando los oligonucleótidos GVIII y GVII. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2:** (Control negativo de PCR) Clonas C4 conteniendo el vector pPICZαA sin inserto. **Carril 3-7:** Clonas de *P. pastoris* A1, A9, A11, A15 y A18 con el gen *invA* de *Z. mobilis*.

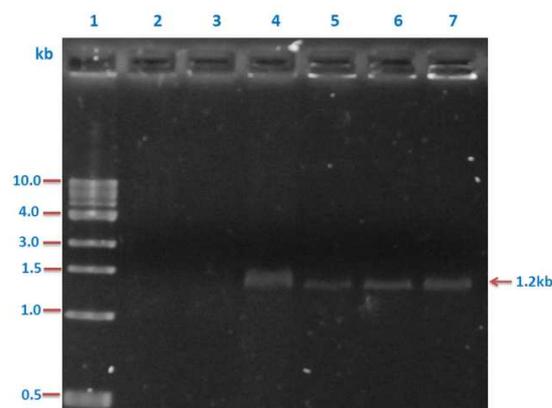


Figura 29. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de PCR colonia de clonas de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZαA-*invB*, utilizando los oligonucleótidos CVIII y CIX. **Carril 1:** Marcador de tamaño molecular. **Carril 2:** Control negativo de PCR C2 conteniendo el vector pPICZαA sin inserto. **Carril 3-7:** Clonas de *P. pastoris* B1, B4, B9, B13 y B18 con el gen *invB* de *Z. mobilis*.

En las **Figura 28** corroboramos la presencia del gen *invA* en 2 de las 5 transformantes de *P. pastoris*, las cuales fueron A1 y A9 analizadas por PCR de colonia. Por otro lado para las cepas de *P. pastoris* con la construcción pPICZαA-*invB*, se detectó la presencia del gen *invB* en 4 de las 5 clonas analizadas por PCR de colonia, las cuales fueron B4, B9, B13 y B18, no encontrando presencia de ninguno de estos genes para las clonas control C2 y C4 (**Figura 28** y **Figura 29**).

Cabe aclarar que debido a que no se utiliza ADN libre de restos celulares los amplificados utilizando la técnica de PCR colonia no serán exactamente del tamaño de interés, por eso es importante tener controles para esta técnica.

Sin embargo, de acuerdo a lo anterior, para asegurarnos que estas construcciones estuvieran integradas en el cromosoma 4 del genoma de *P. pastoris*, región en donde se está dirigiendo la construcción por recombinación homóloga sencilla por inserción (Daly y Hearn 2005), se diseñaron un par de oligonucleótidos que amplifican parte de una región correspondiente al plásmido (pPICZαA) y parte de la región del gen AOX1 propio del genoma de *P. pastoris*, tal como se muestra en la **Figura 30**.

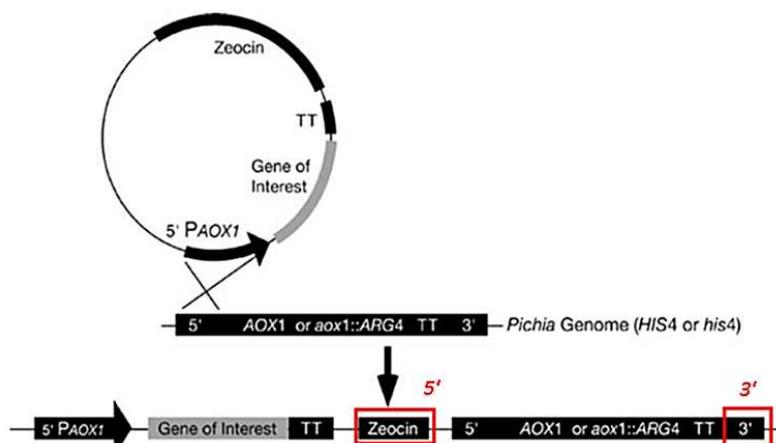


Figura 30. Esquema de diseño de oligonucleótidos para comprobar integración de las construcciones pPICZα-inva y pPICZα-invB en el genoma de *P. pastoris* X-33. Las cajas rojas muestran sitios utilizados para el oligo directo 5' ubicado en el inicio de la secuencia del gen de resistencia a zeocina (*Sh Ble*) y el oligo reverso 3' diseñado a partir de la región final 3' del gen AOX1 de *P. pastoris* (Li *et al.* 2007).

Acorde con la secuencia de nucleótidos del gen *Sh Ble*, codificante para la resistencia a Zeocina, proveniente de *Streptoalloteichus hindustanus* (Apt *et al.* 1996) depositadas en NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L36850.1>), se diseñó el oligo directo 5' ZEO 32; mientras que el oligonucleótido reverso denotado como 3' AOX 33 (Ver Anexo. Tabla de oligonucleótidos) fue diseñado utilizando la región 3' del gen AOX1 proveniente de *P. pastoris* de acuerdo a la secuencia consignada en el sitio NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/FR839631.1>).

Conforme con este diseño, si la construcción se encuentra integrada en el genoma de *P. pastoris* se espera un amplicón de aproximadamente 2.1 kb. (Ver. Sección 6.3.1.8.3). En esta prueba se utilizó como ADN genómico para llevar a cabo la PCR de cada una de las transformantes. (Ver. Sección 6.3.1.2.2).

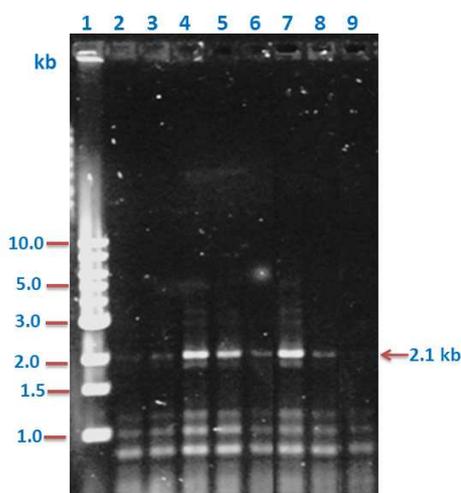


Figura 31. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de integración de los cassettes de expresión de las construcciones pPICZαA-InvA y pPICZαA-InvB en genoma de *P. pastoris* X-33 utilizando los oligonucleótidos 32 y 33. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. **Carril 2 y 3:** Clonas A1 y A9 conteniendo el vector pPICZαA-InvA. **Carril 4-7:** Clonas de *P. pastoris* B4, B9, B13 y B18 con la construcción integrada pPICZαA-InvB. **Carril 8.** Clona C2 de *P. pastoris* con el vector pPICZαA sin inserto (control positivo). **Carril 9.** Cepa de *P. pastoris* X-33 silvestre (control negativo).

Los resultados mostrados en la **Figura 31** nos indican que todas las transformantes analizadas anteriormente por PCR amplifican el fragmento de aproximadamente 2.1 kb, correspondiente al gen de resistencia a zeocina y al gen AOX1, no siendo así para la cepa silvestre, la cual no fue transformada con el gen de resistencia a zeocina o con el vector y por lo tanto no presenta integración ni resistencia a zeocina. Por consiguiente, las clonas que presentan integrado el cassette de expresión dentro del cromosoma 4 de *P. pastoris*, son las transformantes: A1, A9, B4, B9, B13 y B18.

7.1.1.5 Selección de clonas de *P. pastoris* con actividad invertasa mediante bioensayo colorimétrico.

Después de verificar que las construcciones se encuentren integradas en el genoma de *P. pastoris* y que se han detectado los genes de interés, lo siguiente fue confirmar que las clonas de *P. pastoris* expresan las invertasas extracelularmente, y además en forma activa. Con esta finalidad, se utilizó un bioensayo colorimétrico cualitativo fue el fácil escrutinio y detección de un mayor número de transformantes con actividad invertasa. Otro factor importante es la determinación de posibles modificaciones post-traduccionales que lleva a cabo *P. pastoris* (como se abordará más adelante).

Cabe señalar que no se encontró un método estandarizado del tipo bioensayo para detectar la actividad invertasa a partir de clonas o microorganismos. Por lo anterior descrito, se diseñaron 6 medios de cultivo (**Tabla 13**) modificando la concentración de peptona y de fuente de carbono, que para nuestro estudio fueron dos: metanol (fuente de carbono, energía e inductor en *P. pastoris*) y glucosa. Si bien, aunque el metanol no está reportado que sea un sustrato que reacciona con el TTC, no conocemos el efecto de este sobre el bioensayo, por lo que fue considerado como otra fuente de carbono problema. La sacarosa no se consideró como fuente de carbono objetivo para el bioensayo o para el crecimiento de *P. pastoris* debido a que esta levadura es *Suc⁻* (Sreekrishna *et al.* 1987).

Por otro lado, se sabe que la sacarosa funcionó bien para este estudio debido a que no reacciona con el TTC, además de que las clonas que expresen las invertasas, deberán hidrolizar este carbohidrato, generando la glucosa que si reacciona con el TTC, y por lo tanto producirán colonias rojas. La preparación detallada de las placas indicadoras es descrita en Materiales y métodos (Ver. Sección 6.3.2.1) cabe señalar que se comprobó que todos los medios probados tuvieron un pH de 6.0.

Tabla 13. Diferentes formulaciones evaluadas para la realización de bioensayos en placas indicadoras de TTC para detectar actividad invertasa en transformantes de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos integrados pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*.

	A	B	C	D	E	BMMY (modificado)
Agar (%)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TCC 10x (%)	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025
K₂HPO₄ (%)	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	12
KH₂PO₄ (%)	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	3
MgSO₄ (%)	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	----
YNB 10x (%)	-----	-----	-----	-----	-----	13.4
Peptona (%)	0.2	0.2	0.12	0.12	0.125	-----
Metanol 10x (%)	0.2	0.5	0.2	0.5	0.1	0.1
Sacarosa (%)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2

Como controles positivos para este ensayo se utilizaron las transformantes de *P. pastoris* X-33 con las construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* (Calixto-Romo 2009), y como controles negativos se emplearon la cepa silvestre X-33 (X33) y la cepa de *P. pastoris* X-33 transformada con el vector pPICZαA sin inserto (C2). Los resultados de esta prueba son los siguientes:

- 🧪 Clonas con actividad invertasa: Coloración rojo intenso (R).
- 🧪 Clonas sin actividad invertasa: Coloración rosa (r) o blanca (b).

Es importante destacar que la intensidad del rojo no es proporcional a la actividad invertasa, ya que éste ensayo solamente es cualitativo. Por otro lado, un factor que es necesario tomar en cuenta en este ensayo, al menos para el sistema bajo el cual se está trabajando, es que la cepa huésped o silvestre a utilizar no tenga la actividad enzimática a buscar, de otra forma daría “falso positivo” el control negativo. De acuerdo a Tschopp *et al.* 1987 y Menendez *et al.* 2013, *P. pastoris* no tiene actividad invertasa o de algún tipo de sacarasa.

Se probaron 20 cepas de *P. pastoris* X-33 con las construcciones pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*, respectivamente, 2 controles positivos (GAPA y GAPB) y dos controles negativos (C2 y X33).

De los 6 medios de cultivo utilizados (**Tabla 14**), sólo los denominados “E” y “BMMY modificado” presentaron coloración positiva (R) con los controles positivos, es decir, las transformantes de *P. pastoris* X-33 bajo el control del promotor GAP, con los genes *invA* e *invB*, mientras que los controles negativos (C2 y X33) no mostraron coloración roja. El resumen de los resultados de todas las transformantes y la cepa silvestre (X-33) se muestra en la siguiente **Tabla 14**:

Tabla 14. Efecto del medio de cultivo sobre la selección de transformantes de *P. pastoris* X-33 con las construcciones pGAP α A-*invA* (GAP A), pGAPZ α A-*invB* (GAP B), pPICZ α A-*invA*(A's), pPICZ α A-*invB* (B's) y pPICZ α A (C2) en bioensayo de placas indicadoras utilizando como marcador TTC. Las colonias individuales analizadas fueron transferidas a placas con TTC, incubadas a 30°C durante dos días (Ver. Sección 6.3.2.1).

Clona	A	B	C	D	E	BMMY modificado
A2,1	R	R	R	R	R	R
A2,2	R	R	R	R	R	R
A2,3	r	r	r	r	r	r
A2,4	R	R	R	R	R	R
A2,8	R	R	R	R	R	R
A2,11	R	R	R	R	R	R
A2,14	R	R	R	R	r	r
A2,17	R	R	R	R	R	R
A2,18	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c
B10,2	R	R	R	R	R	R
B10,4	r	r	r	r	r	r
B10,5	R	R	R	R	R	R
B10,6	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c
B10,13	R	R	R	R	R	R
B10,14	r	r	r	r	r	r
B10,16	R	R	R	R	R	R
B10,18	R	R	R	R	R	R
B10,19	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c	s/c
GAP A	r	r	r	r	R	R
GAP B	r	r	r	r	R	R
C2	r	r	r	r	r	r
X33	r	r	r	r	r	r

Notación: R (Rojo intenso), r(rosa o blanco), s/c (sin color)

De acuerdo con lo anterior y lo mostrado en la **Tabla 14**, tanto el medio “E” como “BMMY modificado” pueden ser útiles para la selección de transformantes con actividad invertasa.

Los resultados del bioensayo se pueden corroborar debido a que las cepas A2,1; A2,2; A2,9; B10,13 y B10,18 ya habían sido analizadas a presencia de los gen *invA* e *invB* (respectivamente) e integración en genoma de *P. pastoris*. Además, se obtuvieron otras clonas (A2,4-9; A2,11-13; A2,17; B10,2; B10,5; B10,11 y B10,17) para futuros ensayos de actividad.

Los resultados de las placas indicadoras con TTC de las transformantes mencionadas anteriormente se pueden observar en la **Figura 32**.

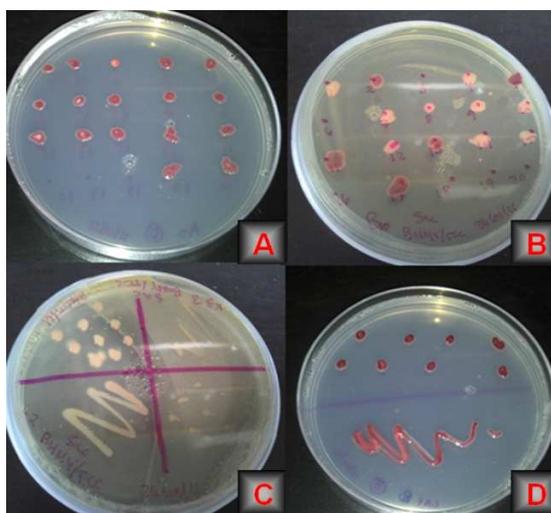


Figura 32. Bioensayo de placas indicadoras de TTC de 20 transformantes de *P. pastoris* X-33 con las construcciones pPICZ α A-*invA*, pPICZ α A-*invB* y controles. A *P. pastoris* X-33 transformadas con la construcción pPICZ α B-*invA*. B *P. pastoris* X-33 con el plásmido pPICZ α B-*invB*. C Controles negativos: *P. pastoris* X-33 silvestre y *P. pastoris* X-33 con el vector pPICZ α B sin los ORFs *invA* or *invB*. D Controles positivos: Clonas de *P. pastoris* X-33 con los vectores pGAPZ α A-*invA* y pGAPZ α A-*invB*, incubadas en medio “E” y medio “BMMY modificado” a 30 °C durante 2 días.

Algunas cepas de *P. pastoris* analizadas anteriormente mediante PCR de colonia no amplificaron el gen de *invA* o *invB*, sin embargo, dieron positivo para el bioensayo de placas indicadoras de TCC, por ejemplo la clona A2, 11. En ocasiones la PCR de colonia no es un método 100% efectivo para corroborar la presencia de los amplicones de las secuencias deseadas debido a que al utilizar la colonia como ADN molde se puede tener en la mezcla de reacción restos celulares y sales del medio de cultivo en ocasiones afectan la eficiencia de la ADN polimerasa, como se había explicado anteriormente.

Por tal motivo se realizó la PCR a partir de la extracción de ADN genómico de *P. pastoris* (Ver. Sección 6.3.1.7.2), para poder corroborar si prueba de TCC es adecuada para la identificación positiva de transformantes con actividad invertasa. Los resultados de la PCR utilizando ADN genómico de *P. pastoris* se muestran en las **Figura 33** y **Figura 34**. Los programas de PCR fueron los mismos descritos para la amplificación de los genes *invA* e *invB* pero utilizando como ADN molde el genómico de las transformantes (Ver. Sección 6.3.1.8.1).

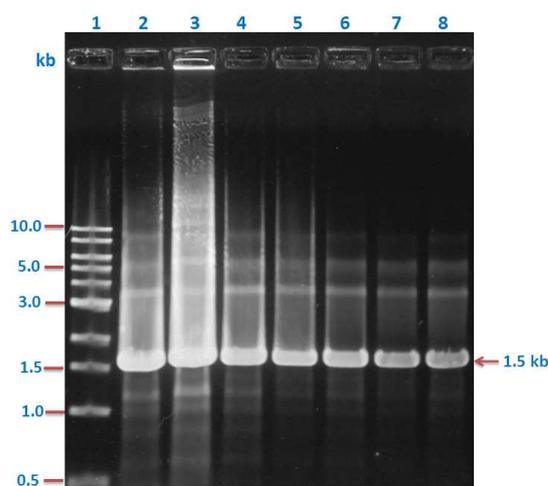


Figura 33. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de la amplificación del gen *invA* en el genoma de *P. pastoris* de transformantes con la construcción pPICZαA-*invA* utilizando los oligonucleótidos GVIII y GVII. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carril 2: (Control positivo) Clona con la construcción pGAPZαA-*invA*. Carril 3-8: Transformantes A2,1; A2,2; A2,8; A2,11 y A2,16 de *P. pastoris* con la construcción pPICZαA-*invA*.

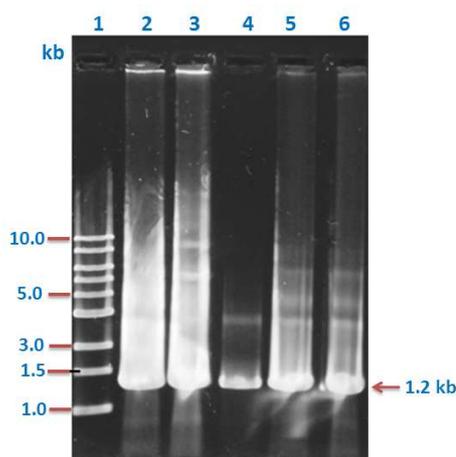


Figura 34. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % amplificación del gen *invB* en genoma de *P. pastoris* de transformantes con la construcción pPICZαA-*invB* utilizando los oligonucleótidos CVIII y CIX. Carril 1: Marcador de tamaño molecular. Carril 2: (Control positivo) Clona con la construcción pGAPZαA-*invB*. Carril 3-6: Transformates B10,2; B10,5; B10,11 y B10,13 de *P. pastoris* con la construcción pPICZαA-*invB*.

Al realizar la PCR a partir del ADN genómico de *P. pastoris* con cada una de las transformantes se observó que las clonas A2,11 que no presentó amplicón por PCR de colonia si amplificó el ORF de 1.5 kb que corresponde al gen *invA*. En el caso de las clonas de *P. pastoris* con el gen *invB*, también se obtuvo el fragmento de 1.2 kb para la clona B10,13; así como para las otras probadas (**Figura 33 y 34**).

7.1.2 Vector de expresión pPICZαB.

7.1.2.1 Obtención de las construcciones pPICZαB-*invA* y pPICZαB-*invB*.

Se obtuvieron de los productos de PCR de los genes *invA* (1.5kb) e *invB* (1.2 kb) de *Z. mobilis* (**Figura 35**), estos fragmentos fueron purificados (Ver. Sección 6.3.1.4) y los productos obtenidos fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron ensambladas con el programa Chromas Pro 1.5.

El alineamiento múltiple de la secuencia ensamblada (mediante programa BLAST) dio como resultado un 98% de similitud con el gen *sacA* de *Z. mobilis* ZM1 reportado por Gunasekaran *et al.* (1990), con número de acceso en NCBI [M62718.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M62718.1) (Para ver alineamiento completo ver Anexo).

En cuanto al ensamblado de las secuencias del gen *invB* utilizando los mismos procedimientos mencionados anteriormente para el gen *invA*, se obtuvo un 99% de similitud con el gen *sacC* de la misma cepa de *Z. mobilis* ZM1 reportado por Kannan *et al.* (1995), con el número de acceso en NCBI de [L33403.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/L33403.1) (Consultar el alineamiento en Anexo).

Utilizando el programa NEBcutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), se realizó un análisis de restricción de los productos de PCR *in silico* de los genes *invA* e *invB* con la endonucleasa BspHI.

Para *invA* se esperaban dos bandas, una de aproximadamente 800 kb y otra de 700 kb, mientras que para *invB* se esperaba un corte y observar dos bandas, una de 1000 kb y otra de 200 kb, resultados que se obtuvieron y que se muestran en la **Figura 35**.

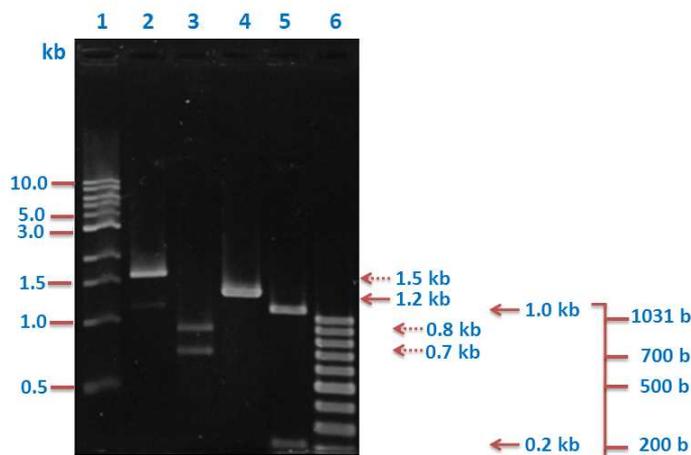


Figura 35. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de los amplicones *invA* e *invB* del genoma de *Z. mobilis* CDBB-B603 empleando los oligonucleótidos 34-35 y 36-37 respectivamente. Carril 1 y 6: Marcadores de tamaño molecular. Carril 2: Amplificación del ORF de la invertasa intracelular (*invA*) Carril 3: Digestión con BspHI al amplificado de *invA*. Carril 4: Amplificación del ORF de la invertasa extracelular (*invB*) Carril 5: Digestión con BspHI del amplificado de *invB*.

Conforme lo que se muestra en la **Figura 35** y el análisis por secuenciación de los amplicones de 1.5 y 1.2 kb para los genes *invA* e *invB* respectivamente podemos asegurar que tenemos los ORFs amplificados corresponde a las invertasas de interés.

7.1.2.2 Análisis de las construcciones pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB*.

Se seleccionaron 40 clonas de *E. coli* DH5α transformadas con la construcción pPICZαB-*invA* resistentes a zeocina (Ver. Sección 6.3.3) y se extrajo el ADNp (Ver Sección 6.3.1.1.1) con el objetivo de analizar la construcción.

Un total de 32 de estas transformantes presentaron una banda de aproximadamente 5.1 kb que corresponde a la suma del vector y el ORF de *invA*. De estas clonas se tomaron 13 y se realizó una doble digestión con PstI y XbaI (Ver. Sección 6.3.4.2) para comprobar presencia de inserto. Los resultados que se muestran en la **Figura 36**.

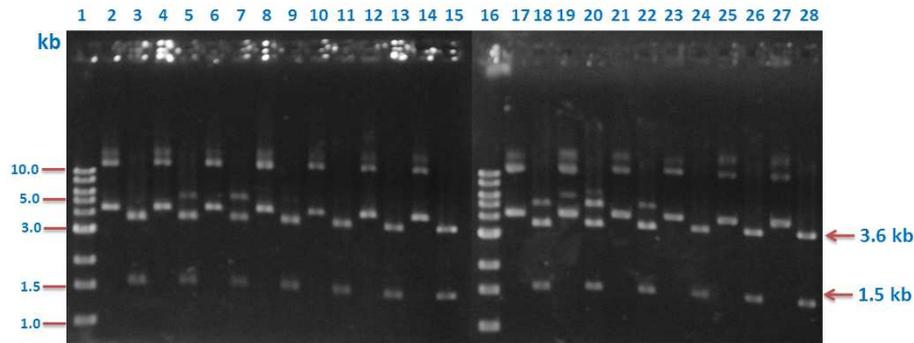


Figura 36. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de las digestiones con *Pst*I y *Xba*I del ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción *pPICZ α B-invA*. Carril 1 y 16: Marcadores de tamaño molecular. Carril 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 17, 19, 21, 23, 25 y 27: ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción *pPICZ α B-invA* denominadas A2, A5, A14, A16, A17, A18, A19, A20, A23, A28, A30, A31 y A32 (respectivamente) Carril 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 24, 26 y 28: Doble digestión con endonucleasas *Pst*I y *Xba*I del ADN plasmídico de las mutantes A2, A5, A14, A16, A17, A18, A19, A20, A23, A28, A30, A31 y A32 (respectivamente) con la construcción *pPICZ α B-invA*.

En la **Figura 36** se comprueba que todas las transformantes seleccionadas liberaron el ORF de aproximadamente 1.5 kb correspondiente al gen *invA*, mostrando en esa digestión el tamaño del vector *pPICZ α B* que es de aproximadamente 3.6 kb.

De igual forma para las transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción *pPICZ α B-invB* (Ver. Sección 6.3.4) se aislaron 40 clones resultantes, 20 de ellas mostraron el tamaño de banda deseado de 4.8 kb que corresponde a la suma del vector de expresión (3.6 kb) y el gen *invB* (1.2kb).

Posteriormente se tomaron 13 clones al azar y se digirió el ADN plasmídico con las enzimas *Pst*I y *Xba*I (Ver. Sección 6.3.4) para corroborar liberación del inserto, resultados que se muestran en la **Figura 37**.

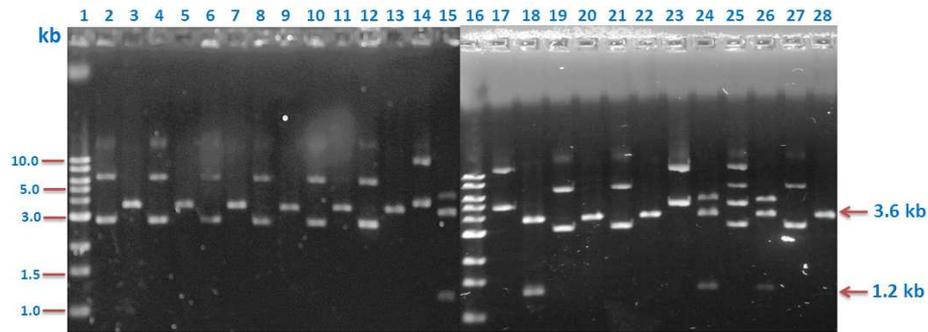


Figura 37. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de digestiones con PstI y XbaI al ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción *pPICZ α B-invB*. Carril 1 y 16: Marcadores de tamaño molecular. Carril 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 19, 21, 23, 25 y 27: ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5 α con la construcción *pPICZ α B-invB* denominadas B12, B14, B16, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 y B10 (respectivamente) Carril 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 18, 20, 22, 24, 26 y 28: Doble digestión con endonucleasas PstI y XbaI del ADN plasmídico de las mutantes B12, B14, B16, B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9 y B10 (respectivamente) con la construcción *pPICZ α B-invB*.

En el caso de las transformantes analizadas con la construcción *pPICZ α B-invB*, sólo las denominadas B4, B5, B9 y B10 liberaron el fragmento de aproximadamente 1.2 kb al digerir con PstI y XbaI, mostrando también la banda de 3.6 kb que corresponde al tamaño del vector *pPICZ α B* (Figura 37).

Las transformantes con las que se decidió continuar el análisis fueron las nombradas A31, B2 y C2 (control con el vector *pPICZ α B* sin inserto) a las cuales se les realizaron los siguientes estudios antes de ser transformadas en células electrocompetentes de *P. pastoris*:

- ◆ PCR para corroborar amplificación de ambos ORFs (Ver. Sección 6.3.1.8.1).
- ◆ PCR para confirmar fase la correcta dirección de ORFs en construcciones (Ver. Sección 6.3.1.8.2)
- ◆ Digestión con PstI y XbaI para comprobar liberación del inserto (Ver. Sección 6.3.4.2).
- ◆ Digestión con las endonucleasas BglII y SacI para confirmar construcción (Ver. Sección 6.3.4.2).
- ◆ Secuenciación de la construcción.

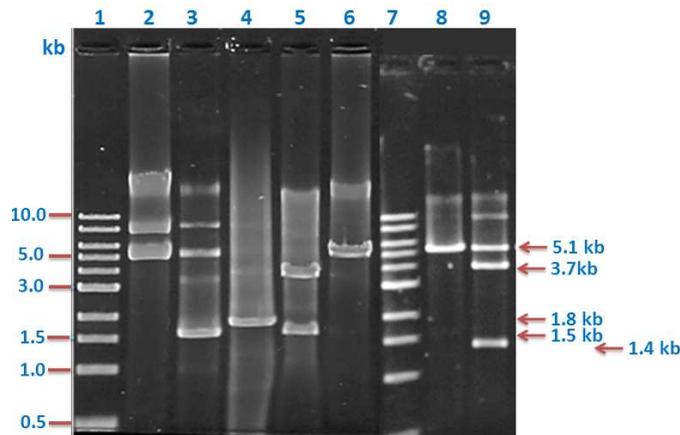


Figura 38. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % para la comprobación de la construcción del pPICZαB-*invA* transformada en *E. coli* DH5α cepa A31. Carril 1 y 7: Marcadores de tamaño molecular. Carril 2: ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5α con la construcción pPICZαB-*invA*. Carril 3: PCR del gen *invA*. Carril 4: PCR para comprobar correcta inserción del ORF de *invA*. Carril 5: Digestión con PstI y XbaI para confirmar liberación del inserto. Carril 6: Digestión con SacI para comprobar correcta linealización de la construcción pPICZαB-*invA*. Carril 8: Digestión de pPICZαB-*invA* con BglII Carril 9: Digestión de pPICZαB-*invA* con BspHI.

La construcción de la cepa A31 de *E. coli* presentó la liberación y presencia del gen de interés (*invA*) revelando una banda de aproximadamente 1.5 kb (Carril 3 y 5, **Figura 38**).

Asimismo al realizar la PCR con los oligonucleótidos 38 y 39 se observó la banda de aproximadamente 1.8 kb (Carril 4 **Figura 38**) que corresponde al tamaño del gen *invA* con 0.3kb adicionales del vector (Ver. Sección 6.3.1.8.2).

Con las endonucleasas SacI y BglII se esperaba una linealización de 5.1 kb resultado que se observa en el carril 6 y 8 (**Figura 38**). Por último al digerir con BspHI se esperaban tres fragmentos, de acuerdo al análisis realizado por el NEBcutter, siendo el más grande de aproximadamente 5 kb, en segundo de 3.7 kb y el tercero de 1.4 kb observado en la **Figura 38**.

Por lo anterior comprobamos que la construcción pPICZαB-*invA* que posee la cepa A31 se llevó a cabo correctamente y no presenta mutaciones el MCS o en el ORF, que pudieran afectar la funcionalidad de la construcción.

De igual forma se realizó el mismo análisis para la construcción pPICZαB-*invB*, resultados que se muestran en la **Figura 39**.

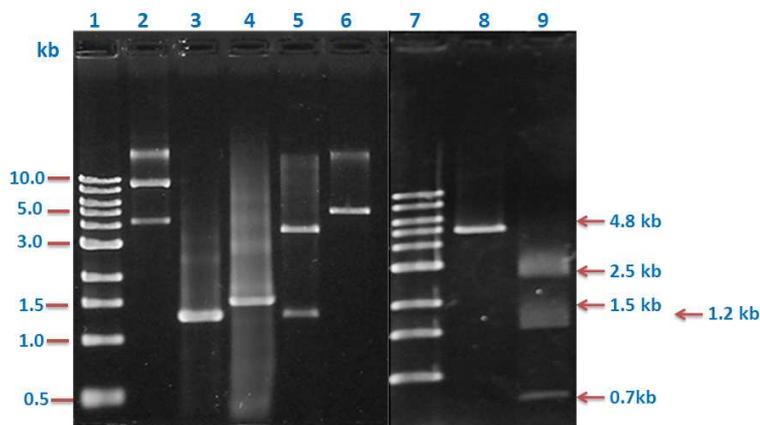


Figura 39. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de comprobación de la construcción del pPICZαB-*invB* transformada en *E. coli* DH5α cepa B2. Carril 1 y 7: Marcadores de tamaño molecular. Carril 2: ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5α B2. Carril 3: PCR del gen *invB*. Carril 4: PCR para comprobar correcta inserción del ORF de *invB*. Carril 5: Digestión con PstI y XbaI para confirmar liberación del inserto. Carril 6: Digestión con SacI para comprobar correcta linearización de la construcción pPICZαB-*invA*. Carril 8: Digestión de pPICZαB-*invB* con BglII. Carril 9: Digestión de pPICZαB-*invB* con BspHI.

En el caso de la construcción pPICZαB-*invB*, la linearización utilizando las endonucleasas BglII y SacI resultaron en una banda de aproximadamente 4.8 kb correspondiente al vector más el inserto de 1.2 kb.

Las digestiones con PstI y XbaI y la PCR con los oligonucleótidos 36 y 37 mostraron una banda de aproximadamente 1.2 kb (Carril 3 y 5 **Figura 39**). Al utilizar la endonucleasa BspHI y de acuerdo al programa NEBcutter se esperaban tres fragmentos uno de aproximadamente 730 bp, 1500 bp y 2500 bp, bandas que se observan en la **Figura 39**. Por lo tanto, la construcción que se encuentra en la clona B2 de *E. coli* se realizó correctamente. Para corroborar que estas determinaciones fueron realizadas adecuadamente también se realizó el mismo estudio para la clona C2 conteniendo el vector pPICZαB sin inserto, resultados que se muestran en la **Figura 40**.

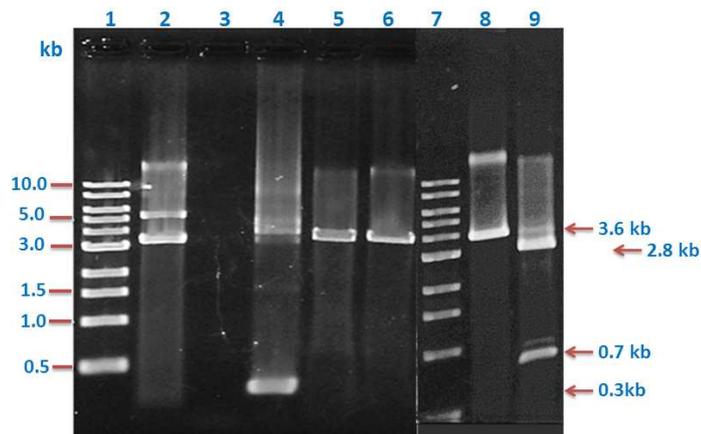


Figura 40. Análisis electroforético en gel de agarosa al 1.2 % de control *pPICZαB* sin inserto transformada en *E. coli* DH5α cepa C2. **Carril 1 y 7:** Marcadores de tamaño molecular. **Carril 2:** ADN plasmídico de transformantes de *E. coli* DH5α con el vector *pPICZαB*. **Carril 3:** PCR de ORFs. **Carril 4:** PCR para comprobar MCS. **Carril 5:** Digestión con PstI y XbaI. **Carril 6:** Digestión con SacI para comprobar correcta linealización de *pPICZαB*. **Carril 8:** Digestión de *pPICZαB* con BglII. **Carril 9:** Digestión de *pPICZαB* con BspHI.

Conforme lo observado en la **Figura 40** el control no presentó ningún inserto al digerirse con PstI y XbaI o al realizar la PCR (utilizando los oligonucleótidos 34 y 35) por lo que esta clona no debe presentar actividad invertasa. Por otro lado, al linealizar el vector con BglII y SacI se puede observar la banda de 3.6 kb correspondiente al tamaño del vector sin inserto.

Finalmente al emplear la endonucleasa BspHI, virtualmente (utilizando el NEBcutter) se obtuvo que se debían obtener dos bandas, una de aproximadamente 730 bp y otra de 2800 bp, observadas en la **Figura 40**.

Por lo tanto, el material genético introducido en las cepas de A31, B2 y C2 fueron utilizadas para los siguientes procedimientos.

7.1.1.3 Transformación en *P. pastoris* GS115, KM71 y X-33 con los plásmidos de las cepas A31, B2 y C2.

Se realizó extracción de ADNp a gran escala (Ver. Sección 6.3.1.1.2) de las clonas A31, B2 y C2 hasta tener aproximadamente 10 µg de ADNp digerido y purificado con SacI (ADN lineal) y se transformaron en células de *P. pastoris* GS115, KM71 y X-33 (Ver. Sección 6.3.1.7.2), ya que, como se ha mencionado anteriormente, en ocasiones los tipos diferentes de cepas huésped puede afectar la expresión y producción de la proteína de interés.

Las transformantes GS115, KM71 y X-33 obtenidas se resembraron en placas de YPD (concentraciones de hasta 1000 µg mL⁻¹ de zeocina). Sin embargo, para el caso de las clonas de GS115, no se tuvo resiembra después de 200 µg mL⁻¹ del antibiótico de resistencia, por lo que se descartaron las transformantes obtenidas en esta etapa y se siguieron trabajando con las transformantes obtenidas con las cepas KM71 y X-33.

Se consiguió aislar 40 clonas de *P. pastoris* KM71 y X-33 con transformadas con las construcciones pPICZαB-*invA* y pPICZαB-*invB* y 22 transformantes de las mismas cepas con el vector sin inserto. Los resultados que se pueden observar en la **Figura 41**.

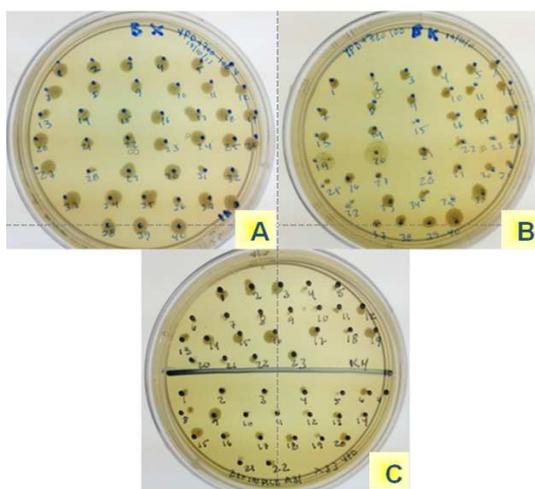


Figura 41. Transformantes aisladas de *P. pastoris* KM71 (KM) y X-33 (X33) transformadas con la construcción pPICZαB-*invB* crecidas en medio YPD con 100 µg mL⁻¹ de zeocina. A. Transformantes de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZαB-*invB* B. Transformantes *P. pastoris* KM71 con la construcción pPICZαB-*invB* C. Transformantes *P. pastoris* X-33 y KM71 con el vector pPICZαB (control).

7.1.2.4 Selección y análisis de transformantes en *P. pastoris* resistentes a zeocina con actividad invertasa.

Tanto las clonas X33 como las KM71 con ambas construcciones crecieron con $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de zeocina y para fines prácticos las siglas con las que se identificarán a las clonas serán las siguientes:

- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZ α B-*invA* →AX's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* KM71 con la construcción pPICZ α B-*invA* →AK's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 con la construcción pPICZ α B-*invB* →BX's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* KM71 con la construcción pPICZ α B-*invB* →BK's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 con el vector pPICZ α B→CX's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* KM71 con el vector pPICZ α B→CK's.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 con la construcción pGAPZ α A-*invA* →GAPA.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 con la construcción pGAPZ α A-*invB* →GAPB.
- 🧪 Cepas de *P. pastoris* X-33 silvestre →X33.

7.1.2.4.1 Clonas de *P. pastoris* con el gen *invA* de *Z. mobilis*.

Los resultados obtenidos de esta selección primaria se resumen en la **Tabla 15** y **Tabla 16**. Cabe señalar que aunque se realizaron estos análisis a aproximadamente 20 transformantes de cada cepa conteniendo cada construcción, para fines prácticos sólo se muestran las transformantes que tuvieron mayor actividad de cada cepa.

Tabla 15. Resumen del escrutinio primario de transformantes de *P. pastoris* X-33 (AX) y KM71 (AK) transformadas con la construcción pPICZ α B-*invA* mediante bioensayos, PCR y fermentación a pequeña escala. Las PCR se realizaron a partir de extracción de ADN genómico (Ver. Sección 6.3.1.2.2). La letra “I” denota la PCR de integración del cassette de expresión e “*invA*” a la presencia del gen en genoma de *P. pastoris*.

Cepa	Bioensayo		PCR		Actividad invertasa (U mL ⁻¹)
	Fenotipo	TTC	I	<i>invA</i>	
AX24	+++	+	+	+	1593 ± 21
AX34	+++	+	+	+	691 ± 17
AX57	+	+	+	+	650 ± 26
AX59	++	+	+	+	1143 ± 29
CX11	+++	-	+	-	4 ± 0.5
AK2	+++	-	-	+	-----
AK5	+++	+	+	+	3.1±1.06
AK52	+++	+	+	+	1.3±0.27
AK58	+++	+	+	+	2.31±0.62
CK10	+++	-	+	-	10 ± 1.5
X33	+	-	-	-	0
GAP A	Nd	+	-----	+	1100 ± 22

De acuerdo a lo que se muestra en la **Tabla 15**, todas las cepas AX tuvieron mayor actividad en comparación con los controles negativos (C11X y X33); sin embargo, todas las transformantes AK tuvieron menor actividad, alrededor de 30 veces menor, comparada con las mutantes de X33, también algunas transformantes no presentaban integración en genoma de *P. pastoris* KM71 motivo por el cual probablemente presentaban menor actividad.

