

**Centro de Investigación y Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional**

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería  
Unidad Zacatenco

**Purificación y caracterización bioquímica de la  $\beta$ -manosidasa de  
*Cellulomonas uda* expresada en *Escherichia coli*. Obtención de  
la construcción pGAPZ $\alpha$ B-*manA*.**

Tesis que presenta:

Isaac Soto Vázquez

Para obtener el grado de:  
Maestría en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Directora de tesis:  
Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

México, D.F. Diciembre de 2015

# Comité tutorial

Directora

Dra. María Eugenia Hidalgo Lara DBB-Cinvestav

Asesores:

Dr. Rodolfo Marsch Moreno DBB-Cinvestav

Dr. Jorge Campos Contreras FES Iztacala-UNAM

Dr. Ismael Bustos Jaimes FM-UNAM

Dra. Patricia Pavón Orozco FQ-UV

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme otorgado la beca para realizar mis estudios de maestría con número de registro 275621.**

## Agradecimientos

A mis Leopoldo Soto Hernández y María Eugenia Vázquez Montiel por siempre apoyarme incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado en mi desarrollo profesional y personal.

A mis hermanos que siempre han estado presentes en los momentos más difíciles de mi vida a pesar de todas las desavenencias que hemos tenido.

A mi familia Vázquez Hernández que me adoptaron y me trataron como si fuese un integrante más en su núcleo familiar. Se los agradezco eternamente.

A la Dra. María Eugenia Hidalgo Lara por su infinita paciencia y todo el apoyo otorgado durante mi estancia en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio: Yolandita, Johansito, Teresita, Marinita, Maribelita, Claudita y Alejandrino por hacerme más fácil la existencia en los momentos más frustrantes.

A Gonzalo y a Omar por su apoyo incondicional y a Janette que la quiero mucho.

Y a todos los que les debo de agradecer y no contemplé en esta sección.

## Índice

Purificación y caracterización bioquímica de la $\beta$ -manosidasa de <i>Cellulomonas uda</i> expresada en <i>Escherichia coli</i> . Obtención de la construcción pGAPZ $\alpha$ B- <i>manA</i> .....	1
Índice de tablas .....	8
Resumen .....	11
Introducción .....	14
1.1 Biomasa lignocelulósica.....	14
1.2 Mananos.....	15
1.3 Degradación de los mananos.....	18
1.4 Aplicaciones de las manosidasas.....	20
1.5 <i>Cellulomonas uda</i> .....	21
1.6 Sistemas para expresión de proteínas recombinantes .....	21
1.7 Optimización de codones.....	22
Antecedentes directos.....	25
Planteamiento del problema .....	31
3.1. Justificación.....	31
3.2. Hipótesis.....	31
3.3. Objetivos.....	31
3.3.1. Objetivo general.....	31
3.3.2 Objetivos específicos .....	31
3.2. Estrategia experimental .....	32
Materiales y métodos .....	34
4.1 Materiales.....	34
4.1.1. Microorganismos.....	34
4.1.2. Oligonucleótidos utilizados.....	34
4.1.3. Vector de expresión.....	34
4.2. Métodos.....	40
4.2.1. Cultivo de <i>E. coli</i> .....	40
4.2.2. Cultivo de <i>C. uda</i> .....	40
4.2.3. Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .....	40
4.2.3. Extracción de DNA genómico de <i>C. uda</i> .....	42
4.2.3. Purificación y caracterización bioquímica de la $\beta$ -manosidasa expresada en <i>E. coli</i> .....	43
4.2.4. Amplificación por PCR a partir de DNA genómico de <i>C. uda</i> .....	45

4.2.5. PCR a partir de DNA plasmídico .....	45
4.2.6. Purificación de DNA a partir de agarosa de bajo punto de fusión .....	46
4.2.7. Ligación en el vector pJETt1.2 .....	46
4.2.8. Preparación de células competentes .....	47
4.2.9. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ por choque térmico.....	48
4.2.10. Transformación de células competentes <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ por electroporación. ....	48
4.2.11. Expresión de la $\beta$ -manosidasa en <i>P. pastoris</i> .....	50
Resultados .....	53
5.1. Purificación y caracterización de la $\beta$ -manosidasa de <i>Cellulomonas uda</i> expresada en <i>E. coli</i> .....	53
5.1.1 Expresión y purificación de la $\beta$ -manosidasa de <i>C. uda</i> expresada en <i>E. coli</i> . ....	53
5.1.2. Caracterización bioquímica de la $\beta$ -manosidasa recombinante.....	57
5.2 Expresión del gen de la $\beta$ -manosidasa de <i>C. uda</i> en <i>P. pastoris</i> .....	66
5.2.1 Extracción de DNA genómico de <i>C. uda</i> . ....	66
5.2.2. PCR a partir de DNA genómico.....	67
5.2.3 Construcción pGAPzaB- <i>manA</i> .....	70
5.2.4 Transformación de <i>P. pastoris</i> .....	77
Conclusiones .....	80
Perspectivas del proyecto .....	81
Bibliografía .....	83
Apéndice .....	87
9.1 Medios de cultivo.....	87
9.1.1. Medio LB .....	87
9.1.2. Medio LB bajo en sales.....	87
9.1.3. Medio 2TY.....	88
9.1.4. Medio SOC .....	88
9.1.5. Medio YPD.....	89
9.1.6. Medio YPDS con Zeocina y agar .....	89
9.2 Amortiguadores .....	90
9.2.1. Solución de lisis alcalina I.....	90
9.2.2. Solución de lisis alcalina II .....	90
9.2.3. Solución de lisis alcalina III .....	90
9.2.4. Amortiguador STE .....	91
9.2.5. Amortiguador TE.....	91

9.2.6. Amortiguador de lisis.....	91
9.2.7 Amortiguador A .....	91
9.2.6. Amortiguador B .....	92

## Índice de tablas

Tabla 1. Enzimas del complejo enzimático para la degradación de las mananas.....	18
Tabla 2. Preferencia de codones por <i>Pichia pastoris</i> (GenScript).....	22
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados por Pavón (2007) y Alarcón (2009) .....	25
Tabla 4. Valores de pH óptimo de $\beta$ -manosidasas de otras especies.....	58
Tabla 5. Temperatura óptima de $\beta$ -manosidasas de otras especies.....	59
Tabla 6. Termoestabilidad de $\beta$ -manosidasas de otras especies.....	61
Tabla 7. Iones con efecto en $\beta$ -manosidasas.....	62
Tabla 8. Valores de KM de otras especies.....	64
Tabla 9. Lista de oligonucleótidos utilizados en PCR.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Tabla 10. Condiciones para la PCR a partir de DNA genómico. ....	45
Tabla 11. Condiciones de la PCR a partir de DNA plasmídico. ....	45
Tabla 12. Componentes para la ligación en pJET con extremos cohesivos. ....	46
Tabla 13. Componentes para la ligación en pJET con extremos cohesivos. ....	47
Tabla 14. Componentes para la ligación en pJET con extremos romos. ....	47
Tabla 15. Componentes para la ligación en pGAPzaB. ....	50
Tabla 16. Condiciones de la PCR Colonia desde <i>Pichia pastoris</i> . ....	51
Tabla 17. Actividad de cepas transformadas de <i>Pichia pastoris</i> . ....	78