Algunas clonas AX presentaron menor actividad que el control positivo GAPA, sin embargo la clona AX24 presentó una actividad comparable con la clona regulada por el promotor GAP, siendo que la cepa AX24 tuvo 1.4 veces mayor actividad en comparación con la GAPA.

7.1.2.4.2 Transformantes de *P. pastoris* con el gen *invB* de *Z. mobilis*.

En el caso de las transformantes con la construcción pPICZ α B-*invB*, al igual que para el caso anterior, todas las clonas BX's presentaron mayor actividad en comparación con los controles negativos (CX11 y X33), por otro lado estas transformantes tuvieron mayor actividad que las BK's, siendo la clona denominada BX26 la que presentó mayor actividad de todas las transformantes probadas y siendo hasta 2 veces superior en comparación con la cepa GAPB con el promotor constitutivo GAP (**Tabla 16**).

Tabla 16. Resumen del escrutinio primario de transformantes de *P. pastoris* X-33 (BX) y KM71 (BK) transformadas con la construcción *pPICZαB-invB* mediante bioensayos, PCR y fermentación a pequeña escala. Las PCR se realizaron a partir de extracción de ADN genómico (Ver. Sección 6.3.1.2.2). La letra “*l*” denota la PCR de integración del cassette de expresión e “*invB*” a la presencia del gen en genoma de *P. pastoris* (Ver. Sección 6.3.1.8.3).

Cepa	Bioensayos		PCR		Actividad invertasa (U mL ⁻¹)
	Fenotipo	TTC	<i>l</i>	<i>invB</i>	
BX1	+++	+	+	+	670±152
BX3	++	+	+	+	723±78
BX5	+++	+	+	+	923±32
BX6	+++	+	+	+	809±60
BX11	++	+	+	+	884±88
BX12	+++	+	+	+	1003±173
BX17	++	+	+	+	963±60
BX20	++	+	+	+	839±32
BX26	+++	+	+	+	1175±25
BX37	++	+	+	+	817±88
BX38	++	+	+	+	848±71
BX40	++	+	+	+	822±14
CX11	+++	-	+	-	4±0
BK2	++	+	+	+	6.±0.5
BK8	++	+	+	+	49±2.2
BK17	++	+	+	+	32±1.48
BK30	+	+	+	+	76±5.6
BK38	++	+	+	+	77±1.9
CK13	++	-	+	-	0±0
X33	+	-	-	-	0±1
GAPB	-----	+	----	-----	591±1

7.2 Optimización de las condiciones de cultivo para las cepas transformantes obtenidas de *P. pastoris* con los genes de interés (*invA* e *invB*).

Una vez que realizó el escrutinio de clonas de *P. pastoris* con actividad invertasa, se realizó la estandarización de las condiciones de fermentación para obtener mayor actividad en el sobrenadante de cultivo.

Es importante señalar que esta evaluación debe realizarse debido a que las mejores condiciones para la producción máxima dependen del tipo de cepa y gen a expresar, aunque se ha descrito que *P. pastoris* es un sistema de expresión muy robusto. Por lo tanto, no hay condiciones estándares que aseguran la óptima generación de la proteína de interés (Cos *et al.* 2006), aunado a lo anterior, parte de éste trabajo es aumentar la producción de invertasas.

7.2.1 Clonas de *P. pastoris* con las construcciones pPICZ α A-*invA/invB*.

Para el estudio se utilizaron las siguientes cepas:

- i) Transformantes con el promotor AOX1: A9 (A2, 9) y B4 (B10, 4).
- ii) Transformantes con el promotor GAP (controles positivos): GAPA y GAPB.
- iii) Controles negativos: C2 y cepa silvestre.

El procedimiento de crecimiento e inducción generales se detalla la sección 6.4.1.

7.2.1.1 Efecto de la temperatura, agitación y concentración de metanol sobre la actividad invertasa.

7.2.1.1.1 Medio BMM.

Conforme a los resultados obtenidos mostrados en la **Tabla 17** hubo una disminución del pH en medio de cultivo aunque este tuviera amortiguador de fosfatos, decreciendo hasta 4 unidades por debajo del pH bajo el cual se ajustó el medio de cultivo a concentración de 100 mM.

Teniendo en cuenta esta disminución del pH, se decidió utilizar una concentración del doble (200 mM) del amortiguador de fosfatos con el objetivo de conseguir mayor amortiguamiento en el pH del medio de cultivo y que probablemente esto influyera de manera positiva al aumento de actividad invertasa, sin embargo la actividad máxima se consiguió hasta las 48 horas.

El rango de pH más común utilizado en la mayoría de la expresión de proteínas heterólogas en *P. pastoris* se encuentra entre 5 y 6. Sin embargo, *Pichia* puede crecer en un intervalo de 3 a 7, siendo el valor más adecuado el de 5.5 a 6 para la expresión de proteínas recombinantes debido a que reduce el efecto de proteasas en el medio de cultivo, además de que mejora la estabilidad de las proteínas recombinantes (Cos *et al.* 2006).

Sin embargo conforme a lo que se muestra en la **Tabla 17**, no se consiguió ni aumentar la actividad invertasa, ni amortiguar adecuadamente el medio de cultivo inducido con metanol. Otro efecto observado constante fue que al utilizar una agitación menor (200 rpm) se obtuvo mayor actividad invertasa al menos para la cepa B4.

Tabla 17. Efecto de la temperatura, agitación y concentración de amortiguador sobre la actividad invertasa de las transformantes de *P. pastoris* X-33 A9 y B4 con las construcciones pPICZ α A-*invA* y pPICZ α A-*invB* respectivamente. El estudio se realizó en matraces con triple indentación de 250 mL con volumen de operación de 25 mL durante 120 horas de inducción con metanol a una concentración de 0.5% (concentración final) utilizando el medio mínimo de inducción BMM.

Cepa	BMM 0.5% Metanol, 30 °C, 100 Mm			BMM 0.5% Metanol, 30 °C, 200 Mm			BMM 0.5% Metanol, 28 °C, 100 mM	
	AI (U mL ⁻¹)		pH	AI (U mL ⁻¹)		pH	AI (U mL ⁻¹)	pH
	200 rpm	250 rpm		200 rpm	250 rpm		200 rpm	
A9	9.8±0.2	8.9±2.3	6→2.5	4.8±0.6	6.4±0.6	6→2.5	11.5 ± 1.5	6→3
B4	13.5± 6	7.2±1	6→2.5	8.9±0.6	7.2±1.2	6→2.5	22.11 ± 1.6	6→3
C2	0	0	6→2.5	0	0	6→2.5	0	6→3
X33	0	0	6→2.5	0	0	6→2.5	0	6→3

Por otro lado, al disminuir la agitación de 250 a 200 rpm se detectó mayor actividad invertasa, cuantificada por la técnica de azúcares reductores (Ver. Sección 6.3.2.3), tanto para la cepa A9 como para la cepa B4, obteniendo el máximo de actividad a las 24 horas de inducción con metanol.

El intervalo de agitación para la obtención de proteínas recombinantes en *P. pastoris* a nivel matraz es variable en un rango de 120 a 300 rpm y aunque la transferencia de materia y de oxígeno sea menor al disminuir la agitación, se observó un aumento en la actividad invertasa a 200 rpm, esto puede deberse a que existe menor evaporación de metanol y no aumenta la temperatura por convección.

Algunos autores como Amore *et al.* (2012), mencionan que la temperatura es un factor importante para el crecimiento de *P.pastoris* viéndose reflejado en la producción de la proteína recombinante tanto en fermentación tipo lote, como en lote alimentado ya que favorece la secreción de la proteína de interés a temperaturas bajas (menores a 30 °C).

Esto se debe a que la temperatura ayuda a reducir la lisis del esqueleto de la célula y la secreción de proteasas cuando el cultivo se induce con metanol, además de una disminución en la muerte celular (Jin *et al.* 2010). Por tal motivo, se decidió realizar una fermentación a una temperatura de 28 °C, condición probada anteriormente por algunos autores (Zhang *et al.* 2000, Macauley *et al.* 2005, Li *et al.* 2006, Sauer *et al.* 2006, Plantz *et al.* 2006, Papakonstantinou *et al.* 2009).

Sin embargo, un número considerable de autores utilizan 30 °C, como temperatura óptima para crecimiento e inducción de proteínas heterólogas en *P. pastoris*, algunos de estos trabajos están citados en el artículo Córdoba-Ruiz *et al.* (2003). Sin embargo, a 32 °C la producción de proteínas heterólogas se detiene y hay un decaimiento rápido del crecimiento de esta levadura (Cos *et al.* 2006), por lo que es muy importante que si se utiliza 30 °C la temperatura no aumente por encima de este valor.

En este trabajo, al utilizar 28 °C, se obtuvo mayor actividad invertasa en las cepas probadas A9 y B4, aumentando la actividad 1.1 y 1.6 veces para cada cepa respectivamente (**Tabla 17**). Sin embargo, el pH a lo largo de la fermentación continuaba disminuyendo hasta valores de 3 unidades. Por lo tanto se decidió realizar otras fermentaciones utilizando el medio complejo BMMY que al contener fuente de nitrógeno puede permitir que el NH₄ liberado equilibre el medio de cultivo, además el uso del amortiguador de fosfatos haciendo el medio más básico.

7.2.1.1.2 Medio BMMY.

Al utilizar el medio complejo BMMY (**Tabla 18**) se pudo obtener un mejor amortiguamiento durante la fermentación debido a que no se presentó el efecto de disminución del pH como lo obtenido al emplear el medio BMM para todos los ensayos realizados. Además se tuvo un aumento en la actividad invertasa en ambas transformantes de hasta 3.3 y 1.8 veces, respectivamente, al utilizar las mismas condiciones (0.5% metanol, 30 °C y 200 rpm) cuando se ocupó el medio complejo BMMY en comparación con el medio mínimo BMM (**Tabla 17**).

Tabla 18. Efecto de temperatura, agitación y concentración de metanol sobre la actividad invertasa de las transformantes de *P. pastoris* X-33 A9 y B4 con las construcciones pPICZαA-*invA* y pPICZαA-*invB* respectivamente. El estudio se realizó en matraces con triple indentación de 250 mL con volumen de operación de 25 mL durante 120 horas de inducción con metanol a una concentración de 0.5% (concentración final) utilizando el medio complejo de inducción BMMY.

Cepa	BMMY 0.5 % Metanol, 28 °C, 100 Mm			BMMY 1 % Metanol, 28 °C, 100 Mm			BMMY 2 % Metanol, 28 °C, 100 mM		
	AI (U mL ⁻¹)		pH	AI (U mL ⁻¹)		pH	AI (U mL ⁻¹) 200 rpm	pH	
	200 rpm	250 rpm		180 rpm	200 rpm				
A9	32.1±1.2	8.9±0.3	6→8.5	43.7±3	32.9±3.2	6→8.5	47.9±0.3	6→4	
B4	25.4±2.6	19.6±1.5	6→8.5	70.5±1.6	42.2±1.5	6→8.5	69.9±0.6	6→4	
C2	0	0	6→8.5	0	0	6→8.5	0	6→4	
X33	0	0	6→8.5	0	0	6→8.5	0	6→4	

Por otro lado como se ha mencionado anteriormente la concentración de metanol en el medio de cultivo de inducción es uno de los factores más importantes para la expresión de proteínas heterólogas reguladas por el promotor AOX1. Algunos autores refieren que al aumentar la concentración de metanol en el medio de inducción se consigue aumentar la expresión de la proteína de interés (Charoenrat *et al.* 2005, Daly y Hearn 2005, Cos *et al.* 2006, Li *et al.* 2007), en concentraciones que pueden ir desde 0.5 hasta 2% de metanol.

Es por esta razón que se realizaron tres ensayos evaluando diferentes concentraciones de metanol: 0.5, 1 y 2% (concentración final), resultados que se muestran en la **Tabla 18**, en donde de acuerdo a lo ya reportado, al aumentar la concentración de metanol, también aumentan los niveles de expresión de la proteína de interés. En nuestro caso, conseguimos detectar mayor actividad invertasa, tanto para cepa A9 como para la cepa B4, a 200 rpm.

Sin embargo, aunque los niveles máximos de actividad con la concentración de metanol al 2% se obtienen hasta las 72 horas, a diferencia de utilizar metanol al 1%, en donde se observan niveles máximos de actividad a las 48 horas, además de que no se observa una diferencia significativa de aumento de actividad si se comparan al utilizar metanol al 1 y 2% a 180 rpm y 200 rpm (respectivamente). Por lo anterior, se concluyó que las condiciones más óptimas para la expresión de ambas invertasas es utilizando medio BMMY, con 1% de metanol, a 28 °C y 180 rpm.

A pesar de las modificaciones en las condiciones de fermentación evaluadas para obtener mayor expresión de las invertasas recombinantes de interés, no se obtuvieron actividades comparables con las obtenidas utilizando el promotor GAP (Tabla 19), cepas obtenidas por Calixto-Romo (2009), siendo éstas 25 y 7 veces menores en comparación con la fermentación realizada para las cepas denominadas GAPA y GAPB.

Tabla 19. Expresión de la invertasa intracelular (GAPA) y extracelular (GAPB) bajo el control del promotor constitutivo GAP en cepas de *P. pastoris* X-33 con las construcciones pGAPZαA-*invA* y pGAPZαA-*invB* respectivamente. El estudio se realizó en matraces con triple indentación de 250 mL con volumen de operación de 25 mL durante 120 horas de fermentación tipo lote con una concentración de 2% de glucosa a 28 °C, 180 rpm utilizando el medio YPD.

Cepa	YPD		
	AI (U _{mL} ⁻¹)	pH	Actividad Máxima
GAP A	1100±22	6→8.5	24 h
GAP B	489±66	6→8.5	24 h

7.2.1.1.3 Problemas relacionados con la expresión de proteínas recombinantes en *P. pastoris*.

Existen diferentes cuellos de botella o factores que diversos autores consideran pueden influir en la expresión, secreción y producción de proteínas heterólogas utilizando el sistema de *P. pastoris*. Boettner *et al.* (2007) sugieren que algunos factores que pueden afectar la expresión de proteínas heterólogas son:

- 🔗 Regiones ricas en AT dentro del gen de la proteína de interés.
- 🔗 Puntos isoeléctricos elevados en la proteína recombinante.
- 🔗 Homología con las proteínas nativas de *Pichia*.

Ninguno de estos factores se encuentran en los ORF's de las invertasas de interés clonadas en *P. pastoris*. Por otro lado, los parámetros que pueden influir en la producción de las proteínas recombinantes de acuerdo a Athmaram *et al.* (2012) son:

- ✍ Fuerza del promotor.
- ✍ Número de copias del cassette de expresión introducidas en *P. pastoris*.
- ✍ Integración del cassette de expresión en el genoma de la levadura.
- ✍ Bloqueo en la transcripción o en las rutas de traducción.
- ✍ Degradación de la proteína por pH, temperatura o proteasas.
- ✍ Naturaleza de la señal de secreción.
- ✍ Fisiología de la cepa huésped.
- ✍ Medio de cultivo utilizado.
- ✍ Condiciones de crecimiento.
- ✍ Parámetros de fermentación.

Hasta este momento, nosotros ya aseguramos la correcta integración de al menos una copia del cassette de expresión conteniendo los marcos de lectura abiertos de los genes *invA* e *invB* conforme a lo ya mencionado anteriormente citado por Arjmand *et al.* (2012).

Sin embargo, de acuerdo a lo que se obtuvo en las fermentaciones mostradas en las **Tablas 17-19**, los valores de pH obtenidos durante la fermentación pudieran estar afectando la integridad de las proteínas de interés, además, por la baja actividad invertasa cuantificada, pudiera ser que si hay un bloqueo en las rutas de transcripción o traducción por la sobreexpresión de estas proteínas, efecto observado por autores como Inan *et al.* (2006).

Si el problema se encuentra en los bajos niveles de secreción de la proteína de interés, algunos autores como Burrowes *et al.* 2005, Inan *et al.* 2006 e Idiris *et al.* 2010 han mencionado una serie de factores, algunos que se comparten con los mencionados anteriormente, que pueden influenciar que la proteína de interés se encuentre en el sobrenadante de cultivo, entre los que se encuentran:

- 🔗 Propiedades de la proteína de interés.
- 🔗 Tipo de cepa huésped.
- 🔗 Vector.
- 🔗 Uso de codones.
- 🔗 Secuencia de señalización o secreción.
- 🔗 Procesamiento y/o mal plegamiento de la proteína.
- 🔗 Señales de traducción.
- 🔗 Translocación de la proteína naciente en el retículo endoplasmático.
- 🔗 Procesamiento en el retículo.
- 🔗 Secreción por la célula.

Debido a que nosotros estamos obteniendo proteínas activas, es decir con actividad detectable, aunque en niveles bajos, existen dos factores probables que pudieran afectar en sentido de secreción a las proteínas recombinantes: (1) obstrucción o bloqueo de la ruta de secreción y (2) mal plegamiento o procesamiento y por lo tanto degradación e inactivación de la mayoría de las proteínas recombinantes producidas.

Descartamos el primer factor debido a que medimos la actividad en el paquete celular de todas las cepas y la actividad que se detectó fue similar a la que se encontraba en el sobrenadante de cultivo. Por otro lado, se ha mencionado que la cola de poli-histidinas puede afectar la funcionalidad de la proteína recombinante de interés (Sreerishna *et al.* 1997, Terpe K 2003 y Kwon *et al.* 2009), como ya se ha mencionado anteriormente, por lo que decidimos realizar nuevas construcciones tomando en cuenta esa consideración (Ver. Sección 6.3.4).

7.2.2 Transformantes de *P. pastoris* con las construcciones pPICZαB-*invA/invB*.

Una vez que se determinó que las cepas AX24 y BX26 fueron las transformantes con mayor actividad invertasa y con los resultados obtenidos en las secciones anteriores, se realizó un experimento para cuantificar la actividad invertasa extracelular utilizando diferentes volúmenes de contenedor, ya que aunque se ha mencionado anteriormente que a nivel matraz generalmente no se ven diferencias en cuanto a la producción de la proteína de interés, se quiso conocer las mejores condiciones para la etapa de purificación y comparación de producción usando el promotor AOX1 y GAP.

El procedimiento para esta etapa fue utilizando la misma metodología de la fermentación en matraces de 250 mL (Ver. Sección 6.4.1), pero empleando también matraces de 500 mL y 1 L.

Se encontró que para la clona BX26, al emplear matraces de 1 L con volumen de operación de 100 mL a una temperatura de 28 °C, 180 rpm y 1% de metanol se obtenía 445 ± 12 U mL⁻¹ de actividad invertasa extracelular, mientras que utilizando un matraz de 500 mL con volumen de operación de 50 mL y las mismas condiciones de operación, se obtenían 321 ± 6 U mL⁻¹ de actividad invertasa y al utilizar matraces de 250 mL con volumen de operación de 25 mL se conseguía una actividad máxima a las 120 horas de inducción con metanol de 164 ± 7 U mL⁻¹, por lo que se decidió trabajar con un contenedor de 1 L para la producción de ambas invertasas y la comparación de la expresión de INVA e INVB utilizando el promotor GAP y AOX1.

El resumen de esta etapa se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 20. Optimización de las condiciones de operación (efecto del volumen del contenedor) sobre la actividad invertasa. Transformantes de *P. pastoris* reguladas por el promotor AOX1 (A24 y B26) y el promotor GAP (GAP A y GAP B) utilizando matraz de 1L, volumen de operación del 10%, 28 °C, 180 rpm y 1% de metanol.

Clona	Actividad invertasa U mL ⁻¹	Tiempo
A24	272±15	120 h
B26	445±12	120 h
GAP A	164±7	24 h
GAP B	249±18	24 h

7.3 Comparación de la producción de las invertasas recombinantes INVA e INVB producidas por *P. pastoris* bajo el control del promotor GAP y AOX1.

7.3.1 Producción de invertasas nativas por *Z. mobilis*.

Las invertasas de esta bacteria han sido muy estudiadas, como ya se mencionó anteriormente, sin embargo no se tiene mucha información acerca de la producción. Algunos autores, como O'Mullan *et al.* (1992), Yanase *et al.* (1995) y Gracida-Rodríguez (2002), sólo refieren que estas enzimas se producen en poca cantidad.

Por lo tanto, parte de la finalidad de este estudio consistió en cuantificar la producción de la invertasa intra y extracelular.

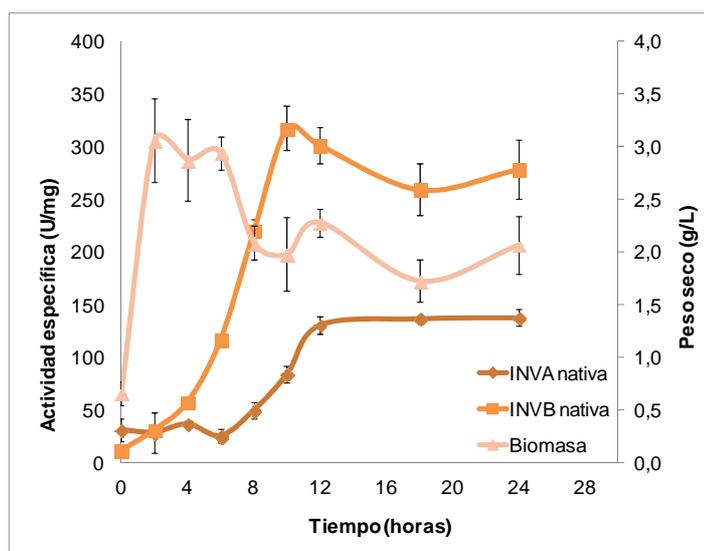


Figura 42. Producción de invertasas intra (INVA) y extra (INVB) celulares en *Z. mobilis*. Cinética de biomasa obtenida utilizando medio Bekers durante 24 horas a 30 °C sin agitación. Cinética de actividad invertasa medida en el paquete celular (INVA) y en el sobrenadante de cultivo (INVB) de las invertasas producidas por *Z. mobilis*. Todos los experimentos se realizaron por triplicado con un volumen de operación del 10% en matraces de 1L.

Tabla 21. Resumen de los resultados más importantes obtenidos de la fermentación realizada por *Z. mobilis* en medio Bekers a 30 °C durante 24 horas sin agitación en matraz de 1 L para evaluar la producción de la invertasa intra y extracelular.

Enzima	Actividad específica (U mg de proteína ⁻¹)	Tiempo (h)	Biomasa (g L ⁻¹)	Proteína (g L ⁻¹)	Productividad específica (mg INV g biomasa ⁻¹)
INVA nativa	129±8	24	1.7±0.2	1.49±0.03	76
INVB nativa	317±21	10	2.3±0.15	2,39±0,13	137

La actividad específica obtenida de las invertasas nativas fue de $129 \pm 8 \text{ U mg}^{-1}$ (24 h) y $317 \pm 21 \text{ U mg}^{-1}$ (10 h), para INVA e INVB, respectivamente, teniendo los valores de actividad más grandes la invertasa extracelular (**Figura 42**). Por otro lado, los resultados correspondientes a la **Tabla 21** nos indican que hay mayor producción de invertasa extracelular (INVB) en comparación con la intracelular (INVA).

Estos resultado es consistente con lo reportado por Aït-Abdelkader *et al.* (2000), donde se menciona que INVA no está involucrada en la hidrólisis de la sacarosa, papel que desempeña INVB y la levansacarasa, siendo la invertasa extracelular la enzima con mayor actividad sacarolítica producida por *Z. mobilis*.

7.3.2 Producción de invertasas recombinantes intracelulares mediadas por el promotor GAP (INVA_{GAP}) y AOX1 (INVA_{AOX1}).

Para poder realizar un estudio comparativo entre la producción de las invertasas recombinantes bajo estos promotores, las clonas que contenían las construcciones pGAPZαA-*invA* (Calixto-Romo 2009) y pPICZαB-*invA* (este trabajo) fueron tratadas bajo las mismas condiciones de crecimiento y condiciones de operación, con la diferencia de el medio utilizado para la expresión de cada sistema, debido a que anteriormente se probó el medio BMMY para la clona regulada con el promotor GAP y no hubo secreción de la proteína de interés, encontrando actividad sólo en el paquete celular. Esto probablemente se debe al estrés de la misma transformante generado por las condiciones de crecimiento.

7.3.2.1 Invertasa intracelular recombinante.

Se detectó actividad invertasa en el sobrenadante de cultivo de ambas clonas (GAP y AOX1) y de acuerdo a lo que se muestra en la **Figura 43 A** se obtuvo mayor biomasa al utilizar la cepa de *P. pastoris* con el promotor GAP en comparación con la cepa A24 con el promotor AOX1. De igual forma, la invertasa recombinante producida en el primer sistema alcanzó un máximo de actividad específica a las 36 horas de 1904 Umg⁻¹, siendo de 2.2 veces mayor en comparación con la actividad de INVA_{AOX1} (Umg⁻¹) cuya máxima actividad fue detectada a las 84 horas (**Figura 43 B**).

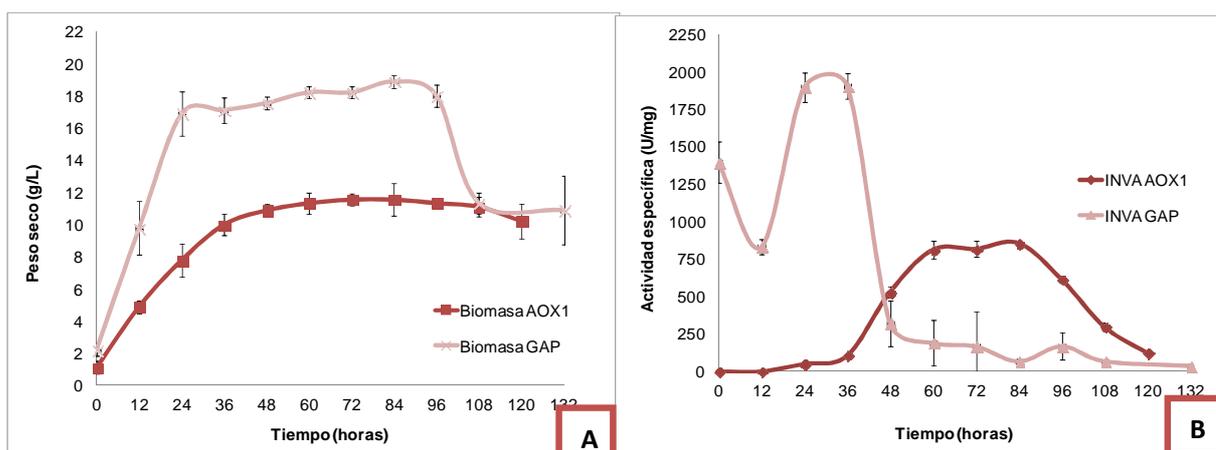


Figura 43. Producción de la invertasa intracelular recombinante regulada por el promotor inducido con metanol (AOX1) y constitutivo (GAP) expresadas en cepas de *P. pastoris* X-33. A. Cinética de biomasa obtenida por cepas de *P. pastoris* X-33 en medio BMMY (AOX1) y YPD (GAP) durante 132 horas a 28 °C y 180 rpm B. Cinética de actividad invertasa medida en el sobrenadante de cultivo de la invertasa intracelular recombinante producida por cepas de *P. pastoris* conteniendo el promotor inducible (AOX1) y constitutivo (GAP). Todos los experimentos se realizaron por triplicado con un volumen de operación del 10% en matraces de 1L.

Estos resultados se ven reflejados en un aumento en la productividad de INVA recombinante usando el promotor GAP (1.3 veces mayor que al usar el promotor AOX1), sin embargo cualquiera de los dos sistemas de expresión fue adecuado para obtener mayor cantidad de enzima en comparación con su producción de manera nativa como se muestra en la **Tabla 22**.

Tabla 22. Producción de la invertasa intracelular nativa comparada con la obtenida utilizando el sistema de *P. pastoris* con el promotor inducible (INVA_{AOX1}) y con el promotor constitutivo (INVA_{GAP}).

Enzima	Actividad específica (U mg de proteína ⁻¹)	Tiempo (h)	Biomasa (g L ⁻¹)	Proteína (g L ⁻¹)	Productividad específica (mg INV g biomasa ⁻¹)
INVA nativa	129±8	24	1.7±0.2	1.49±0.03	76
INVA _{GAP}	1904±83	36	17.1±0.8	2.82±0.08	111
INVA _{AOX1}	854±15	84	10.6±1	2.71±0.06	86

Existen diversos trabajos en donde se comparan ambos promotores para la expresión de proteínas heterólogas, para los autores que se presentan a continuación, se obtuvieron mejores resultados utilizando el promotor GAP sobre el promotor AOX1.

Tabla 23. Diferentes trabajos comparando la expresión de proteínas recombinantes utilizando el promotor constitutivo GAP y el promotor AOX1. Obteniendo que el promotor GAP fue el más adecuado para el sistema probado.

Proteína expresada	Resultado	Sistema	Referencia
β-Lactamasa	1.5 \uparrow actividad	Matraces agitados	Waterham <i>et al.</i> 1997
Quitinasa	1.5 \uparrow rendimiento	Bioreactor 1.5 L	Goodrick <i>et al.</i> 2001
Exo-levanasa	1.2 \uparrow actividad	Bioreactor 7.5 L	Menéndez <i>et al.</i> 2004
α- 1 antitripsina	1.2 \uparrow expresión	Matraces 250 mil	Arjmand <i>et al.</i> 2013
INVA_{AOX1}	1.2 \uparrow producción	Matraces 1L	Este trabajo

Cabe mencionar que los sistemas con los que se está comparando éste trabajo (**Tabla 23**) no son bajo las mismas condiciones con las cuales se realizaron las fermentaciones y en ocasiones al utilizar biorreactores los rendimientos o producción pueden verse alteradas.

7.3.2.2 Invertasa extracelular recombinante.

Conforme lo que se observa en la **Figura 44 A**, aunque la producción de biomasa fue inferior en la cepa B26 (1.3 veces) en comparación con la cepa con el promotor GAP, se obtuvo mayor actividad específica (1.3 veces más) de $INVB_{AOX1}$ (2278 Umg^{-1}) en comparación con $INVB_{GAP}$ (1748 Umg^{-1}) (**Figura 44 B**); sin embargo, en cualquiera de estos dos sistemas se obtuvo mayor actividad invertasa en comparación con la producida de manera nativa que fue de 1.7 y 1 veces, respectivamente (**Tabla 24**).

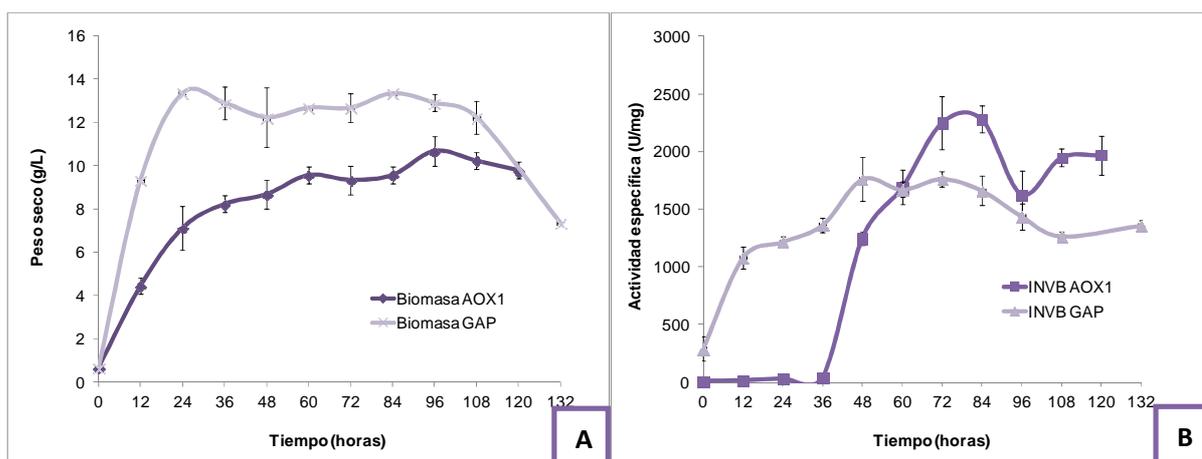


Figura 44. Producción de la invertasa extracelular recombinante regulada por el promotor inducido con metanol (AOX1) y constitutivo (GAP) expresadas en cepas de *P. pastoris* X-33. A. Cinética de biomasa obtenida por cepas de *P. pastoris* X-33 en medio BMMY (AOX1) y YPD (GAP) durante 132 horas a 28 °C y 180 rpm **B.** Cinética de actividad invertasa medida en el sobrenadante de cultivo de la invertasa extracelular recombinante producida por cepas de *P. pastoris* conteniendo el promotor inducible (AOX1) y constitutivo (GAP). Todos los experimentos se realizaron por triplicado con un volumen de operación del 10% en matraces de 1L.

A diferencia que $INVA_{GAP}$, la mayor actividad se detectó a las 48 horas para $INVB_{GAP}$ (Figura 44 B, Tabla 24), mientras que para $INVB_{AOX1}$ el tiempo en el que se cuantificó mayor actividad invertasa fue el mismo que para $INVA_{AOX1}$, siendo de 84 horas (Figura 44 B, Tabla 24).

Tabla 24. Producción de la invertasa extracelular nativa comparada con la obtenida utilizando el sistema de *P. pastoris* con el promotor inducible ($INVA_{AOX1}$) y con el promotor constitutivo ($INVA_{GAP}$).

Enzima	Actividad específica (U mg de proteína ⁻¹)	Tiempo (h)	Biomasa generada (g L ⁻¹)	Proteína generada (g L ⁻¹)	Productividad específica (mg INV g biomasa ⁻¹)
INVB nativa	317±21	10	2.3±0.15	2.39±0,13	137
INVB _{GAP}	1748±189	48	12.2±1,4	5.16±0,41	143
INVB _{AOX1}	2278±117	84	9.6±0,4	2.9±0.12*	239

Respecto a estos resultados, diversos autores han encontrado que al utilizar el promotor AOX1, la obtención de proteína recombinante fue mejor que al utilizar el promotor GAP, resultados que se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Diferentes trabajos comparando la expresión de proteínas recombinantes utilizando el promotor constitutivo GAP y el promotor AOX1. Obteniendo que el promotor AOX1 fue el más adecuado para el sistema probado.

Proteína expresada	Resultado	Sistema	Referencia
β -glucoronidasa	1.6 ↑ actividad	Tubos Falcon	Sears <i>et al.</i> 1998
Celobiohidrolasa	3 ↑ proteína	Biorreactor 5 L	Boer <i>et al.</i> 2000
Peroxidasa	5 ↑ expresión	Matraces agitados	Su-Jin <i>et al.</i> 2009
Xilanasas	11 ↑ actividad	Matraces agitados	Cayetano-Cruz 2011
Invertasa extracelular	1.5 ↑ producción	Matraces agitados 1L	Este trabajo

Aunque la producción de las invertasas utilizando el promotor AOX1 fue distinta para cada caso, se ha mencionado que la producción y expresión de las proteínas recombinantes al usar *P. pastoris* puede ser variable de un sistema a otro, siendo ambas invertasas muy diferentes en cuanto a estructura y propiedades como ya se ha mencionado con anterioridad.

Sin embargo, los resultados de actividad específica son comparables con los obtenidos por otros autores (Hsieh *et al.* 2006 y Menéndez *et al.* 2013), e incluso superiores a lo que reportan autores como Huang *et al.* (2003), Van Den Ende *et al.* (2003), Wang *et al.* (2005) y Ritsema *et al.* (2006) (Tabla 7), usando el mismo promotor AOX1.

Por otro lado, este sistema todavía puede presentar mejora, ya que de acuerdo a lo que reportan Tschoop *et al.* (1987) y Acosta *et al.* (2000), esta actividad específica es 2 veces menor utilizando el mismo sistema (Tabla 7).

Esto se puede deber a que todavía se puede optimizar las condiciones de fermentación debido a que aproximadamente el 50% de la proteína no fue secretada, detectando actividad en el paquete celular (dato no mostrado). Esto puede deberse a diversos motivos entre ellos, que las proteínas se encuentran glicosiladas y por lo tanto se retienen en el periplasma (Menéndez *et al.* 2013). Otra razón es a la falta de “tiempo” que necesita el sistema de plegamiento de *P. pastoris*. Esto se puede solucionar disminuyendo la temperatura de incubación en la fermentación hasta a 20 °C (Amore *et*

a). 2012), favoreciendo también una disminución en la lisis del citoesqueleto, junto con la secreción de proteasas al medio de cultivo y la muerte celular.

7.4 Purificación y caracterización de invertasas recombinantes $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$.

7.4.1 $INVA_{AOX1}$.

Como primer paso se ultrafiltró el sobrenadante de la fermentación inducida por metanol de la cepa AX24, utilizando una membrana de polietersulfona de 30 kDa. Posteriormente, se dializó contra el Amortiguador A (KCl 25 mM, PMSF 0.1 mM, glicerol 5% en amortiguador de acetatos 25 mM, pH 5.2). Este amortiguador fue utilizado para equilibrar una columna de intercambio catiónico UNOSPHERE S, utilizando un flujo de 2 mL con un gradiente de sal hasta 1 M.

En la **Figura 45** se muestra el cromatograma resultante de la corrida al inyectar 5 mL de muestra dializada.

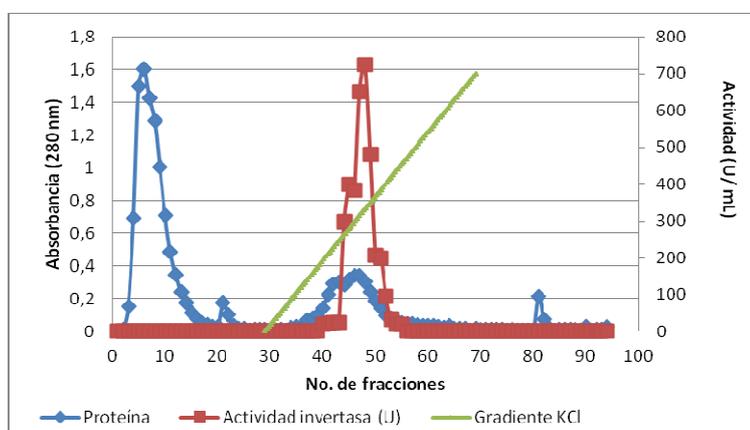


Figura 45. Perfil cromatográfico de la purificación de $INVA_{AOX1}$ utilizando una columna de intercambio catiónico. Se empleó el sobrenadante de cultivo de la clona AX24 obtenido de fermentación inducida por metanol, ultrafiltrado y en amortiguador A con un flujo de 2 mL min^{-1} .

Conforme a la actividad detectada en las fracciones, aquellas con mayor actividad invertasa fueron inyectadas en un gel SDS-PAGE al 10% para observar el perfil proteico resultante que se aprecia en la **Figura 46**.

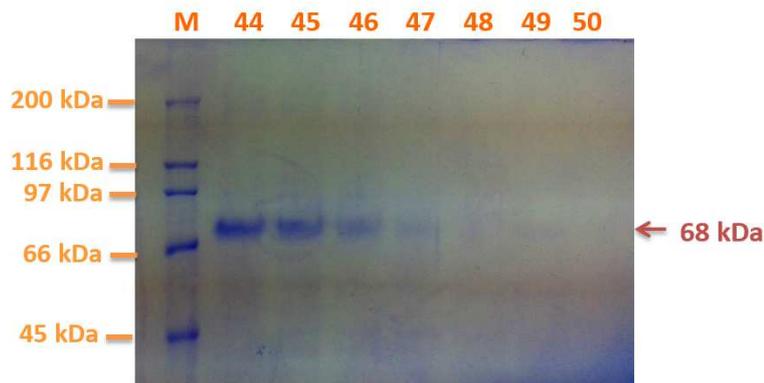


Figura 46. Análisis electroforético de las fracciones con actividad invertasa obtenidas durante la purificación de $INVA_{AOX1}$. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 44-50: Fracciones obtenidas a partir de cromatografía de intercambio catiónico.

De acuerdo a lo que se muestra en la **Figura 46** la proteína INVA expresada mediante inducción con metanol se encuentra prácticamente pura en las fracciones 44, 45 y 46, estas fracciones fueron recolectadas y almacenadas para ser utilizadas en la caracterización bioquímica de la enzima recombinante.

En la **Figura 47** se muestra el patrón proteico de los diferentes pasos de purificación llevados a cabo, mientras que en la **Tabla 26** se muestra el resumen de los resultados obtenidos de la purificación de $INVA_{AOX1}$.

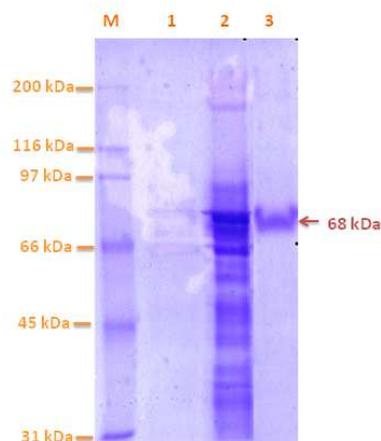


Figura 47. Análisis electroforético de los pasos de purificación empleados para obtener a $INVA_{AOX1}$ homogénea. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 1: Sobrenadante obtenido después de la inducción con metanol. Carril 2: Sobrenadante ultrafiltrado con la membrana de 30 kDa. Carril 3: Proteína purificada en la columna de intercambio catiónico.

Tabla 26. Etapas de purificación para obtener a INVA_{AOX1} homogénea expresada por *P. pastoris* X-33 mediante inducción con metanol.