## Índice de figuras

Figura 1. Estructura de la pared celular de plantas .....	14
Figura 2. Estructura de la manana lineal .....	16
Figura 3. Estructura de la galactomanana .....	16
Figura 4. Estructura de la glucomanana .....	17
Figura 5. Estructura de la galactoglucomanana.....	17
Figura 6. Estructura de la galactomanana con acetilación.....	18
Figura 7. $\beta$ -manosidasa de <i>Cellulomonas flavigena</i> .....	19
Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de las $\beta$ -manosidasas.....	20
Figura 10. Mapa del vector pQE-30Xa (Qiagen).....	36
Figura 11. Análisis electroforético de las fracciones solubles después de la inducción con IPTG 1mM .....	54
Figura 12. Cromatograma de la purificación de la $\beta$ -manosidasa de <i>C. uda</i> .....	55
Figura 13. Análisis electroforético por SDS-PAGE de la proteína purificada .....	56
Figura 14. Actividad de la $\beta$ -manosidasa a diferentes valores de pH. ....	57
Figura 15. Actividad de la $\beta$ -manosidasa ManA a diferentes temperaturas. ....	59
Figura 16: Termoestabilidad la $\beta$ -manosidasa de <i>Cellulomonas uda</i> .....	60
Figura 17. Efecto de iones metálicos sobre actividad de la enzima.....	62
Figura 18: Modelo Lineweaver-Burk .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 19: Modelo Eadie-Hofstee .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 20: Modelo Hanes-Woolf .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 21. Mapa del vector pUC57 (GenScript).....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 22: Mapa del vector pJET1.2/blunt (ThermoScientific). .	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 23: Mapa del vector pGAPZ $\alpha$ B (Invitrogen). ....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 24. Análisis electroforético del DNA genómico de <i>C. uda</i> .....	66
Figura 25. Análisis electroforético de la PCR a partir de DNA genómico de <i>C. uda</i> .....	67
Figura 26. Mapa del vector pUC57. ....	70
Figura 27. Análisis electroforético de la digestión con PstI y XbaI .....	71
Figura 28: Electroferograma de la secuenciación de la construcción pGAPz $\alpha$ B- <i>manA</i> .....	72
Figura 29: Digestión <i>in silico</i> de la construcción pGAPzB- <i>manA</i> con AclI. ....	73
Figura 30. Análisis electroforético de la digestión de la construcción pGAPz $\alpha$ B- <i>manA</i> con	

AcuI. ....	74
Figura 31. Análisis electroforético de la digestión con <i>PstI</i> y <i>XbaI</i> .....	75
Figura 32. Análisis electroforético de la construcción pGAPZaB con múltiples digestiones ...	76
Figura 33. A) Digestión con <i>ApaI</i> . b). Digestión con <i>AatII</i> .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 34. Selección de clonas transformadas a diferentes concentraciones de Zeocina .....	83 <b>¡Error! Marcador no definido.</b>
Figura 35. Análisis electroforético de resultados de PCR Colonia .....	84 <b>¡Error! Marcador no definido.</b>

## Resumen

La lignocelulosa es la biomasa más abundante en la naturaleza y está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina. De éstas, la hemicelulosa está constituida por xilanos, mananos,  $\beta$ -glucanos con enlaces mixtos, y xiloglucanos. Los mananos, que son los menos estudiados, son polímeros compuestos principalmente por monómeros de manosa con ramificaciones de glucosa, galactosa y acetilaciones en algunos monómeros.

Por esta complejidad, la hemicelulosa requiere ser degradada por un conjunto de enzimas: la  $\beta$ -manosidasa, la endo- $\beta$ -manosidasa, la  $\beta$ -glucosidasa y la  $\alpha$ -glucosidasa. De este grupo, la menos estudiada ha sido la  $\beta$ -manosidasa pues hasta la fecha presenta menos estudios publicados respecto a las otras enzimas. Esta enzima cuenta con aplicaciones industriales en la industria papelera, farmacéutica y cafetalera, entre otras.

La bacteria *Cellulomonas uda* se caracteriza por ser productora de celulasas y hemicelulasas. En nuestro grupo de trabajo, se logró obtener el 100 % de la secuencia del gen codificante de la  $\beta$ -manosidasa ManA y expresarla heterológamente en *Escherichia coli*.

El objetivo de este trabajo fue caracterizar bioquímicamente a la enzima recombinante ManA expresada en *E. coli* y, expresar esta enzima en *Pichia pastoris* mediante la optimización de codones específicos para esta levadura.

Para caracterizar bioquímicamente la enzima expresada en *E. coli*, se partió de la construcción pQE-30Xa-manA realizada por Ortega-Licona en 2011. Finalmente, se logró obtener cepas de *P. pastoris* transformadas con el gen *manA* de *C. uda*, pero sin actividad enzimática.

## Abstract

Lignocellulose is the most abundant biomass in the nature and its main components are cellulose, hemicellulose and lignin. From them, the hemicellulose is composed by xylan, mannan,  $\beta$ -glucan with mixed bonds and xyloglucan. The mannan, which is the less studied, is a polymer made mainly by manose with ramifications of glucose, galactose and acetylations in some monomers.

By this complexity, the hemicellulose needs to be degraded by an enzyme group: the  $\beta$ -manosidase, endo-  $\beta$ -manosidase,  $\beta$ -glucosidase and  $\alpha$ -glucosidase. From this group, the less studied is the  $\beta$ -manosidase because until this day shows the less number of papers than the other enzymes. This enzyme has industrial applications in the pulp, pharmaceutical, coffee and others industries.

The bacteria *Cellulomonas uda* is characterized by the production of cellulases and hemicellulases. In our work group, we achieved to know 100 % of the sequence of the  $\beta$ -manosidase gene, ManA, and to express this gene in *Escherichia coli*.

The objective of this work was the biochemical characterization of the recombinant enzyme ManA expressed in *E. coli* and the expression of this enzyme in *Pichia pastoris* through codon optimization.

We used the construction pQE-30Xa-*manA*, made it by Ortega-Licona in 2011, for the characterization of the recombinant enzyme expressed in *E. coli*. Finally, we obtained strains *P. pastoris* harboring the *manA* gene, but showing no enzymatic activity.