	Actividad Total U (10 ³)	Proteína Total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento (%)	Factor purificación (%)
Sobrenadante	59.8±10	400±2	149±10	100	1.0
Ultrafiltración	8.21±17	8.16±0.02	1007±17	13.72	6.75
Intercambio catiónico	4.47±12	2.69±0.03	1660±11	7.47	11.14

De acuerdo a lo que se observa en la **Tabla 26**, el rendimiento general de la purificación fue de menos del 7 %, perdiendo gran cantidad de proteína en la etapa de ultrafiltración lo que nos indica que no fue el mejor método para concentrar la proteína recombinante.

Por otro lado el factor de purificación fue del 48% indicando que la proteína solamente se expresó 11 mL cada 100 mL del sobrenadante de cultivo. Aunque este valor es muy bueno, todavía se pueden optimizar las condiciones de secreción y purificación de la proteína recombinante, dado el bajo rendimiento general.

Sólo se encontró un paso crítico en la purificación de INVA_{AOX1} y esta fue al ultrafiltrar la proteína. Cabe mencionar que al realizar otros pasos de concentración, como es la precipitación con sulfato de amonio, no se obtuvieron buenos resultados, por lo que se propone buscar una alternativa para concentrar y purificar ésta proteína.

Cabe mencionar que el peso molecular no coincide con la enzima nativa, ya que ésta última presenta un peso de 59 kDa (Yanase *et al.*, 1991), mientras que la nativa presenta un de alrededor de 68 kDa. Por lo anterior, se supuso que la enzima estaba glicosilada, debido a que en la construcción obtenida no se expresó la clona de poli-histidinas ni el epítopo c-myc. Para corroborar esta hipótesis, se corrió un gel de poliacrilamida al 10% y se realizó la tinción de PAS (Ver. Sección 6.6.4.1), resultado que se muestra en la **Figura 48**.

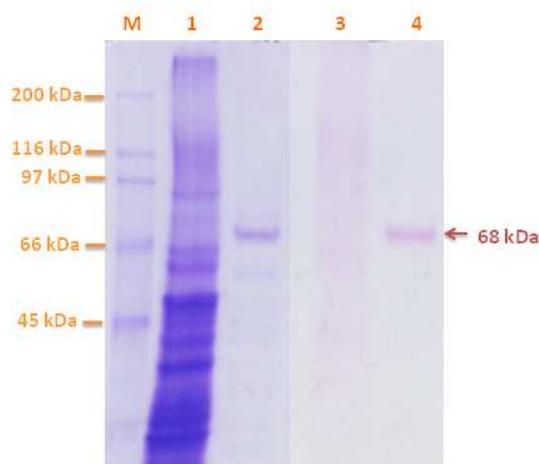


Figura 48. Análisis electroforético de la invertasa $INVA_{AOX1}$ por medio de tinción de PAS. Gel de poliacrilamida al 10% teñido con reactivo de Schiff **Carril M:** Marcador de peso molecular. **Carril 1 y 3.** Control positivo de glicosilación: Preparación de invertasa comercial de *S. cerevisiae*. **Carril 2 y 4:** $INVA$ recombinante purificada.

En la **Figura 48** se corrobora que $INVA_{AOX1}$ expresada por *P. pastoris* se encuentra glicosilada, debido a que se observa una banda en el carril 4 color rosado, característica de la tinción de azúcares oxidados por el reactivo de Schiff, banda que se observa en el carril 3, siendo nuestro control positivo un preparado comercial de la invertasa de *S. cerevisiae*, la cual tiñe también color rosa.

7.4.1.1 Análisis de la glicosilación de $INVA_{AOX1}$.

Dado que se encontró que $INVA_{AOX1}$ presentaba evidencia de glicosilación al realizar la tinción PAS, se decidió hacer un análisis *in silico* de los posibles sitios de glicosilación utilizando el programa <http://turing.cs.iastate.edu/EnsembleGly/> resultados que se muestran a continuación:

```

MESPSYKNLIKAEDAQKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFFKGEYHLFYQYYPFAPVWGPMMHWGHAKSRDL
-----
VHWETLPVALAPGDSFDRDGCFSGCAVDNNGVLTLIYTGHI VLSNDSPDAIREVQCMATSIDGIHFQKEGIVLEKAPMPQ
-----N-----
VAHFRDPRVWKENDHWFMVVGYRTDDEKHQGI GHVALYRSENLDWIFVKTL LGDNSQLPLGKRAFMWECPDFFSLGNRS
-----N-----
VLMFSPQGLKASGYKNRNLFGNGYILGKWQAPQFTPETSFQELDYGHDFYAAQRFEAKDGRQILIAWFDMWENQKPSQRD
-----
GWAGCMTLPRKLDLIDNKIVMTPVREMEILRQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSSAYQAGLALRCNG
-----
KGQETLLYIDRSQNRRIILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRSSEIEIFVGDDQTQGLYSISSRIFPKDLSLKG
-----N-----
RLFAIEGYAVFDSFKRWTLQDANLAAFSSDTC
-----

```

Figura 49. Análisis de la estructura primaria de la invertasa intracelular de *Z. mobilis* de posibles sitios de N-glicosilación. La secuencia fue tomada de UniProt con número de acceso AAO38865.1.

Conforme lo que se muestra en la **Figura 49** existen cuatro sitios para N-glicosilación siendo éstos en los aminoácidos de asparagina los cuales se encuentran en las posiciones: 124, 237, 420 y 436 de la estructura primaria de la invertasa intracelular. Por lo tanto se puede decir que el aumento de peso de $INVA_{AOX1}$ en un 16% puede deberse a las evidencias presentadas de tinción con PAS (**Figura 48**) y el análisis *in silico*.

Se realizó el análisis para determinar si esta misma secuencia puede presentar secuencias de O-glicosilación, sin embargo no se obtuvo sitios posibles de O-glicosilación, para que *P. pastoris* pudiera llevar a cabo dicha adición.

7.4.1.2 Desglicosilación de $INVA_{AOX1}$.

Una vez que se utilizó la Endo H para la desglicosilación de $INVA_{AOX1}$ purificada, la enzima desglicosilada, denominada d- $INVA_{AOX1}$, (Ver. Sección 6.6.4.2) se analizó por SDS-PAGE al 10% para determinar el peso molecular de la enzima desglicosilada (**Figura 50**).

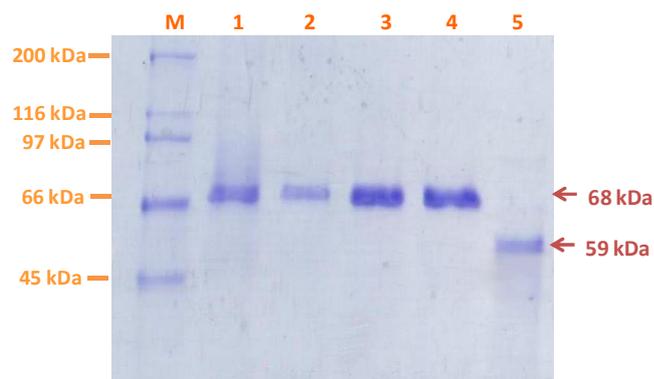


Figura 50. Análisis electroforético de la invertasa d-INVA_{AOX1}. Gel de poliacrilamida al 10 %. **Carril M:** Marcador de peso molecular. **Carril 1-4.** INVA_{AOX1} **Carril 5:** INVA_{AOX1} después de tratamiento con Endo H.

En la **Figura 50** se observa que una vez se le remueven los grupos manosa a la invertasa recombinante, el peso molecular disminuye a aproximadamente 59 kDa, que es el peso reportado por Calixto-Romo (2008). Sin embargo, las pruebas realizadas anteriormente no son 100% concluyentes para estudios de glicosilación, por lo que entre las perspectivas de este trabajo podrían incluirse el análisis detallado del tipo de glicosilación que presenta esta enzima recombinante.

7.4.1.3 Caracterización bioquímica de INVA_{AOX1} y d-INVA_{AOX1}.

7.4.1.3.1 Determinación de temperatura óptima.

La primera determinación bioquímica que se realizó fue la temperatura óptima, utilizando como sustrato sacarosa 50 mM y amortiguador de acetatos pH 5.5, las temperaturas probadas fueron desde 20 a 55 °C, con un tiempo de incubación de 10 minutos.

Se observó un pico máximo de actividad porcentual en la temperatura de 35 °C (**Figura 51**), siendo ésta 5 grados superior a la temperatura óptima de la invertasa nativa (Yanase *et al.*, 1995). Esta diferencia probablemente se deba a que la enzima recombinante se encuentra glicosilada y de acuerdo a algunos estudios de Meldgaard & Svendsen (1994), la glicosilación en enzimas le confieren mayor termoestabilidad. Al desglicosilar la enzima, la temperatura óptima registrada fue de 30 °C, siendo esta la temperatura óptima reportada. Por lo tanto, se puede suponer que la glicosilación podría confiere mayor termoestabilidad a la INVA_{AOX1}.

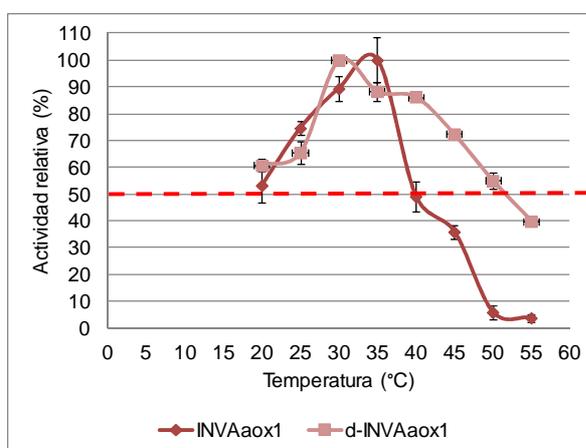


Figura 51. Determinación de la temperatura óptima de la INVA_{AOX1} y d-INVA_{AOX1}. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

7.4.1.3.2 Determinación de pH óptimo

La temperatura óptima sirvió de referencia para realizar la determinación de pH óptimo, el cual se determinó utilizando un rango de pH de 4.0 a 7.5 utilizando diferentes amortiguador y sacarosa 50 mM, con un tiempo de incubación de 10 minutos.

En la **Figura 52** se observa la campana del actividad conforme el rango de pH mencionado anteriormente, mostrando un óptimo de 5.5, siendo éste una unidad más baja que el pH óptimo de la enzima nativa, que fue de 6.5 (Yanase *et al.*, 1995).

Para ambas enzimas (glicosilada y desglicosilada) el pH óptimo no fue modificado, parámetro que no se ha visto sea afectado por la glicosilación.

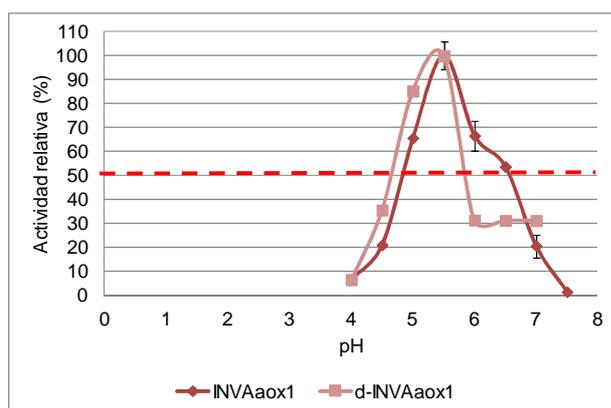


Figura 52. Determinación del pH óptimo de INVA_{AOX1} y d-INVA_{AOX1}. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

7.4.1.3.3 Determinación de parámetros cinéticos

Una vez obtenidos la temperatura y pH óptimo se estimó la velocidad de hidrólisis utilizando diferentes concentraciones de sacarosa, que fueron de 0.01 M a 2 M, bajo las condiciones mencionadas anteriormente. En la **Figura 53** se presentan las curvas de consumo de sacarosa de ambas enzimas.

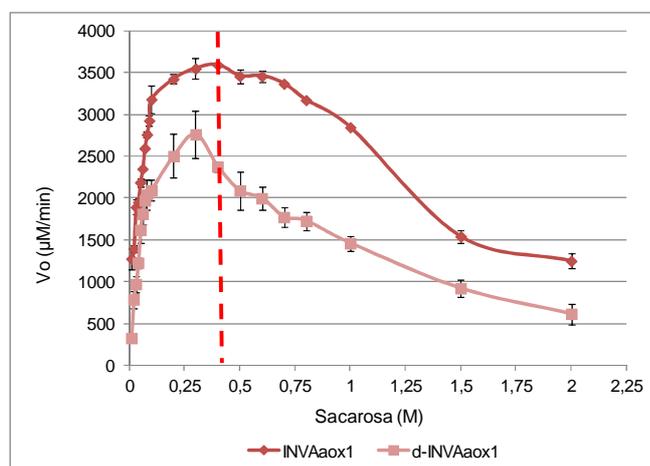


Figura 53. Consumo de sacarosa de INVA_{AOX1} y d-INVA_{AOX1}. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

Conforme lo observado en la **Figura 53** se puede determinar que esta invertasa recombinante tiene una tolerancia a concentraciones elevadas de sacarosa, empezando a inhibir su actividad a una concentración de 0.4 M, siendo ésta superior a la inhibición por sustrato de la invertasa nativa, la cual es de 0.3 M de sacarosa (Yanase *et al.*, 1995). Este valor reportado es el mismo cuando la enzima es desglicosilada (**Figura 53**, línea con cuadros). Sin embargo, ambas invertasas presentan mayor estabilidad a sacarosa en comparación con la invertasa de *S. cerevisiae* que tolera concentraciones de 150 mM (Gracida-Rodríguez 2002).

Con estos valores se realizaron las regresiones lineales para determinar las constantes cinéticas K_M y V_{max} , mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Wolf obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 27. Constantes cinéticas de la INVA_{AOX1} e d-INVA_{AOX1} obtenidas mediante regresión lineal y su comparación con la invertasa nativa de *Z. mobilis*. El valor de k_{cat} fue calculado utilizando 5.51 μ M de INVA_{AOX1} y 8.8 μ M de d-INVA_{AOX1}. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

	K_M (mM)	V_{max} (μ mol mLmin ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Inhibición sacarosa (mM)	Método de regresión
INVA nativa*	110	62.5	56.92	0.517	400	-----
INVA_{AOX1}	41	4000	12 149	296	400	Hanes-Wolf
d-INVA_{AOX1}	83	3333	8 831	107	300	Eadie- Hofstee

* Los valores de la INVA nativa fueron obtenidos de Yanase *et al.* 1995, Calixto-Romo 2008 y éste trabajo.

De acuerdo a lo que se presenta en la **Tabla 27**, todos los parámetros cinéticos se vieron afectados negativamente al desglicosilar INVA_{AOX1}, disminuyendo la afinidad de la enzima por el sustrato aproximadamente dos veces, la velocidad de consumo en 1.2 veces, el número de recambio en 1.3 veces y la eficiencia de la invertasa en 2.7 veces.

Como se ha mencionado anteriormente, la glicosilación puede afectar la actividad y funcionalidad de las enzimas recombinantes, este efecto se da tanto positiva como negativamente y ha sido reportado por diversos autores (Han y Lei 1999, Acosta *et al.* 2000, Henriksson *et al.* 2003, Kim *et al.* 2010, Jedrzejczak *et al.* 2011, Han *et al.* 2014, Plascencia-Espinosa *et al.* 2014).

Se ha observado que la desglicosilación de una enzima recombinante puede provocar un cambio de efecto dinámico o cambio en las interacciones específicas que se dan en el sitio activo. Sin embargo, es evidente que ambas enzimas recombinantes presentaron características más atractivas que la invertasa nativa. Este aumento en sus propiedades puede deberse a que la adición de glúcidos aumenta la estabilidad de la proteína influyendo positivamente en la tasa específica de reacción (Henriksson *et al.* 2003).

Existen algunos estudios acerca del mecanismo bajo el cual la glicosilación afecta la actividad enzimática, refiriendo a que si el sitio de glicosilación se encuentra cerca del sitio de unión a sacarosa puede haber una interacción específicamente en el sitio activo (Lloyd *et al.* 2000) y en este caso, esta interacción afectó positivamente la tasa específica de reacción con el sustrato.

7.4.1.3.4 Determinación de la termoestabilidad

Se determinó la termoestabilidad de las enzimas recombinantes purificadas las cuales se evaluaron a 55 °C (**Figura 55**), 45 y 35°C (**Figura 54**).

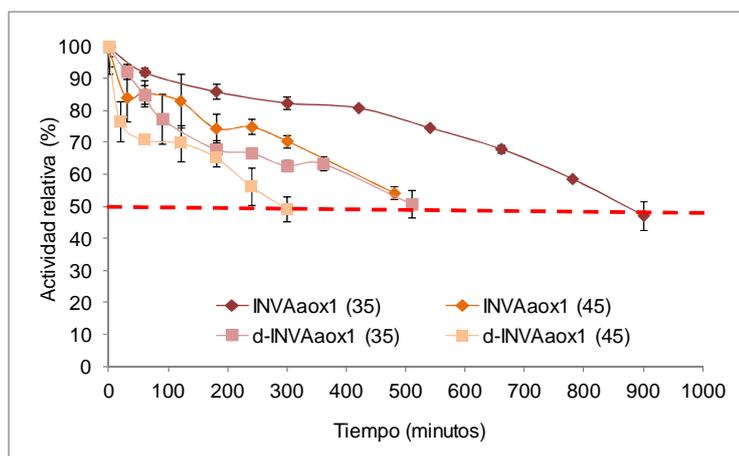


Figura 54. Termoestabilidad de INVA_{Aox1} y d-INVA_{Aox1} a 35 y 45 °C. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 54**, la invertasa recombinante producida por *P. pastoris* es capaz de tolerar mayor temperatura, a diferencia de la enzima nativa, debido a que la temperatura máxima reportada por Calixto-Romo (2008) sugieren que a 40 °C la invertasa nativa perdía el 100% de actividad después de 20 minutos de incubación; mientras que la obtenida de manera recombinante tolera una temperatura de 45°C, manteniendo el 54% de su actividad durante 480 minutos, y a lo reportado por Aït-Abdelkader *et al.*(2000), quienes obtuvieron una vida media de 30 minutos a 46°C.

Este aumento de termoestabilidad probablemente se deba al grado de glicosilación que presenta la proteína recombinante, de acuerdo a lo reportado por Meldgaard y Svendsen en 1994.

Por otro lado, haciendo la comparación de entre la glicosilada y la tratada con Endo H se puede observar que la estabilidad a las temperaturas probadas fue mayor para las enzimas con grupos glicosilo, debido a que al incubar a INVA_{AOX1} a 35 °C la vida media se alcanza a los 900 minutos (15 horas) 1.7 veces superior que al su homóloga desglicosilada.

El mismo efecto se observa al preservar INVA_{AOX1} a 45 °C obteniendo un aumento en la vida media de 1.6 veces (480 minutos, 8 horas) en comparación con d-INVA_{AOX1} (300 minutos, 5 horas), así como a 55 °C (**Figura 55**) obteniendo un incremento de 1.5 veces la estabilidad a esa temperatura (90 minutos) comparada con la desglicosilada (60 minutos).

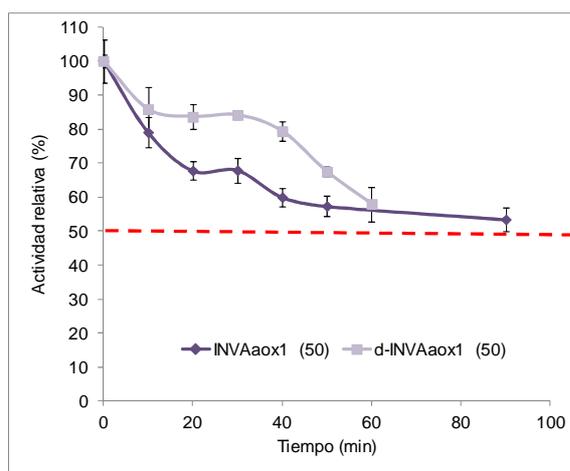


Figura 55. Termoestabilidad de INVA_{AOX1} y d-INVA_{AOX1} a 55 °C. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

Este efecto no se puede atribuir al tipo de enzima que se utilizó para desglicosilar, debido a que, como se ha mencionado con anterioridad, la Endo H sólo remueve grupos glicosilo sin generar alteración en la actividad enzimática (Meldgaard y Svendsen 1994), además que esta etapa se llevó a cabo a 4 °C.

El efecto de la glicosilación sobre la termoestabilidad ya ha sido observado por diversos autores (Guimarães *et al.* 2009, Acosta *et al.* 2000, Han y Lei 1999, Han *et al.* 2014), quienes sugieren que los carbohidratos confieren estabilidad a la enzima mediante interacciones covalentes, protegiendo a la enzima de desnaturalización por calor y pueden por lo tanto proveer estabilidad térmica protegiéndola de agregación prematura por las altas temperaturas.

La remoción de estos grupos glicosilo, como ya se ha observado en la **Figura 50**, resulta en la disminución de la estabilidad (Kim *et al.* 2010) y por lo tanto se puede reflejar en la reducción de la vida media de las temperaturas probadas en este estudio.

7.4.1.3.5 Efecto de iones metálicos y EDTA

Se probaron diferentes iones metálicos divalentes para determinar el efecto de éstos sobre la actividad invertasa, debido a que se ha visto que pueden fungir de activadores o inhibidores, resultados que se muestran a continuación:

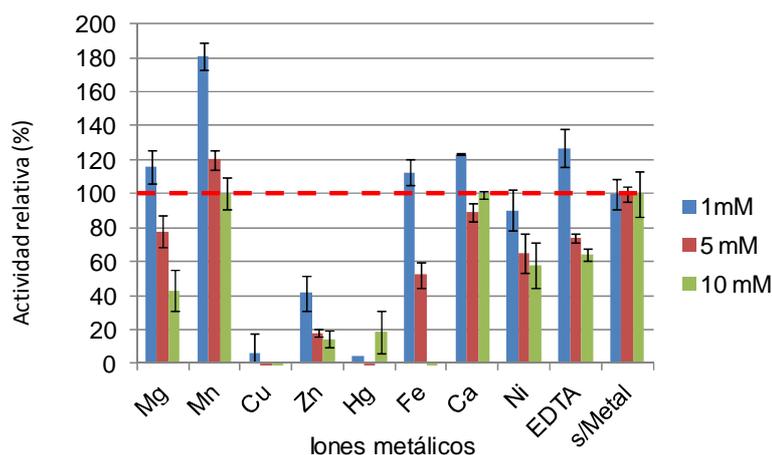


Figura 56. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre $INVA_{AOX1}$ a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Todos los metales fueron adicionados en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5, preparados al momento del estudio y se realizó por triplicado.

Conforme a lo que se muestra en la **Figura 56**, los iones que fueron activadores de la actividad invertasa fueron el Fe^{2+} (12%), Mg^{2+} (16%) y Mn^{2+} (80%), mientras que los iones Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} y Ni^{2+} fueron inhibidores de la actividad invertasa en cualquiera de las concentraciones probadas.

Se ha reportado que la enzima nativa de *Z. mobilis* es inhibida de la misma forma por $HgCl_2$ (Yanase *et al.* 1995). Este tipo de efecto sugiere que puede existir la presencia de grupos tiol en el sitio catalítico de la enzima, los cuales son importantes para la actividad (Dipasquale *et al.* 2009, Jedrzejczak *et al.* 2011). Por lo tanto, interacciones con el grupo $-SH$ o $-S$ pueden producir cambios conformacionales en la estructura de la proteína. En el caso del ion Cu^{2+} , este puede oxidar los residuos de cisteína en la proteína y por lo tanto ocasionar cambios en la estructura y por tanto alterar la actividad (Giraldo *et al.* 2012).

En el caso de los activadores como el ion Ca^{2+} , aunque no es un activador convencional en invertasas bacterianas, este ion puede interactuar con las cargas de los grupos amino de las proteínas y por lo tanto alterar la conformación estructural afectando directamente el sitio catalítico y por lo tanto actuando con la interacción hacia su sustrato (Rustigel *et al.* 2011).

7.4.1.3.6 Determinación del punto isoeléctrico (PI)

Por último se realizó el estudio para determinar el punto isoeléctrico de la $\text{INVA}_{\text{AOX1}}$, utilizando un Rotofor® de BioRad, utilizando una solución de anfolitos de pH de un rango de 3.5 a 10.

Los resultados correspondientes a éste experimento se muestran en la **Figura 57**.

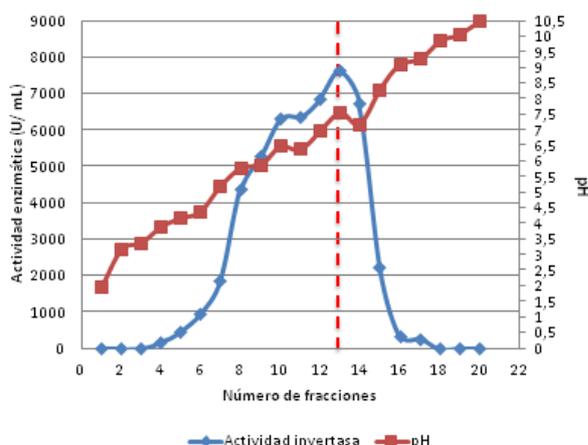


Figura 57. Isoelectroenfoque obtenido a partir del ultrafiltrado conteniendo a la proteína recombinante INVA.

Conforme a lo observado en la **Figura 57**, el PI de la INVA recombinante es de 7.6 siendo éste diferente al reportado por Yanase *et al.* (1995) que es de 8.5, pero que sin embargo es muy similar al reportado por Aït-Abdelkader *et al.* (2000), el cual es de 7.3.

7.4.2 INVB_{AOX1}.

Para el caso de la invertasa extracelular, se siguió el mismo protocolo para la inducción descrito para INVA_{AOX1}; sin embargo, para concentrar la proteína se realizó precipitación con sales de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 80% y posteriormente se dializó contra amortiguador de L-Histidina (KCl 25 mM, PMSF 0.1% y Glicerol al 5%, amortiguador de L-Histidina, pH 5.2). Este amortiguador fue utilizado para realizar la cromatografía de intercambio aniónico, utilizando una columna UNOSPHERE Q, con un flujo de 2 mL min^{-1} .

En la **Figura 58** se presenta el cromatograma resultante de la corrida de la muestra de invertasa dializada descrita anteriormente.

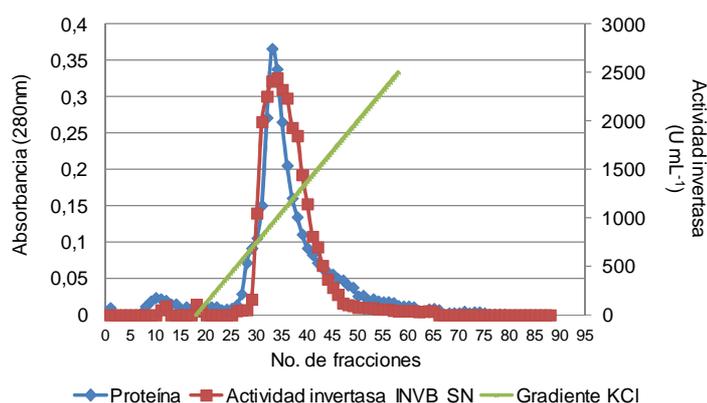


Figura 58. Perfil cromatográfico de la purificación de INVB_{AOX1} utilizando una columna de intercambio aniónico. Se empleó el sobrenadante de cultivo de la transformante BX26, obtenido de la fermentación inducida con metanol, precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado contra amortiguador B con un flujo de 2 mL min^{-1} .

Las fracciones que presentaron mayor actividad y proteína, se inyectaron a un gel SDS-PAGE al 10% para observar el perfil proteico resultante, el cual se vislumbra en la **Figura 59**.

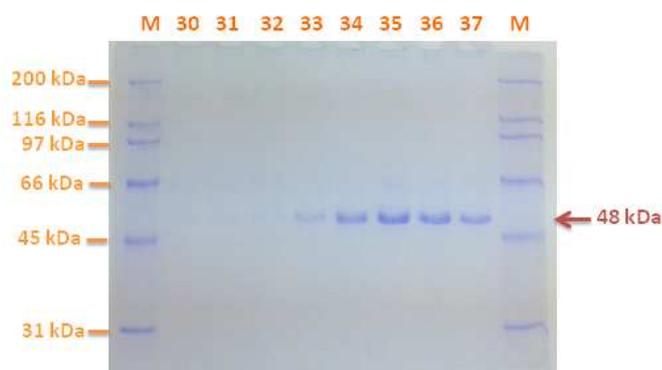


Figura 59. Análisis electroforético de las fracciones con actividad invertasa obtenidas durante la purificación de la invertasa $INVB_{AOX1}$. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 30-37: Fracciones obtenidas a partir de cromatografía de intercambio aniónico.

De acuerdo a lo que se observa en la **Figura 59** $INVB_{AOX1}$ se encuentra pura desde las fracciones 33 a la 37, las cuales fueron recolectadas y utilizadas para la caracterización bioquímica.

En la **Figura 60** se muestra el gel de SDS-PAGE resumiendo las etapas de purificación utilizados para $INVB_{AOX1}$, asimismo en la **Tabla 28** se muestra el resumen de los resultados obtenidos de los pasos de separación de la invertasa producida por *P. pastoris*.

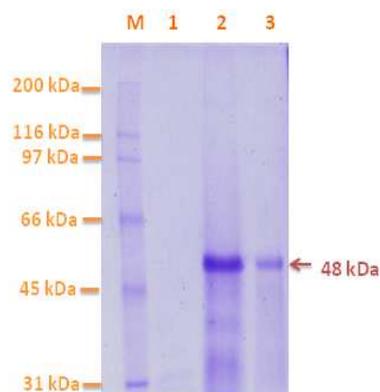


Figura 60. Análisis electroforético de los pasos de purificación empleados para a $INVB_{AOX1}$ homogénea. Carril M: Marcador de peso molecular. Carril 1: Sobrenadante obtenido después de la inducción con metanol. Carril 2: Sobrenadante precipitado con $(NH_4)_2SO_4$. Carril 3: Proteína purificada por una columna de intercambio aniónico.

Tabla 28. Pasos de purificación para obtener a INVB_{AOX1} homogénea expresada por *P. pastoris* X-33 mediante inducción con metanol.

	Actividad Total U (10 ³)	Proteína Total (mg)	Actividad específica (U mg ⁻¹)	Rendimiento %	Factor purificación %
Sobrenadante	15.81 ± 2	23.34 ± 0.08	678 ± 2	100	1
Precipitación	11.46 ± 28	7.81 ± 0.07	1468 ± 28	72	2.17
Intercambio aniónico	7.59 ± 15	3.81 ± 0.01	1993 ± 15	48	2.94

Para esta purificación se obtuvo un rendimiento más alto que en el caso de INVA_{AOX1}, siendo este del 48%, correspondiendo a la etapa donde se perdió mayor cantidad de proteína el paso de precipitación y por lo tanto la etapa crítica de este proceso.

Sin embargo, el factor de purificación por otro lado fue más bajo que para la invertasa intracelular, siendo de casi 3%, lo que indica que solamente la proteína se encuentra expresada en el sobrenadante de cultivo en esa proporción (**Tabla 28**).

En ambos casos sigue siendo necesario optimizar el proceso de fermentación, ya sea disminuyendo la temperatura para permitir mejor secreción de la proteína recombinante (Amore *et al.* 2012), utilizando un biorreactor para controlar adecuadamente variables que influyen la expresión de la proteína de interés como son: oxígeno disuelto, concentración de metanol, agitación, pH, entre otros (Cereghino *et al.* 2002, Daly y Hearn 2005, Macauley-Patrick *et al.* 2005, Jahic *et al.* 2006).

7.4.2.1 Análisis de la glicosilación de INVB_{AOX1}.

Por el análisis de tinción de PAS realizado anteriormente (**Figura 48**) se intuye que el grado de glicosilación o los sitios de glicosilación de INVB son menores a INVA. Para confirmar esto, se realizó el análisis *in silico* de los posibles sitios de N- u O-glicosilación.

```

MFNFNASRWTRAQAMKVNKFDLTTSMPEIGTDFPIMRDDLWLWDTWPLRDINGNPVVSFKGWNVIFSLVADRNIIPWDRHS
-----N-----
HARIGYFYKDGKSWVYGGHLLQESANTRTAEWSSGTIMAPGSRNQVETFFSTLFDKNGVREAAVTKGRIYADSEGV
-----
WFKGFDQSTDLFQADGLFYQNYAENNLWNFRDPHFVINPEDGETYALFEANVATVRGEDDIGEDEIGPVPANTVVPKDAN
-----
LCSASIGIARCLSPDRTEWELLPLLLTAFGVNDQMERPHVIFQNGLYLFTI SHDSTYADGLTGSDGLYGFVSENGIFGP
-----
YEPLNGSGLVGGPASQPTEAYAHYIMNGLVESFINEIIDPKSGKVIAGGSLAPTVRVELQGHETFATEVFDYGYIPAS
-----N-----
YAWPVWPFDRRK
-----

```

Figura 61. Análisis de la estructura primaria de la invertasa extracelular de *Z. mobilis* de posibles sitios de N-glicosilación. La secuencia fue tomada de UniProt con número de acceso P0DJA4.

En la **Figura 61** se corrobora que INVB tiene menos sitios probables para N-glicosilación, siendo estos en las asparaginas de posición 4 y 324 además de encontrarse en los extremos de la estructura primaria, sólo son dos en comparación con INVA, es por esta razón que el peso molecular de la recombinante no fuera tan elevado siendo este de sólo del 6%.

De igual forma se realizó el análisis para probables sitios de O-glicosilación, resultando que no existen sitios probables para esta modificación.

7.4.2.2 Desglicosilación de INVB_{AOX1}.

De igual manera que para INVA_{AOX1} el PM de INVB_{AOX1} no coincide con la enzima nativa, presentando un peso de aproximadamente 48 kDa; mientras que la nativa presenta un PM de 45 kDa (Yanase *et al.*, 1991, Calixto-Romo 2008), por lo que se cree que esta enzima también posee glicosilación, para corroborarlo se realizó un gel con tinción de PAS resultado que se muestra en la **Figura 62**.

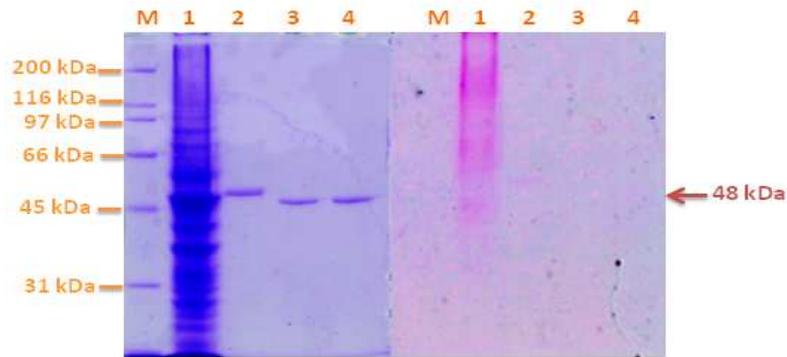


Figura 62. Análisis electroforético de la invertasa $INVB_{AOX1}$ purificada mediante tinción de PAS. Gel SDS-PAGE al 10% teñido con reactivo de Schiff Carril M: Marcador de peso molecular, Carril 1. Control positivo de glicosilación: Preparación de invertasa comercial de *S. cerevisiae*, Carril 2: $INVB_{AOX1}$ purificada, Carril 3 y 4: $INVB_{AOX1}$ después de tratamiento con Endo H

Tal como se muestra en la **Figura 62**, la proteína que es expresada por *P. pastoris* se encuentra glicosilada, debido a que se observa una banda en el carril 2 color rosado, no siendo así para los carriles 3 y 4, los cuales al ser tratados con la Endo H pierden sus grupos glicosilo, y por lo tanto ya no se lleva a cabo la tinción de PAS. Además de presentar una migración diferente de la banda de 48 kDa, la cual muestra un peso molecular de la enzima desglucosilada ($d-INVB_{AOX1}$), que es de 45 kDa.

Con estos resultados se llevó a cabo e mismo procedimiento que para $INVA_{AOX1}$ y $d-INVA_{AOX1}$.

7.4.2.3 Caracterización bioquímica de $INVB_{AOX1}$ y $d-INVB_{AOX1}$.

7.4.2.3.1 Determinación de temperatura óptima.

La primera determinación bioquímica que se realizó fue la temperatura óptima, utilizando como sustrato sacarosa 50 mM y amortiguador de acetatos pH 5.5, las temperaturas probadas fueron desde 20 a 55 °C, dejando incubar a la enzima durante 1 minuto.

Se observó un pico máximo de actividad porcentual en la temperatura de 40 °C (**Figura 63**), tanto para la glicosilada como la desglucosilada, siendo ésta 5 grados inferior a la temperatura óptima de la invertasa nativa (Yanase *et al.*,1995). Dado que el grado de glicosilación de la enzima recombinante no es muy grande (3 kDa), no podemos atribuir el cambio de temperatura a esta modificación postraduccional en específico.

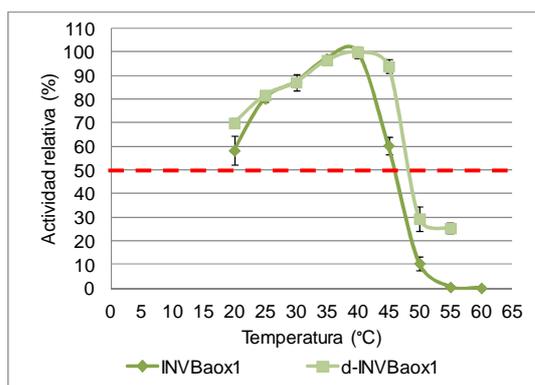


Figura 63. Determinación de la temperatura óptima de la INV_{AOX1} y $d-INV_{AOX1}$. La línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglucosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

7.4.2.3.2 Determinación de pH óptimo

Posteriormente se realizó la determinación de pH óptimo, el cual se determinó utilizando diferentes amortiguadores para abarcar un rango desde pH 4.0 a 7.5, incubando en solución de sacarosa por 1 minuto.

En la **Figura 64** se observa la campana del actividad conforme el rango de pH mencionado anteriormente, mostrando un óptimo de 5.5, para ambas enzimas siendo éste el mismo pH óptimo de la enzima nativa (Yanase *et al.* 1995).

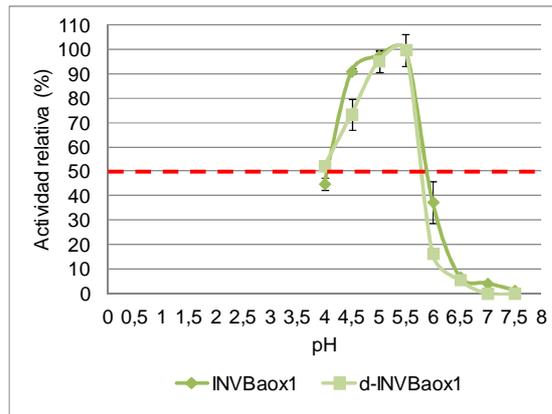


Figura 64. Determinación del pH óptimo de $INVB_{AOX1}$ y $d-INVB_{AOX1}$. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

7.4.2.3.3 Determinación de parámetros cinéticos

Determinados la temperatura y pH óptimo se estimó la velocidad de hidrólisis utilizando diferentes concentraciones de sacarosa, que fueron de 0.01 M a 2 M, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, para ambas enzimas, en la **Figura 65** se presenta la curva de consumo de sacarosa.

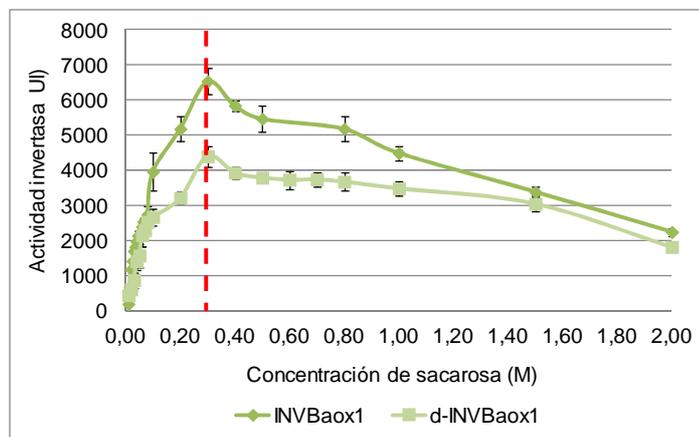


Figura 65. Consumo de sacarosa de $INVB_{AOX1}$ y $d-INVB_{AOX1}$. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

Conforme lo observado en la **Figura 65**, se puede determinar que ambas invertasas poseen alta tolerancia a concentraciones elevadas de sacarosa, empezando a inhibir su actividad a una concentración de 0.3 M, siendo ésta superior a la inhibición por sustrato de la invertasa nativa, la cual es de 0.2 M de sacarosa (Yanase *et al.*, 1995); sin embargo, INVA_{AOX1} presenta el mayor grado de tolerancia a sacarosa (0.4 M).

Con estos valores se realizaron las regresiones lineales para determinar las constantes cinéticas K_M y V_{max} , mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hoffstee y Hanes-Wolf, lo que se presenta en **Tabla 29**.

Tabla 29. Constantes cinéticas de la INVB_{AOX1} e d-INVB_{AOX1} obtenidas mediante regresión lineal y su comparación con la invertasa nativa de *Z. mobilis*. El valor de k_{cat} fue calculado utilizando 7.82 μ M de INVB_{AOX1} y 8.2 μ M de d-INVB_{AOX1}. Todas las determinaciones fueron hechas por triplicado.

	K_M (mM)	V_{max} (μ mol mLmin ⁻¹)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Inhibición sacarosa (mM)	Método de regresión
INVB nativa*	98	33.6	12000	122	300	-----
INVB_{AOX1}	50	5000	10 396	208	300	Hanes-Wolf
d-INVB_{AOX1}	50	4060	8210	164	300	Hanes-Wolf

* Los valores de la INVA nativa fueron obtenidos de Santiago-Hernández *et al.* 2006, Calixto-Romo 2008 y Vallejo-Becerra *et al.* 2008.

De acuerdo a lo que se presenta en la **Tabla 29**, al igual que para el caso de la invertasa recombinante intracelular, cuando a INVB_{AOX1} se le remueven los grupos glicosilo, las propiedades catalíticas de esta se ven disminuidos para la velocidad máxima (1.5 veces), k_{cat} (1.3 veces) y k_{cat}/K_M (1.3 veces). Sin embargo, estas modificaciones no fueron tan drásticas como para la intracelular, e incluso no hubo cambios para K_M , lo cual podría deberse a que el número de sitios de glicosilación disminuyeron.

Sin embargo, la mayoría de los parámetros cinéticos mejoraron, independientemente de si la enzima está glicosilada o sin glicosilar, en comparación con la enzima nativa. Las posibles explicaciones se discutieron en las secciones anteriores.

7.4.2.3.4 Determinación de la termoestabilidad

En esta sección se evaluaron cuatro temperaturas: 50, 45, 40 y 35 °C, y los resultados que se muestran a continuación:

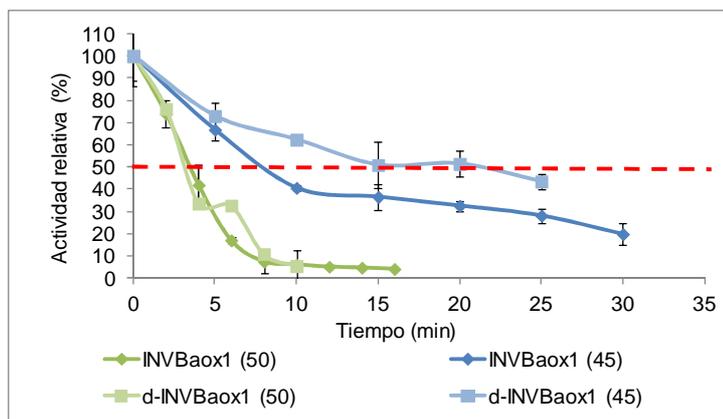


Figura 66. Termoestabilidad de $INVB_{AOX1}$ y $d-INVB_{AOX1}$ a 50 y 45 °C. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 66**, para las temperaturas de 50 y 45 °C no hubo diferencia significativa en la termoestabilidad.

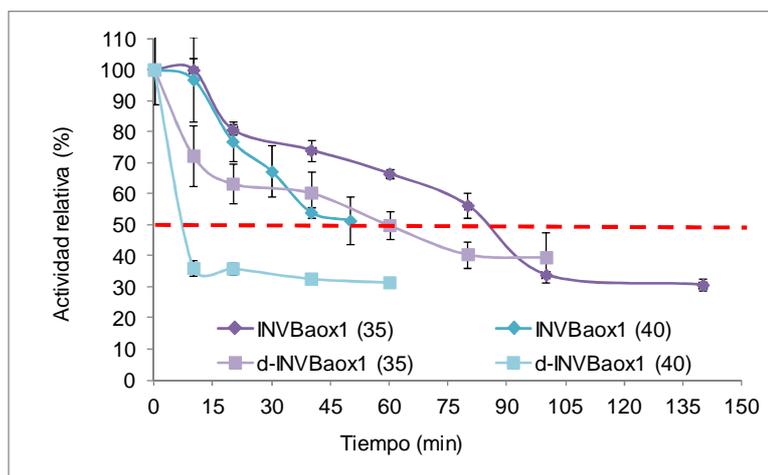


Figura 67. Termoestabilidad de $INVB_{AOX1}$ y $d-INVB_{AOX1}$ a 40 y 35 °C. La gráfica de línea continua con rombos corresponde a la invertasa recombinante glicosilada mientras que la gráfica con cuadros corresponde a la desglicosilada. Ambas enzimas fueron probadas bajo las mismas condiciones realizando el estudio por triplicado.

Como se muestra en la **Figura 67**, para las temperaturas evaluadas de 35 y 40 °C se observó un comportamiento similar al desglucosilar $INVA_{AOX1}$, debido a que para ambas temperaturas se observó una menor vida media (50%) de actividad, en ambos casos disminuyendo. Para la temperatura de 35 °C, la vida media de $INVB_{AOX1}$ fue de 80 minutos, disminuyendo 1.3 veces (60 minutos) al desglucosilarla y someterla a la misma temperatura. Para 40 °C el 50% de actividad se alcanzó 40 minutos en la glicosilada, mientras que para la desglucosilada este porcentaje se obtuvo aproximadamente a los 7 minutos, casi 6 veces menos del tiempo.

Es evidente que para $INVA_{AOX1}$, que presentó mayores sitios potenciales de glicosilación, la termoestabilidad fue mayor que para $INVB_{AOX1}$. Esto nos da indicios de que el grado de glicosilación puede ayudar a que una enzima recombinante sea más termoestable.

7.4.2.3.5 Efecto de iones metálicos y EDTA

Se probaron diferentes iones metálicos divalentes para determinar el efecto de éstos sobre la actividad invertasa, debido a que se ha visto que pueden fungir de activadores o inhibidores. Los resultados que se muestran a continuación:

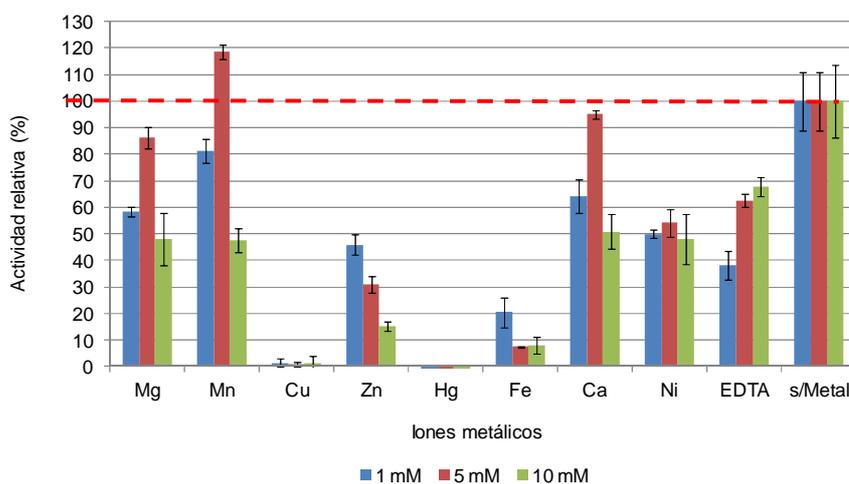


Figura 68. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre $INVB_{AOX1}$ a concentraciones de 1, 5 y 10 mM. Todos los metales fueron medidos en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5, preparados al momento del estudio y se realizó por triplicado incubando al enzima por 1 minuto.

Los resultados de la **Figura 68** muestran que tanto para la invertasa intracelular como para la extracelular, el ion Hg^{2+} tiene un efecto inhibitorio del 100% y, en el caso de $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$, también se ve inhibida por el ion Cu^{2+} .

La adición de Mn^{2+} 5 mM aumentó la actividad en 20%, este efecto activador también se ha observado en invertasas de *Aspergillus ochraceus* y *Aspergillus phoenicis* (Guimarães *et al.* 2009, Rustigel *et al.* 2011). Aunque este aumento es poco, también hubo un aumento al usar Ca^{2+} , igual que en el caso de la invertasa intracelular $\text{INVA}_{\text{AOX1}}$.

7.4.2.3.6 Determinación de actividad invertasa mediante Zimograma.

Como parte de los ensayos para estandarizar nuevos métodos de cuantificación de actividad invertasa, se estandarizó una técnica para detección de proteínas con actividad invertasa mediante gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes. Los resultados se muestran en la **Figura 69**.

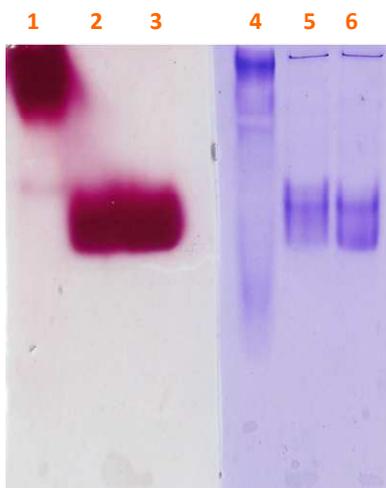


Figura 69. Zimograma de actividad invertasa realizado a $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ purificada. Carril 1 y 4: Control positivo, preparación comercial de invertasa de *S. cerevisiae*, Carril 2, 3, 5 y 6. $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ purificada.

Conforme lo que se muestra en la **Figura 69**, el método estandarizado para detectar actividad invertasa mediante geles de poliacrilamida fue adecuado por lo que se puede realizar para otros estudios de detección de actividad invertasa en extractos celulares o sobrenadantes de cultivo.

7.5 Inmovilización de las invertasas $INVA_{AOX1}$ e $INVBA_{OX1}$ mediante métodos químicos.

7.5.1 Soporte de Nylon 6.

El método químico utilizado en este trabajo fue mediante la unión covalente o entrecruzamiento, siendo un método barato, químicamente inerte, no tóxico, mecánicamente estable, insoluble en agua y con la posibilidad de adquirir diferentes formas, aunado a esto, la inmovilización sólo se lleva a cabo en la superficie externa, lo que permite mejorar la actividad enzimática (Silva *et al.* 2007).

Todos los estudios realizados en esta etapa se llevaron a cabo utilizando la misma metodología que para las enzimas recombinantes libres, midiendo: pH óptimo, temperatura óptima, cinética de consumo de sacarosa, efecto de iones metálicos y EDTA y termoestabilidad.

7.5.1.1 $INVA_{AOX1}$ -Nylon 6.

En el caso de la $INVA_{AOX1}$, se utilizaron 9.5 mg de proteína purificada, no se detectó proteína en el sobrenadante centrifugado posterior a la inmovilización (Ver. Sección 6.7.1.1), por lo que toda la proteína fue unida al brazo espaciador de PEG. Todas las determinaciones descritas a continuación se realizaron de la misma forma a lo descrito en la sección 6.6, correspondiente a la sección de caracterización bioquímica de $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$.

La eficiencia de este método fue de sólo 25% lo que nos habla respecto a que todavía se tienen que optimizar los métodos bajo los cuales se realizó este proceso, desde la concentración de glutaraldehído, la naturaleza química del brazo espaciador, los tiempos de incubación, entre otros.

7.5.1.1.1 Temperatura y pH óptimo

La temperatura óptima de la enzima inmovilizada se vió modificada aumentando en 5 °C a que la enzima inmovilizada se encuentra protegida por el Nylon 6, lo que la hace menos susceptible a condiciones del medio externo (**Figura 70 A**).

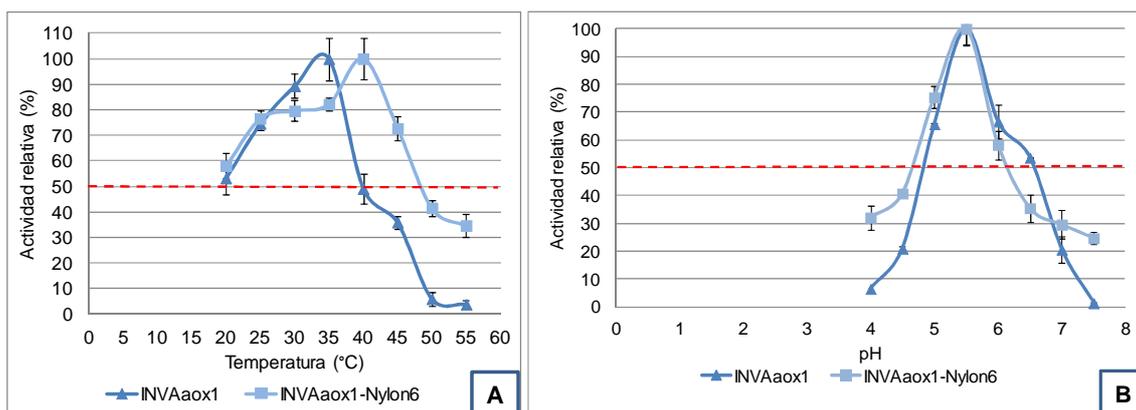


Figura 70. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVA_{AOX1} acoplada a Nylon 6 y su comparación con la enzima libre. Las gráficas oscuras (triángulos) representan la invertasa libre y las líneas claras (cuadrados) corresponden a la enzima inmovilizada.

En cuanto al pH óptimo, el valor no se vio afectado siendo el mismo para la enzima libre e inmovilizada (5.5, **Figura 70 B**). Esto puede deberse al microambiente que se genera de la enzima-soporte.

7.5.1.1.2 Consumo de sacarosa

Una vez determinados los parámetros anteriores se estimó la velocidad de hidrólisis utilizando diferentes concentraciones de sacarosa que fueron de 0.01 M a 2M, incubando la enzima por 10 minutos. En la **Figura 71** se presenta la curva de consumo de sacarosa de la invertasa libre y acoplada a Nylon 6.

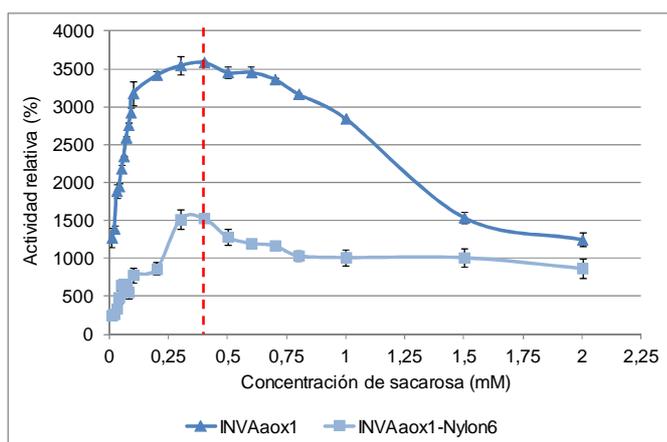


Figura 71. Velocidad de hidrólisis de la INVA_{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. La gráfica oscura (triángulos) representa la invertasa libre y la línea continua (cuadrados) corresponde a la enzima inmovilizada.

Conforme lo observado en la **Figura 71**, se puede determinar que INVA_{AOX1}-Nylon 6 sigue conservando una alta tolerancia a concentraciones elevadas de sacarosa, comportamiento observado también en la enzima libre, empezando a inhibir su actividad a una concentración de 0,4 M, siendo ésta superior a la inhibición por sustrato de la invertasa nativa, la cual es de 0,3 M de sacarosa (Yanase *et al.*, 1995).

Con estos valores se realizaron las regresiones lineales para determinar las constantes cinéticas K_M y V_{max} , mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hoffstee y Hanes-Wolf.

El método que mejor se ajustó a la regresión lineal, con una R^2 de 0,969 fue el de Hanes-Wolf. Por lo anterior, se determinó que la V_{max} de la enzima inmovilizada es de $2500 \mu\text{mol mLmin}^{-1}$ y la K_M de 550 mM, presentando una disminución de 1,6 veces comparada con la enzima INVA_{AOX1} libre ($4000 \mu\text{mol mLmin}^{-1}$).

La afinidad por acarosa también se vio afectada negativamente disminuyendo 13 veces con respecto a la invertasa INVA_{AOX1} libre (41 mM). Al verse afectados ambos parámetros, podemos atribuir un cambio conformacional alterando del sitio activo de la invertasa inmovilizada, además de posibles problemas difusionales (Mutlu *et al.* 2006, Mateo *et al.* 2007, Vallejo-Becerra *et al.* 2008).

7.5.1.1.3 Termoestabilidad

Incubando $INVA_{AOX1}$ acoplada a Nylon 6 a 50 y 45 °C, tomando una alícuota cada 10 minutos se observó que no hubo una diferencia significativa en el comportamiento del sistema, comparada con la enzima $INVA_{AOX1}$ libre, presentando la misma vida media de 90 y 480 minutos respectivamente (**Figura 72**).

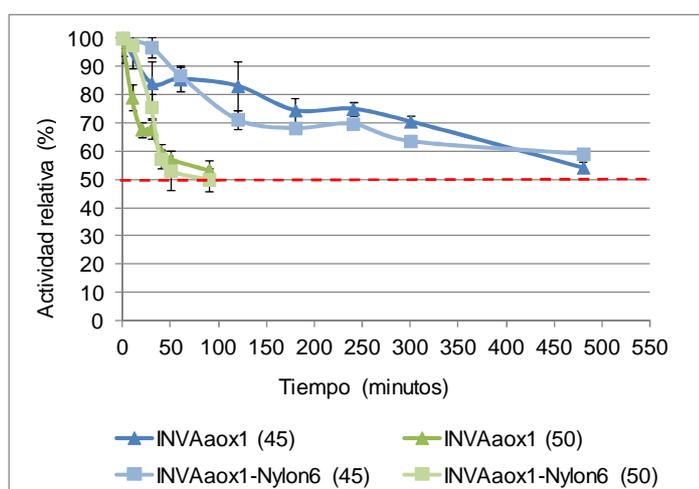


Figura 72. Termoestabilidad a 50 y 45 °C de $INVA_{AOX1}$ acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la invertasa recombinante libre mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la invertasa recombinante inmovilizada.

7.5.1.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA

Un resultado interesante fue el efecto de iones como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} y Ca^{2+} en una concentración de 10 mM (**Figura 73**, prismas claros), los cuales aumentaron la actividad invertasa de la enzima $INVA_{AOX1}$ inmovilizada, no observándose dicho efecto en la enzima $INVA_{AOX1}$ libre, presentando un aumento de la actividad de 109, 83, 80 y 150 %, respectivamente, no observando otro efecto positivo al utilizar las demás concentraciones.

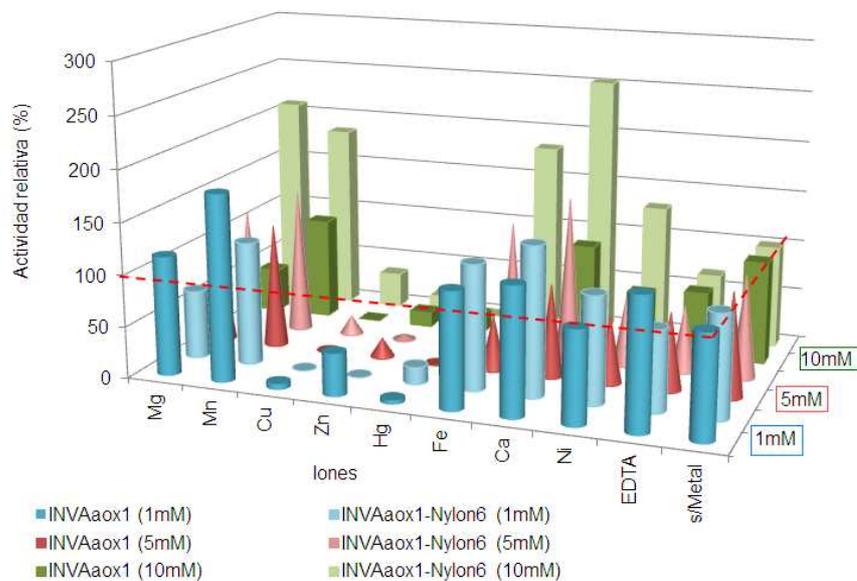


Figura 73. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA_{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. De adelante a atrás representan concentraciones de iones 1, 5 y 10 mM. Las gráficas oscuras representan la invertasa libre, mientras que las gráficas claras corresponden a la inmovilizada.

Tanto para la INVA_{AOX1} libre como para la inmovilizada, los iones Cu²⁺, Zn²⁺ y Hg²⁺ provocan una disminución en la actividad enzimática para cualquiera de las concentraciones probadas.

En la **Tabla 30** se muestran los resultados obtenidos de la inmovilización de INVA_{AOX1} inmovilizada (INVA_{AOX1} Nylon 6) en comparación con la enzima libre (INVA_{AOX1}).

Tabla 30. Caracterización bioquímica de INVA_{AOX1} inmovilizada en Nylon 6 y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVA nativa	INVA_{AOX1}	INVA_{AOX1} Nylon 6
pH óptimo	6.0	5.5	5.5
Temperatura óptima (°C)	30	35	40
V_{max} (μmol mgmin⁻¹)	62.5	4000	2500
K_M (mM)	110	41	550
Inhibidores (1,5 y 10 mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ ZnSO ₄	CuSO ₄ HgCl ₂ ZnSO ₄
Inductores (1,5 y 10 mM)	ND	MnCl ₂ (1mM) ↑ 80%	MnCl ₂ ↑ 80% FeCl ₂ ↑ 80% CaCl ₂ ↑ 150% (10mM)
Inhibición por sacarosa (mM)	300	400	400
Termo-estabilidad (t_{1/2})	40 °C, 20 min (pérdida total de actividad)	50 °C, 90 min 45 °C, 480 min 40 °C, 1400 min (23h)	50 °C, 90 min 45 °C, 480 min
Reúsos	0	0	44

ND: No determinado

Conforme lo que se muestra en la **Tabla 30**, la mayoría de los parámetros de la invertasa inmovilizada. A pesar de que la enzima inmovilizada en Nylon 6 presentó muchas desventajas en cuanto a sus parámetros cinéticos y bioquímicos, ésta sigue siendo mejor en comparación con la enzima nativa (**Tabla 30**), además es importante señalar que se obtuvieron 44 reúsos del sistema y hubo un incremento en la termoestabilidad en cualquiera de los dos métodos probados.

7.5.1.2 INVB_{AOX1}-Nylon 6.

Para INVB_{AOX1} se utilizaron 13.9 mg de la enzima purificada y tampoco se detectó proteína en el sobrenadante centrifugado posterior a la inmovilización (Ver. Sección 6.7.1.1), por lo que toda la proteína fue unida al brazo espaciador de PEG. En este caso se obtuvo una eficiencia de inmovilización del 65%, siendo ésta mayor que en el caso de la invertasa intracelular INVA_{AOX1}.

7.5.1.2.1 Temperatura y pH óptimo.

Se observó un pico máximo de actividad porcentual en la temperatura de 30 °C (**Figura 74 A**), siendo ésta 5 grados menor a la temperatura óptima de la invertasa INVA nativa (Yanase *et al.*, 1995), esta diferencia probablemente a un efecto negativo de la concentración de glutaraldehído sobre la enzima inmovilizada (Leuba & Widmer 1979).

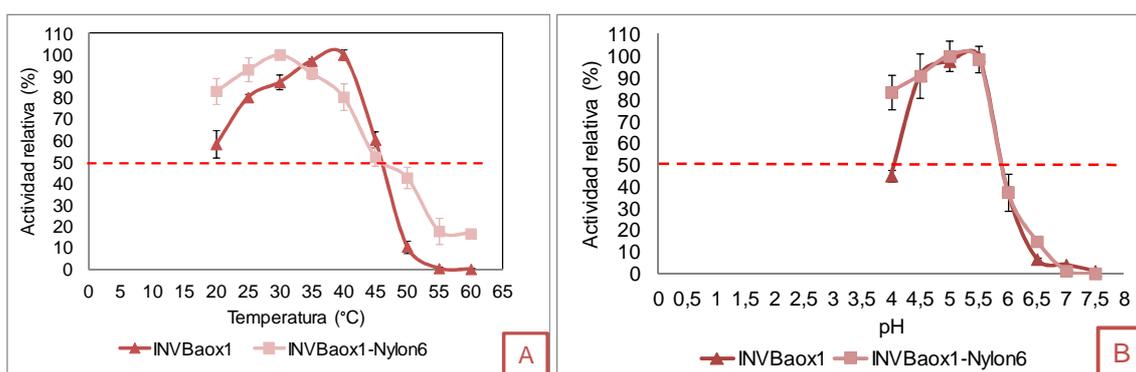


Figura 74. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVB_{AOX1} acoplada a Nylon-6 y su comparación con la enzima libre. Las gráficas oscuras (triángulos) representan la invertasa libre y las líneas claras (cuadrados) corresponden a la enzima inmovilizada.

En la **Figura 74 B** se observa la campana de la actividad conforme el rango de pH mencionado anteriormente, mostrando un óptimo de 5.5, siendo muy parecida a la campana observada para la enzima INVB_{AOX1} libre.

7.5.1.2.2 Consumo de sacarosa

Se estimó la velocidad de hidrólisis utilizando concentraciones de sacarosa de 0.01 M a 2 M, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, durante 2 minutos de incubación, en la **Figura 75** se presenta la curva de consumo de sacarosa para éste sistema y su comparación con la enzima INVB_{AOX1} libre.

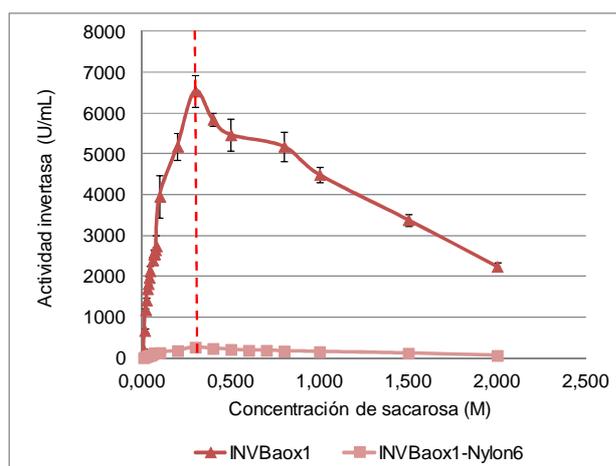


Figura 75. Velocidad de hidrólisis de la INVB_{AOX1} acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. La gráfica oscura (triángulos) representa la invertasa libre y la línea continua (cuadrados) corresponde a la enzima inmovilizada.

Conforme lo observado en la **Figura 75** se puede determinar la enzima INVB_{AOX1} inmovilizada conserva una alta tolerancia a concentraciones elevadas de sacarosa, comportamiento observado también en la INVB recombinante libre, empezando a inhibir su actividad a una concentración de 0,3 M.

Con estos valores se realizaron las regresiones lineales para determinar las constantes cinéticas K_M y V_{max} , mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hoffstee y Hanes-Wolf.

El método que mejor se ajustó a la regresión lineal, con una R^2 de 0,969 fue el de Lineweaver-Burk, por lo tanto, se determinó que la V_{max} de la INVB_{AOX1}-Nylon 6 fue de $504 \mu\text{mol mLmin}^{-1}$ y la K_M de 270 mM.

Estos valores representan una disminución de 10 veces para la velocidad máxima en comparación con la enzima INVB_{AOX1} libre ($5000 \mu\text{mol mLmin}^{-1}$), y 5 veces una disminución de afinidad por sacarosa a diferencia de INVB_{AOX1} libre (50 mM).

Además de los factores ya mencionados que pudieran estar ocasionando estos cambios otra variable que afecta negativamente para algunas enzimas es la concentración de glutaraldehído, que si bien fue lavado en las etapas de inmovilización, todavía pueden quedar trazas de éste al momento de realizar el acoplamiento (Leuba y Widmer 1979).

7.5.1.2.3 Termoestabilidad.

De igual forma que para la enzima libre, se determinó la termoestabilidad de la invertasa $INV_{B_{AOX1}}$ inmovilizada, la cual se midió incubando la enzima inmovilizada y libre a 50, 45 y 40°C y tomando alícuota de 1 μ L durante a diferentes tiempos hasta llegar a la vida media de las enzimas (50% de actividad invertasa), lo que se muestra en las **Figura 76**.

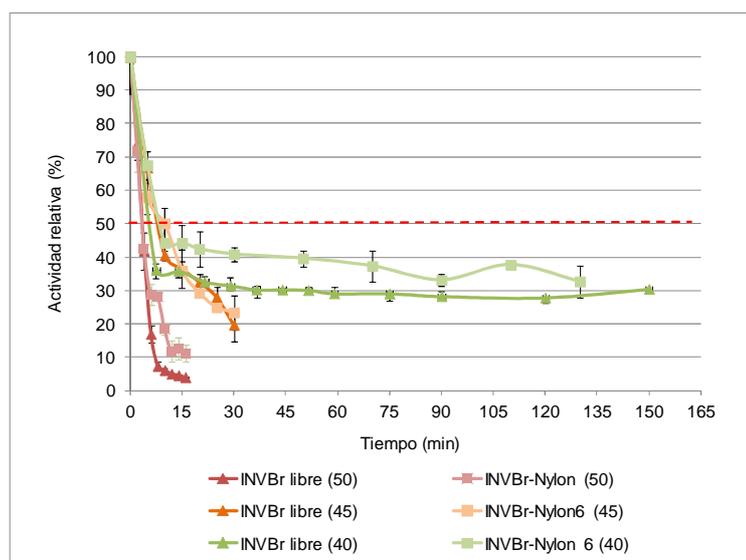


Figura 76. Termoestabilidad a 50, 45 y 40 °C de $INV_{B_{AOX1}}$ acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la invertasa recombinante libre mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la invertasa recombinante inmovilizada.

De acuerdo a los datos presentados en la **Figura 76**, no se observó una diferencia significativa entre la vida media de la invertasa $INV_{B_{AOX1}}$ libre y acoplada a Nylon 6.

7.5.1.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.

Para esta determinación se dejó incubando el sistema por 10 minutos a 40 °C con los iones mencionados anteriormente, siendo el control $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ -Nylon6 sin metal el cual corresponde al 100% de actividad. Los resultados que se presentan en la **Figura 77**.

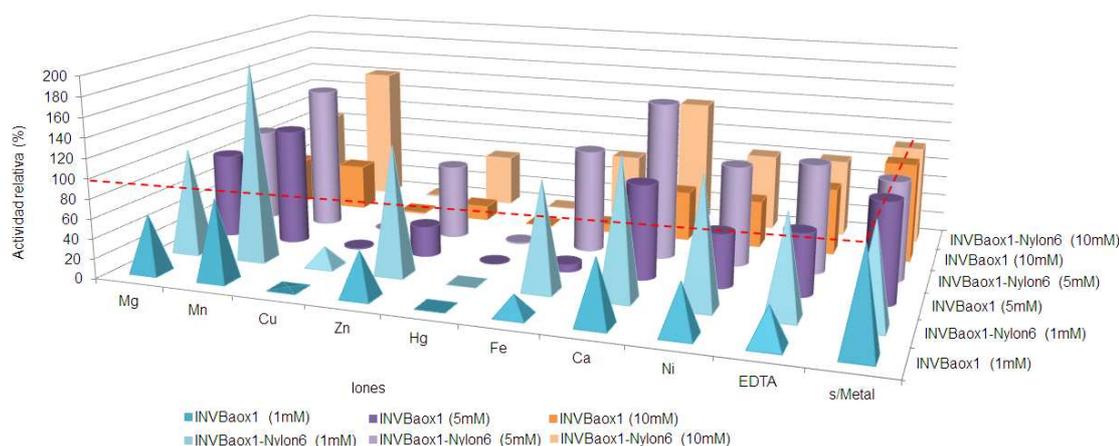


Figura 77. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ acoplada a Nylon 6 comparada con su homóloga libre. De adelante a atrás representan concentraciones de iones 1, 5 y 10 mM. Las gráficas oscuras representan la invertasa libre, mientras que las gráficas claras corresponden a la inmovilizada.

Conforme lo mostrado en la **Figura 77**, tanto para la enzima $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ libre como para la inmovilizada los iones Cu^{2+} y Hg^{2+} provocan una disminución en la actividad enzimática, ya sea a 1, 5 y 10 mM. Por otro lado, los iones Mg^{2+} y Zn^{2+} fueron inductores de la actividad a 1 mM para la inmovilizada, no siendo así para $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ libre.

En el caso del ion Mn^{2+} fue buen inductor para la invertasa $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ inmovilizada en cualquier concentración probada, siendo hasta 101% mayor la actividad a 1 mM comparado con el control sin metal.

También se observó un efecto positivo y “protector” utilizando los iones Fe^{2+} , Ca^{2+} y Ni^{2+} (**Figura 77** prismas claros), ya que no disminuyó la actividad de la enzima $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ inmovilizada sino que en algunos casos aumentó la actividad en comparación con la enzima libre, llegando hasta un máximo 59% mayor actividad utilizando Ca^{2+} a 5 mM (**Figura 77** cilindros claros). Esto fue un efecto constante para estos iones de las dos enzimas inmovilizadas $\text{INVA}_{\text{AOX1}}$ e $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$.

El resumen de los resultados obtenidos de todas las caracterizaciones de esta inmovilización y su comparación con la enzima INVB_{AOX1} libre y la INVB nativa se muestran en la **Tabla 31**.

Tabla 31. Caracterización bioquímica de INVB_{AOX1} inmovilizada en Nylon 6 y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVB nativa	INVB_{AOX1}	INVB_{AOX1} Nylon 6
pH óptimo	5.5	5.5	5.5
Temperatura óptima (°C)	45	40	30
V_{max} (μmol mgmin⁻¹)	33.6	5000	504
K_M (mM)	98	50	270
Inhibidores (1 mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ FeSO ₄ ZnSO ₄ NiCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂
Inductores (1,5 y 10 mM)	ND	MnCl ₂ ↑ 20%	MnCl₂ ↑ 100% CaCl₂ ↑ 50%
Inhibición por sacarosa (mM)	300	300	300
Termo-estabilidad (t_{1/2})	55 °C, 25 min	50 °C, 3 min 45 °C, 10 min 40 °C, 10 min	50 °C, 3 min 45 °C, 10 min 40 °C, 10 min
Reúsos	0	0	9

ND: No determinado

Conforme lo que se muestra en la **Tabla 31**, aunque se tuvo una buena eficiencia de inmovilización (65%), el método para llevar a cabo este confinamiento en la invertasa INVB_{AOX1} tampoco fue el adecuado, debido a que todos los parámetros fueron afectados negativamente, no siendo así para los iones metálicos y los reúsos en donde se vio una mejora en comparación con la enzima INVB_{AOX1} libre y en la termoestabilidad donde no se vio efecto.

A pesar de las desventajas utilizando este método, ambas enzimas INVA_{AOX1} e INVB_{AOX1} inmovilizadas conservan algunas características deseables para ser aplicadas en procesos como es el caso de la tolerancia a altas concentraciones de sacarosa y los parámetros cinéticos, esto en comparación con las enzimas nativas, pudiéndose ocupar este sistema en fermentación de melaza de caña.

7.5.2 Método químico: Soporte de Quitosano.

Este método consistió en dejar reactivos los grupos glicosilo pertenecientes a la glicosilación de ambas invertasas recombinantes, determinaciones que se demostraron en secciones anteriores, para que reaccionen con los grupos reactivos amino o hidroxilo que permiten poseer el quitosano.

7.5.2.1 INVA_{AOX1}-Quitosano.

Los estudios de inmovilización de la INVA_{AOX1} se realizaron utilizando quitosano de mediano grado de acetilación de Sigma®. Se probaron varios métodos de inmovilización, sin embargo los mejores resultados se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Hsieh (2000), con algunas modificaciones, tal como se en Materiales y Métodos (Ver. Sección 6.7.1.2).

Algo que se observó al utilizar este método de inmovilización fue un efecto negativo sobre la actividad de INVA_{AOX1} ocasionado por la concentración de metaperiodato de sodio, debido a que para algunas enzimas, este compuesto ocasiona un efecto sobre la actividad catalítica, disminuyéndola, debido a que es un agente oxidante (Stanley *et al.* 1976, Marek *et al.* 1984, Hsain *et al.* 1996).

Se realizaron algunos ensayos probando el efecto del metaperiodato sobre la actividad de esta invertasa obteniendo lo siguiente:

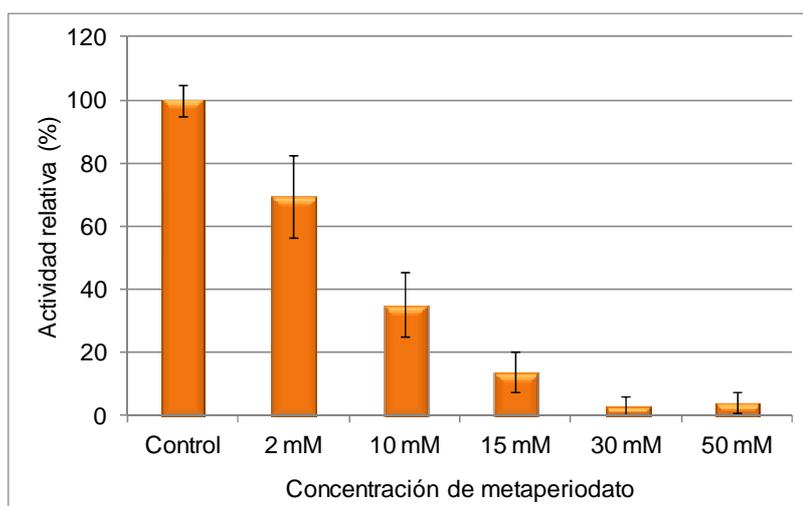


Figura 78. Efecto de la concentración de metaperiodato de sodio sobre la actividad relativa de $INVA_{AOX1}$. Este ensayo se realizó incubando 50 μL de $INVA_{AOX1}$ con concentraciones de NaIO_4 que fueron desde 2 a 50 mM en solución de amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 (50 μL), incubándose por 3 horas a 4°C a 300 rpm, pasado este tiempo se detuvo la reacción con 100 μL de PEG, pasado este tiempo se adicionó sacarosa 50 mM y se dejó la reacción por 10 minutos a 35 °C para de terminar la actividad invertasa.

Como se muestra en la **Figura 78**, el agente oxidante NaIO_4 efectivamente tiene un efecto negativo sobre la actividad invertasa. Se repitieron experimentos de inmovilización cambiando la concentración a 2 y 15 mM, sin embargo la mayoría de la enzima no se unía al quitosano (dato no mostrado). Otras condiciones que fueron modificadas son las que se muestran en la **Figura 79**.



Figura 79. Optimización del método de inmovilización para confinar a $INVA_{AOX1}$ utilizando Nylon-6. ϵ se refiere al factor de eficiencia determinado para cada ensayo.

Por lo tanto, el método de inmovilización usando el soporte de quitosano no fue una buena opción para llevar a cabo la unión de la enzima-soporte dado que las eficiencias de inmovilización no fueron superiores al 15% (**Figura 79**). Esto se puede deber, principalmente, al agente para modificar los grupos funcionales de los glúcidos, el pudiera estar afectando otros grupos funcionales importantes en esta enzima.

Otro inconveniente que presentó esta técnica consistió en que no se pudo realizar la estabilidad operacional del mismo modo que se realizó para el Nylon 6, debido a la densidad de la enzima-soporte lo que dificultó montar una técnica de medición en sistema continuo por lo que no se pudieron determinar los reúsos.

A pesar de lo anteriormente descrito, se utilizaron 10 mg de INVA_{AOX1} purificada, no se detectó proteína en el sobrenadante centrifugado posterior a la inmovilización (Ver. Sección 6.7.1.2), por lo que a pesar de que la enzima posee poca glicosilación, en comparación con estudios realizados con la invertasa de *S. cerevisiae*, fue suficiente para la unión.

7.5.2.1.1 Temperatura y pH óptimos.

Para la obtención de estos parámetros se realizó la metodología empleada en las demás caracterizaciones bioquímicas, incubando el sistema durante 10 minutos. Al final de esta determinación y de todas las mencionadas posteriormente, se cuantificó la cantidad de azúcares reductores utilizando la técnica descrita por Miller 1959 (Ver. Sección 6.3.2.3).

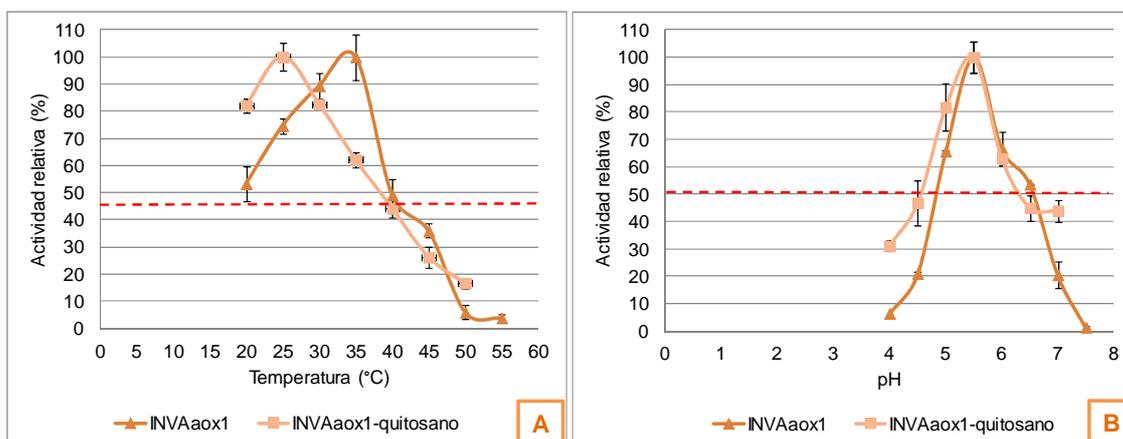


Figura 80. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVA_{AOX1} acoplada a quitosano y su comparación con la enzima libre.

Conforme lo que se observa en la **Figura 80 (A)**, al inmovilizar a INVA_{AOX1} hubo un efecto negativo en la temperatura óptima, disminuyendo 5 °C en comparación con la

enzima libre, por otro lado, no hubo diferencia significativa en el pH óptimo de la enzima inmovilizada en comparación con su homóloga libre (**Figura 80 B**).