# Capítulo 1

## Introducción

# Introducción

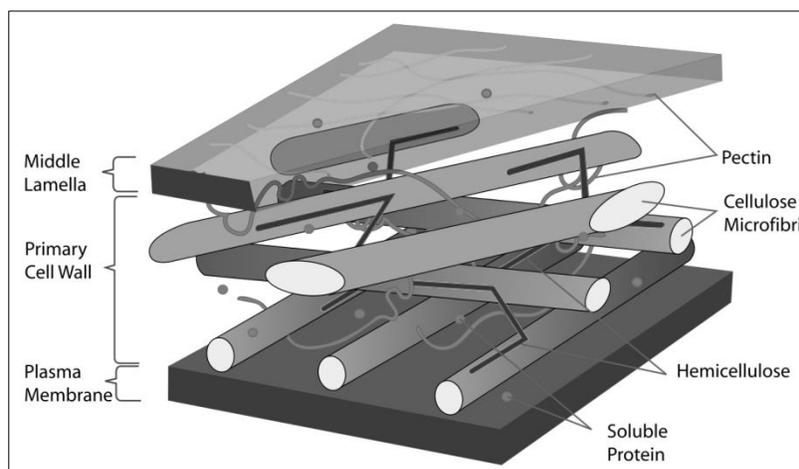
## 1.1 Biomasa lignocelulósica

La biomasa lignocelulósica es la más abundante de la naturaleza y es un recurso sustentable único y de bajo costo que, de acuerdo a Peng *et al.* (2012), se encuentra constituido principalmente por:

- Celulosa: Constituyente principal de la pared celular conteniendo principalmente poliglucanos con enlaces  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4).
- Hemicelulosa: El segundo polisacárido más abundante en plantas, contiene una amplia variedad de monosacáridos: xilosa, arabinosa, glucosa, galactosa, manosa, fucosa, entre otros dependiendo de la fuente.
- Lignina: Es una red de polímeros de fenilpropanoides (C6-C3) con enlaces carbono-carbono y otros enlaces.

En la **Figura 1** se muestra un esquema representativo de la estructura de la lignocelulosa.

El término hemicelulosa fue originalmente propuesto por Schulze en 1891 para designar a los componentes de la pared celular que son solubles y extraíbles por medio de soluciones alcalinas (Whistler, 2014). La hemicelulosa, que comprende hasta el 50 % de la biomasa de plantas perenes y anuales, ha emergido en los últimos años como una inmensa fuente renovable de polisacáridos (Ebringerová *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructura de la pared celular de plantas (Ortega-Licona, 2011).

La clasificación de los componentes de la hemicelulosa varía de acuerdo al autor que se ha dedicado a su estudio; sin embargo, de acuerdo a Ebringerová *et al.* (2005) se pueden clasificar en 4 grandes grupos:

- Xilanos
- Mananos
- $\beta$ -glucanos con enlaces mixtos
- Xiloglucanos

## 1.2 Mananos

Los mananos son el componente más antiguo de la hemicelulosa puesto que se han encontrado en la pared celular de algunas algas (Domozych *et al.*, 2012). En las plantas, sus principales funciones son: contribución de rigidez a la pared celular, almacenamiento de polímeros en la semilla, señalización en la pared, embriogénesis y diferenciación de tejidos (Rodríguez-Gacio *et al.*, 2012). Además, son el componente principal de semillas de la nuez de marfil, semilla de café verde y de la pulpa seca de coco (van Zyl *et al.*, 2010; Yamabhai *et al.*, 2014).

Los mananos son polisacáridos de cadenas lineales de manosa con enlaces  $\beta$ -1,4 que tienden a presentar cadenas laterales de galactosa y glucosa, y residuos de glucosa en la cadena principal. Estos se pueden dividir según su composición en (Pauly *et al.*, 2013):

- Mananos
- Galactomananos
- Glucomananos
- Galactoglucomananos

Los mananos son cadenas lineales de manosa con enlaces  $\beta$ -1,4 que raramente se encuentran sin otros componentes, y contienen menos del 5 % (w/w) de residuos de galactosa. En la **Figura 2**, se muestra un esquema de la estructura de la manana lineal.

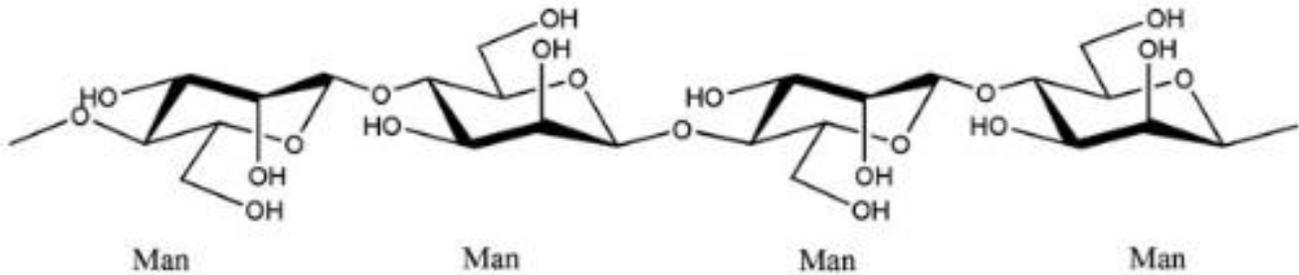


Figura 2. Estructura de la manana lineal (Yamabhai *et al.*, 2014).

Los galactomananos son cadenas lineales de manosa con enlaces  $\beta$ -1,4 y cadenas laterales de galactosa con enlaces  $\alpha$ -1,6 mayor al 5% (w/w). Esta cadena lateral le confiere hidrofiliidad ayudando a prevenir la agregación de la cadena lineal de manana (Dea & Morrison, 1975). En la **Figura 3** se muestra un esquema de la estructura de la galactomanana.

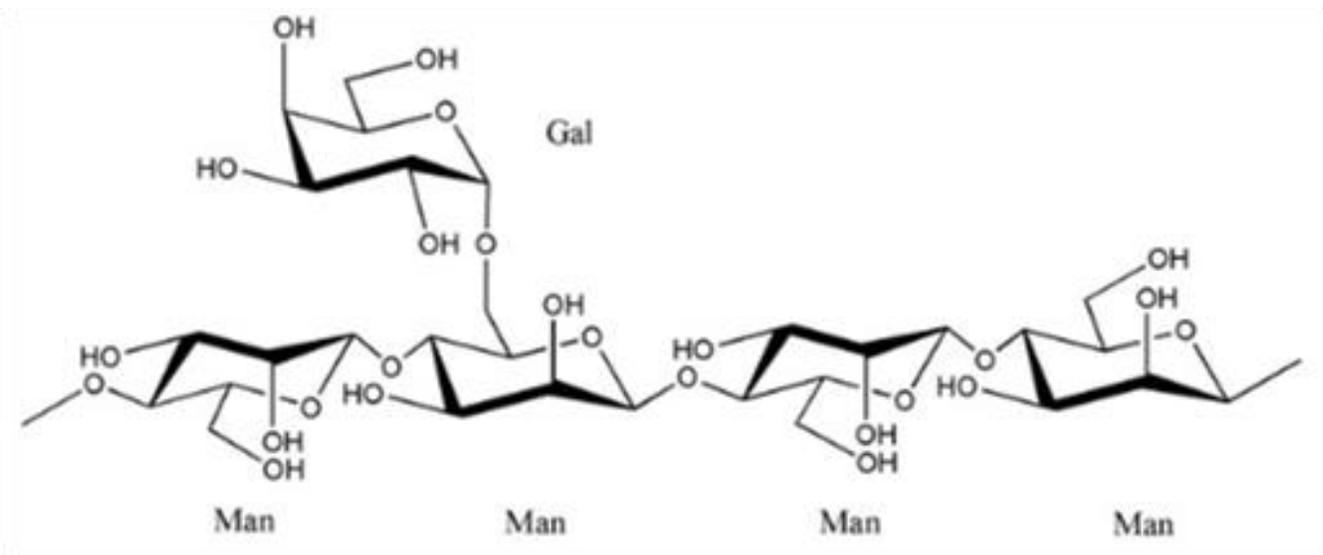


Figura 3. Estructura de la galactomanana (Yamabhai *et al.*, 2014).

Los glucomananos son cadenas lineales de manosa y glucosa con enlaces  $\beta$ -1,4 en una proporción manosa: glucosa (2:1 a 4:1) presentando un grado de polimerización superior a los 200 residuos. Las conformaciones del glucomanano son muy similares a las de la celulosa (Al-Ghazzewi *et al.*, 2007; Yamabhai *et al.*, 2014). En la **Figura 4** se muestra un esquema de la estructura de la glucomanana.

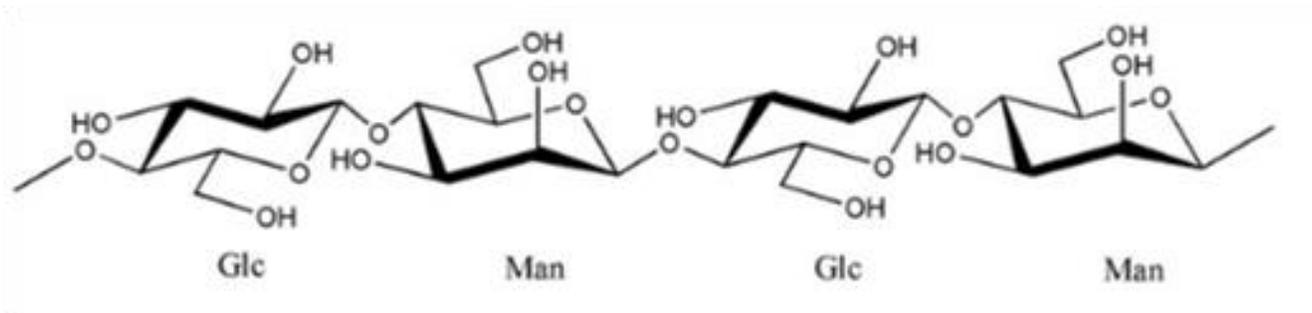


Figura 4. Estructura de la glucomanana (Yamabhai *et al.*, 2014).

Los galactoglucomananos son cadenas lineales de manosa y glucosa con enlaces  $\beta$ -1,4 en la cadena lineal y cadenas laterales de galactosa con enlaces  $\alpha$ -1,6 enlazadas a manosa o glucosa. Se encuentran principalmente en las maderas suaves y presentan una proporción de manosa:glucosa:galactosa (3:1:1 y 4:1:0.1) (Lundqvist *et al.*, 2002; Yamabhai *et al.*, 2014). En la **Figura 5** se muestra un esquema de la estructura de la galactoglucomanana.

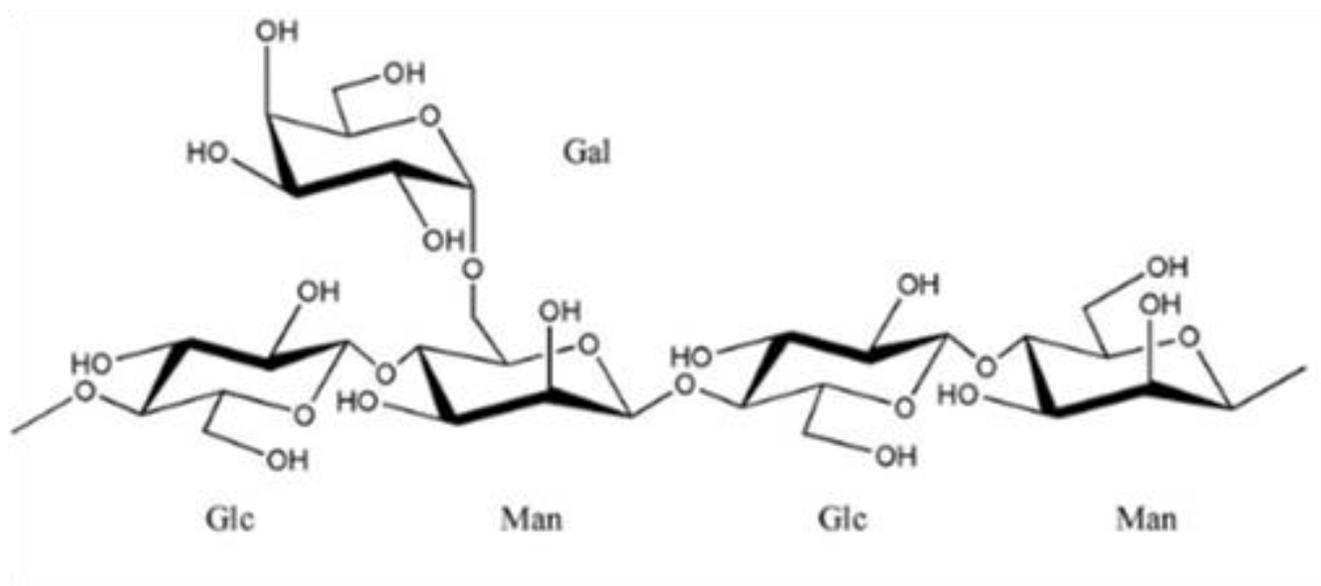


Figura 5. Estructura de la galactoglucomanana (Yamabhai *et al.*, 2014).

Los galactoglucomananos también pueden presentar acetilaciones aleatorias en los

carbonos 2 y 3 de los residuos de manosa pero no en los de glucosa. En promedio, se encuentran cada 3-4 residuos de manosa. Tienen un grado de polimerización de 100-150 residuos (Timell, 1965; Yamabhai *et al.*, 2014). En la **Figura 6** se muestra un esquema de la estructura de la galactoglucomanana con una acetilación.