7.5.2.1.2 Consumo de sacarosa.

Una vez determinados la temperatura y pH óptimo se estimó la velocidad de hidrólisis utilizando concentraciones de sacarosa de 0.01 M a 2 M, bajo las condiciones mencionadas anteriormente, durante 10 minutos de incubación y 50 μ L de suspensión INVA_{AOX1}-quitosano.

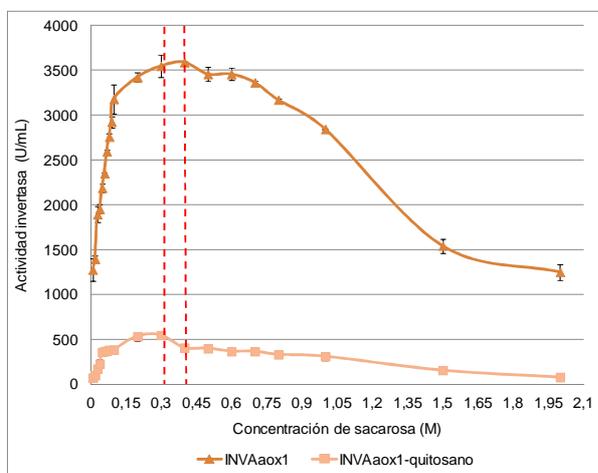


Figura 81. Velocidad de hidrólisis de la INVA_{AOX1} acoplada a quitosano comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la invertasa recombinante libre mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la invertasa recombinante inmovilizada.

INVA_{AOX1}-quitosano presentó menor tolerancia a concentraciones de sacarosa (0.3 M), comparado con INVA_{AOX1} (0.4 M). Este comportamiento puede deberse a cambios conformacionales de la enzima al ser inmovilizada (Hsieh *et al.* 2000)

Con estos valores se realizaron las regresiones lineales para determinar las constantes cinéticas K_M y V_{max} , mediante los métodos de Lineweaver-Burk, Eadie-Hoffstee y Hanes-Wolf, siendo mejor aproximación con una $R^2 = 0.966$ el método de Hanes-Wolf obteniendo una V_{max} de $1000 \mu\text{mol mgmin}^{-1}$ y una K_M de 100 mM, estos valores resultan también en un efecto negativo en comparación con la enzima libre de 4 y 2.4 veces menor.

7.5.2.1.3 Termoestabilidad.

De igual forma que como se determinó la termoestabilidad de la invertasa inmovilizada, la cual se midió incubando la enzima inmovilizada y libre a 25, 30 y 35 °C tomando alícuota de 50 µL durante a diferentes tiempos hasta llegar a la vida media de las enzimas (50% de actividad invertasa). Cabe señalar que se decidió utilizar estas temperaturas debido a la baja temperatura óptima obtenida en empleando este método.

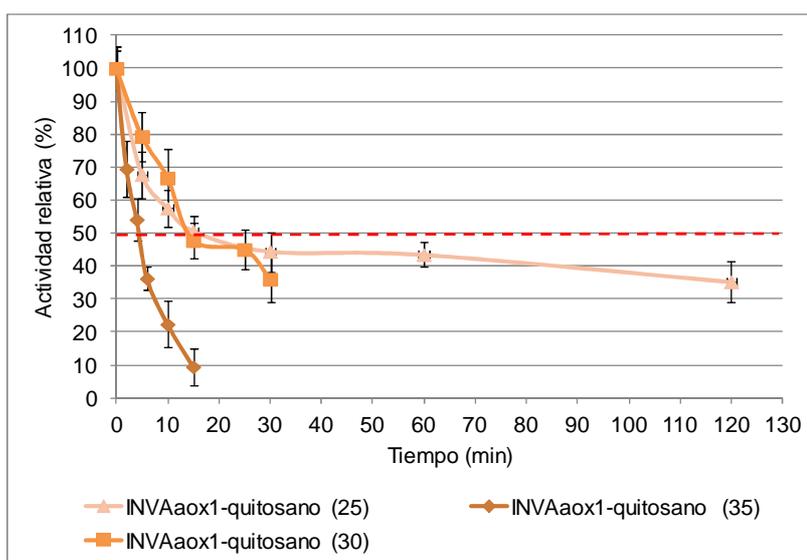


Figura 82. Termoestabilidad a 25, 30 y 35 °C de INV A_{AOX1} acoplada a quitosano comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la invertasa recombinante libre mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la invertasa recombinante inmovilizada.

Como era de esperarse, debido a que disminuyó la temperatura óptima de la enzima inmovilizada en quitosano, la termoestabilidad también se vio afectada negativamente, obteniendo únicamente buenos resultados a temperatura ambiente (25 °C) obteniendo una vida media de 1 hora.

7.5.2.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.

De igual manera a los métodos anteriormente descritos se evaluó el efecto de varios iones metálicos (Mg^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} y Zn^{2+}) y EDTA sobre la actividad de la enzima inmovilizada, utilizando concentraciones de 1, 5 y 10 mM, la suspensión de INVA_{AOX1}-quitosano incubándose por 10 minutos, siendo el control INVA_{AOX1}-quitosano sin metal el cual corresponde al 100% de actividad.

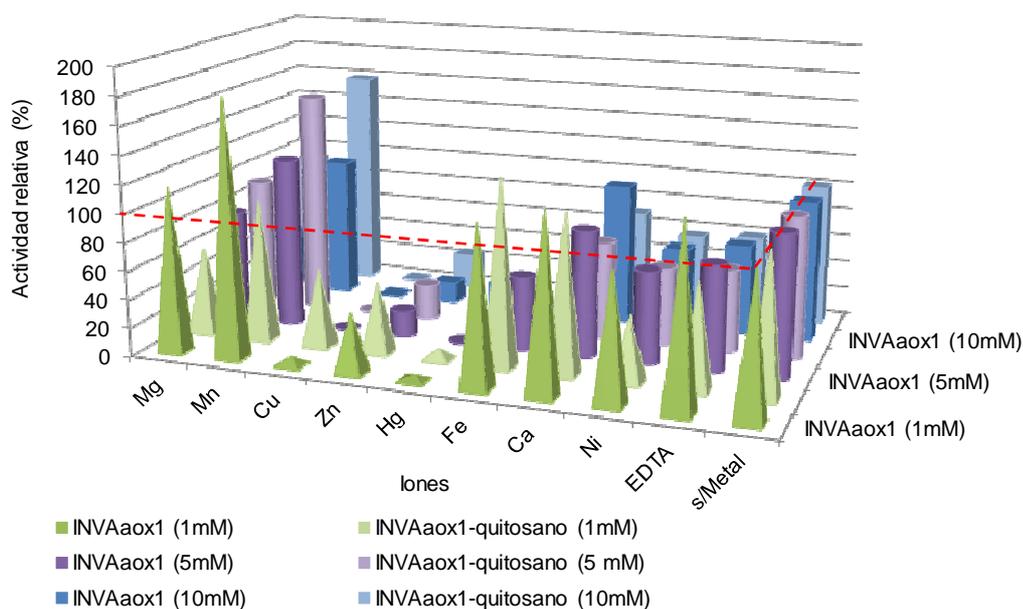


Figura 83. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA_{AOX1} acoplada a Quitosano comparada con su homóloga libre. Las figuras en colores claros corresponden a la enzima inmovilizada y las figuras en colores sólidos corresponden a la enzima en su estado libre.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 83**, al inmovilizar a INVA_{AOX1} en quitosano, se tiene un efecto negativo con la mayoría de los iones, resultados muy parecidos a la enzima libre, obteniendo también un efecto inductor al utilizar el ion Mn^{2+} en concentraciones de 5 y 10 mM obteniendo un aumento en la actividad del 58 % (**Figura 83**, cilindros y prismas claros) en ambos casos, sin embargo utilizando el mismo ion a una concentración de 1 mM en el caso de la enzima libre se consigue hasta un 80 % de aumento en la actividad (**Figura 83**, pirámides oscuras).

Los resultados de todos los estudios realizados se resumen y comparados con la enzima nativa se muestran en la **Tabla 32**.

Tabla 32. Caracterización bioquímica de INVA_{AOX1} inmovilizada en Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVA nativa	INVA_{AOX1}	INVA_{AOX1} Quitosano
pH óptimo	6.0	5.5	5.5
Temperatura óptima (°C)	30	35	25
V_{max} (μmol mgmin⁻¹)	62.5	4000	1000
K_M (mM)	110	41	100
Inhibidores (1mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ ZnSO ₄	Todos los metales probados menos MnCl ₂
Inductores (1 mM)	ND	MnCl ₂ (1mM) ↑ 80%	MnCl ₂
Inhibición por sacarosa (mM)	300	400	400
Termo-estabilidad (t_{1/2})	40 °C, 20 min (pérdida total de actividad)	50 °C, 90 min 45 °C, 480 min 40 °C, 1400 min (23h)	35 °C, 4 min 30 °C, 15 min 25 °C, 15 min
Reúsos	0	0	ND

ND: No determinado

Conforme lo observado en la **Tabla 32**, el método de inmovilización en quitosano no fue muy adecuado para confinar la invertasa recombinante intracelular, ya que afecta a todos los parámetros cinéticos y bioquímicos de la enzima de manera negativa, esto en resumen probablemente se debe al mismo efecto negativo que tiene el metaperiodato.

7.5.2.2 INVB_{AOX1}-Quitosano.

En el caso de INVB_{AOX1}, los resultados obtenidos fueron más alentadores, obteniendo una eficiencia del 40% siendo inferior al método de inmovilización anterior (65%), esto pudiera deberse al microambiente que se genera en el quitosano, ya que éste tiende a tener pH muy ácidos (Muzzarelli 1980), o a que el método de inmovilización no es el óptimo para la enzima.

7.5.2.2.1 Temperatura y pH óptimos.

Estas determinaciones se realizaron conforme la metodología mencionada anteriormente (Ver. Sección 6.6.2 y 6.6.3.1) utilizando 100 μ L de suspensión de INVB_{AOX1}-quitosano incubando por 10 minutos.

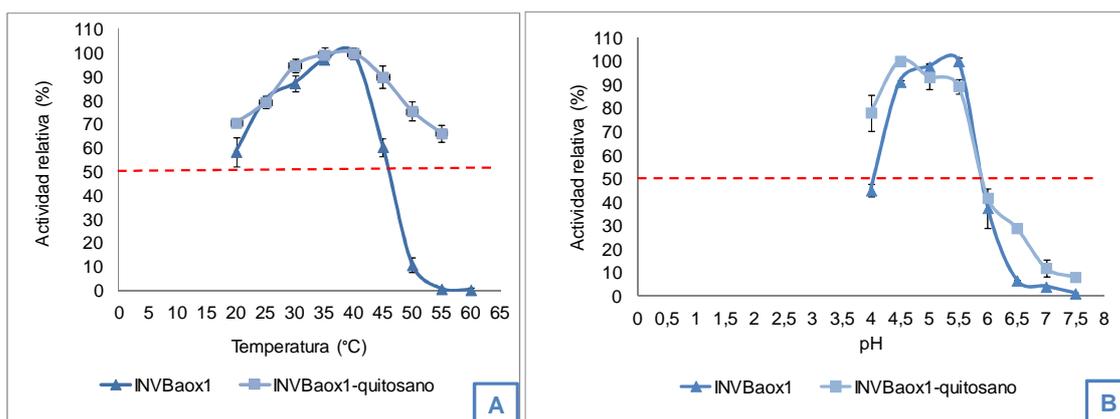


Figura 84. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de INVB_{AOX1} acoplada quitosano y su comparación con la enzima libre. Las gráficas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre mientras que las gráficas claras (cuadrados) corresponden a la enzima unida a quitosano.

Conforme a lo que se muestra en la **Figura 84 A**, la temperatura óptima no se vió modificada para la enzima inmovilizada, sin embargo, cabe señalar que a una temperatura de 55 °C todavía conserva 66 % de su actividad, no siendo así para la enzima libre que a la misma temperatura pierde el 100 % de su actividad.

En el caso del pH óptimo, este si se vió modificado, disminuyendo su valor en una unidad (4.5) en comparación con la enzima libre (5.5). Este comportamiento era de esperarse, ya que el quitosano al ser un soporte policatiónico atrae más fácilmente iones OH⁻ a la zona inmovilizada, por lo tanto hace el microambiente más básico y por lo tanto la enzima inmovilizada requiere un pH más bajos para su actividad óptima (Hsieh *et al.* 2000).

7.5.2.2.2 Consumo de sacarosa

Las condiciones utilizadas en esta determinación se realizaron de igual forma a las mencionadas anteriormente, incubando 100 μL de la suspensión de $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ -quitosano, durante 1 minuto a 40 $^{\circ}\text{C}$. En la **Figura 85** se presenta la curva de consumo de sacarosa obtenida.

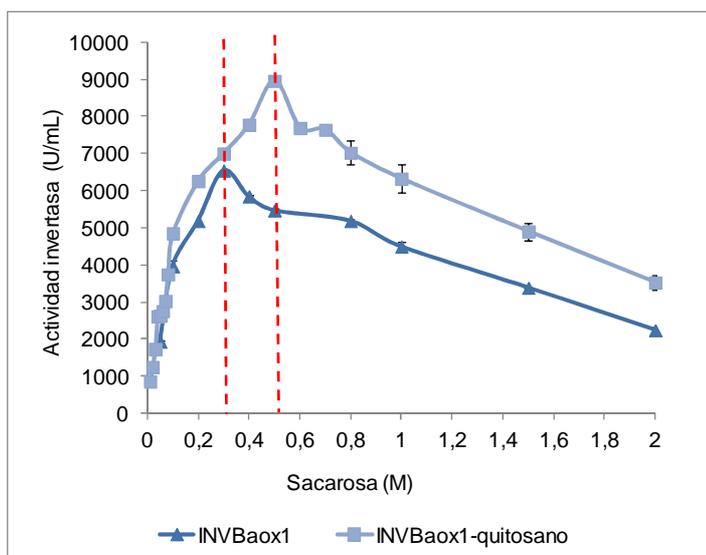


Figura 85. Velocidad de hidrólisis de la $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ acoplada a quitosano comparada con su homóloga libre. La línea oscura (triángulos) corresponde a la enzima libre, mientras que la línea clara (cuadrados) corresponde a la enzima unida a quitosano.

Conforme lo que se observa en la **Figura 85**, al inmovilizar $\text{INVB}_{\text{AOX1}}$ en quitosano, a diferencia de la invertasa recombinante intracelular, hubo una mejora en la tolerancia a mayor concentración de sacarosa siendo 1.6 veces más resistente a inhibición por sustrato comparada con la enzima nativa/libre y 3 veces más estable en comparación con la enzima comercial de *S. cerevisiae*.

Este comportamiento se atribuye a la limitación de la difusión del sustrato hacia la enzima, por lo que se requiere mayor concentración del sustrato para llegar a la velocidad máxima de reacción, también puede deberse a cambios conformacionales de la enzima al ser inmovilizada (Hsieh *et al.* 2000).

De acuerdo a las regresiones lineales utilizadas se obtuvo una V_{max} de $5000 \mu\text{mol mgmin}^{-1}$ y una K_M de 50 mM , por lo que no hubo cambios de estos parámetros en comparación con la enzima libre.

7.5.2.2.3 Termoestabilidad.

De igual forma se determinó la termoestabilidad de la invertasa inmovilizada, incubándola 50 y $45 \text{ }^\circ\text{C}$ tomando alícuota de $100 \mu\text{L}$ durante a diferentes tiempos hasta llegar a la vida media de las enzimas, 50% de la actividad invertasa inicial, lo que se muestra en la **Figura 86**.

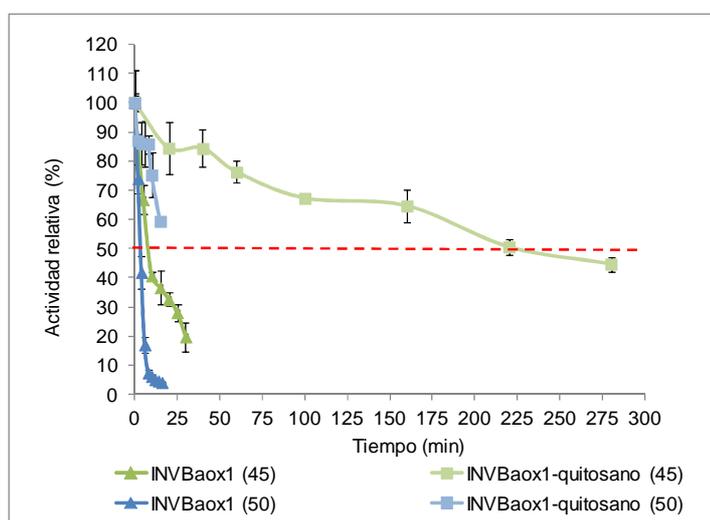


Figura 86. Termoestabilidad a 25, 30 y 35 °C de $INV B_{AOX1}$ acoplada a quitosano y su comparación con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre, mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden la enzima unida a quitosano.

A diferencia de la $INVA_{AOX1}$ -Quitosano, al inmovilizar la invertasa extracelular se obtuvieron mejores resultados en cuanto a termoestabilidad. Esto se reflejó primero en la curva de temperatura óptima debido a que a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ todavía se conservaba el 60% de actividad y posteriormente en el estudio de estabilidad incubando el sistema a diferentes temperaturas, observando que a tanto para 45 como $50 \text{ }^\circ\text{C}$ aumentó la vida media en 5 y 22 veces (15 y 220 minutos, respectivamente), en comparación con la enzima libre (3 y 10 minutos respectivamente) (**Figura 86**).

Esta mejora en termoestabilidad viene de una unión multipuntual de la invertasa al soporte lo que provoca un aumento en la resistencia al desplegamiento por tratamientos térmicos (Hsieh *et al.*, 2000)

7.5.2.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.

Las condiciones para este estudio fueron iguales a las de la invertasa sin inmovilizar con la excepción de la incubación por 10 minutos a 40 °C de 100 µL de la suspensión INVB_{AOX1}-quitosano. Esta suspensión sin metal correspondió al 100% de actividad, los resultados que se presentan en la **Figura 87**.

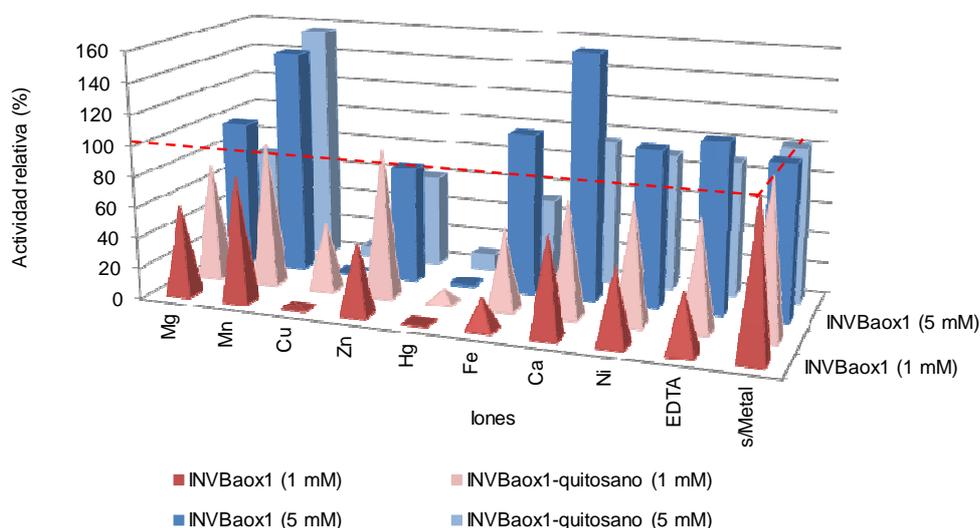


Figura 87. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB_{AOX1} acoplada a Quitosano comparada con su homóloga libre. Las figuras en colores claros corresponden a la enzima inmovilizada y las figuras en colores sólidos corresponden a la enzima en su estado libre.

De acuerdo a lo observado en la **Figura 87**, al inmovilizar a INVB_{AOX1} en quitosano, a una concentración de 1 mM para todos los iones probados, se tiene un efecto ligeramente positivo comparado con la enzima libre, efecto que se mencionada anteriormente debido probablemente al carácter quelante del quitosano.

Por otro lado, a una concentración de 5 mM este efecto empieza a perderse con todos los iones con excepción del Mn^{2+} con el que se observa un aumento de la actividad en un 56%, siendo este 9% más elevado que la enzima libre (47%) utilizando el mismo ion.

Los resultados de la caracterización de este sistema se muestran a continuación:

Tabla 33. Caracterización bioquímica de INV_{AOX1} inmovilizada en Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVB nativa	INV_{AOX1}	INV_{AOX1} Quitosano
pH óptimo	5.5	5.5	4.0
Temperatura óptima (°C)	45	40	40
V_{max} ($\mu\text{mol mgmin}^{-1}$)	33.6	5000	5000
K_M (mM)	98	50	50
Inhibidores (1 mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ FeSO ₄ ZnSO ₄ NiCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ FeSO ₄ ZnSO ₄ NiCl ₂
Inductores (1,5 y 10 mM)	ND	MnCl ₂ ↑ 20%	MnCl ₂
Inhibición por sacarosa (mM)	300	300	500
Termo-estabilidad ($t_{1/2}$)	55 °C, 25 min	50 °C, 3 min 45 °C, 10 min 40 °C, 10 min	50 °C, 15 min 45 °C, 220 min
Reúsos	0	0	ND

ND: No determinado

A diferencia de la $INVA_{AOX1}$ -Quitosano, al inmovilizar la invertasa extracelular se obtuvieron mejores resultados en cuanto a termoestabilidad, esto se reflejó primero en la curva de temperatura óptima debido a que a 55 °C todavía se conservaba el 60% de actividad y posteriormente en el estudio de estabilidad incubando el sistema a diferentes temperaturas, observando que a tanto para 45 como 50 °C aumentó la vida media en 5 y 22 veces en comparación con la enzima libre.

Esta mejora en termoestabilidad tiene que ver con una unión multipuntual de la invertasa al soporte, lo que provoca un aumento en la resistencia al desplegamiento por tratamientos térmicos (Hsieh *et al.* 2000).

Respecto al efecto de iones metálicos, ninguno tuvo un efecto significativo con excepción del Mn^{2+} (1 mM), el cual aumentó hasta en 56% la actividad de la enzima inmovilizada en quitosano. Esto puede atribuirse a que el quitosano tiene un efecto quelante, por lo que puede proteger a la enzima inmovilizada de los iones del medio (Muzarelli 1980).

Por lo que respecta a este sistema, se puede concluir que fue mejor con respecto a la inmovilización con Nylon 6, no afectando los parámetros cinéticos y mejorando una problemática que posee esta invertasa que es la baja termoestabilidad que posee.

Sin embargo todavía queda una de las principales ventajas de la inmovilización, que consiste en la estabilidad operacional, por tal motivo se decidió realizar un tercer método de inmovilización mediante la elaboración de perlas de quitosano que pueden permitir la medición de este parámetro, debido a que el diámetro de las partículas formadas es milimétrico y no micrométrico, como el tamaño de las partículas formadas con el método anteriormente descrito.

7.5.3 Método químico: Soporte de Perlas de quitosano (PQ).

Debido a que el soporte de quitosano dió resultados deseables respecto al aumento de termoestabilidad de $INVB_{AOX1}$ inmovilizada, se decidió buscar un método de inmovilización con el mismo soporte pero modificando la manera de acoplar la enzima con el sistema. El resultado de la formación de perlas de quitosano se muestra en la **Figura 88:**

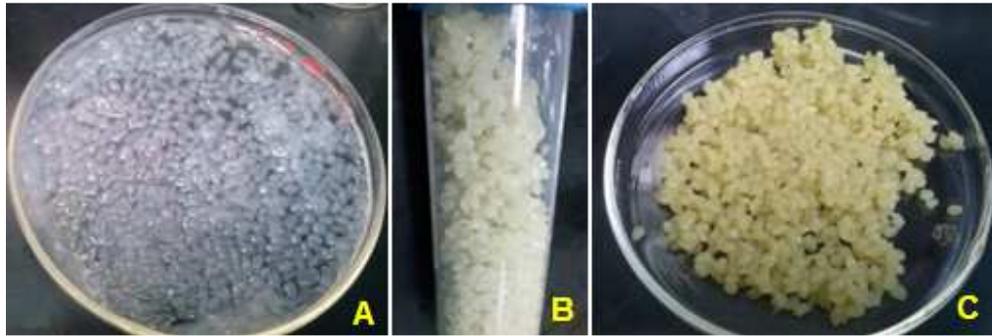


Figura 88. Etapas de formación de perlas de quitosano. **A.** Formación de las macropartículas. **B.** Activación de perlas con glutaraldehído al 2%. **C.** Acoplamiento de la invertasa purificada a las perlas activadas de quitosano.

7.5.3.1 INVA_{AOX1}-Perlas de quitosano

De acuerdo a la actividad del sobrenadante en comparación con la actividad de la enzima en las perlas de quitosano, la eficiencia obtenida utilizando este método fue del 25%, la misma eficiencia obtenida con el soporte de Nylon-6.

7.5.3.1.1 Temperatura y pH óptimo

Para llevar a cabo estas determinaciones se tomaron 100 μ L de perlas (sin necesidad de romperse u homogeneizarse) suspendidas en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5 y 100 μ L de solución de sacarosa 50 mM y 300 μ L de amortiguador correspondiente, realizando la metodología la misma metodología que lo descrito en Materiales y Métodos (Ver. Sección 6.6.1 y 6.6.3.1).

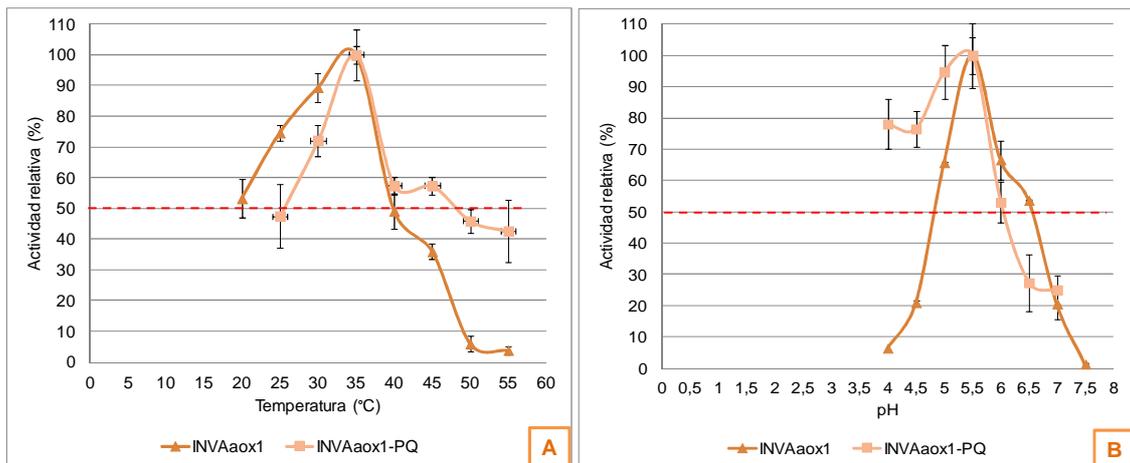


Figura 89. Determinación de la temperatura (A) y pH óptimo (B) de $INVA_{AOX1}$ acoplada a perlas de quitosano y su comparación con la enzima libre. Las gráficas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre mientras que las gráficas claras (cuadrados) corresponden a la enzima unida a las perlas de quitosano.

Para el caso de la invertasa recombinante intracelular, no hubo diferencia en la temperatura y pH óptimo, sin embargo conforme lo que se muestra en a **Figura 89 A**, la enzima inmovilizada presenta mayor estabilidad desde 45 a 55 °C, ya que a la última temperatura mencionada presenta 43% de actividad no siendo así para la enzima libre donde a la misma temperatura sólo presenta 4% de actividad.

En cuanto a la campana de pH (**Figura 89 B**) $INVA_{AOX1}$ -PQ presenta una estabilidad a valores de pH ácidos, desde 3.5 a 5.5, no siendo así para la enzima libre. Esta campana no cambia significativamente a valores de pH alcalinos.

7.5.3.1.2 Consumo de sacarosa

Esta determinación se realizó tomando de la misma forma a lo mencionado en la sección anterior 100 μ L de perlas resuspendidas en amortiguador de acetatos 50 mM pH 5.5.

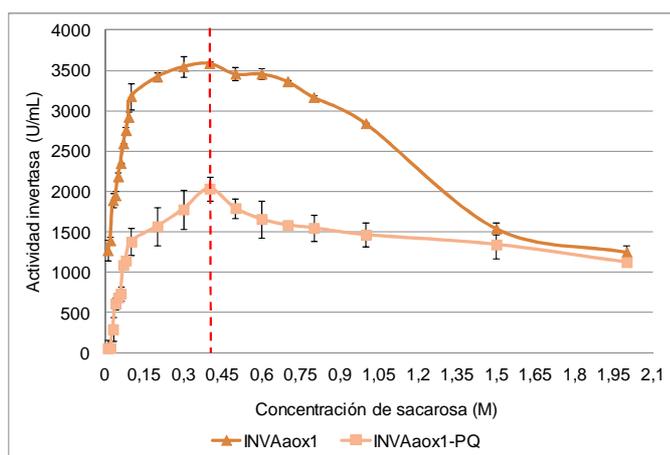


Figura 90. Velocidad de hidrólisis de la INVA_{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. La línea oscura (triángulos) corresponde a la enzima libre, mientras que la línea clara (cuadrados) corresponde a la enzima unida a las perlas de quitosano.

La baja eficiencia obtenida en al inmovilizar INVA_{AOX1} por este método ya nos hablaba de problemas con la actividad catalítica, hipótesis que se confirma conforme lo que se muestra en la **Figura 90**, dado que hay una disminución de la actividad invertasa de la enzima acoplada a las perlas de quitosano.

Con estos valores se realizó la regresión lineal, obteniendo una R^2 de 0.972 ajustada al método de Hanes-Wolf obteniendo una K_M de 125 mM y una V_{max} de $2500 \mu\text{molmgmin}^{-1}$, dichos valores son 3 veces mayor y 1.6 veces menor a lo obtenido para la enzima libre, lo cual nos habla tanto de problemas difusionales como un posible cambio conformacional al inmovilizar la enzima. A pesar de ello, la tolerancia a sacarosa continua siendo de 300 mM.

7.5.3.1.3 Termoestabilidad.

La termoestabilidad de este ensayo se probó a 35 y 45 °C utilizando 100 μL de suspensión de perlas y siguiendo la metodología mencionada anteriormente.

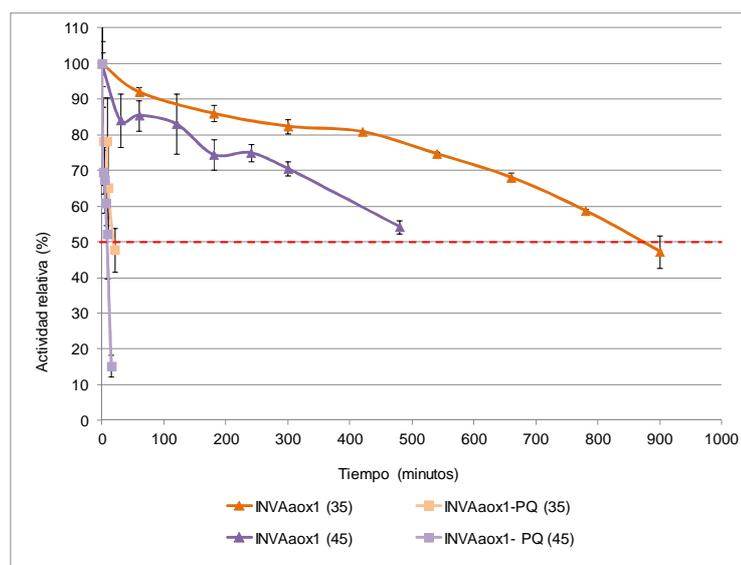


Figura 91. Termoestabilidad a 35 y 45 °C de INVA_{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre, mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden la enzima unida a las perlas de quitosano.

A pesar de que en la **Figura 89 A** se observó un aligera mejora en la campana de temperatura óptima, al realizar el ensayo incubando la enzima inmovilizada a diferentes temperaturas no se obtuvo un resultado positivo, debido a que a en los ensayos realizados hubo una disminución de la termoestabilidad en comparación con la enzima libre (**Figura 91**).

En el caso de la temperatura de 45 °C hubo una disminución de 60 veces el tiempo de vida media de la enzima inmovilizada (8 minutos), en comparación con la enzima libre (480 minutos). Mientras que para 35 °C la disminución fue de 30 veces (30 minutos) en comparación con la enzima libre (900 minutos).

7.5.3.1.4 Efecto de iones metálicos y EDTA.

Para este ensayo sólo se probó una concentración (1 mM) debido a que vimos un efecto negativo desde esa concentración, lo cual se muestra en la **Figura 92**:

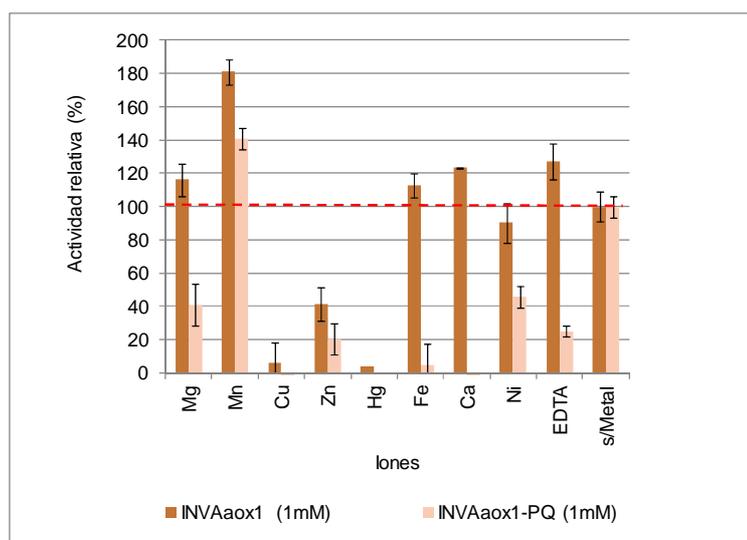


Figura 92. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVA_{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. Las barras en colores claros corresponden a la enzima inmovilizada y las figuras en colores oscuros corresponden a la enzima en su estado libre.

Como se observa en la figura anterior, con cualquiera de los iones divalentes probados hubo un efecto negativo en comparación con el control (sin metal) y con la enzima libre, con excepción del ion manganeso, el cual aumentó la actividad de la enzima inmovilizada en perlas de quitosano de 40%.

En la **Tabla 34** se muestran los resultados obtenidos de las mediciones realizadas a este sistema.

Tabla 34. Caracterización bioquímica de INVA_{AOX1} inmovilizada en Perlas de Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVA nativa	INVA_{AOX1}	INVA_{AOX1} Perlas de Quitosano
pH óptimo	6.0	5.5	5.5
Temperatura óptima (°C)	30	35	35
V_{max} (μmol mgmin⁻¹)	62.5	4000	2500
K_M (mM)	110	41	125
Inhibidores (1mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ ZnSO ₄	Todos los metales probados menos Mn ²⁺
Inductores (1 mM)	ND	MnCl ₂ (1mM) ↑ 80%	MnCl ₂ (1mM) ↑ 40%
Inhibición por sacarosa (mM)	300	400	400
Termo-estabilidad (t_{1/2})	40 °C, 20 min (pérdida total de actividad)	50 °C, 90 min 45 °C, 480 min 40 °C, 1400 min (23h)	45 °C, 8 min 35 °C, 30 min 30 °C, 45 min
Reúsos	0	0	17

ND: No determinado

Conforme los resultados obtenidos en la **Tabla 34**, el método de perlas de quitosano no fue el adecuado para inmovilizar a INVA_{AOX1} debido a que se observó un patrón de comportamiento similar al observado usando exclusivamente al quitosano, salvo que en éste método se pudieron medir 17 reúsos en comparación con el método anterior.

Por lo tanto, se concluye que el mejor método de inmovilización para INVA_{AOX1} fue empleando Nylon-6, ya que se obtuvieron 44 reúsos y se consiguió mejora en la termoestabilidad.

7.5.3.2 $INVB_{AOX1}$ -Perlas de Quitosano

En cuanto a la invertasa extracelular recombinante, le eficiencia obtenida por este método fue del 78%, porcentaje más alto obtenido que utilizando Nylon-6 o Quitosano, 65 y 40%, respectivamente.

7.5.3.2.1 Temperatura y pH óptimos

De la misma forma que para la $INVA_{AOX1}$ -PQ se tomaron 100 μ L de la suspensión de perlas donde se encuentra la $INVB_{AOX1}$ sin romperlas y se realizaron todas las determinaciones que se desglosan a continuación siguiendo el mismo procedimiento descrito en Materiales y Métodos (Ver. Sección 6.6.2 y 6.6.3.3).

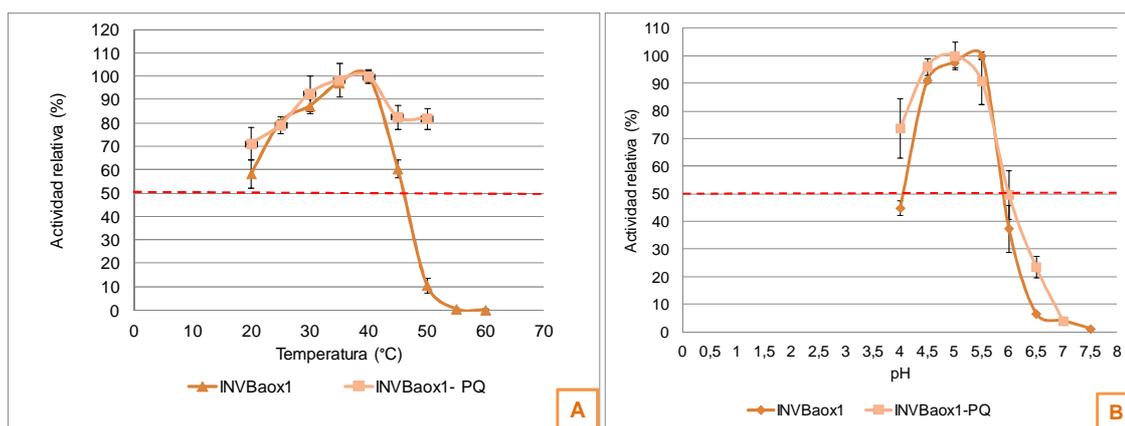


Figura 93. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre $INVB_{AOX1}$ acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre, mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la enzima unida a las perlas de quitosano.

El comportamiento de ambas campanas (temperatura y pH óptimo **Figura 93 A y B**) presentaron un patrón muy similar a la observada para la invertasa intracelular inmovilizada en el mismo sistema (**Figura 89**). No hubo cambios en la temperatura óptima de $INVB_{AOX1}$ inmovilizada, sin embargo a una temperatura de 50 °C todavía conserva aproximadamente el 80% de su actividad, no siendo así para su forma libre la cual a la misma temperatura presentó una actividad del 10%.

En el caso del pH, este si presentó una modificación de 0.5 unidades. Este fenómeno ya había sido observado para la misma enzima con el mismo tipo de soporte (**Figura 84**).

7.5.3.2.2 Consumo de sacarosa

Dada alta eficiencia obtenida en con éste método de inmovilización, y a los antecedentes de los otros métodos, se esperaba una diferencia en la curva de hidrólisis de sustrato tal como se observa en la **Figura 94**.

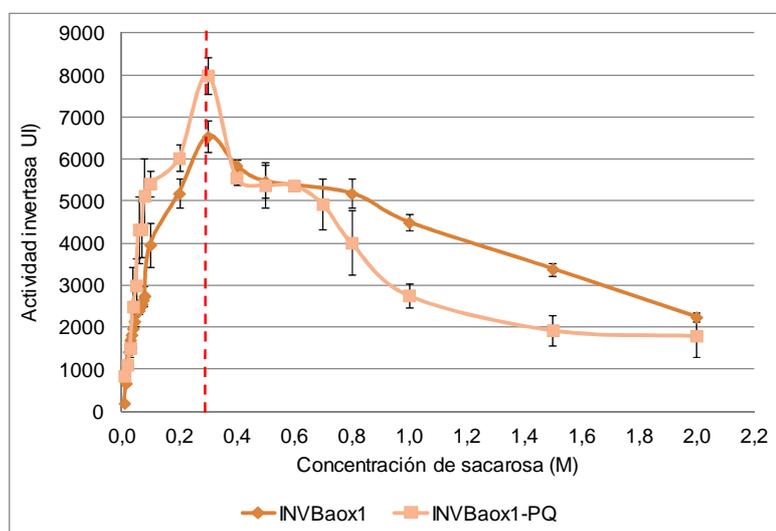


Figura 94. Velocidad de hidrólisis de la INVB_{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. La línea oscura (triángulos) corresponde a la enzima libre, mientras que la línea clara (cuadrados) corresponde a la enzima unida a las perlas de quitosano.

Sin embargo, lo que no se esperaba era que esta velocidad se mejorara en comparación con la enzima libre. Con esta curva se realizó la regresión lineal obteniendo una R^2 de 0.998 con el método de Lineweaver-Burk y como resultado los valores de K_M y V_{max} fueron de: 30 mM y $10,000 \mu\text{mol mgmin}^{-1}$, siendo éstos 1.6 y 2 veces mejores en comparación con los obtenidos para la enzima libre (50 mM y $5000 \mu\text{mol mgmin}^{-1}$, respectivamente).

Estas mejoras pueden deberse a un cambio conformacional en la integridad de la estructura de $INVB_{AOX1}$ por la formación de enlaces covalentes en los grupos amino, además de un efecto protector que puede tener la matriz sobre la enzima confinada (Tripathi *et al.* 2006). Esta modificación no sólo puede afectar a los parámetros, como K_M y V_{max} , sino también estabilidad térmica de la enzima inmovilizada.

7.5.3.2.3 Termoestabilidad.

Este ensayo se realizó a 45 y 50 °C, resultados que se muestran en la **Figura 95**.

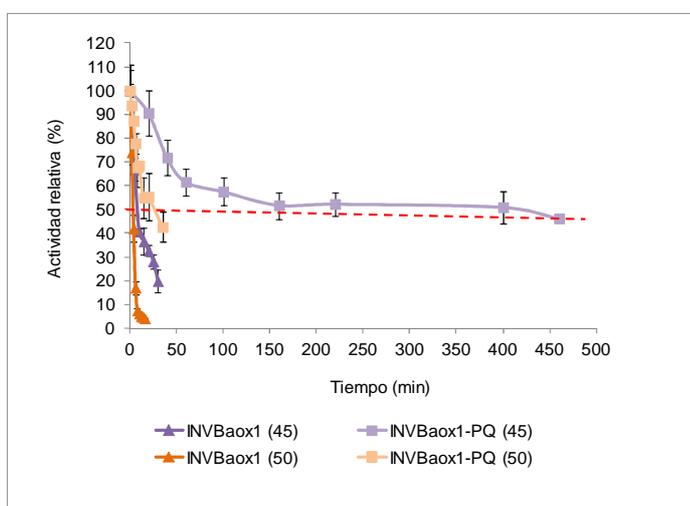


Figura 95. Termoestabilidad a 45 y 50 °C de $INVB_{AOX1}$ acoplada a perlas de quitosano y su comparación con su homóloga libre. Las líneas oscuras (triángulos) corresponden a la enzima libre, mientras que las líneas claras (cuadrados) corresponden a la enzima unida a las perlas de quitosano.

Por el contrario de la invertasa intracelular inmovilizada con el mismo método, $INVB_{AOX1}$ -PQ presentó un aumento en la termoestabilidad en las dos temperaturas probadas (**Figura 95**). En el caso de la temperatura menor (45 °C), la vida media de la enzima inmovilizada se extendió en 40 veces (400 minutos), en comparación con la enzima libre (10 minutos). Para la temperatura mayor (50 °C) también hubo un aumento de la vida media de casi 7 veces (20 minutos), comparada con su homóloga no inmovilizada (3 minutos).

7.5.3.2.4 Efecto de iones metálicos y EDTA

Nuevamente para esta determinación se vió un efecto diferente al observado anteriormente para la enzima intracelular (**Figura 92**), lo cual se muestra en la **Figura 96**.

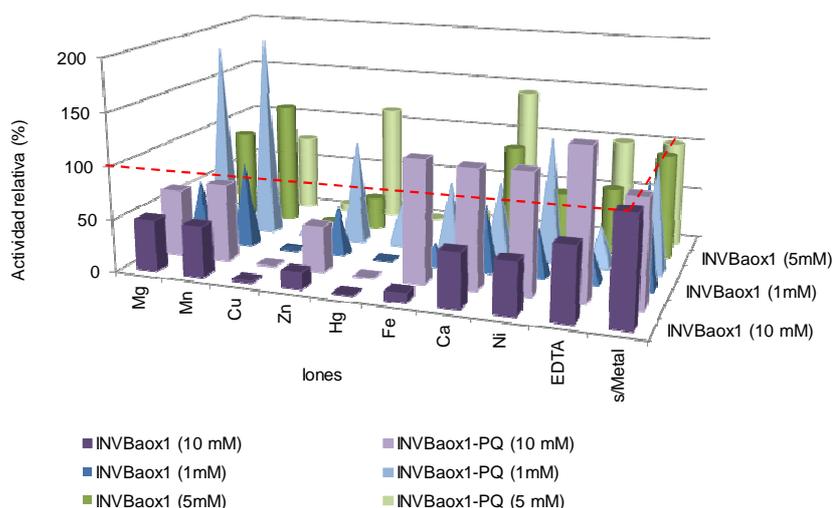


Figura 96. Efecto de iones metálicos y EDTA sobre INVB_{AOX1} acoplada a perlas de quitosano comparada con su homóloga libre. Las figuras en colores claros corresponden a la enzima inmovilizada y las figuras en colores oscuros corresponden a la enzima en su estado libre.

Utilizando el soporte de quitosano sin realizar las perlas (**Figura 87**), ya se había observado un efecto similar al presentado en la **Figura 96**; es decir, un efecto “protector” ante los iones divalentes probados, efecto que se observa claramente para una concentración de 1 y 5 mM para todos los iones probados. En el caso de 10 mM, este efecto ya no se conserva para los iones como Mg^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+} .

Sin embargo, es evidente que a cualquiera de las concentraciones probadas, tanto para la enzima libre como inmovilizada utilizando Cu^{2+} y Hg^{2+} se tiene un efecto completamente inhibitorio (**Figura 96**), comportamiento ya discutido anteriormente.

Los resultados comparados con la enzima libre y nativa del sistema se muestran en la **Tabla 35**:

Tabla 35. Caracterización bioquímica de INVB_{AOX1} inmovilizada en Perlas de Quitosano y su comparación con la enzima nativa y recombinante libre.

	INVB nativa	INVB _{AOX1}	INVB _{AOX1} Perlas de Quitosano
pH óptimo	5.5	5.5	5.5
Temperatura óptima (°C)	45	40	40
V _{max} (μmol mgmin ⁻¹)	33.6	5000	10000
K _M (mM)	98	50	30
Inhibidores (1 mM)	HgCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ FeSO ₄ ZnSO ₄ NiCl ₂	CuSO ₄ HgCl ₂ FeSO ₄ ZnSO ₄
Inductores (1,5 y 10 mM)	ND	MnCl ₂ ↑ 20%	MnCl ₂ ↑ 80% MgCl ₂ ↑ 90%
Inhibición por sacarosa (mM)	300	300	300
Termo-estabilidad (t _{1/2})	55 °C, 25 min	50 °C, 3 min 45 °C, 10 min 40 °C, 10 min	50 °C, 20 min 45 °C, 400 min
Reúsos	0	0	24

ND: No determinado

De acuerdo a los resultados mostrados en la **Tabla 35**, el método de inmovilización mediante Perlas de Quitosano fue adecuado para INVB_{AOX1}, obteniendo mejoras en los parámetros cinéticos aumentando 2 veces la velocidad máxima y 1.6 veces la afinidad de la enzima por sacarosa; así mismo, la termoestabilidad del sistema fue mejor en comparación con la enzima libre aumentando la estabilidad a 50 y 45 °C en 7 y 40, respectivamente. Aunado a esto, el número de reúsos logrados fue de 24, siendo el mayor número obtenido por los tres métodos y siendo mayor que lo obtenido por Kumari y Kayastha (2011), consiguiendo 10 reúsos al inmovilizar una α-amilasa de frijol de soya.

Por lo tanto, el mejor método de inmovilización para la invertasa recombinante extracelular producida por *P. pastoris* fue mediante la inmovilización con Perlas de Quitosano obteniendo mejores valores de parámetros cinéticos, termoestabilidad y reúsos, en comparación con la enzima nativa y la enzima recombinante no inmovilizada.

7.6 Evaluación de actividad fructosiltransferasa (transfructosilación) en INVA_{AOX1} e INVB_{AOX1}.

7.6.1 Análisis *in silico* a estructura primaria de INVA e INVB

Utilizando el programa Network Protein Sequence Analysis se obtuvieron los resultados que se muestran en la **Figura 97**.

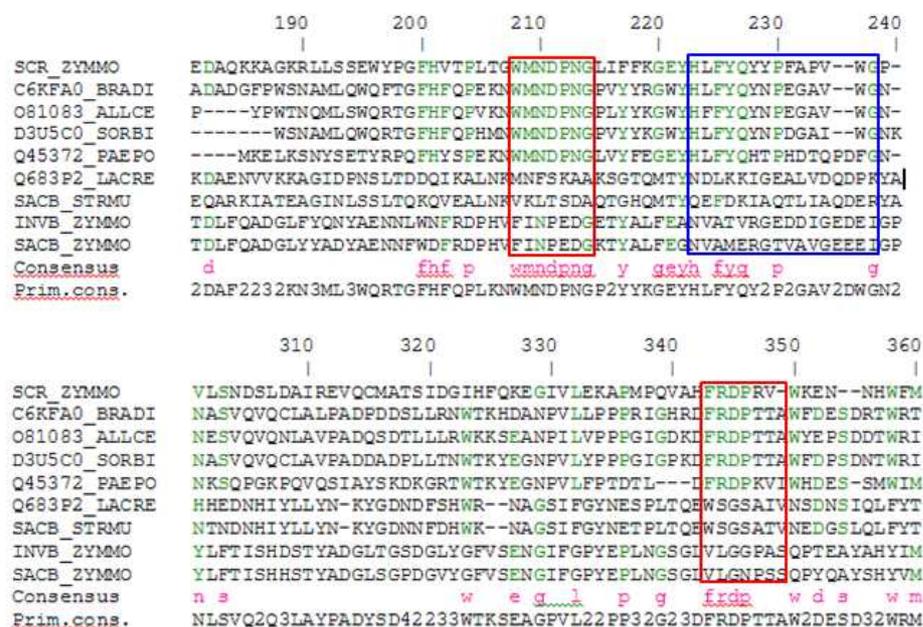


Figura 97. Alineamiento múltiple utilizando el programa Network Protein Sequence Analysis para identificar regiones conservadas de posible actividad transfructosilación.

Como se puede observar en la **Figura 97**, en los recuadros rojos y azules, SCR_ZYMMO (INVA de *Z. mobilis*) presenta alta homología con las regiones conservadas de otras invertasas de la familia GH32 con actividad transfructosilación, patrón no observado para la secuencia INVB_ZYMMO (INVB de *Z. mobilis*). Cabe recordar que las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* no presentan más que 32% de similitud entre ambas enzimas.

Sin embargo, INVB si posee cierta similitud con la levansacarasa de *Z. mobilis* (SACB_ZYMMO) la cual, de acuerdo con Yanase *et al.* 1995, 2002, es capaz de formar levanos y producir FOS. Esta suposición que nos hace pensar que de acuerdo a la similitud de aminoácidos que comparten estas dos enzimas, INVB puede presentar actividad de transfructosilación.

7.6.2 Evaluación de los productos de hidrólisis.

Aunque a lo largo de este trabajo se ha recalcado en diversos experimentos que la $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$ no presentan las mismas características funcionales y estructurales que sus homólogas nativas, se decidió medir los productos de hidrólisis suponiendo que al ser enzimas más activas se podría detectar una diferencia con estudios realizados anteriormente, donde se asegura que estas invertasas no presentan actividad FT.

Se trabajaron con diferentes condiciones tanto de columnas, fases móviles, flujos y tiempos de reacción, sin embargo, la metodología que nos funcionó mejor para separar los productos glucosa y fructosa fue la que se describe en Materiales y Métodos (Ver. Sección 6.8.2).

Se obtuvieron dos cromatogramas donde se muestra una diferencia en alturas respecto a los productos que se deseaban detectar (Glucosa y Fructosa) como se muestra en la **Figura 98**:

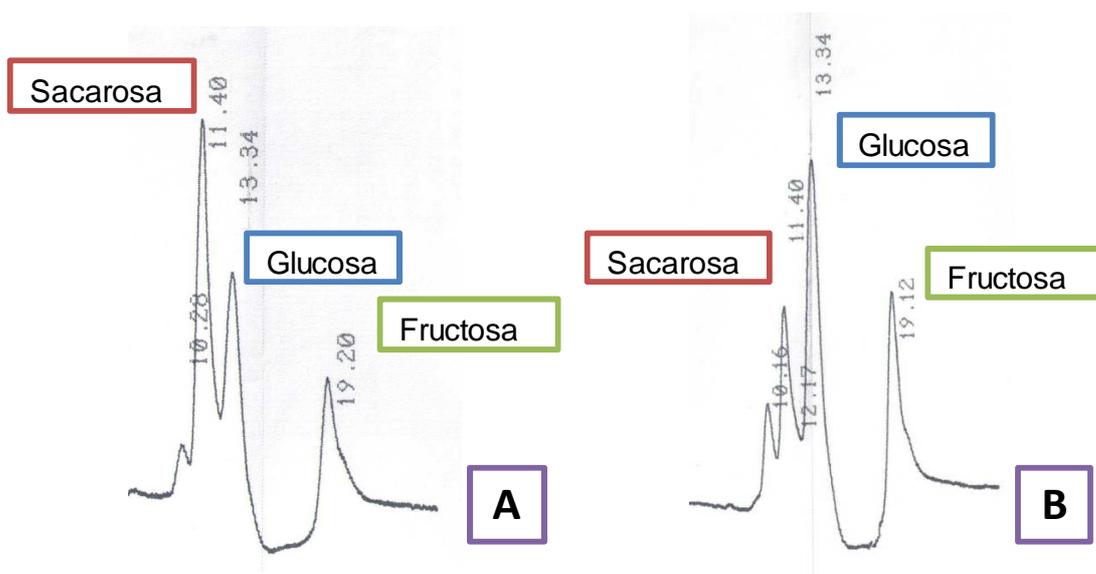


Figura 98. Cromatogramas de hidrólisis de sacarosa a los 30 minutos de incubar $INVA_{AOX1}$ e $INVBA_{OX1}$ en 1 M de sacarosa a temperatura ambiente.

Conforme a lo observado en la **Figura 98**, las invertasas $INVA_{AOX1}$ e $INVBA_{OX1}$ de *Z. mobilis* expresadas en *P. pastoris* no producen una mezcla equimolar de glucosa y fructosa, cabe señalar que estos datos son únicamente cualitativos, por lo que éste sería un análisis preliminar, el cual da indicios sobre la posible actividad FT de ambas invertasas.

Es importante destacar que no fue posible medir la presencia de FOS en estos hidrolizados dado que no se contaron con los estándares y a lo largo del cromatograma no se detectaron más picos de otros compuestos.

Una posible explicación de lo anterior es que todavía quedan por estandarizar las condiciones para la obtención de los FOS, un análisis más sencillo y que diversos autores menciona es más concluyente es hacer una TLC para observar presencia o ausencia de FOS.

8. CONCLUSIONES

- 1) Se expresaron exitosamente las invertasas INVA e INVB de *Z. mobilis* en *P. pastoris* utilizando como promotor AOX1, estas proteínas fueron producidas sin la cola poli-histidinas y el epítipo mcy.
- 2) Se optimizaron las condiciones del medio de cultivo para obtener mayor actividad de INVA_{AOX1} e INVB_{AOX1} producidas por transformantes de *P. pastoris*, siendo estas: 180 rpm, 28 °C y 1% de metanol.
- 3) La producción de INVA_{AOX1} fue mayor utilizando el promotor GAP.
- 4) La producción de INVB_{AOX1} fue mayor utilizando el promotor AOX1.
- 5) Las propiedades cinéticas y bioquímicas de INVA_{AOX1} fueron pH óptimo de 5.5, temperatura óptima de 35 °C, V_{max} ($\mu\text{mol mgmin}^{-1}$)= 4000, K_M (mM)= 41, inhibición de sacarosa 400 mM, estabilidad por 480 minutos a 45 °C. Todas estas propiedades fueron mejores al compararlas con la enzima nativa.
- 6) Las propiedades cinéticas y bioquímicas de INVB_{AOX1} fueron pH óptimo de 5.5, temperatura óptima de 40 °C, V_{max} ($\mu\text{mol mgmin}^{-1}$)= 5000, K_M (mM)= 50, inhibición de sacarosa 400 mM, estabilidad por 10 minutos a 45 °C. Todas estas propiedades fueron mejores al compararlas con la enzima nativa.
- 7) Ambas enzimas presentaron glicosilación, determinada por tinción PAS y haciendo análisis removiendo los grupos glicosilo con la enzima Endo H.
- 8) INVA_{AOX1} presentó mayor grado de glicosilación, aumentando su peso original en 16%. INVB_{AOX1} presentó menor grado de glicosilación aumentando su peso en 6% con respecto a la nativa.
- 9) Al remover los grupos glicosilo las propiedades cinéticas y la termoestabilidad se vieron afectadas negativamente en ambos casos.
- 10) Se realizaron 3 métodos de inmovilización modificando el tipo de soporte y el tipo de agente activador.
- 11) Para la enzima INVA_{AOX1} ningún método de inmovilización fue adecuado, obteniendo 44 reúsos al utilizar como soporte Nylon-6 y aumento en la termoestabilidad.

- 12) $INVB_{AOX1}$ presentó dos métodos de inmovilización óptimos siendo las Perlas de Quitosano el mejor, obteniendo mejores resultados de termoestabilidad y parámetros cinéticos.
- 13) Las diferencias en cuanto a los resultados de inmovilización nos hace suponer que las estructuras terciarias de ambas invertasas son totalmente diferentes unas de otras.
- 14) $INVA_{AOX1}$ e $INVB_{AOX1}$ presenta una caja de unión a sacarosa y posible actividad de FT, sin embargo se requieren de más estudios para corroborar dicha actividad.

9. PERSPECTIVAS

- 1) Caracterizar la estructura secundaria y/o terciaria de las proteínas para indagar más acerca de cuáles fueron las modificaciones que realizó *P. pastoris* para mejorar las propiedades catalíticas de estas enzimas.
- 2) Optimizar la producción de las proteínas heterólogas en biorreactor.
- 3) Optimizar las condiciones de inmovilización de ambas invertasas, sobre todo de la intracelular.
- 4) Buscar posible actividad de transfructosilación, debido a que aunque reportes mencionan que estas enzimas no presentan actividad de transfructosilación, las propiedades de esas enzimas recombinantes no son iguales a las nativas, siendo estas muy activas y con cajas de unión capaces de realizar esta actividad.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta N, Beldarraín A, Rodríguez L, Alonso Y (2000) Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeasts. *Biotechnol Appl Biochem* 32:179-187.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 1-14
- Ahn JY, Kang HS (2000) Sequence analysis of 44B6 fosmid clone of *Zymomonas mobilis* ZM4. Submitted (17-OCT-2000) to the INSDC. School of Biological Sciences, Seoul National University, San56-1 Shilimdong Gwanakgu, Seoul 151-742, Korea.
- Ait-Abdelkader N, De Caro A, Guzzo J, Michel GPF, Batti JC (2000) The intracellular sucrose (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. *Biotechnol Lett* 22:461-467.
- Alonso-Ochoa M, Zavala-Tapia O, Pedroza-Roldán C (2002). Expresión de anticuerpos de cadena sencilla (ScFv) contra *Helicobacter pylori* en la levadura *Pichia pastoris*. *Rev Biomed.* 168-174.
- Altenbach D, Rudiño-Pinera ER, Olvera C, Boller T, Wiemken A, Ritsema T (2009) An acceptor-substrate binding site determining glycosyl transferase emerges from mutant analysis of a plant vacuolar invertase and a fructosyltransferase. *Plant Mol Biol* 69:47-56.
- Álvaro-Benito M, de Abreu M, Fernández-Arrojo L, Plou FJ, Jiménez-Barbero J, Ballesteros A, Polaina J, Fernández-Lobato M (2007) Characterization of a β -fructofuranosidase from *Schwanniomyces occidentalis* with transfructosylating activity yielding the prebiotic 6-kestose. *J Biotechnol* 132:75-81.
- Amaya-Delgado L, Hidalgo-Lara ME, Montes-Horcasitas MC(2006) Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized on nylon-6 microbeads. *Food Chem* 99:299–304.
- Amersham Pharmaci Biotech AB (1999) Handbook Protein Purification. Amersham Pharmaci Biotech Inc. USA.
- Amore A, Amoresano A, Birolo L, Henrissat B, Leo G, Palmese A, Faraco V (2012) A family GH51 α -L-arabinofuranosidase from *Pleurotus ostreatus*: identification, recombinant expression and characterization. *Appl Microbiol Biotechnol* 94:995-1006.
- Apt KE, KrothPancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Molecular & General Genetics* 252(2):572-579.
- Arjmand S, Lotfi AS, Shamsara M, Mowla SJ (2012) Elevating the expression level of biologically active recombinant human alpha 1-antitrypsin in *Pichia pastoris*. *Electronic Journal of Biotechnology* 16(1) <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue1-fulltext-4>.
- Arrollo M (1998) Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharmaceutica* 39(2):23-39.
- Arruda M, Vitolo M (1999) Characterization of Invertase Entrapped into Calcium Alginate Beads. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 81:23-33..
- Athmaran TN, Saraswat S, Singh AK, Rao MK, Gopalan N, Suryanarayana VVS, Rao PVL (2012) Influence of copy number on the expression levels of pandemic influenza hemagglutinin recombinant protein in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Virus Genes* 45:440-451.
- Bai J, Ma D, Lao H, Jian Q, Ye X, Luo J, Xong X, Li Y, Liang X (2006) Molecular cloning, sequencing, expression of Chinese sturgeon cystatin in yeast *Pichia pastoris* and its proteinase inhibitory activity. *Journal of Biotechnology* 125:231-241.
- Balamurugan V, Reddy G, Suryanarayana V (2007) *Pichia pastoris*: A notable heterologous expression system for the production of foreign proteins-Vaccines. *Indian Journal of Biotechnology* 6: 175-186.
- Barral P, Batanero E, Villalba M, Rodríguez R (2005) Expression of the major olive pollen allergen Ole e 10 in the yeast *Pichia pastoris*: Evidence of post-translational modifications. *Protein Expression and Purification* 44(2): 147-154.

- Bazan SB, Chaves ADM, Aires KA, Cianciarullo AM, Garcea RL, Ho PL (2009) Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in *Pichia pastoris*. Arch Virol 154(10): 1609-1617.
- Bekers M, Vigants A, Laukevics J, Toma M, Rapoport, Zikmanis P (2000) The effect of osmo-induced stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. Int J Food Microbiol 55:147-150.
- Bhanot V, Balamurugan V, Bhanuprakash V, Venkatesan G, Sen A, Yadav V, Yogisharadhya R, Singh RK (2009) Expression of P32 protein of goatpox virus in *Pichia pastoris* and its potential use as diagnostic antigen in ELISA. Journal of Virological Methods 162:251-257.
- Bhatti HN, Asgher M, Abbas A, Nawaz R, Sheikh MA (2006) Studies on kinetics and thermostability of a novel acid Invertase from *Fusarium solani*. J Agric Food Chem 54:4617-4623.
- Bochner BR, Savageau MA (1977) Generalized Indicator Plate for Genetic, Metabolic, and Taxonomic Studies with Microorganisms Applied and Environmental Microbiology 33(2):434-444.
- Boer H, Teeri TT, Koivula A (2000) Characterization of Trichoderma reesei Cellobiohydrolase Cel7A Secreted from Pichia pastoris Using Two Different Promoters. Biotechnol Bioeng 69:486-494.
- Böer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G (2007) Yeast expression platforms. Appl Microbiol Biotechnol 77:513-523.
- Boettner M, Steffens C, von Mering C, Bork P, Stahl U, Lang C (2007) Sequence-based factors influencing the expression of heterologous genes in the yeast Pichia pastoris-A comparative view on 79 human genes. Journal of Biotechnology 130:1-10.
- Bommarius AS, Riebel BR (2004) Biocatalysis. Fundamentals and Applications. Wiley-VCH. Alemania
- Brierley RA, Bussineau C, Kosson R, Melton A, Siegel RS (1990) Fermentation development of recombinant *Pichia pastoris* expressing the heterologous gene: bovine lysozyme. Ann N Y Acad Sci 589:350-362.
- Burrowes OJ, Diamond G, Lee TC (2005) Recombinant expression of pleurocidin cDNA using the *Pichia pastoris* expression system. Journal of Biomedicine and Biotechnology 4:374-384.
- Çalik P, Orman MA, Çelik E, Halloran SM, Çalik G, Özdamar TH (2008) Expression system for synthesis and purification of recombinant human growth hormone in *Pichia pastoris* and structural analysis by MALDI-ToF mass spectrometry. Biotechnol Prog 24:221-226.
- Calixto-Romo MA, Santiago-Hernández JA, Vallejo-Becerra V, Amaya-Delgado L, Montes-Horcasitas MC, Hidalgo-Lara ME (2008) Expression, purification and immobilization of the intracellular invertase INVA, from *Zymomonas mobilis* on crystalline cellulose and Nylon-6. J Ind Microbiol Biotechnol 35:1455-1463.
- Calixto-Romo (2009) Mejoramiento de las propiedades catalíticas de las invertasas INVA e INVB de *Zymomonas mobilis* por métodos bioquímicos y moleculares. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- Canam T, Unda F, Mansfield SD (2008) Heterologous expression and functional characterization of two hybrid polar cell-wall invertases. Planta 228:1011-1019.
- Cayetano Cruz EM (2011) Expresión de la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* en *Pichia pastoris* por inducción con metanol. Tesis de Maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- Cenis JL (1999) Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucleic Acids Research 20(9):1.
- Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiology Reviews 24:45-66
- Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, Cregg JM (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. Current Opinion in Biotechnology 13:329-332.
- Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, Jahic M, Enfors SO (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess Biosyst Eng 27:399-406.
- Chavez F, Pons T, Delgado J y Rodríguez L (1998) Cloning and Sequence Analysis of the Gene Encoding Invertase (INV1) from the Yeast *Candida utilis*. Yeast 14:1223-1232.

- Chen TH, Huang YC, Yang CS, Yang CC, Wang AI, Sung HY (2009) Insights into the catalytic properties of bamboo vacuolar invertase through mutation analysis of active site residues. *Phytochemistry* 70:25-31.
- Chiruvolu V, Eskridge K, Cregg J, Meagher M (1998). Effect of Glycerol Concentration and pH on Growth of Recombinant *Pichia pastoris* Yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 75:163-173.
- Córdoba-Ruiz H, Algecira-Encizo N, Poutou-Piñales R, Barrera-Avellaneda LA (2003) *Pichia pastoris*, una alternativa para la producción de glicoproteínas humanas de uso terapéutico. Estrategia de fermentación. *Revista Colombiana de Biotecnología* 5:73-84.
- Cortés-Romero C, Martínez-Hernández A, Mellado-Mojica E, López MG, Simpson J (2012) Molecular and functional characterization of novel fructosyltransferases and invertases from *Agave tequilana*. *PLoS ONE* 7(4): e35878. doi:10.1371/journal.pone.0035878.
- Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F (2006) Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. *Microbial Cell Factories* 5:17.
- Cregg JM, Tschopp JF, Stillman C, Siegel R, Akong M, Craig WS, Buckholz RG, Madden KR, Kellaris A, Davis GR, Smiley BL, Cruze J, Torregrossa R, Velicelebi G, Thill GP (1987) High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biol Technology* 5: 479-485.
- Cregg J, Madden K (1988) Development of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, as a host system for the production of foreign proteins. *Development in industrial microbiology* 29:31-41.
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993). Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*. *Bio/Technology* 11: 905-910.
- Cregg JM, Higgins DR (1995) Production of foreign protein in yeast *Pichia pastoris*. *Can J Bot (Suppl.)* 73, 5981–5987.
- Cregg JM, Tolstorukov I, Kusari A, Sunga J, Madden K, Chappell T (2009) Expression in the yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Enzymology* Capítulo 13 Volumen 463. Editorial Elsevier Inc. California USA.
- Couderc R, Baratti J (1980) Oxidation of metanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2279-2289.
- Daly R, Hearn MTW (2005) Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit* 18:119-138.
- d'Anjou MC, Daugulis AJ (2001) A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioeng* 72:1–11.
- Damasceno LM, Plat I, Chang HJ, Cohen L, Ritter G Old LJ, Batt CA (2002) An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain FV antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 37:18-26.
- David A, Wang N, Yang V, Yang A (2006) Chemically surface modified gel (CSMG): An excellent enzyme-immobilization matrix for industrial processes. *Journal of Biotechnology* 125:395-407.
- De Coninck B, Le Roy K, Francis I, Clerens S, Vergauwen R, Halliday AM, Smith SM, Van Laere A, Van Den Ende W (2005) *Arabidopsis* AtcwINV3 and 6 are not invertasas but are frutan exohydrolase (FEHs) with different substrate specificities. *Plant Cell Environ* 28:432-443.
- Desari PN, Shrivastava N, Padh H (2010) Production of heterologous proteins in plants: Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances* 28:427-435.
- Dipasquale L, Gambacorta A, Siciliano RA, Mazzeo MF, Lama L (2009) Purification and biochemical characterization of a native invertase from the hydrogen-producing *Thermotoga neapolitana* (DSM 4359). *Extremophiles* 13:345-354.
- Dragon-Serrano ME, Sainz-Espuñes TR (2006) Sistemas de expresión para proteínas recombinantes terapéuticas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 37(1): 38-44.
- Fernández FJ (1997) Caracterización de la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de penicilina: Reacción enzimática catalizada por el mproducto del último gen (pen DE) de la ruta de biosíntesis de penicilina. Tesis de doctorado. Universidad de León. España.

Flickinger MC, Drew SW (1999) Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, biocatalysis and bioseparation. Wiley & Sons Inc Vol 1.

Friessen JD, An G (1983) Expression vehicles used in recombinant DNA technology. *Biotechnology Advances* (1) 2:205-227.

Fu RH, Wang AY, Wang YC, Sung HY (2003) A cDNA encoding vacuolar type β -D-fructofuranosidase (Os β fruct3) of rice and its expression in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 25: 1525-1530.

Gellissen G, Melber K, Janowicz Z, Dahlems U, Weydemann U, Piontek M, Strasser A, Hollenberg C (1992) Heterologous protein production in yeast. *Antonie van Leeuwenhoek* 62: 79-93.

Geutjes P, Nillesen STM, Lammers G, Daamen WF, Kuppevelt TH (2010). Cloning, large-scale production, and purification of active dimeric rat vascular endothelial growth factor (rrVEGF-164). *Protein Expression and Purification* 69: 76-82.

Giraldo MA, da Silva TM, Salvato F, Terenzi HF, Jorge JA, Guimarães LH (2012) Thermostable invertase from *Paecilomyces variotti* produced under submerged and solid-state fermentation using agroindustrial residues. *World J Microbiol Biotechnol* 28:463-472.

Gómez L, Ramírez HL, Villalonga R (2006) Immobilization of Chitosan-Invertase Neoglycoconjugate on Carboxymethylcellulose-Modified Chitin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 36:259-217.

Gómez L, Ramírez HL, Villalonga ML, Hernández J, Villanonga R (2006) Immobilization of chitosan-modified invertase on alginate-coated chitin support via polyelectrolyte complex formation *Enzyme and Microbial Technology* 38:22-27.

Goochee CF, Gramer MJ, Andersen DC, Bahr JB, Rasmussen JR (1991). The oligosaccharides of glycoproteins: bioprocess factor affecting oligosaccharide structure and their effect on glycoprotein properties. *Bio/Technology* 9:1347-1355.

Goodrick J C, Xu M, Finnegan R, Schilling B M, Schiavi S, Hoppe H & Wan N C (2001) High-level Expression and Stabilization of Recombinant Human Chitinase Produced in a Continuous Constitutive *Pichia pastoris* Expression System. *Biotechnology and Bioengineering*.74: 492-497.

Gracida-Rodríguez J, Favela-Torres E, Prado-Barragan A, Huerta-Ochoa S, Saucedo-Castañeda G (2002) Invertases. In: Pandey A. (ed) *Enzyme Technology*. 1st edn. Springer, New York, 449-462.

Guimarães LHS, Terenzi HF, Polizeli MLTM, Jorge JA (2007) Production and characterization of a thermostable extracellular β -fructofuranosidase produced by *Aspergillus ochraceus* with agroindustrial residues as carbon source. *Enzyme and Microbial Technology* 42:52-57.

Gunasekaran P, Karunakaran T, Cami B, Mukundan AG, Preziosi L, Baratti J, Mukundan AG (1990) Cloning and sequencing of the *sacA* gene: characterization of a sucrase from *Zymomonas mobilis*. *J Bacteriol* 172:6727-35.

Gunasekaran P, Mukundan G, Kannan R, Velmurugan (1995) The *SacB* and *SacC* genes encoding levansucrase and sucrose form a gene cluster in *Zymomonas mobilis*. *Biotechnology Letters* 17(6):635-642.

Haki GD y Rakshit SK (2003) Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology* 89:17-34.

Han Y, Lei XG (1999) Role of glycosylation in the functional expression of an *Aspergillus niger* phytase (*phyA*) in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys* 364:83-90.

Han M, Wang X, Ding H, Jin M, Yu L, Wang J, Yu X (2014) The role of N-glycosylation sites in the activity, stability and expression of the recombinant elastase expressed by *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol* 54:32-37.

Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580.

Hanes CS. Studies on plant amylases: the effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley (1932). *Biochem J* 26:1406–1421.

- Henriksson H, Denman SE, Campuzano IDG, Ademark P, Masters ER, Teeri TT, Brumer H 3rd (2003) N-linked glycosylation of native and recombinant cauliflower xyloglucan endotransglycosylase 16A. *Biochem J.* 375:61-73.
- Hernalsteens S y Maugeri F (2010) Partial Purification and Characterization of Extracellular Fructofuranosidase with Transfructosylating Activity from *Candida sp.* *Food Bioprocess Technol* 3:568-576.
- Higgins DR, Cregg JM. (1998) *Pichia* Protocols. In *Methods in Molecular Biology* Vol. 103. J M Walker, Humana Press, Totowa NJ.
- Higgins DR (1995) *Current Protocols in Protein Science.* Wiley & Sons Inc 5.7.1-5.7.18 USA.
- Hirayama M, Sumi N, Hidaka H. 1989. Purification and Properties of a fructooligosaccharide producing beta-fructofuranosidase from *Aspergillus* ATCC 20611. *Agric. Biol. Chem* 53: 667-673.
- Holmes DS, Quigley M (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacteria plasmids. *Anal Biochem* 144:193-197.
- Hooker AD, James DC (2000). Analysis of glycoprotein heterogeneity by capillar electrophoresis and mass spectrometry. *Molecular Biotechnology* 4(3): 241-249.
- Hsieh HJ, Liu PC, Liao WJ (2000) Immobilization of invertasa via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability. *Biotechnol Lett* 22:1459-1464.
- Hsieh CW, Liu LK, Yeh SH, Chen CF, Lin HI, Sung HY, Wang AY (2006) Molecular cloning and functional identification of invertase isozymes from Green Bamboo *Bambusa oldhamii*. *J Agric Food Chem* 54:3101-3107.
- Huang WC, Wang AY, Wang LT, Sung HY (2003) Expression and characterization of sweet potato invertase in *Pichia pastoris*. *J Agric Food Chem* 51:1494-1499.
- Husain S, Jafri F, Saleemuddin M (1996) Effect of chemical modification on the stability of invertase before and after immobilization. *Enzyme and Microbial Technology* 18:275-280.
- Idiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa (2010) Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol.* 86:403-417 Mini-review DOI 10.1007/s00253-010-2447-0.
- Inan M, Chiruvolu V, Eskridge KM, Vlasuk GP, Dickerson K, Brow S, Meagher MM (1999) Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Anylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology* 24:438-445.
- Inan M, Meagher MM (2001) Non-repressing carbon source for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92:585-589.
- Inan M, Meagher MM, Zhang W, Liu CP (2004) Optimization of cell density and dilution rate in *Pichia pastoris* continuous fermentation for production of recombinant proteins. *J. Ind Microbiol Biotechnol* 31: 330-334.
- Inan M, Aryasomayajula D, Sinha J, Meagher MM (2006) Enhancement of Protein Secretion in *Pichia pastoris* by Overexpression of Protein Disulfide Isomerase. *Biotechnology and bioengineering* 93(4):771-778.
- Invitrogen (2014). *Pichia Expression Kit.* Disponible en: URL: http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pich_man.pdf Último acceso Enero 10, 2014.
- Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Teeri T, Enfors SO (2006) Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* 22:1465-1473.
- Ji X, Van de Ende W, Schroeven L, Clerens S, Geuten K, Cheng S, Bennett J (2007) The rice genome encodes two vacuolar invertases with fructan exohydrolase activity but lacks the related fructan biosynthesis genes of the Pooideae. *New Phytol* 173:50-62.
- Jin H, Liu G, Ye X, Duan Z, Li Z, Shi Z (2010) Enhanced porcine interferon- α production by recombinant *Pichia pastoris* with a combinational control strategy of low induction temperature and high dissolved oxygen concentration. *Biochemical Engineering Journal* 52:91-98.
- Jahic M, Veide A, Charoenrat T, Terri T, Enfors SO (2006) Proccess Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with *Pichia pastoris*. *Biotechnol Prog* 22:1465-1473.

- Jedrzejcak-Krzepkowska M, Tkaczuk KL, Bielecki (2011) Biosynthesis, purification and characterization of β -fructofuranosidase from *Bifidobacterium longum* KN29.1. *Process Biochem* 46:1963-1972.
- Jenkins N, Curling EM (1994) Glycosylation of recombinant proteins: Problems and prospects. *Enzyme Microb Technol* 16: 354-364.
- Jonasson P, Liljeqvist S, Nygren PA, Sthal S (2002) Genetic design for facilitated production and recovery of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 35(2):91-105.
- Kannan R., Mukundan G., Ait-Abdelkader N., Augier-Magro V., Baratti J., Gunasekaran P (1995) Molecular cloning and characterization of the extracellular sucrase gene (*sacC*) of *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol* 163:195-204.
- Kim YJ, Oh YK, Kang W, Lee EY, Park S (2005). Production of human caseinomacropeptide in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32(9): 402-408.
- Kim D, Park SY Chung Y, Park J, Lee S, Lee TK (2010) Biochemical characterization of soluble acid and alkaline invertases from shoots of etiolated pea seedlings. *J Integr Plant Biol* 52:536-548.
- Klein MP, Nunes MR, Rodrigues RC, Benvenuti EV, Costa TMH, Hertz PF, Ninow JL (2012) Effect of the Support Size on the Properties of β -Galactosidase Immobilized on Chitosan: Advantages and Disadvantages of Macro and Nanoparticles *Biomacromolecules* 13:2456-2464.
- Kondo Y, Toyoda A, Fukushi H, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H, Sakai T (1994) Cloning and characterization of a pair of genes that stimulate the production and secretion of *Zymomonas mobilis* extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* 58:526-530.
- Kotwal SM, Shankar V (2009) Immobilized invertase. *Biotechnology Advances* 27:311-322.
- Kouvelis V, Saunders E, Brettin T, Bruce D, Detter C, Han C, Typas M y Pappas K (2009) Complete Genome Sequence of the Ethanol Producer *Zymomonas mobilis* NCIMB 11163. *Journal of Bacteriology* 191 (22), 7140-7141.
- Krajewska B (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilization: a review. *Enzyme and Microbial Technology* 35:126-139.
- Kumari A, Kayastha AM (2011) Immobilization of soybean (*Glycine max*) α -amylase onto Chitosan and Amberlite MB-150 beads: Optimization and characterization. *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatics* 69:8-14.
- Kupcsulik B, Sevela B (2004) Effect of methanol concentration on the recombinant *Pichia pastoris* MutS fermentation. *Periodica polytechnica Ser Chem Eng* 48(2):73-87.
- Kyono K, Yanase H, Tonomura K, Kawasaki H, Sakai T (1995) Cloning and characterization of *Zymomonas mobilis* genes encoding extracellular levansucrase and invertase. *Biosci Biotechnol Biochem* 59:289-293.
- Kwon MA, Kim HS, Yang TH, Song BK, Song JK (2009) High-level expression and characterization of *Fusarium solani* cutinase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 68:104-109.
- Lafraya A, Sanz-Aparicio J, Polaina J, Marín-Navarro J (2011) Fructo-oligosaccharide synthesis by mutant versions of *Saccharomyces cerevisiae* invertase. *Appl Environ Microbiol* 77:6148–6157.
- Lammens W, Le Roy K, Van Laere A, Rabijns A, Van den Ende W (2008) Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose. *J Mol Biol* 377:378–385.
- Lenhinger AL (1995) Principios de bioquímica. 2ª edición Ediciones Omega SA. Barcelona.
- Leyva-Castillo (2007) Expresión extracelular de la invertasa INVB de *Zymomonas mobilis* en la levadura *Kluyveromyces lactis*. Tesis de Maestría Departamento de Biotecnología y Bioingeniería CINVESTAV-IPN México, D.F.
- Li P, Anumanthan A, Gao XG, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgünes N, Renogopalakrishnan V (2007) Expression of Recombinant Proteins in *Pichia Pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol* 142:105-124.
- Li H, Wang D, Xu A, Li S, Jin S, Wu D (2009) High level expression and purification of active recombinant human interleukin-8 in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 68:60-64.
- Lineweaver H, Burk D. The determination of enzyme dissociation constants (1934). *J Am Chem Soc* 56: 658–666.