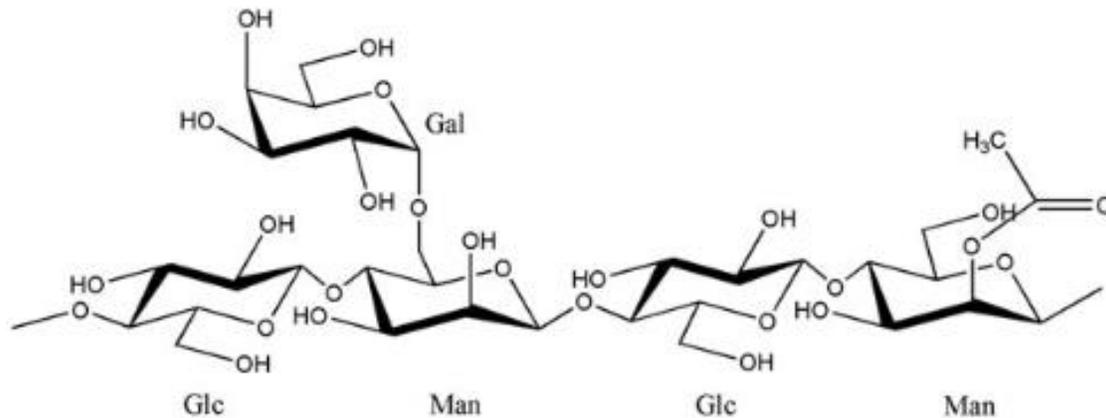


Figura 6. Estructura de la galactomanana con acetilación (Yamabhai *et al.*, 2014).

### 1.3 Degradación de los mananas

El esquema general para la bioconversión de la lignocelulosa, una plataforma de carbohidratos, comprende un tratamiento de la materia prima, una hidrólisis enzimática de la celulosa y la hemicelulosa en azúcares fermentables (Liu *et al.*, 2013).

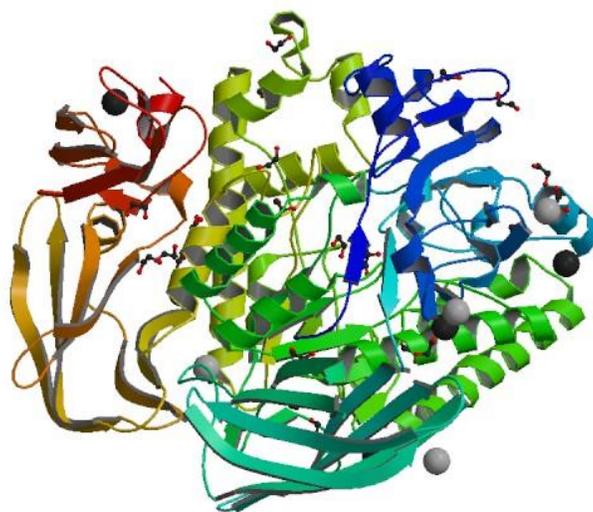
La degradación de las mananas se lleva a cabo por un complejo enzimático debido a su complejidad estructural. En la **Tabla 1** se muestran las principales enzimas involucradas en la degradación enzimática de las mananas.

Tabla 1. Enzimas del complejo enzimático para la degradación de las mananas.

Nombre	E.C.	Enlace hidrolizado
Endo- $\beta$ -1,4-manosidasa	3.2.1.78	$\beta$ -1,4 interno
$\beta$ -1,4-manosidasa	3.2.1.25	$\beta$ -1,4 terminal
$\beta$ -glucosidasa	3.2.1.21	$\beta$ -1,4 terminal

$\alpha$ -galactosidasa	3.2.1.22	$\alpha$ -1-6 terminal
-------------------------	----------	------------------------

La  $\beta$ -manosidasa es una exoglicosidasa específica para la hidrólisis de manosas terminales con enlaces  $\beta$ -1,4. Esta enzima es esencial para la completa hidrólisis de mananas a residuos de manosa (Fliedrova *et al.*, 2012). En bases de datos como BRENDA, se han reportado  $\beta$ -manosidasas de más de 50 especies diferentes. En la **Figura 7** se muestra la estructura tridimensional obtenida por Cristalografía de Rayos X de la  $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas flavigena*.



**Figura 7.**  $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas flavigena* (Davies *et al.*, 2008).

La reacción de hidrólisis involucra a dos grupos carboxilo, uno es utilizado como nucleófilo y el otro como catalizador ácido-base. En el primer paso, el nucleófilo ataca al carbono anomérico de la manosa, mientras el catalizador ácido-base protona a la manosa liberada, dejando la formación de un intermediario covalente manosa-enzima. En el segundo paso, el catalizador ácido-base promueve el ataque de una molécula de agua al carbono anomérico de la manosa, por lo que el nucleófilo libera a la manosa (Stoll *et al.*, 2000). Esto se describe de forma gráfica en la **Figura 8**.

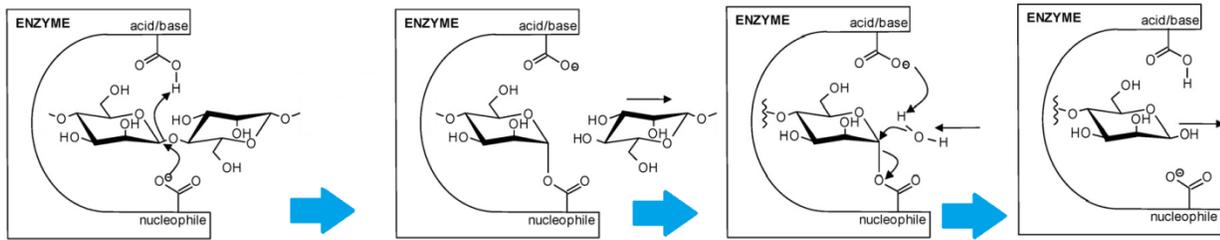


Figura 8. Mecanismo de hidrólisis de las  $\beta$ -manosidasas (Ortega-Licona, 2011)

## 1.4 Aplicaciones de las manosidasas

La aplicación más importante, como hidrolasa, es su uso en el blanqueamiento de pulpas de maderas suaves para la producción de papel que actualmente se realiza por tratamientos alcalinos, representando un grave problema de contaminación. La extracción de lignina es un paso esencial en el blanqueamiento. El uso de manosidasas facilita la remoción de la lignina y tiene resultados comparables al tratamiento alcalino (Cuevas *et al.*, 1996; Hongpattarakere, 2002).

Los heteromananos son los principales componentes de los extractos de café, dándole una mayor viscosidad, lo que afecta negativamente el procesamiento de café soluble e instantáneo. Las manosidasas se pueden usar para la hidrólisis de los galactomananos presentes en el café (Sachslehner *et al.*, 2000).

La manosa es utilizada en la industria farmacéutica como excipiente en algunos medicamentos. La  $\beta$ -manosidasa es usada para la producción de manosa, este proceso es posible gracias a que algunas de estas enzimas pueden llevar a cabo la reacción de transglucosidación. Actualmente la síntesis de manosa es realizada mediante una síntesis química, el cual resulta un proceso caro y complicado (Fu *et al.*, 2006)

## 1.5 *Cellulomonas uda*

Actinobacteria es un filo de bacterias Gram (+) con un alto contenido de GC (hasta un 70 %) en el genoma de la mayoría de las especies que lo componen y son principalmente bacterias del suelo. Actinobacteria es uno de los filos dominantes y contiene a *Streptomyces*, uno de los mayores géneros de bacterias y productores de una gran cantidad de antibióticos (Hogan, 2014).

*Cellulomonas uda* es una bacteria Gram (+) del filo Actinobacteria y posee un alto contenido de GC en su genoma. Crece en ambientes ricos en vegetales en proceso de degradación. Este microorganismo tiene la capacidad de hidrolizar polisacáridos, como xilanos, glucanos y mananos, debido a que secreta un complejo de glicosil hidrolasas, de las cuales se han reportado endo y exoglucanasas, que actúan sinérgicamente degradando celulosa y hemicelulosa (Glazer y Nikaido, 2007).

## 1.6 Sistemas para expresión de proteínas recombinantes

Existen diversos organismos modelo para la expresión heteróloga de proteínas. Entre los más empleados se encuentran *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*.

*E. coli* es un microorganismo muy versátil para la producción de proteínas recombinantes y varios sistemas de expresión de proteínas han sido desarrollados y comercializados para la producción de proteínas recombinantes (Cornelis, 2000). Sin embargo, el 70-80 % de las proteínas recombinantes expresadas en *E. coli* se agregan en cuerpos de inclusión. La purificación a partir de estos cuerpos usualmente requiere dos pasos: extracción de los cuerpos y la posterior solubilización de estos, siendo este procedimiento muy laborioso y poco efectivo (Yang *et al.*, 2011).

*Pichia pastoris* es frecuentemente usado como sistema de expresión para proteínas recombinantes. La mayor ventaja de *P. pastoris* sobre *E. coli* es que el primero es capaz de producir puentes disulfuro y glicosilar proteínas, dándose el caso de que si una proteína requiere un puente disulfuro y es expresada en *E. coli*, ésta será expresada con un plegamiento incorrecto, de forma inactiva, insoluble o en cuerpos de inclusión (Brondik, 2009).

## 1.7 Optimización de codones

La expresión en sistemas heterólogos puede disminuir el rendimiento. La competencia de tRNA diferentes a los tRNA del organismo puede afectar adversamente la expresión de genes externos. Por ejemplo, los codones de arginina AGA y AGG son particularmente raros en *E. coli* y se ha mostrado que causa errores en la traducción, así como bajos niveles de expresión (Chen *et al.*, 2013).

Una forma de aumentar los niveles de expresión en levaduras es por medio de la optimización de codones. Muchos estudios han reportado un mejoramiento significativo en la expresión transgénica en levaduras por medio de la optimización de codones. Con ello, se han reportado altos rendimientos de proteína en su estado nativo de plegamiento, una alta pureza e inclusive una mejora en su función (Li *et al.*, 2014). En la **Tabla 2** se muestra la frecuencia de uso de codones de la maquinaria de transcripción de *P. pastoris*.

**Tabla 2. Preferencia de codones por *Pichia pastoris* (GenScript).**

Codón	aa	Frecuencia (miles)									
TTT	F	23.9	TCT	S	23.5	TAT	Y	14.7	TGT	C	8.3
TTC	F	19.1	TCC	S	16.3	TAC	Y	18.3	TGC	C	4.5
TTA	L	14.9	TCA	S	15.6	TAA	*	0.9	TGA	*	0.3
TTG	L	31.4	TCG	S	7.2	TAG	*	0.5	TGG	W	9.9
CTT	L	16.0	CCT	P	15.3	CAT	H	10.5	CGT	R	6.9
CTC	L	7.6	CCC	P	6.7	CAC	H	8.9	CGC	R	2.3
CTA	L	11.2	CCA	P	17.1	CAA	Q	23.9	CGA	R	4.6
CTG	L	15.3	CCG	P	4.1	CAG	Q	14.5	CGG	R	2.2
ATT	I	31.7	ACT	T	23.3	AAT	N	23.5	AGT	S	12.1
ATC	I	19.3	ACC	T	13.7	AAC	N	25.7	AGC	S	7.4
ATA	I	11.5	ACA	T	14.3	AAA	K	30.2	AGA	R	19.9
ATG	M	19.2	ACG	T	6.3	AAG	K	34.4	AGG	R	6.6

GTT	V	26.7	GCT	A	29.6	GAT	D	37.2	GGT	G	26.6
GTC	V	14.5	GCC	A	16.7	GAC	D	26.2	GGC	G	8.6
GTA	V	10.1	GCA	A	15.9	GAA	E	40.2	GGA	G	20.0
GTG	V	12.8	GCG	A	3.7	GAG	E	29.6	GGG	G	6.4

# Capítulo 2

Antecedentes directos

## Antecedentes directos

En el grupo de trabajo, se han realizado 3 estudios previos con la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda*. Pavón (2007) detectó la actividad intracelular de la  $\beta$ -manosidasa en *C. uda*. Dentro de este trabajo, se encontró que la enzima tiene un peso molecular de 94 kDa, un pH óptimo de 7 y una temperatura óptima de 50 °C. En ese trabajo también se logró obtener un fragmento de 1,375 pb, correspondiente a aproximadamente el 50% de la secuencia del gen, tomando como referencia el tamaño del gen de la  $\beta$ -manosidasa en *Cellulomonas fimi*, el cual presenta un tamaño molecular de 2529 nucleótidos. Esto se llevó a cabo por medio de PCR, a partir del DNA genómico de *C. uda*, y utilizando oligonucleótidos diseñados a partir de regiones conservadas de otras  $\beta$ -manosidasas bacterianas

Alarcón (2009) logró obtener secuencias adicionales en ambos extremos de la secuencia obtenida por Pavón (2007), alcanzando un 85 % de la secuencia del gen siendo un total de 2211 pb. En la **Tabla 3** se muestran los oligonucleótidos utilizados para la obtención de 85 % del gen en los dos estudios previos.

**Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados por Pavón (2007) y Alarcón (2009)**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Tm °C</b>	<b>Autor</b>
DOSIDASA	ATGGCGTGCTCGTTCGGCTGGGACTG	79	Pavón (2007)
ROSIDASA	CACCGGCCAGCAGTCCGTTGAGCTGCCA	82	Pavón (2007)
MancfiD1	CCGACCCGTACCTCGACCGCAACGAG	88	Alarcón (2009)
MancfiR1	GCGCCACCGCTCGACGCGCACCGG	88	Alarcón (2009)
MancfiD2	CTCACCCAGGCGCGCGGTCGCG	86	Alarcón (2009)
MancfiR2	CGTCGCGTCGGGGTCGAGCGCGTC	86	Alarcón (2009)

En estudios realizados por Ortega (2011), se obtuvo la secuencia completa del gen *manA* que codifica para la  $\beta$ -manosidasa. Es un gen de 2,577 pb que codifica para una proteína de 858 aminoácidos con un peso molecular de 93.86 kDa. Esta enzima presenta un dominio conservado de transglicosidasa. Sin embargo, será necesario demostrar que la enzima presenta actividad de transglicosilación.