- Liu ZM, Lu ZX, Lv FX, Bie XM, Zhao HZ (2006) Heterologous expression and purification of protopectinase-N from *Bacillus subtilis* in *Pichia pastoris*. *Process Biochemistry* 41: 975-979.
- Loewen MC, Liu X, Davies PL, Daugulis AJ (1997) Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48:480-486.
- Lloyd RC, Davis BG, Jones JB (2000) Site-selective glycosylation of subtilisin *Bacillus lentus* causes dramatic increases in esterase activity. *Bioorg Med Chem* 8:1537-1544.
- Madhan SSR, Sathyavani R, Niket B (2010) Production and partial purification of invertase using *Cymbopogon caecius* leaf powder as substrate. *Indian J Microbiol* 50:318-324.
- Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, Harvey L (2005) Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast* 22:249-270.
- Marek M, Valentova O, Kas J (1984) Invertase Immobilization via its Carbohydrate Moiety. *Biotechnology and Bioengineering* 26:1223-1226.
- Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R (2007) Improvement of enzymatic activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40:1451-1463.
- Melo JS y D'Souza SF (1992) Immobilization of Invertase Through Its Carbohydrate Moiety on *Ocimum basilicum* Seed. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 32:159-170.
- Meldgaard y Svendsen (1994) Different effects of N-glycosylation on the thermostability of highly homologous bacterial (1,3-1,4)- β -glucanases secreted from yeast. *Microbiology* 140:159-166.
- Menéndez C, Martínez D, Trujillo LE, Mazola Y, González E, Pérez ER, Hernández L (2013) Constitutive high-level expression of a codon-optimized β -fructosidase gene from the hyperthermophile *Thermatoga maritima* in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 97:1201-1212.
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31:426-428.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- Mutlu M, Turhan N, Ercan M, Özdula A, Celebi S (1996) Kinetics of invertase immobilized on Poly(Phe-Lys) Coated Polystyrene beads. *Biotechnology Techniques* 10(2):71-76.
- Muzzarelli RAA (1980) Immobilization of enzymes on chitin and chitosan. *Enzyme Microbiol Technol* (2):177-184.
- Nagaraj VJ, Galati V, Lüscher M, Boller T, Wiemken A (2005) Cloning and functional characterization of a cDNA encoding barley soluble acid invertase (HvINV1). *Plant Sci* 168:249-258.
- Nigam PS (2013) Microbial enzymes with special characteristics for Biotechnological application. *Biomolecules* 3:597-611.
- O'Mullan PJ, Chase TJr, Eveleigh DE (2002) Sequence of a probable nucleotide sugar epimerase and guanine deaminase from *Zymomonas mobilis*. Submitted (31-OCT-2002) to the INSDC. Biochemistry and Microbiology, Cook College, Rutgers University, 76 Lipman Drive, New Brunswick, NJ 08901, USA.
- Okabayashi K, Ohmura T, Yokoyama K, Kawabe H (1997) Mutant strain of *Pichia pastoris* wich utilizes methanol in the presence of glucose. United States Patent. No. 5,643,792: 1-10
- Ortega-López J, Morales-Ramos LH, Montes MC, Magaña-Plaza I (1993) Lactose hydrolysis by immobilized β -galactosidase on Nylon-6: A novel spin-basket reactor *Biotechnology Techniques* 7(11):775-780.
- Panesar P, Marwaha S y Kennedy J (2006) *Zymomonas mobilis*: an alternative ethanol producer. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 81:623-635.
- Papakonstantinou T, Harris S, Hearn MTW (2009) Expression of GPF using *Pichia pastoris* vectors with zeocin or G-418 sulphate as the primary selectable marker *Yeast* 26:311-321.

- Plascencia-Espinosa M, Santiago-Herández A, Pavón-Orozco P, Vallejo-Becerra V, Trejo-Estrada S, Sosa-Peinado A, Benitez-Cardoza CG, Hidalgo-Lara ME (2014) Effect of deglycosylation on the properties of thermophilic invertase purified from the yeast *Candida guilliermondii* MplIIa. *Process Biochemistry* 49:1480-1487.
- Plantz BA, Sinha J, Villarete L, Nickerson KW, Schlegel VL (2006) *Pichia pastoris* fermentation optimization: energy state and testing a growth-associated model *Appl Microbiol Biotechnol* 72:297-305.
- Poutou RA, Quevedo BE, Córdoba HA, Sáenz H, Barrera LA (2005) Influencia de la fuente de carbono sobre la expresión de proteínas AOX1-reguladas en *Pichia pastoris*. *NOVA-Publicación científica* 3(3):75-87.
- Preziosi L, Michel GPF, Baratti J (1990) Characterization of sucrose-hydrolyzing enzymes of *Zymomonas mobilis*. *Arch Microbiol* 153:181-186.
- Preziosi L, Michel GPF, Baratti J (1990) Sucrose metabolism in *Zymomonas mobilis*: production and localization of sucrose and levansucrase activities. *Can J Microbiol* 36:159-163.
- Rai M, Padh H (2001) Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science* 80(9):1121-1128
- Rahore A S, Sobacke SE, Kocot TJ, Morgan DR, Dufield RL, Mozier NN (2003). Analysis for residual host cell proteins and DNA in process streams of a recombinant protein product expressed in *Escherichia coli* cells. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32(6):1199-1211.
- Ritsema T, Hernández L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *Plant J* 48:228–237.
- Rodríguez L, Narciandi R, Roca H, Cremata J, Montesinos R, Rodríguez E, Grillo J, Muzio J, Herrera S, Delgado J (1996). Invertase Secretion in *Hansenula polymorpha* under the AOX1 Promoter from *Pichia pastoris*. *Yeast* 12:815-822.
- Rogers L, Leon Y, Lee K y Lawford H (2007) *Zymomonas mobilis* for fuel ethanol and higher value products. *Biochem Engin Biotechnol* 108:263-288.
- Ritsema T, Hernández L, Verhaar A, Altenbach D, Boller T, Wiemken A, Smeekens S (2006) Developing fructan-synthesizing capability in a plant invertase via mutations in the sucrose-binding box. *Plant J* 48:228–237.
- (SAGARPA) Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Estados Unidos Mexicanos. www.sagarpa.gob.mx. 2009.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual* 3a edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York.
- Sanches-Peres MF, Silva VC, Valentini VC, Valentini SR, Gattás WA (2010) Recombinant expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase using the *Pichia pastoris* system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 65: 128-132
- Santiago-Hernández JA, Vásquez-Bahena JM, Calixto-Romo MA, Xoconostle-Cázares GB, Ortega-López J, Ruíz-Medrano R, Montes-Horcasitas MC, Hidalgo-Lara ME (2006) Direct immobilization of a recombinant invertase to Avicel by *E. coli* overexpression of a fusion protein containing the extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* and the carbohydrate-binding. *Enzyme Microb Technol* 40:172-176.
- Sauer M, Branduardi P, Gasser B, Valli M, Maurer M, Porro D, Mattanovich D (2004) Differential gene expression in recombinant *Pichia pastoris* analysed by heterologous DNA microarray hybridization. *Microbial Cell Factories* 3:17.
- Sears I B, Connor J, Rossanese O W & Glick B S (1998) A versatile Set of Vectors for Constitutive and Regulated Gene Expression in *Pichia pastoris*. *Yeast*. 14: 783-790.
- Seo JS, Chong H, Park HS, Yoon KO, Jung C, Kim JJ, Hong JH, Kim H, Kim JH, Kil JI, Park CJ, Oh HM, Lee JS, Jin SJ, Um HW, Lee HJ, Oh SJ, Kim JY, Kang HL, Lee SY, Lee KJ, Kang HS (2005) The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4. *Nat Biotechnol* 23:63-68.
- Segrest J, Jackson R (1972) Molecular weight determination of glycoproteins by poly-acrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. In: Ginsburg V, editor. *Methods in enzymology*. New York: Academic Pres. 28:54–63.
- Shaheen I, Bhatti HN, Ashraf T (2008) Production, purification and thermal characterization of invertase from a newly isolated *Fusarium sp.* under solid-state fermentation. *International Journal of Food Science and Technology* 43:1152-1158.

- Silva C, Silva CJ, Zille A, Gubitz GM, Cavaco-Paulo A (2007) Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6 fibres *Enzyme and Microbial Technology* 41:867-875.
- Song KB, Joo HK, Rhee SK (1993) Nucleotide sequence of levansucrase gene (*levU*) of *Zymomonas mobilis* ZM1 (ATCC10988). *Biochim Biophys Acta* 1173: 320-324.
- Song Y, Xu X y Yan Y (2005) Stability of recombinant *Zymomonas mobilis* 31821 (pZB5). *Annals of Microbiology* 55(4):261-265.
- Sreekrishna K, Tschopp JF, Fuke M (1987) Invertase gen (*SUC2*) of *Saccharomyces cerevisiae* as a dominant marker for transformation of *Pichia pastoris*. *Gene* 59:115-125.
- Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D (1989) High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28:4117–4125.
- Sreekrishna K, Brankamp RG, Kropp KE, Blankenship DT, Tsay JT, Smith PL, Wiershke JD, Subramaniam A, Bikenberg LA (1997) Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene* 190:55-62.
- Stanley WL, Watters GG, Kelly SH, Chan BG, Garibaldi JA, Schade JE (1976) Immobilization of Glucose Isomerase on Chitin with Glutaraldehyde and by Simple Adsorption. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 439-443.
- Su-Jin K, Lee JA, Kim YH, Song BK (2009) Optimization of the Functional Expression of *Coprinus cinereus* Peroxidase in *Pichia pastoris* by Varying the Host and Promoter. *J Microbiol Biotechnol* 19(9):966-971.
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:523-533.
- Tomas P, Smart TG (2005). HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51(3): 187-200.
- Trimble RB, Atkinson PH, Tschopp JF, Townsend RR, Maley F (1991) Structure of oligosaccharides on *Saccharomyces SUC2* invertase secreted by the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J Biol Chem* 266:22807–22817.
- Tripathi P, Kumari A, Rath P, Kayastha AM (2007) *J Mol Catal B: Enzyme* 49:69.
- Trivedi SM, Frondoza CG, Humphrey RL (1983) Modified Technique for Periodic Acid-Schiff Staining of Glycoproteins on Agarose-Film Electrophoretograms. *Clin Chem* 29(5): 836-839.
- Tschopp JF, Sverlow G, Kosson R, Craig W, Grinna L (1987) High-level secretion of glycosylated invertase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 5:1305–1308.
- Vallejo-Becerra V, Vásquez-Bahena JM, Santiago-Hernández JA, Hidalgo-Lara ME (2008) Immobilization of the recombinant invertase INVB from *Zymomonas mobilis* on Nylon-6. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:1289-1295.
- Van den Ende W, De Coninck B, Clerens S, Vergauwen R, Van Laere A (2003) Unexpected presence of fructan 6-exohydrolases (6-FEHs) in non-fructan plants: characterization, cloning, mass mapping and functional analysis of a novel “cell-wall invertase-like” specific 6-FEH from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) *Plant J* 36:697–710.
- Vásquez-Bahena JM, Vega-Estrada JA, Santiago-Hernández J, Ortega-López LB, Flores-Cotera LB, Montes-Horcasitas MC, Hidalgo-Lara ME (2006) Expression and improved production of the soluble extracellular invertase from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb Technol* 40:61-66.
- Vásquez-Bahena J.M. (2007) Expresión, producción, purificación y cristalización de la invertasa extracelular INVB de *Zymomonas mobilis*. Tesis de Doctorado. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México, D.F.
- Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001). Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 21(1):71-80.

- Voegelé RT, Wirsel S, Möll U, Lechner M, Mendgen K (2006) Cloning and characterization of a novel invertase from the obligate biotroph *Uromyces fabae* and analysis of expression patterns of host and pathogen invertases in the course of infection. *Mol Plant Microbe Interact* 19:625-634.
- Wang LT, Wang AY, Hsieh CW, Chen CY, Sung HY (2005) Vacuolar invertases in sweet potato: molecular cloning, characterization, and analysis of gene expression. *J Agric Food Chem* 53:3672-3678.
- Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, Lair S V & Cregg J M (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*. 186: 37-44.
- Wurm FM (2004). Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. *Nature Biotechnology* 22(11): 1393-1398.
- Xie T, Liu Q, Zhang Y (2008) Secretory Expression of Insulin Precursor in *Pichia pastoris* and Simple Procedure for Producing Recombinant Human Insulin. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 38: 308-317.
- Yanase H, Fukushi H, Ueda N, Maeda Y, Toyoda A, Tonomura K (1991) Cloning, Sequencing and Characterization of the Intracellular Invertase Gene from *Zymomonas mobilis*. *Agric. Biol. Chem* 55 (5):1383-1390.
- Yanase H, Iwata M, Kita K, Kato N, Tonomura K (1995) Purification, Crystallization, and Characterization of the Extracellular Invertase from *Zymomonas mobilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 79(4):367-369.
- Yanase H, Fujimoto J, Maeda M, Okamoto K, Kita K, Tonomura K (1998) Expression of the extracellular levansucrase and invertase genes from *Zymomonas mobilis* in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62:1802-1805.
- Yildiz H B, Kiralp S, Toppare L, Yagci Y (2005) Immobilization of Invertase in Conducting Polypyrrole PMM-co-PMTM Graft Copolymers. *Journal of Applied Polymers Science* 96:502-507.
- Zacharius RM, Zell TE, Morrison JH, Woodlock JJ (1969) Glycoprotein staining following electrophoresis on acrylamide gels. *Analyt Biochem* 30:148-152.
- Zhang M, Eddy C, Deanda K, Finkelstein M, Picataggio S (1995) Metabolic Engineering of a Pentose Metabolism Pathway in Ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science* 267:240-243.
- Zhang W, Potter KJH, Plantz BA, Schlegerl VL, Smith LA, Meagher MM (2003) *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30:210-215.
- Zhang W, Inan M, Meagher MM (2000) Fermentation Strategies for Recombinant Protein Expression in the Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 5:275-287.
- Zhang AI, Luo JX, Zhang TY, Pan YW, Tan YH, Fu CY, Tu FZ (2009) Recent advance on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Mol Biol Rep* 36:1611-1619.

11. ANEXO

11.1 Preparación de las soluciones

Amortiguador TBE (5x) (g L⁻¹)

Tris-base	54
Ácido bórico	27.5
EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mL

Amortiguador de carga

Tris 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
Glicerol absoluto	2.5 mL
SDS 10%	2 mL
Azul de bromofenol 0.5%	0.2 mL
H ₂ Od	3.55 mL

Bromuro de Etidio

Diluir 2.5 µL de bromuro de etidio en 50 mL de H₂Od.

Solucion STET (g L⁻¹)

Sacarosa	80
Tris-HCl 10 mM pH 8.0	
Tritón x-100 5 % (v/v)	
EDTA 50 mM pH 8.0	

Solución TE

EDTA 1 mM pH 8.0
Tris-HCl 10 mM pH 8.0

Solución Fenol neutro

1. Para la preparación del fenol ácido, se mezclan 500 mL de fenol fundido (en baño maría a 60 °C) con 500 mL de H₂Od, agitar y dejar reposar, toda la noche a 4 °C, separar la fase acuosa.
2. Lavar la fase fenólica con 5 o 6 volúmenes de Tris-HCl 1M pH 8.0 o hasta que el fenol ácido alcance pH 8.0.
3. Retirar la fase acuosa del último lavado y adicionar 50 mL de Tris-HCl 1M pH8.0 para estabilizar el pH.
4. Conservar a 4 °C en recipiente opaco.

Solución Fenol-CIA

Preparar mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA

Solución CIA

Preparar mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.

Solución ARNasa

1. Disolver RNasa (concentración 10 mgmL⁻¹) en solución de NaCl 15 mM y amortiguador Tris-HCl 10 mM pH 7.5.
2. Hervir la mezcla por 15 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente.
3. Repartir en alícuotas y almacenar a -20 o 4 °C.

Amortiguador de lisis (Para extracción de ADN genómico de hongos y levaduras)

Tris-HCl 200 mM
NaCl 250 mM
EDTA 25 mM
SDS 5%

Ácido dinitrosalisílico (DNS) (g L⁻¹)

NaOH	10
Fenol	2
NA ₂ SO ₃	0.5
C ₄ H ₄ Na ₂ O ₆	200
DNS	10

Reactivo utilizados para técnica de Lowry para determinación de cantidad de proteína

Reactivo A: Disolver 0.5 g de sulfato de Cobre (CuSO₄* 5H₂O) y 1 g de citrato de Sodio en 100 mL de H₂O

Reactivo B: Disolver 20 g de Na₂CO₃ y 4 g de NaOH en 1 litro de H₂O (Nota: Puede prepararse la parte proporcional a utilizar)

Reactivo C: A 50 mL del reactivo B, adicionar 1 mL de reactivo A (Nota: Este reactivo se prepara al momento de realizar la técnica)

Reactivo D: A 20 mL de reactivo Folin-Ciocalteu agregar 10 mL de H₂O (Nota: Este reactivo se prepara al momento de realizar la técnica).

Blanco: 2.5 µL de Lowry y 100 µL de H₂O

Preparación de geles de agarosa (Sambrook y Rusell 2001)

La concentración del gel de agarosa depende del tamaño de banda que se desea visualizar en los geles, conforme a las siguientes relaciones:

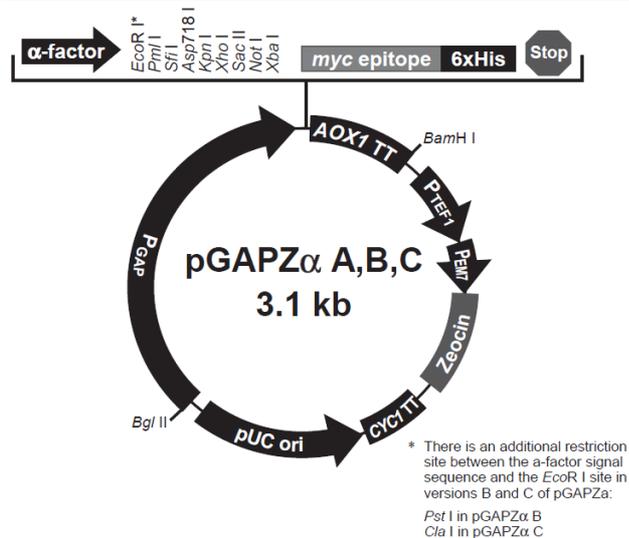
<u>Concentraciones del gel %</u>	<u>Tamaño de ADN (kb)</u>
0.50	1-30
0.75	0.8-12
1.00	0.5-10
1.25	0.4-7
1.50	0.2-3
2-5	0.01-0.5

Una vez determinada la concentración del gel se realiza el siguiente procedimiento:

1. Mezclar la cantidad de agarosa pesada con amortiguador de electroforesis.
2. Calentar la mezcla hasta ebullición (Tapar recipiente para evitar evaporación).
3. La agarosa se debe ver translúcida y se deja enfriar antes de verter.
4. Arreglar cámara y peines de electroforesis y verter la agarosa líquida.
5. Esperar hasta solidificación (Sambrook 1989).

6. Sumergir el gel solidificado en solución de TBE 1x e inyectar muestras de ADN a analizar con la siguiente mezcla: Amortiguador de carga (Ver. Soluciones) 1x, muestra problema, H₂Od.
7. Conectar la cámara con el gel de agarosa y las muestras inyectadas a cámara de electroforesis y correr el gel, recomendando una corriente de 80 volts.
8. Teñir el gel en solución de bromuro de etidio por 5 minutos.
9. Retirar la solución de bromuro y realizar dos lavados con H₂Od por 5 minutos.
10. Revelar bandas en el gel con luz UV.

11.2 Mapa y características del vector de expresión pGAPZα A, B, C (INVITROGEN)



Descripción:

3147 nucleótidos

Región del promotor GAP: 1-483 bases

Secuencia señal factor α: 493-759 bases

Sitio múltiple de clonación (MCS): 760-828 bases

Tag epítopo *myc*: 827-856 bases

Tag Polihistidinas: 872-889 bases

Región de terminación de transcripción AOX1: 893-1233 bases

Promotor TEF1: 1234-1644 bases

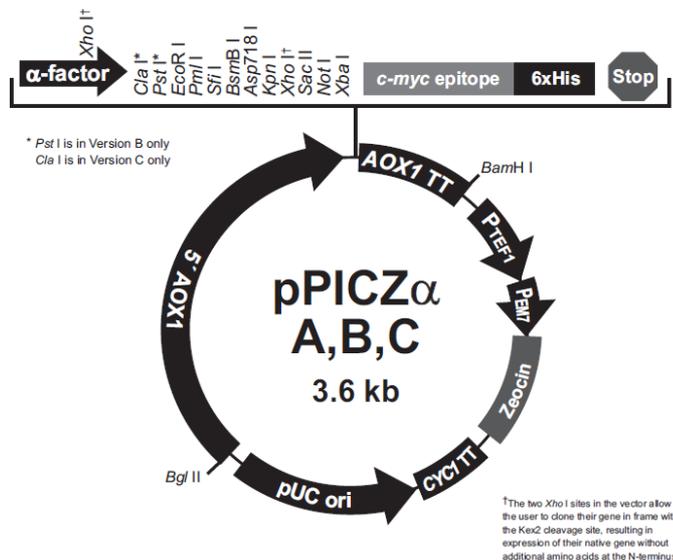
Promotor EM7: 1645-1712 bases

ORF *Sh ble*: 1713-2087 bases

Región de terminación de transcripción CYC1: 2088-2405

Origen pUC: 2416-3089

11.3 Mapa y características del vector de expresión pPICZ α A, B, C (INVITROGEN)



Descripción:

3593 nucleótidos
 Región del promotor 5'AOX2: 1-941 bases
 Sitio PRIMING 5'AOX1: 855-875 bases
 Secuencia señal factor α : 941-1207 bases
 Sitio múltiple de clonación (MCS): 1208-1276 bases
 Tag epitope *myc*: 1275-1304 bases
 Tag Polihistidinas (6xHis): 1320-1337 bases
 Región de terminación de transcripción AOX1: 1341-1682 bases
 Promotor TEF1: 1683-2093 bases
 Promotor EM7: 2095-2162 bases
 ORF *Sh ble*: 2163-2537 bases
 Región de terminación de transcripción CYC1: 2538-2855
 Origen pUC: 2866-3539 (hebra complementaria)

11.4 Enzimas

11.4.1 Endonucleasas de restricción

BglIII (de *Bacillus globigii*)
 (New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 μ g de λ ADN en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 μ L

Sitio de corte

5'-.....A↓GATCT.....-3'
 3'-.....TCTAG↑A.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE Amortiguador 3
 No requiere BSA con éste amortiguador

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: No hay especificación

BspHI (de *Bacillus species* H)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de λ ADN en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....T↓CATGA.....-3'
3'-.....AGTAC↑T.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE 4

No requiere BSA con este amortiguador.

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C.
- ◆ Temperatura de inactivación: 80 °C por 20 minutos.

EcoRI (de *E. coli* RY13)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de λ ADN en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....G↓AATTC.....-3'
3'-.....CTTAA↑G.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE EcoRI

No requiere BSA

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: 65 °C por 20 minutos.

PstI (de *Providencia stuartii* 164)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de λ ADN en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....CTGCA↓G.....-3'
3'-.....G↑ACGTC.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE Amortiguador 3

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: 80 °C por 20 minutos.

Sac I (de *Streptomyces achromogenes*)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de ADN (digestión HindIII) en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....GAGCT↓C.....-3'
3'-.....C↑TCGAG.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE Amortiguador 1 suplementado con 100 µg mL⁻¹ con BSA

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: 65 °C por 20 minutos.

Nota: SacI se inhibe por concentración de sales superiores a 10 mM. Las Minipreps que se realizan con lisis alcalina contienen residuos de sal lo cual hace resistente el rompimiento. Realizar lavado con etanol al 70% o diálisis para remover las sales.

Sac II (de *Streptomyces achromogenes*)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de Adenovirus-2 ADN en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....CCGC↓GG.....-3'
3'-.....GG↑CGCC.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE Amortiguador 4

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: 65 °C por 20 minutos.

Nota: SacII es sensible a metilaciones en citosinas en GAGmCmC e insensible a metilaciones en adenina GmAGCTC.

XbaI (de *Xanthomonas badrii*)
(New England Biolabs)

1 unidad está definida como la cantidad de enzima que se requiere para digerir 1 µg de ADN (dam^r/HindIII) en 1 hora a 37 °C en un volumen total de reacción de 50 µL

Sitio de corte

5'-.....T↓CTAGA.....-3'
3'-.....AGATC↑T.....-5'

Reacción

Amortiguador: 1xNE Amortiguador 4 suplementado con 100 µg mL⁻¹ con BSA

- ◆ Temperatura de incubación: 37 °C
- ◆ Temperatura de inactivación: 65 °C por 20 minutos.

11.4.2 Recomendaciones al utilizar endonucleasas de restricción:

- ◆ La mezcla de reacción se realiza por pipeteo y no con vortex, también se puede utilizar un “spin”.
- ◆ La doble digestión no se recomienda si se va a purificar el fragmento de interés.
- ◆ No se aconseja dejar las reacciones de doble digestión durante más de 16 horas.
- ◆ La concentración de glicerol en la reacción no debe ser superior al 5% (v/v) para evitar actividad “star”.
- ◆ El volumen de la enzima no debe superar 1/10 del volumen total de la mezcla de reacción, debido a la alta concentración de glicerol presente en las soluciones de almacenamiento de las enzimas utilizadas.
- ◆ Para ADN plasmídico super-enrollado generalmente se requiere más de 1 unidad/ μg para ser completamente cortado.
- ◆ El amortiguador de digestión normalmente se requiere en un volumen que sea la décima parte del volumen final de la mezcla debido a que el tampón se distribuye con una concentración de 10 veces más de la recomendada para su uso.
- ◆ Si el ADN está disuelto en el amortiguador es recomendable que el volumen utilizado en la mezcla no supere la décima parte del total de la reacción para evitar modificar las características del tampón de digestión (El ADN también se puede disolver en H_2O d).
- ◆ La cantidad de enzima recomendada es de 2 n unidades de enzima.
- ◆ Cuando se utiliza un amortiguador que no es el óptimo para la enzima, probablemente es necesario añadir mayor cantidad de enzima para completar la digestión.

11.4.3 T4 ADN ligasa

Definición de unidad: Una unidad está definida como la cantidad de enzima para dar 50% de ligación de fragmentos de HindIII de λ ADN (Concentración de ADN $0.12 \mu\text{M}$, $300 \mu\text{g mL}^{-1}$) en un volumen total de reacción de $20 \mu\text{L}$ en 30 minutos en amortiguador 1x T4 ADN ligasa.

- ◆ Fuente: *E. coli* C600 pc1857 pLc28 lig B
- ◆ Aplicaciones: Para clonar fragmentos de restricción. Unir “linkers” y adaptadores de extremos cohesivos de ADN.
- ◆ Calor de inactivación: $65 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos.
- ◆ Condiciones de reacción: Incubar en amortiguador 1x T4 ADN ligasa a $16 \text{ }^\circ\text{C}$.
- ◆ Concentración: $400,000$ extremos cohesivos mL^{-1}

11.4.4 ADN polimerasas

11.4.4.1 Amplificasa ADN polimerasa (BioTecMol®)

Es una ADN-Polimerasa termoestable recombinante proveniente de *Thermus aquaticus*.

Condiciones de la reacción:

20 μL reacción total con: Amortiguador 1x de PCR, $1\text{pmol}\mu\text{L}^{-1}$ de oligonucleótidos
0.2mM de dNTP
0.25 U de Amplificasa
25-100 ng ADN genómico o 1 ng de ADN plasmídico

Nota: Si la reacción de PCR no es positiva se pueden modificar dos parámetros:

- a) Temperatura de reasociación. A mayor temperatura, mayor especificidad
- b) Concentración de MgCl_2 . A menor concentración de MgCl_2 , mayor especificidad.
- c) Si el producto de PCR poco concentrado se puede incluir DMSO o formamida (3%)

11.4.4.2 *Pfu* ADN polimerasa (FERMENTAS®)

Es una ADN polimerasa proveniente de la archaia hipertermófila *Pyrococcus furiosus*. Esta enzima cataliza la polimerización de nucleótidos de ADN dúplex en dirección 5'→3'. También presenta actividad exonucleasa (proofreading) de 3'→5' lo cual le permite a la polimerasa corregir nucleótidos incorporados por error. No tiene actividad exonucleasa 5'→3'.

Ventajas:

- 8 veces más exacta que la Taq ADN polimerasa.
- Altamente termoestable. Después de 2 horas a 95 °C conserva 95% de actividad.
- Genera productos de PCR con extremos romos.
- Incorpora nucleótidos modificados (biotina, digoxigenina, nucleótidos marcados con fluorescencia)
- Su tasa de error es de 2.6×10^{-6} errores por nucleótido por ciclo, por lo tanto la exactitud de la PCR es 3.8×10^5 .
- No tiene actividad de transcriptasa reversa

Definición de actividad: Una unidad de enzima cataliza la incorporación de 10 nmol de deoxiribonucleótidos en una fracción de polinucleótido en 30 minutos a 72 °C.

Inactivación: Extracción con fenol/cloroformo.

11.5 Tabla de oligonucleótidos empleados en este trabajo

Descripción	Clave	Secuencia de 5' a 3'	Tm (°C)
Primer directo clonación ORF <i>invA</i> en pGAPZαA y utilizado para reacciones de PCR control positivo	AINVAPPD GVIII	CCG GAA TTC ATG GAA TCC CCC TCT TAT AAA AAT	74.4
Oligo reverso clonación ORF <i>invA</i> en pGAPZαA y utilizado para reacciones de PCR control positivo	AINVAPPR GVII	TTC CCG CGG ACA GGC ATC GCT TGA AAA AG	83.5
Oligo directo clonación ORF <i>invB</i> en pGAPZαA y utilizado para reacciones de PCR control positivo	AINVBPPD CVIII	CCG GAA TTC ATG TTT AAT TTT AAT GCC AGT CGC	75.5
Oligo reverso clonación ORF <i>invB</i> en pGAPZαA y utilizado para reacciones de PCR control positivo	AINVBPPR CIX	TCC CCG CGG TTT GCG ACG ATC AG	80.7
Oligo directo clonación ORF <i>invA</i> en pPICZαB y utilizado para reacciones de PCR	34	GAA CTG CAG GTG AAT CCC CCT CTT ATA AAA ATT TAA TC	73.5
Oligo reverso clonación ORF <i>invA</i> en pPICZαB y utilizado para reacciones de PCR	35	TGC TCT AGA TTA ACA GGC ATC GCT TGA AAA AGC G	77.2
Oligo directo clonación ORF <i>invB</i> en pPICZαB y utilizado para reacciones de PCR	36	GAA CTG CAG GGT TTA ATT TTA ATG CCA GTC GCT GG	78
Oligo reverso clonación ORF <i>invB</i> en pPICZαB y utilizado para reacciones de PCR	37	TGC TCT AGA TTA TTT GCG ACG ATC AGG GAA AGG CC	79.3
Oligo directo para secuenciación kit <i>Pichia</i> .	5' AOX1 66	GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC	58.1
Oligo reverso para secuenciación kit <i>Pichia</i> .	3' AOX1 38	GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC	61
Oligo directo para secuenciación kit <i>Pichia</i> .	Factor α 39	TAC TAT TGC CAG CAT TGC TGC	59.8
Oligo directo inserción genoma <i>P. pastoris</i>	ZEO 32	ATG GCC AAG TTG ACC AGT GCC GTT C	76
Oligo reverso inserción genoma <i>P. pastoris</i>	3 AOX 33	GAA TCT AGC AAG ACC GGT CTT CTC G	68.8
Oligo para secuenciación de construcciones pPICZαA- <i>invA</i> y pPICZαA- <i>invB</i>	45	GAA CAA AGC ATA GGT CTC ACC	60.2

Nota: Las en negritas que corresponden a los oligonucleótidos GVIII, GVII, CVIII y CIX corresponden a los sitios de corte EcoRI y SacII, mientras que en los oligonucleótidos 34-37 corresponden a los sitios de restricción PstI y XbaI, mientras que los codones rojos son las señales de paro de la transcripción.

11.6 Alineamiento múltiple de secuencias reportadas de invertasas intracelulares de *Z. mobilis* utilizando el programa Clustal W

```

ENA|AAA27701|AAA27701.1|ATGGAATCCCCTCTTATAAAAA|TTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA|BAA01258|BAA01258.1|ATGGAATCCCCTCTTATAAAAA|TCTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA|AAO38865|AAO38865.1|ATGGAATCCCCTCTTATAAAAA|TTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
ENA|AAV89566|AAV89566.1|ATGGAATCCCCTCTTATAAAAA|TTAATCAAAGCCGAGGATGCACAGAA
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|AAAAGCTGGAAAACGGCTTCTATCTTCTGAATGGTATCCTGGATTTCATG
ENA|BAA01258|BAA01258.1|AAAAGCTGGAAAACGGCTTGTATCTTCTGAATGGTATCCTGGATTTCATG
ENA|AAO38865|AAO38865.1|AAAAGCTGGAAAACGGCTTCTATCTTCTGAATGGTATCCTGGATTTCATG
ENA|AAV89566|AAV89566.1|AAAAGCTGGAAAACGGCTTCTATCTTCTGAATGGTATCCTGGATTTCATG
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|TAACGCCTTTAACTAGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTC
ENA|BAA01258|BAA01258.1|TAACGCCTTTAACTGGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTC
ENA|AAO38865|AAO38865.1|TAACGCCTTTAACTGGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTC
ENA|AAV89566|AAV89566.1|TAACGCCTTTAACTGGCTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTC
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|AAGGGGAATACCATCTTTTTTATCAATACTATCCTTTTGCACCTGTCTG
ENA|BAA01258|BAA01258.1|AAGGGGAATATCATCTTTTTTACCAATATATCCTTTTGCGCCCGTCTG
ENA|AAO38865|AAO38865.1|AAGGGGAATACCATCTTTTTTATCAATACTATCCTTTTGCACCTGTCTG
ENA|AAV89566|AAV89566.1|AAGGGGAATACCATCTTTTTTATCAATACTATCCTTTTGCACCTGTCTG
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|GGGGCCGATGCATTGGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGG
ENA|BAA01258|BAA01258.1|GGGGCCGATGCATTGGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGG
ENA|AAO38865|AAO38865.1|GGGGCCGATGCATTGGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGG
ENA|AAV89566|AAV89566.1|GGGGCCGATGCATTGGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGG
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|AAACACTCCCTGTTGCCCTTGCTCCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGC
ENA|BAA01258|BAA01258.1|AAACACTCCCTGTTGCCCTTGCTCCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGC
ENA|AAO38865|AAO38865.1|AAACACTCCCTGTTGCCCTTGCTCCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGC
ENA|AAV89566|AAV89566.1|AAACACTCCCTGTTGCCCTTGCTCCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGC
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|TGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAATAATGGCGTTTTGACTCTGATCTA
ENA|BAA01258|BAA01258.1|TGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAATAATGGTATTTGACTCTGATCTA
ENA|AAO38865|AAO38865.1|TGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAATAATGGCGTTTTGACTCTGATCTA
ENA|AAV89566|AAV89566.1|TGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAATAATGGCGTTTTGACTCTGATCTA
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|TACGGGGCATATCGTTTTATCTAACGATAGCCCTGATGCCATTCGTGAAG
ENA|BAA01258|BAA01258.1|TACGGGGCATATCGTTTTATCCAACGATAGCCCGATGCCATTCGTGAAG
ENA|AAO38865|AAO38865.1|TACGGGGCATATCGTTTTATCTAACGATAGCCCTGATGCCATTCGTGAAG
ENA|AAV89566|AAV89566.1|TACGGGGCATATCGTTTTATCTAACGATAGCCCTGATGCCATTCGTGAAG
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|TGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGC
ENA|BAA01258|BAA01258.1|TGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGC
ENA|AAO38865|AAO38865.1|TGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGC
ENA|AAV89566|AAV89566.1|TGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGC
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|ATCGTCCTTGAAAAAGCACCATGCCCACAGGTGCCCCATTTTCAGAGACCC
ENA|BAA01258|BAA01258.1|ATCATCCTTGAAAAACCACCATGCCCACAGGTGCCCCATTTTCAGAGACCC
ENA|AAO38865|AAO38865.1|ATCGTCCTTGAAAAAGCACCATGCCCACAGGTGCCCCATTTTCAGAGACCC
ENA|AAV89566|AAV89566.1|ATCGTCCTTGAAAAAGCACCATGCCCACAGGTGCCCCATTTTCAGAGACCC
***

ENA|AAA27701|AAA27701.1|TCGCGTTTGAAGGAGAATGACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAA
ENA|BAA01258|BAA01258.1|TCGCGTTTGAAGGAGAATGACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGGA
ENA|AAO38865|AAO38865.1|TCGCGTTTGAAGGAGAATGATCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAA
ENA|AAV89566|AAV89566.1|TCGCGTTTGAAGGAGAATAACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAA
*****

ENA|AAA27701|AAA27701.1|CAGATGATAAGAAACATCAAGGAATCGGACATGTCGCTCTATACAGAAGC
ENA|BAA01258|BAA01258.1|CAGATGATGAGAAACATCAAGGAATCGGACATGTCGCTCTATACAGAAGT
ENA|AAO38865|AAO38865.1|CAGATGATGAGAAACATCAAGGAATCGGACATGTCGCTCTATACAGAAGC

```

ENA | AAV89566 | AAV89566.1 CAGATGATGAGAAACATCAAGGAATCGGACATGTCGCTCTATACAGAAGC

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 GAAAACTCTAAAAGACTGGATTTTTGTCAAAACACTGCTGGGTGATAATTC
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 GAAAACTCTAAAAGACTGGATTTTTGTCAAAACACTGCTGGGTGATAATTC
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 GAAAACTCTAAAAGACTGGATTTTTGTCAAAACACTGCTGGGTGATAATTC
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 GAAAACTCTAAAAGACTGGATTTTTGTCAAAACACTGCTGGGTGATAATTC

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 TCAATTACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGGAATGTCCTGATTTCT
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 TCAATTACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGGAATGTCCTGATTTCT
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 TCAATTACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGGAATGTCCTGATTTCT
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 TCAATTACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGGAATGTCCTGATTTCT

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 TCTCGTTAGGCAATCGTTCGTTTTGATGTTTTCTCCACAAGGCTTGAAG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 TCTCATTAGGCAATCGTTCGTTTTGATGTTTTCTCCGCAAGGCTTGAAG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 TCTCGTTAGGCAATCGTTCGTTTTGATGTTTTCTCCACAAGGCTTGAAG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 TCTCGTTAGGCAATCGTTCGTTTTGATGTTTTCTCCACAAGGCTTGAAG

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 GCAAGCGGTTACAAAACCGGAATCTATTTCAAAACGGCTATATTCCTTGG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 GCAAGCGGTTACAAAACCGGAATCTATTTCAAAACGGCTATATTCCTTGG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 GCAAGCGGTTACAAAACCGGAATCTATTTCAAAACGGCTATATTCCTTGG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 GCAAGCGGTTACAAAACCGGAATCTATTTCAAAACGGCTATATTCCTTGG

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 AAAATGGCAAGCACCTCAATTTACGCCGAAACATCCTTCCAAGAAGCTAG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 AAAATGGCAAGCACCTCAATTTACGCCGAAACATCCTTCCAAGAAGCTAG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 AAAATGGCAAGCACCTCAATTTACGCCGAAACATCCTTCCAAGAAGCTAG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 AAAATGGCAAGCACCTCAATTTACGCCGAAACATCCTTCCAAGAAGCTAG

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 ACTATGGTCATGATTTCTATGCAGCACAAACGTTT-GAAGCTAAAAGATGG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 ACTATGGTCATGATTTCTATGCAGCACAAACGTTTGAAGACAAA-GATGG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 ACTATGGTCATGATTTCTATGCAGCACAAACGTTTGAAGCTAAA-GATGG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 ACTATGGTCATGATTTCTATGCAGCACAAACGTTTGAAGCTAAA-GATGG

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 TCGTCAAAATATTAATTGCATGGTT-GATATGTGG--AAATCAAAA-CCC
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 TCGTCAAA-TATTAATTGCATGGTTGATATGTGGGAAAATCAAAAGCCC
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 TCGTCAAA-TATTAATTGCATGGTTGATATGTGGGAAAATCAAAACCCC
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 TCGTCAAA-TATTAATTGCATGGTTGATATGTGGGAAAATCAAAACCCC

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 AGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTATGACGTTGCCCGCAAGCTTGA
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 AGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTATGACGTTGCCCGCAAGCTTGA
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 AGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTATGACGTTGCCCGCAAACTTGA
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 AGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTATGACGTTGCCCGCAAACTTGA

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 TTAAATTGATAATAAAAATTGTGATGACGCTGTAGAGAAATGGAGATTT
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 TTAAATTGATAATAAAAATTGTGATGACGCTGTAGGGAAATGGAGATTT
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 TTAAATTGATAATAAAAATTGTGATGACGCTGTAGGGAAATGGAGATTT
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 TTAAATTGATAATAAAAATTGTGATGACGCTGTAGGGAAATGGAGATTT

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 TACGACAATCGGAAAAAATTGAATCTGTGTAACGCTTTCGGATGCCGAG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 TACGGAATCGGAAAAAATTGAATCTGTGTAACGCTTTCGGATGCCGAG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 TACGACAATCGGAAAAAATTGAATCTGTGTAACGCTTTCGGATGCCGAG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 TACGACAATCGGAAAAAATTGAATCTGTGTAACGCTTTCGGATGCCGAG

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 CATCCCTTTACGATGGACTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGA
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 CATCCCTTTACGATGATTTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGA
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 CATCCCTTTACGATGGACTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGA
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 CATCCCTTTACGATGGACTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGA

 ENA | AAA27701 | AAA27701.1 CTTGGAAAAAAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATG
 ENA | BAA01258 | BAA01258.1 CTTGGAAAAAAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATG
 ENA | AAO38865 | AAO38865.1 CTTGGAAAAAAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATG
 ENA | AAV89566 | AAV89566.1 CTTGGAAAAAAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATG

ENA	AAA27701	AAA27701.1	GCAAAGGGCAAGAAACGCTTCTTTTATATCGATAGAAGCCAGAATCGTATC
ENA	BAA01258	BAA01258.1	ACAAAGGGCAAGAAACGCTTCTTTTATATCGATAGAAGCCAGAATCGTATC
ENA	AAO38865	AAO38865.1	GCAAAGGGCAAGAAACGCTTCTTTTATATCGATAGAAGCCAGAATCGTATC
ENA	AAV89566	AAV89566.1	GCAAAGGGCAAGAAACGCTTCTTTTATATCGATAGAAGCCAGAATCGTATC

ENA	AAA27701	AAA27701.1	ATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAATGTAAAAGGGATTAGAAGCTG
ENA	BAA01258	BAA01258.1	ATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAATGTAAAAGGGATTAGAAGCTG
ENA	AAO38865	AAO38865.1	ATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAATGTAAAAGGAATTAGAAGCTG
ENA	AAV89566	AAV89566.1	ATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAATGTAAAAGGAATTAGAAGCTG

ENA	AAA27701	AAA27701.1	TCCGCTTCCGAACACCTCCAAGTCAGACTGCATATATTCCTTGACCGAT
ENA	BAA01258	BAA01258.1	TCCGCTTCCGAACACCTCTAAAGTCAGACTGCATATATTCCTTGACCGAT
ENA	AAO38865	AAO38865.1	TCCGCTTCCGAACACCTCCAAGTCAGACTGCATATATTCCTTGACCGAT
ENA	AAV89566	AAV89566.1	TCCGCTTCCGAACACCTCCAAGTCAGACTGCATATATTCCTTGACCGAT

ENA	AAA27701	AAA27701.1	CATCTATAGAAATTTTGTGCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCCTCTACAGC
ENA	BAA01258	BAA01258.1	CATCTATAGAAATTTTGTGCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCCTCTACAGC
ENA	AAO38865	AAO38865.1	CATCTATAGAAATTTTGTGCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCCTCTACAGC
ENA	AAV89566	AAV89566.1	CATCTATAGAAATTTTGTGCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCCTCTACAGC

ENA	AAA27701	AAA27701.1	ATAAGTAGTCGAATATTCCTCCGATAAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATT
ENA	BAA01258	BAA01258.1	ATAAGTAGTCGAATATTCCTCCGATAAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATT
ENA	AAO38865	AAO38865.1	ATAAGTAGCCGAATATTCCTCCGATAAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATT
ENA	AAV89566	AAV89566.1	ATAAGTAGTCGAATATTCCTCCGATAAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATT

ENA	AAA27701	AAA27701.1	CGCTATCGAAGGCTATGCCGTTTTTGATTCTTTTAAAGAGATGGACATTAC
ENA	BAA01258	BAA01258.1	CGCTATCGAAGGCTATGCCGTTTTTGATTCTTTTAAAGAGATGGACATTAC
ENA	AAO38865	AAO38865.1	CGCTATCGAAGGCTATGCCGTTTTTGATTCTTTTAAAGAGATGGACATTAC
ENA	AAV89566	AAV89566.1	CGCTATCGAAGGCTATGCCGTTTTTGATTCTTTTAAAGAGATGGACATTAC

ENA	AAA27701	AAA27701.1	AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTTCAAGCGATGCCTGTAA
ENA	BAA01258	BAA01258.1	AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTTTAAGCGATGCCTGTAA
ENA	AAO38865	AAO38865.1	AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTTCAAGCGATGCCTGTAA
ENA	AAV89566	AAV89566.1	AGGATGCTAATCTAGCCGCTTTTTCAAGCGATGCCTGTAA

La parte amarilla corresponde a los nucleótidos ocupados para el diseño de oligonucleótido directo para la realización de la construcción pPICZαB-*invA*, mientras que el extremo en verde fue el empleado para la síntesis del oligonucleótido reverso para la misma construcción.