En la secuencia deducida de la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* se identificaron dos residuos de ácido glutámico (E): E446, que estaría participando como catalizador ácido-base, y E536 como nucleófilo. La posición de los residuos E446 y E536 se muestran a continuación y se identificaron por similitud a los residuos de ácido glutámico del sitio catalítico de la  $\beta$ -manosidasa de *C. fimi* (Ortega-Licon, 2011).

A continuación, se muestra la secuencia completa del gen *manA* y la secuencia de la proteína ManA.

```

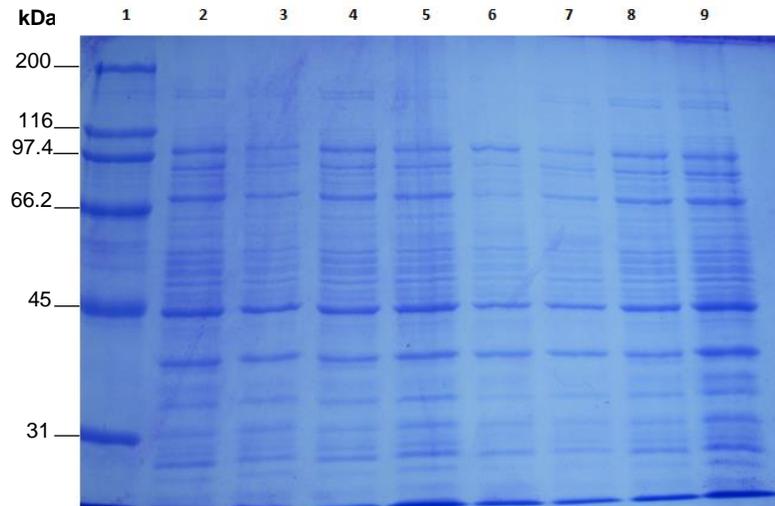
atgcaccacccggagcacaccatgaccttcccgacctcgccgacggctggctgctgacc      60
M H H P E H T H D L P D L A D G W L L T                               20
gccacggcgggcacgcccggcgacctcgacccggcgctggcggccgcctggccgcgggc      120
A T A G T P G D L D P A L A A A L A A G                               40
Gtccccgcccgcctccccggcaccagccacacggcgctgctcgacgcggcctgatcccg      180
V P A A V P G T S H T A L L D A G L I P                               60
Gaccggtacctcgaccggaacgaggaggcgctcgcgctggatgcgggcacgtcgactggcgc      240
D P Y L D R N E E A L A W M R H V D W R                               80
Taccgagcggcggctcgacgagcccggcggccgcgacgacgagcggcgtcgacctcgcgttc      300
Y E R P L D E P A A A H D E R V D L A F                               100
Gacggcatcgacacggctcgcgacgacctcgctcgctcgctcgggggacgcccacgtgctc      360
D G I D T V A T T S L V V A G D A H V L                               120
Ggccgcaccgccaaccagcaccgctcctaccggttcgacgtgcgcgcgctggctggccgc      420
G R T A N Q H R S Y R F D V R A L V G R                               140
Gccggcacgacgctgcgggctcgacctcgctcgccctgcaccacgccgaggccgaggag      480
A G T T L R V D L A S A L H H A E A E E                               160
Gcccgcctggggcaccgcccgcctcgcgctacccgcagccgttcaacatggtccgcaagatg      540
A R L G H R P L A Y P Q P F N M V R K M                               180
Gcgtgctcgcttcggctgggactggggacccgacctgcagaccgcggggctgtggcgcccg      600
A C S F G W D W G P D L Q T A G L W R P                               200
Gtgcgcgctcgagcgggtggcgcgctcgcgcggtcgcgcccgctcgtcacgctg      660
V R V E R W R V A R L A Q V R P V V T L                               220
Ggcgcccagggcacgggcccgcgaggctgcacgtcaccgtggagcgtcgggcctgcca      720
G A D G T G R A E L H V T V E R S G L P                               240
Ggcggtgacccccgctcacggctccgcgcgcaggctcgggcgctcgctcgcggtcgcgctcg      780
G G D A P L T V R A Q V A G V V A V A S                               260
Ctcgcccggcagaggacggcgacgctcgctcgctcgagggtccccgacgcgcccgtgtgg      840

```

**L A P D E D A A T L V V E V P D A P V W** 280  
Tggcccgtcgccacggcgaccagccgctcgctcgacgcgaccgtagcgctcgcgggcg 900  
**W P V G H G D Q P L V D A T V T L A A A** 300  
Ggccacgacgacctcgccgctggcaccggcggtcggttccgacgctgcgcgctcgac 960  
**G H D D L G R W H R R L G F R D V R V D** 320  
Cgcaaccgacgagcacggcacgggttcacgttcgctcgtaacggccgaccgggttc 1020  
**R N R D E H G T R F T F V V N G R P V F** 340  
Gtccgcgcccaactggatccccgacgaccactgctcaccggatcaccgagcg 1080  
**V R G A N W I P D D H L L T R I T R E R** 360  
Ctcgagcgtcgctcgaccagggctcgcgcgcacctcaacctgctgcggtgtggggc 1140  
**L E R R V D Q A L G A H L N L L R V W G** 380  
Gcgggcatctacgagtcgacgacctctacgacgtgtgacgagcgcggtgctcgtc 1200  
**G G I Y E S D D L Y D V C D E R G V L V** 400  
Tggcaggacttctgctcgctgcgcggtaccggaggagtccccgctgctcgaggag 1260  
**W Q D F L L A C A A Y P E E S P L L E E** 420  
Atcgaggcgaggcgcgagaaacgtcggtcgctcgacgagcctcgtgctg 1320  
**I E A E A R E N V V R L A S H A S L V Lc** 440  
Tggaacggcggaacgagaacgtgtggggccacgaggactggggctggaaggacgagctc 1380  
**W N G G N E N V W G H E D W G W K D E L** 460  
Gacggccgacgtggggccaccggcatgccacggagctgctccccggtcgtcgcgag 1440  
**D G R T W G H R H A T E L L P A V V A E** 480  
Ctcgacccgagccgcccgtacgcccacaacagcccgtactccccgggttcgcccgc 1500  
**L D P S R P Y A D N S P Y S P G F A P D** 500  
Gaggtgcaccccgacgaccggcccacggcaccaccaccagtgagggtgtggaaccgc 1560  
**E V H P D D P A H G T H H Q W E V W N R** 520  
Gtcgactacagcactaccgacgacgtgccgggttctgctccgagttcgggttcag 1620  
**V D Y T H Y R D D V P R F C S E F G F Q** 540  
Ggcccgccacgtggtcgacgctgaccgcgcggtccgacgagcagggcgcgctcgtc 1680  
**G P P T W S T L T R A V R D E Q G A L V** 560  
Gtcgacaaggagcaccgacgtttctggcgcaccagaaggccgaggacggcaacggcaag 1740  
**V D K E H P T F L A H Q K A E D G N G K** 580  
Ctcgaccgcggtcgcaccgcacctcggcgtgcccgaggacttcacggactggcactgg 1800  
**L D R G L A P H L G V P E D F T D W H W** 600  
Gcgacgcagctcaaccagggcgcgcggtcgcgtacgccgacgcaccaccgctcgtgg 1860  
**A T Q L N Q A R A V A Y A A T H H R S W** 620  
Tggccgcgaccgcccgggtcggctcgtgtggcagctcaacgactgctggcccgtgacgtcg 1920  
**W P R T A G S V V W Q L N D C W P V T S** 640