11.7 Alineamiento múltiple de algunas secuencias reportadas de invertasas extracelulares de *Z. mobilis* utilizando el programa Clustal W.

```

ENA|AAA61488|AAA61488.1|ATGTTTAATTTTAATGCCAGT|CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|BAA04476|BAA04476.1|ATGTTTAATTTTAATGCCAGT|CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAC36942|AAC36942.1|ATGTTTAATTTTAATGCCAGT|CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAG29871|AAG29871.1|ATGTTTAATTTTAATGCCAGT|CGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGT
ENA|AAV88999|AAV88999.2|-----ATGAAAGT
                                     *****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|GAATAAAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGGAATCGGCACCTGATTTTC
ENA|BAA04476|BAA04476.1|GAATAAAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGGAATCGGCACCTGATTTTC
ENA|AAC36942|AAC36942.1|GAATAAAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGGAATCGGCACCTGATTTTC
ENA|AAG29871|AAG29871.1|GAATAAAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGGAATCGGCACCTGATTTTC
ENA|AAV88999|AAV88999.2|GAATAAAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGGAATCGGCACCTGATTTTC
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|CCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGGAT
ENA|BAA04476|BAA04476.1|CTATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGGAT
ENA|AAC36942|AAC36942.1|CCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGGAT
ENA|AAG29871|AAG29871.1|CCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGGAT
ENA|AAV88999|AAV88999.2|CCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGGAT
* *****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|ATCAATGGCAATCCTGTGAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTT
ENA|BAA04476|BAA04476.1|ATCAATGGCAATCCTGTGAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTT
ENA|AAC36942|AAC36942.1|ATCAATGGCAATCCTGTGAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTT
ENA|AAG29871|AAG29871.1|ATCAATGGCAATCCTGTGAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTT
ENA|AAV88999|AAV88999.2|ATCAATGGCAATCCTGTGAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTT
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|GGTCGCTGACCGCAATATTCCTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCA
ENA|BAA04476|BAA04476.1|GGTCGCTGACCGCAATATTCCTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCA
ENA|AAC36942|AAC36942.1|GGTCGCTGACCGCAATATTCCTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCA
ENA|AAG29871|AAG29871.1|GGTCGCTGACCGCAATATTCCTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCA
ENA|AAV88999|AAV88999.2|GGTCGCTGACCGCAATATTCCTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCA
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|TCGGCTATTTCTATTCCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCAT
ENA|BAA04476|BAA04476.1|TCGGCTATTTCTATTCTAAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCAT
ENA|AAC36942|AAC36942.1|TCGGCTATTTCTATTCCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCAT
ENA|AAG29871|AAG29871.1|TCGGCTATTTCTATTCCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCAT
ENA|AAV88999|AAV88999.2|TCGGCTATTTCTATTCCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCAT
*** *****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|CTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGTCCGGCGGCAC
ENA|BAA04476|BAA04476.1|CTATTGCAAGAATCGGCCAATAGCCGCACGGCAGAATGGTCCGGCGGCAC
ENA|AAC36942|AAC36942.1|CTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGTCCGGCGGCAC
ENA|AAG29871|AAG29871.1|CTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGTCCGGCGGCAC
ENA|AAV88999|AAV88999.2|CTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGTCCGGCGGCAC
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|GATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
ENA|BAA04476|BAA04476.1|GATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
ENA|AAC36942|AAC36942.1|GATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
ENA|AAG29871|AAG29871.1|GATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
ENA|AAV88999|AAV88999.2|GATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACAGAAA
ENA|BAA04476|BAA04476.1|CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACAGAAA
ENA|AAC36942|AAC36942.1|CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACAGAAA
ENA|AAG29871|AAG29871.1|CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACAGAAA
ENA|AAV88999|AAV88999.2|CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACAGAAA
*****

ENA|AAA61488|AAA61488.1|GGCCGCATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGTACCA
ENA|BAA04476|BAA04476.1|GGCCGCATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGTACCA
ENA|AAC36942|AAC36942.1|GGCCGCATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGTACCA
ENA|AAG29871|AAG29871.1|GGCCGCATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGTACCA
ENA|AAV88999|AAV88999.2|GGCCGCATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGTACCA
*****

```

ENA	AAA61488	AAA61488.1	GTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAATTTATGCAG
ENA	BAA04476	BAA04476.1	GTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAATTTATGCAG
ENA	AAC36942	AAC36942.1	GTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAATTTATGCAG
ENA	AAG29871	AAG29871.1	GTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAATTTATGCAG
ENA	AAV88999	AAV88999.2	GTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAATTTATGCAG

ENA	AAA61488	AAA61488.1	AAAATAATCTCTGGAATTTCCGTGATCCTCATGTTTTATCAATCCTGAG
ENA	BAA04476	BAA04476.1	AAAATAATCTCTGGAATTTCCGTGATCCTCATGTTTTATCAATCCTGAG
ENA	AAC36942	AAC36942.1	AAAATAATCTCTGGAATTTCCGTGATCCTCATGTTTTATCAATCCTGAG
ENA	AAG29871	AAG29871.1	AAAATAATCTCTGGAATTTCCGTGATCCTCATGTTTTATCAATCCTGAG
ENA	AAV88999	AAV88999.2	AAAATAATCTCTGGAATTTCCGTGATCCTCATGTTTTATCAATCCTGAG

ENA	AAA61488	AAA61488.1	GATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTTCGAAGCCAATGTTGCCACTGTCCGTGG
ENA	BAA04476	BAA04476.1	GATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTTCGAAGCCAATGTTGCCACTGTCCGTGG
ENA	AAC36942	AAC36942.1	GATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTTCGAAGCCAATGTTGCCACTGTCCGTGG
ENA	AAG29871	AAG29871.1	GATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTTCGAAGCCAATGTTGCCACTGTCCGTGG
ENA	AAV88999	AAV88999.2	GATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTTCGAAGCCAATGTTGCCACTGTCCGTGG

ENA	AAA61488	AAA61488.1	AGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTTGGTCCGTGTTCCGGCCAATACGG
ENA	BAA04476	BAA04476.1	AGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTTGGTCCGTGTTCCGGCCAATACGG
ENA	AAC36942	AAC36942.1	AGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTTGGTCCGTGTTCCGGCCAATACGG
ENA	AAG29871	AAG29871.1	AGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTTGGTCCGTGTTCCGGCCAATACGG
ENA	AAV88999	AAV88999.2	AGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTTGGTCCGTGTTCCGGCCAATACGG

ENA	AAA61488	AAA61488.1	TCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTCTATTGGTATTGCGCGT
ENA	BAA04476	BAA04476.1	TCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTCTATTGGTATTGCGCGT
ENA	AAC36942	AAC36942.1	TCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTCTATTGGTATTGCGCGT
ENA	AAG29871	AAG29871.1	TCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTCTATTGGTATTGCGCGT
ENA	AAV88999	AAV88999.2	TCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTCTATTGGTATTGCGCGT

ENA	AAA61488	AAA61488.1	TGTTTGTTCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGAC
ENA	BAA04476	BAA04476.1	TGTTTGTTCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGAC
ENA	AAC36942	AAC36942.1	TGTTTGTTCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGAC
ENA	AAG29871	AAG29871.1	TGTTTGTTCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGAC
ENA	AAV88999	AAV88999.2	TGTTTGTTCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGAC

ENA	AAA61488	AAA61488.1	AGCCTTTGGTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCATTTCCAGA
ENA	BAA04476	BAA04476.1	AGCCTTTGGTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCATTTCCAGA
ENA	AAC36942	AAC36942.1	AGCCTTTGGTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCATTTCCAGA
ENA	AAG29871	AAG29871.1	AGCCTTTGGTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCATTTCCAGA
ENA	AAV88999	AAV88999.2	AGCCTTTGGTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCATTTCCAGA

ENA	AAA61488	AAA61488.1	ATGGTTTGACCTATCTCTTTACGATCAGCCATGATTTCGACTTATGCCGAT
ENA	BAA04476	BAA04476.1	ATGGTTTGACCTATCTCTTTACGATCAGCCATGATTTCGACTTATGCCGAT
ENA	AAC36942	AAC36942.1	ATGGTTTGACCTATCTCTTTACGATCAGCCATGATTTCGACTTATGCCGAT
ENA	AAG29871	AAG29871.1	ATGGTTTGACCTATCTCTTTACGATCAGCCATGATTTCGACTTATGCCGAT
ENA	AAV88999	AAV88999.2	ATGGTTTGACCTATCTCTTTACGATCAGCCATGATTTCGACTTATGCCGAT

ENA	AAA61488	AAA61488.1	GGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATGGCTTTGTTTCCGAAAATGGTAT
ENA	BAA04476	BAA04476.1	GGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATGGCTTTGTTTCCGAAAATGGTAT
ENA	AAC36942	AAC36942.1	GGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATGGCTTTGTTTCCGAAAATGGTAT
ENA	AAG29871	AAG29871.1	GGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATGGCTTTGTTTCCGAAAATGGTAT
ENA	AAV88999	AAV88999.2	GGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATGGCTTTGTTTCCGAAAATGGTAT

ENA	AAA61488	AAA61488.1	TTTTGGCCCCATAGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTGTCTCGGTGGCC
ENA	BAA04476	BAA04476.1	TTTTGGCCCCATAGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTGTCTCGGTGGCC
ENA	AAC36942	AAC36942.1	TTTTGGCCCCATAGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTGTCTCGGTGGCC
ENA	AAG29871	AAG29871.1	TTTTGGCCCCATAGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTGTCTCGGTGGCC
ENA	AAV88999	AAV88999.2	TTTTGGCCCCATAGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTGTCTCGGTGGCC

ENA	AAA61488	AAA61488.1	CCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATGGC
ENA	BAA04476	BAA04476.1	CCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATGGC
ENA	AAC36942	AAC36942.1	CCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATGGC

```

ENA | AAG29871 | AAG29871.1      CCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATGGC
ENA | AAV88999 | AAV88999.2      CTGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATGGC
* * * * *

ENA | AAA61488 | AAA61488.1      TTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATTGATCCCAAAGCGGCAAAGT
ENA | BAA04476 | BAA04476.1      TTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATTGATCCCAAAGCGGCAAAGT
ENA | AAC36942 | AAC36942.1      TTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATTGATCCCAAAGCGGCAAAGT
ENA | AAG29871 | AAG29871.1      TTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATTGATCCCAAAGCGGCAAAGT
ENA | AAV88999 | AAV88999.2      TTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATTGATCCCAAAGCGGCAAAGT
* * * * *

ENA | AAA61488 | AAA61488.1      CATTGCGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTCGCGTTGAATTACAGGGAC
ENA | BAA04476 | BAA04476.1      CATTGCGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTCGCGTTGAATTACAGGGAC
ENA | AAC36942 | AAC36942.1      CATTGCGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTCGCGTTGAATTACAGGGAC
ENA | AAG29871 | AAG29871.1      CATTGCGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTCGCGTTGAATTACAGGGAC
ENA | AAV88999 | AAV88999.2      TATTGCGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTCGCGTTGAATTACAGGGAC
* * * * *

ENA | AAA61488 | AAA61488.1      ATGAGACTTTCGCAACCGAAGTCTTTGATTATGGCTATATTCCCGCATCT
ENA | BAA04476 | BAA04476.1      ATGAGACTTTCGCGACCGAAGTCTTTGATTATGGATATATTCCCGCATCT
ENA | AAC36942 | AAC36942.1      ATGAGACTTTCGCAACCGAAGTCTTTGATTATGGCTATATTCCCGCATCT
ENA | AAG29871 | AAG29871.1      ATGAGACTTTCGCAACCGAAGTCTTTGATTATGGCTATATTCCCGCATCT
ENA | AAV88999 | AAV88999.2      ATGAGACTTTCGCGACCGAAGTCTTTGATTATGGATATATTCCCGCATCT
* * * * *

ENA | AAA61488 | AAA61488.1      TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTTCCCTGATCGTCGCAAATAA
ENA | BAA04476 | BAA04476.1      TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTTCCCGGATCGTCGCAAATAA
ENA | AAC36942 | AAC36942.1      TATGCTTGGCTCGGTATGGC-TTTCCTGATCGTCGCAAATAA
ENA | AAG29871 | AAG29871.1      TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTTCCCTGATCGTCGCAAATAA
ENA | AAV88999 | AAV88999.2      TATGCTTGGC-CGGTATGGCCTTTCCCTGATCGTCGCAAATAA
* * * * *

```

La parte amarilla corresponde a los nucleótidos ocupados para el diseño de oligonucléotido directo para la realización de la construcción pPICZαB-*invA*, mientras que el extremo en verde fue el empleado para la síntesis del oligonucléotido reverso para la misma construcción.

11.8 Alineamiento de la secuencia de *invA* de *Z. mobilis* cepa CDBB-B603 con el gen *sacA* de *Z. mobilis* ZM1 reportado por Gunasekaran et al. 1990 utilizando el programa BLAST.

Z.mobilis sacA gene, complete cds

Sequence ID: [gb|M62718.1|ZMOSACA](#) Length: 2093 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2584 bits(1399)	0.0	1459/1483(98%)	23/1483(1%)	Plus/Plus	
Query 7	GCCGAGGATGCACAGAAAAAGCTGGAAAACGGCTTCTATCTTCTGAATGGTATCCTGGA	66			
Sbjct 126	GCCGAGGATGCACAGAAAAAGCTGGAAAACGGCTTCTATCTTCTGAATGGTATCCTGGA	185			
Query 67	TTTCATGTAACGCCTTTAACTGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTCAAG	126			
Sbjct 186	TTTCATGTAACGCCTTTAACTAGTTGGATGAATGACCCCAACGGGCTGATTTTTTTCAAG	245			
Query 127	GGGAATACCATCTTTTTTATCAATACTATCCTTTTGCACCTGTCTGGGGCCGATGCAT	186			
Sbjct 246	GGGAATACCATCTTTTTTATCAATACTATCCTTTTGCACCTGTCTGGGGCCGATGCAT	305			
Query 187	TGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGGAAACACTCCCTGTTGCCCTTGCT	246			
Sbjct 306	TGGGACATGCGAAAAGCCGTGATTTAGTTCATTGGGAAACACTCCCTGTTGCCCTTGCT	365			
Query 247	CCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGCTGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAAATAATGGC	306			
Sbjct 366	CCAGGGGATTCATTTGATCGCGACGGCTGTTTCTCAGGATGCGCTGTTGATAAATAATGGC	425			
Query 307	GTTTTGACTCTGATCTATACGGGCATATCGTTTTTATCTAACGATAGCCCTGATGCCATT	366			
Sbjct 426	GTTTTGACTCTGATCTATACGGGCATATCGTTTTTATCTAACGATAGCCCTGATGCCATT	485			
Query 367	CGTGAAGTGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGCATC	426			
Sbjct 486	CGTGAAGTGCAGTGTATGGCGACAAGCATAGACGGCATCCATTTTCAAAAAGAAGGCATC	545			
Query 427	GTCCTTGAAAAAGCACCCATGCCACAGGTCGCCCATTTTCAGAGACCCTCGGTTTGGAAAG	486			
Sbjct 546	GTCCTTGAAAAAGCACCCATGCCACAGGTCGCCCATTTTCAGAGACCCTCGGTTTGGAAAG	605			
Query 487	GAGAATGACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAACAGATGATAAGAAACATCAAGGA	546			
Sbjct 606	GAGAATGACCACTGGTTTATGGTGGTGGGCTATCGAACAGATGATAAGAAACATCAAGGA	665			
Query 547	ATCGGACATGTGCGCTCTATAACAGAAAGCGAAAAATCTAAAAAGACTGGATTTTTGTCA	606			
Sbjct 666	ATCGGACATGTGCGCTCTATAACAGAAAGCGAAAAATCTAAAAAGACTGGATTTTTGTCA	720			
Query 607	AAACACTGGCTGGGTGATAAATCTCAATTACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGG	666			
Sbjct 721	AAACACTG-CTGGGTGATAA-TCTCAATT-ACCGCTGGGAAAACGGGCTTTTATGTGGG	777			
Query 667	AATGTCCTGATTTCTTTCTCGTTAGGCAATCGTTCGTTTGGATGTTTCTCCACAAGG	726			
Sbjct 778	AATGTCCTGATTTCTTTCTCGTTAGGCAATCGTTCGTTTGGATGTTTCTCCACAAGG	835			
Query 727	CTTGAAGCAAGCGGTTACAAAAACCGGAATCTATTTCAAACGGCTATATTC-TGGAAA	785			
Sbjct 836	CTTGAAGCAAGCGGTTACAAAAACCGGAATCTATTTCAAACGGCTATATTC-TGGAAA	895			
Query 786	ATGGCAAGCACCTTCAATTTACTGCCGAAACATCCTTCCAAGAAACTAGACTATGGTCA	845			
Sbjct 896	ATGGCAAGCACCT-CAATTTAC-GCCGAAACATCCTTCCAAG-AACTAGACTATGGTCA	952			
Query 846	TGATTTCTATGCAGCACAACGTTTTGAAAGCT-AAAGATGGTCGTC-AAATATTAATTGC	903			
Sbjct 953	TGATTTCTATGCAGCACAACGTTT-GAA-GCTAAAAGATGGTCGTCAAAATATTAATTGC	1010			
Query 904	ATGGTTTGATATGTGGGAAATCAAAAACCCAGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTAT	963			

```

Sbjct 1011 ATGGTT-GATATGTGG-AAA-TC-AAAACCCAGCCAACGAGATGGATGGGCTGGCTGTAT 1066
Query 964 GACGTTGCCCCGCAAGCTTGATTTAATTGATAATAAAATTGTGATGACGCCTGTTAGAGA 1023
      |||
Sbjct 1067 GACGTTGCCCCGCAAGCTTGATTTAATTGATAATAAAATTGTGATGACGCCTGTTAGAGA 1126
Query 1024 AATGGAGATTTTACGACAATCGGAAAAAATTGAATCTGTCGTAACGCTTTCGGATGCCGA 1083
      |||
Sbjct 1127 AATGGAGATTTTACGACAATCGGAAAAAATTGAATCTGTCGTAACGCTTTCGGATGCCGA 1186
Query 1084 GCATCCCTTTACGATGGACTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGACTTGGAAAA 1143
      |||
Sbjct 1187 GCATCCCTTTACGATGGACTCTCCCCTGCAAGAAATAGAGCTGATCTTTGACTTGGAAAA 1246
Query 1144 AAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATGGCAAAGGGCAAGAAACGCT 1203
      |||
Sbjct 1247 AAGCAATGCTTATCAAGCTGGTTTGGCTTTGCGCTGTAATGGCAAAGGGCAAGAAACGCT 1306
Query 1204 TCTTTATATCGATAGAAAGCCAGAATCGTATCATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAA 1263
      |||
Sbjct 1307 TCTTTATATCGATAGAAAGCCAGAATCGTATCATTCTTGACCGAAATCGCTCGGGGCAAAA 1366
Query 1264 TGTAAAAGGGATTAGAAAGCTGTCCGCTTCCGAACACCTCCAAAGTCAGACTGCATATATT 1323
      |||
Sbjct 1367 TGTAAAAGGGATTAGAAAGCTGTCCGCTTCCGAACACCTCCAAAGTCAGACTGCATATATT 1426
Query 1324 CCTTGACCGATCATCTATAGAAATTTTGTTCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCTCTACAG 1383
      |||
Sbjct 1427 CCTTGACCGATCATCTATAGAAATTTTGTTCGGCGATGATCAGACCCAAGGCCTCTACAG 1486
Query 1384 CATAAGTAGTCGAATATTCCCCGATAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATTCGCTATCGA 1443
      |||
Sbjct 1487 CATAAGTAGTCGAATATTCCCCGATAAGGACAGCCTTAAAGGCCGTTTATTCGCTATCGA 1546
Query 1444 AGGCTATGCCGTTTTTGGATTCTTTAAGAGATGGACAT-ACAG 1485
      |||
Sbjct 1547 AGGCTATGCCGTTTTTGGATTCTTTAAGAGATGGACATACAG 1589

```

Las bases en subrayadas en amarillo corresponden a las diferencias observadas entre la secuencia del gen *invA* y el gen *sacA* de diferentes cepas de *Z. mobilis*.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_155615

11.9 Alineamiento de la secuencia de *invB* de *Z. mobilis* cepa CDBB-B603 con el gen *sacC* de *Z. mobilis* ZM1 reportado por Kannan *et al.* 1995 utilizando el programa BLAST.

Zymomonas mobilis extracellular sucrase (*sacC*) gene, complete cds

Sequence ID: [gb|L33403.1|ZMOSACC](#) Length: 1641 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
2137 bits(1157)	0.0	1182/1193(99%)	6/1193(0%)	Plus/Plus	
Query 11	GCGAGTCACATGCGATGCAGGTGAATAAAATTGATTGACGACCTCTATGCCGGAAATCG				70
Sbjct 227	GCGAG-CCCAAGCGATGAAAAGTGAATAAAATTGATTGACGACCTCTATGCCGGAAATCG				285
Query 71	GCACTGATTTTCCCATTTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGG				130
Sbjct 286	GCACTGATTTTCCCATTTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTTGGCCATTACGGG				345
Query 131	ATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTTGGTCGCTG				190
Sbjct 346	ATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTTCTCTTTGGTCGCTG				405
Query 191	ACCGCAATATTCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGCTATTCTATTCCA				250
Sbjct 406	ACCGCAATATTCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGCCTATTCTATTCCA				465
Query 251	AAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCA				310
Sbjct 466	AAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCA				525
Query 311	CGGCAGAATGGTCCGGCGGCACGATTATGGCACCGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCT				370
Sbjct 526	CGGCAGAATGGTCCGGCGGCACGATTATGGCACCGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCT				585
Query 371	TCTTTACCTCGACTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTGCTGCTGCACGA				430
Sbjct 586	TCTTTACCTCGACTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTGCTGCTGCACGA				645
Query 431	AAGGCCGATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGACCAGTCAACGG				490
Sbjct 646	AAGGCCGATTTATGCGGATAGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTGACCAGTCAACGG				705
Query 491	ATTTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAAATTATGCAGAAAATAATCTCTGGAATT				550
Sbjct 706	ATTTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTATCAAAATTATGCAGAAAATAATCTCTGGAATT				765
Query 551	TCCGTGATCCTCATGTTTTTCATCAATCCTGAGGATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTGAAG				610
Sbjct 766	TCCGTGATCCTCATGTTTTTCATCAATCCTGAGGATGGTGAGACCTATGCTTTGTTTGAAG				825
Query 611	CCAATGTTGCCACTGTCCGTGGAGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTGGTCTGTTC				670
Sbjct 826	CCAATGTTGCCACTGTCCGTGGAGAAGACGATATAGGCGAGGATGAAATTGGTCTGTTC				885
Query 671	CGGCCAATACGGTCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTATTGGTATTGCGC				730
Sbjct 886	CGGCCAATACGGTCGTTCCAAAAGATGCCAATTTATGCTCGGCCCTATTGGTATTGCGC				945
Query 731	GTTGTTTGTGCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGACAGCCTTTG				790
Sbjct 946	GTTGTTTGTGCGCGGATCGCACCGAATGGGAGCTGTTACCGCCTTTGTTGACAGCCTTTG				1005
Query 791	GTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCAATTTCCAGAATGGTTTGACCTATCTCT				850
Sbjct 1006	GTGTCAATGACCAGATGGAACGGCCTCATGTCAATTTCCAGAATGGTTTGACCTATCTCT				1065
Query 851	TTACGATCAGCCATGATTCGACTTATGCCGATGGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATG				910
Sbjct 1066	TTACGATCAGCCATGATTCGACTTATGCCGATGGCTTAACCGGTTCCGATGGTCTTTATG				1125

```

Query 911 GCTTTGTTTCCGAAAAATGGTATTTTTGGCCCTATGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTG 970
          |||
Sbjct 1126 GCTTTGTTTCCGAAAAATGGTATTTTTGGCCCTATGAGCCGCTGAATGGTTCTGGCCTTG 1185

Query 971 TTCTCGGTGGCCCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAATG 1030
          |||
Sbjct 1186 TTCTCGGTGGCCCGCGTCACAGCCGACCGAAGCCTATGCTCATTACATCATGAATAAT- 1244

Query 1031 GGCTTGGTTGAATCTTTTATCAATGAAATCATGATCCCAAAGCGGCAAAGTCATTG 1090
          |||
Sbjct 1245 GGCTTGGTTGAATC-TTTTATCAATGAAATCATGATCCCAAAGC-GGCAAAGTCATTG 1302

Query 1091 CGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTGCGCTTGAATTACAGGGACATGAGACTTTCGCAA 1150
          |||
Sbjct 1303 CGGGCGGTAGCTTGGCACCGACGGTTGCGCTTGAATTACAGGGACATGAGACTTTCGCAA 1362

Query 1151 CCGAAGTCTTTGATTATGGCTATATTCCCGCATCTTATGCTGGC-CGGTATG 1201
          |||
Sbjct 1363 CCGAAGTCTTTGATTATGGCTATATTCCCGCATCTTATGCTTGGCTCGGTATG 1415

```

Las bases en subrayadas en amarillo corresponden a las diferencias observadas entre la secuencia del gen *invB* y el gen *sacC* de diferentes cepas de *Z. mobilis*.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#alnHdr_495675

11.10 Resultados de la secuenciación del MCS de la construcción pPICZαB-*invA*

```

ATAATGCAAAAAAFGATCCCCTGGGAATTTCCGGGATCCTACAGGTCTATCCCTCAATCCCTGAAGATG
GATGAGACATTTGGTTTTGTTCAAAAACCAAAGGTTGCACCTGTCCCAGTGAAAAAAGAATAAAGCA
AGGATAATATGTGCCACTGTCCAGCCAGACNTCATA TGATCAGCGAGTCACATGCGATGCAGGTGAAT
AAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGAAATCGGC ACTGATTTTCCCATTATGCGTGATGACTTGTGGC
TGTGGGATACTTGGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTT
TCTCTTTGGTCGCTGACCGCAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCGCATCGGCTATTTCTA
TTCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGG
CAGAATGGTCCGGCGGCACGATTATGGCACCGGGTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACGAAAGGCCGATTATGCGGAT
AGTGAAGGCGTTTGGTTCAAGGGTTTTGACCAGTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTAT
CGGCGGCCGCGCAGCTTTCTA GAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCAT
CATCATCATCATCATGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCCCTCAGTTCAAGTTGGGCACTACGAGA
AGACCGGTCTGCTAGATTTAACGTAG
NNNTAAGACAAATTTCCCGTACGATTCTACGACACTTGAGAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAAC
GATGAGATTTCTTCAACTTTTTACTGCTGTTTTATTTCGAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAAC
ACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGG
GGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTCCAACAGCACACATAACGGGTTATTGTTATAAATACTACTA
TTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCaTCGATGAAT
TCATGTTTAAATTTAATGCCAGTCGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAGTGAATAAATTTGATTTGA
CGACCTCTATGCCGAAATCGGC ACTGATTTTCCCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTT
GGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTTAAAGGCTGGAATGTTATTTCTTTGGTCCG
TGACCGCAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCGCATCGGCTATTTCTATTCCAAAGATGGT
AAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATCGCAAGAATCGGCCAATAACCCGCACGGCAGAATGGGTCCG
GCGGCACGATTATGGCACCGGGTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGACTTTATTCGAT
CAAGAATGGCGTCAGAAAAACCCGTTGCTGCTGTACGAAATGGCCGATTTTTCGGATAGCTGAAGG
CGTTTGGGTCCAAGGGTTTTGTACCAGTACCAGGATATCGTTTCAGGCTGATGGGCTGTTTCAACACAA

```

atgagattccttcaatcctttactgctgttttattcgcagcatcctccgcattagctgcc
 M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A
 ccagtcaactacaacagaagatgaaacggcacaaattccggctgaagctgtcatcggg
 P V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G
 tactcagatttagaaggggatttcgatggttgctgttttgccattttccaacagcacaat
 Y S D L E G D F D V A V L P F S N S T N
 aacgggttattgtttataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggta
 N G L L F I N T T I A S I A A K E E G V
 tctctcgagaagagagaggctgaagcatcgat
 S L E K R E A E A S

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EDV11040.1	mating factor alpha-1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a]	140	140	98%	1e-40	97%

```

VIRT5148      MESPSYKNLIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      MESPSYKNLIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  MESPSYKNLIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFF
*****

VIRT5148      KGEYHLFYQYYPFAPVWVGMHWHGAKSRDLVHWETLPVALAPGDSFDRDG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      KGEYHLFYQYYPFAPVWVGMHWHGAKSRDLVHWETLPVALAPGDSFDRDG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  KGEYHLFYQYYPFAPVWVGMHWHGAKSRDLVHWETLPVALAPGDSFDRDG
*****

VIRT5148      CFSGCAVDNIGVLTLLIYTGHI VLSNDS PDAIREVQCMATSIDGIFHQKEG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      CFSGCAVDNNGVLTLLIYTGHI VLSNDS PDAIREVQCMATSIDGIFHQKEG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  CFSGCAVDNNGVLTLLIYTGHI VLSNDS PDAIREVQCMATSIDGIFHQKEG
*****

VIRT5148      IVLEKAMPQVAHFRDPRVWKENDHWFMVVGYRTDDKKHQGIGHVALYRT
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      IVLEKAMPQVAHFRDPRVWKENDHWFMVVGYRTDDKKHQGIGHVALYRS
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  IVLEKAMPQVAHFRDPRVWKENDHWFMVVGYRTDDEKHQGIGHVALYRS
*****:*****

VIRT5148      ENLKDWFVLTLLGDNSQLPLGKVLFRSSRPVFFSLGNSVLMFSPQGLK
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      ENLKDWFVLTLLGDNSQLPLGKRAFMECPDFFSLGNSVLMFSPQGLK
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  ENLKDWFVLTLLGDNSQLPLGKRAFMECPDFFSLGNSVLMFSPQGLK
*****.:*****

VIRT5148      ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPE TSPQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPE TSPQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  ASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPE TSPQELDYGHDFYAAQRFEAKDG
*****

VIRT5042      RQSEKIESVVTLSDAHPFTMDSPLQEI ELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      RQSEKIESVVTLSDAHPFTMDSPLQEI ELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
sp|P0DJA7|SCR_ZYMMA      RQSEKIESVVTLSDAHPFTMDSPLQEI ELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  RQSEKIESVVTLSDAHPFTMDSPLQEI ELIFDLEKSNAYQAGLALRCNG
*****

VIRT5042      KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
sp|P0DJA7|SCR_ZYMMA      KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  KGQETLLYIDRSQNR IILDRNRSGQNVKGI RSCPLPNTSKVRLHIFLDRS
*****

VIRT5042      SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRI FPKDLSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRI FPKDLSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
sp|P0DJA7|SCR_ZYMMA      SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRI FPKDLSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  SIEIFVGDDQTQGLYSIS SRI FPKDLSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQ
*****

VIRT5042      DANLAAFSSDAC
sp|F8DVG5|SCR_ZYMMA      DANLAAFSSDAC
sp|P0DJA7|SCR_ZYMMA      DANLAAFSSDAC
tr|C8WB21|C8WB21_ZYMMN  DANLAAFSSDAC
*****:

```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AAO38865.1	invertase A [Zymomonas mobilis]	417	417	60%	1e-139	95%
YP_162677.1	unnamed protein product [Zymomonas mobilis subsp. mobilis ZM4] Full=Sucrose-6-phosphate hydrolase	417	417	60%	1e-139	95%
ADG85673.1	InvA [synthetic construct]	417	417	60%	2e-139	95%
AAA27701.1	sacA [Zymomonas mobilis]	416	416	60%	4e-139	95%

11.11 Resultados de la secuenciación del MCS de la construcción pPICZαB-*invB*

ATAATGCAAAAAAFGATCCCCTGGGAATTTCCGGGATCCTACAGGTCTATCCCTCAATCCCTGAAGATG
 GATGAGACATTTGGTTTTGTCAAAAACCAAAGTTGCACCTGTCCCAGTGAAAAAAGAAATAAAGCA
 AGGATAATATGTGCCACTGTCCAGCCAGACNTCATATGATCAGCGAGTCACATGCGATGCAGGTGAAT
 AAATTTGATTTGACGACCTCTATGCCGAAATCGGCACTGATTTTCCCATTATGCGTGATGACTTGTGGC
 TGTGGGATACTTGGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTAAAGGCTGGAATGTTATTT
 TCTCTTTGGTCGCTGACCGAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGGCTATTTCTA
 TTCAAAGATGGTAAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATTGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGG
 CAGAATGGTCCGGCGGCACGATTATGGCACGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGA
 CTTTATTCGACAAGAATGGCGTCAGAGAAGCCGTTGCTGCTGTACGAAAGGCCGATTATGCGGAT
 AGTGAAGGCGTTGGTTCAAGGGTTTTGACCAGTCAACGGATTGTTTCAGGCTGATGGTCTGTTTTAT
 CGGCGGCGCCAGCTTTCTA GAACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCAT
 CATCATCATCATCAT TGAGTTTGTAGCCTTAGACATGACTGTTCTCAGTTC AAGTTGGGCACTACGAGA
 AGACCGGTCTGCTAGATTTAACGTAG
 NNNTAAGACAAATTTCCCGTACGATTCTACGACACTTGAGAGATCAAAAAACAATAATTATTCGAAAC
 GATGAGATTTCTTCAACTTTTTACTGCTGTTTTATTGCGCAGCATCCTCCGATTAGCTGCTCCAGTCAAC
 ACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCGGCTGAAGCTGTATCGGTTACTCAGATTTAGAAGG
 GGATTTGATGTTGCTGTTTTGCCATTTCCAACAGCACACATAACGGGTATTGTTTATAAATACTACTA
 TTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAGAGAGAGGCTGAAGCaTCGATGAAT
 TGATGTTTAATTTAATGCCAGTCGCTGGACGCGAGCCCAAGCGATGAAAAGTGAATAAATTTGATTTGA
 CGACCTCTATGCCGAAATCGGCACTGATTTTCCCATTATGCGTGATGACTTGTGGCTGTGGGATACTT
 GGCCATTACGGGATATCAATGGCAATCCTGTCAGCTTAAAGGCTGGAATGTTATTTCTTTGGTCGC
 TGACCGCAATATCCGTGGAATGATCGCCATTCTCATGCCCGCATCGGCTATTTCTATTCCAAGATGGT
 AAAAGCTGGGTTTATGGTGGCCATCTATCGCAAGAATCGGCCAATACCCGCACGGCAGAATGGGTCCG
 GCGGCACGATTATGGCACCCGGGTTCCCGTAATCAGGTCGAAACCTTCTTTACCTCGACTTTATTCGAT
 CAAGAATGGCGTCAGAAAAACCCGTTGCTGCTGTACGAAATGGCCGATTTTTCGGATAGCTGAAGG
 CGTTTGGGTCCAAAGGGTTTTGTACAGTACCGAATATCGTTTCAGGCTGATGGGCTGTTTCAACACAA
 atgagatttccttcaactttttactgctgTTTTtattcgcagcatcctccgcattagctgc
 M R F P S T F Y C C F I R S I L R I S C
 tccagtcaacactacaacagaagatgaaacggcacaatcctccgctgaagctgtcatcgg
 S S Q H Y N R R E N G T N S G A S C H R
 ttactcagatttagaaggggatttcgatgTTTgctgTTTTgccattttccaacagcaca
 L L R F R R G F R C C C F A I F Q Q H T
 taacgggttattgTTTTataaataactactattgccagcattgctgctaaagaagaaggggt
 N R V I V Y K Y Y Y C Q H C C E R R R G
 atctctcagag aag agagaggctgaa gca tcat
 I S R K E R G L A I D

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
EDV11040.1	mating factor alpha-1 precursor [Saccharomyces cerevisiae RM11-1a] >gb E09089.1 Mf(alpha)1p [Saccharomyces cerevisiae JAY291]	130	130	75%	2e-36	98%

```

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
MFNFNASMISESHAMQVNKFDLTTSMPEIGTDFFIMRDDLWLWDTWPLRDLINGNPVSFKG
MFNFNASRWTRAQAMKVNKFDLTTSMPEIGTDFFIMRDDLWLWDTWPLRDLINGNPVSFKG
MFNFNASRWTRAQAMKVNKFDLTTSMPEIGTDFFIMRDDLWLWDTWPLRDLINGNPVSFKG
*****:.:*:*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
WNVIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGHLLQESANTRTAEWSSGGTIMA
WNVIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGHLLQESANTRTAEWSSGGTIMA
WNVIFSLVADRNI PWNDRHS HARIGYFYSKDGKSWVYGHLLQESANTRTAEWSSGGTIMA
*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGR IYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGR IYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
PGSRNQVETFFTSTLFDKNGVREAVA AVTKGR IYADSEGVWFKGFDQSTDLFQADGLFYQ
*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGE DDI GE DE I GPV PANTVV PKDAN
NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGE DDI GE DE I GPV PANTVV PKDAN
NYAENNLWNFRDPHFVFNPE DGETYALFEANVATVRGE DDI GE DE I GPV PANTVV PKDAN
*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
LCSAS IGIARCLSPDRTEWELLPPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLYLFTI SHDSTYAD
LCSAS IGIARCLSPDRTEWELLPPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLYLFTI SHDSTYAD
LCSAS IGIARCLSPDRTEWELLPPLLTAFGVNDQMERPHVI FQNGLYLFTI SHDSTYAD
*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEPLNGSGLV LGGPASQPTEA YAHYIMNGLVESFINE II
GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEPLNGSGLV LGGPASQPTEA YAHYIMNGLVESFINE II
GLTGS DGLYGFVSENGI FGPYEPLNGSGLV LGGPASQPTEA YAHYIMNGLVESFINE II
*****

VIRT551
sp|P0DJA4|INVB_ZYMMO
sp|F8DT27|INVB_ZYMMA
DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAW PVW PFPDRRK
DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAW PVW PFPDRRK
DPKSGKVIAGGSLA PTVRVELQGHET FATEVFDYGYIPASYAW PVW PFPDRRK
*****

```

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AAC36942.1	extracellular sucrase [Zymomonas mobilis]	783	783	98%	0.0	96%
BAA04476.1	invertase [Zymomonas mobilis] >prf 2107190B invertase	782	782	98%	0.0	95%
2019242A	extracellular sucrase	771	771	98%	0.0	95%

11.12 Conservación de células de bacteria

1. Crecer células de bacteria hasta fase exponencial.
2. Tomar alícuotas de 875 µL de células y adicionar 125 µL de Glicerol al 80%, de manera que la concentración final de glicerol sea al 10%.
3. Guardar a -20 o -70 °C.