Tgggcccgcgctcgacggcgacgagcgcgtcaagccgctgtggtgggcgctgcggcacgcc	1980
W A A V D G D E R V K P L W W A L R H A	660
Aacgcgcccgcgtctgctcacgggtgcaggagcgcgacggcgcccccggtggtcgcggtggtc	2040
N A P R L L T V Q E R D G A P V V A V V	680
Aacgacacggcggacgcgtggaccgggcgctggcggtctcgcggcagacgttcgacggc	2100
N D T A D A W T G R L A V S R Q T F D G	700
Gacgagcgcgctccgcgaccctcgcggtcgacgtgccgccgcgcgaggtgcgcatcctg	2160
D E R A S A T L A V D V P P R E V R I L	720
Ccgctgcccgcgacgacgtcgcgcgcgcgacggacgtcgcgcgtgaggcgctcgctcgcg	2220
P L P D D V A R A Q D V A R E A L V V R	740
Ctcgacgacgcgctcgagcgtgcacctgctcgccgaggacgtggcgctcgacctcgacccc	2280
L D D A S S V H L L A E D V A L D L D P	760
Gacccgctgtccgcgagcgcacgcccgtgccggcggtacgcggtcacggtcaccgcg	2340
D P L S A S A T P V P G G Y A V T V T A	780
Cgctcgtcgcgcgcgacgtgacgggtgctcgtggaccggctcgacccggcgggcgacggtc	2400
R S L A R D V T V L V D R L D P A A T V	800
Gacgacgcgctcgtcgacctccccgcgggcgcgagcgtcacgttcacgtccgcacggac	2460
D D A L V D L P A G A S V T F H V R T D	820
Gcgggtgctcgaccccgacgcgctgacctcgccgcccggtgctgcgcgagcgcgaacgacgtc	2520
A V L D P D A L T S P P V L R S A N D V	840
Gtgggtccccgcggcccgtccggcggtggcgctccggcgcccccgcccgcgacgctga	2574
V V P A A R P A V A S G A P A A G R -	858

En ese mismo estudio, el gen codificante para la  $\beta$ -manosidasa se expresó en *E. coli*, y la proteína recombinante se encontró en la fracción soluble del lisado bacteriano, presentando una actividad de  $\beta$ -manosidasa de 123.87 U/ml (Ortega-Licona, 2011). Sin embargo, la inducción resultó ser muy baja tal como se muestra en la **Figura 9**.



**Figura 9.** Inducción de la  $\beta$ -manosidasa por Ortega-Licona 2011. Carril 1. Marcador de PM. Carril 2: clona 1 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=0 h). Carril 3: clona 1 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=4 h). Carril 4: clona 2 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=0 h). Carril 5: clona 1 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=4 h). Carril 6: clona 3 pQE30 (IPTG, t=0 h). Carril 7: clona 1 pQE30 (IPTG, t=4 h). Carril 8: clona 4 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=0 h). Carril 9: clona 4 pQE30-Xa-*manA* (IPTG, t=4 h).

# Capítulo 3

Planteamiento del problema

## Planteamiento del problema

### 3.1. Justificación

Debido a la importancia biotecnológica que representa la aplicación de la  $\beta$ -manosidasa en la industria farmacéutica, cafetalera y papelera, entre otras, el interés de este proyecto es continuar con el estudio de la  $\beta$ -manosidasa recombinante de *C. uda* expresada en *E. coli*, la cual no ha sido purificada y caracterizada bioquímicamente. Así mismo, y dado que se observó una baja inducción de la  $\beta$ -manosidasa expresada en este sistema heterólogo, se tiene el interés de utilizar a *P. pastoris* como sistema de expresión y caracterizar bioquímicamente a la enzima recombinante.

### 3.2. Hipótesis

*Sistemas de expresión heteróloga basados en Escherichia coli y Pichia pastoris permitirán la expresión de la  $\beta$ -manosidasa de Cellulomonas uda en forma catalíticamente activa.*

### 3.3. Objetivos

#### 3.3.1. Objetivo general

Purificar y caracterizar bioquímicamente la  $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas uda* expresada en *Escherichia coli*.

Expresar el gen codificante para la  $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas uda* en *Pichia pastoris*.

#### 3.3.2 Objetivos específicos

Purificar la  $\beta$ -manosidasa recombinante de *C. uda* expresada en células de *E. coli*

M15/pREP4 que portan la construcción pQE30-Xa-*manA*.

Caracterizar bioquímicamente la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* expresada en *E. coli*.

Generar la construcción pGAPz $\alpha$ B-*manA*.

Expresar el gen *manA* de *C. uda* en *P. pastoris*.

### 3.2. Estrategia experimental

- 1) Expresión del gen codificante para la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* en células de *E. coli* M15/pREP4 que portan la construcción pQE30-Xa-*manA*.
- 2) Purificación de la  $\beta$ -manosidasa expresada en *E. coli* por cromatografía de afinidad a níquel.
- 3) Caracterización bioquímica de la  $\beta$ -manosidasa expresada en *E. coli*, mediante la evaluación de pH y temperatura óptimos, termoestabilidad, resistencia a iones metálicos y parámetros cinéticos  $K_M$  y  $V_{max}$ .
- 4) Optimización de codones de la secuencia del gen *manA* para la expresión en *P. pastoris*, y síntesis del gen.
- 5) Obtención de la construcción pGAPz $\alpha$ B-*manA* compatible con el sistema de expresión *P. pastoris* X-33.
- 6) Expresión del gen *manA* de *C. uda* en *P. pastoris* X-33.

# Capítulo 4

Materiales y métodos

## Materiales y métodos

### 4.1 Materiales

#### 4.1.1. Microorganismos

*E. coli* DH5 $\alpha$  se usó para la subclonación del gen de la  $\beta$ -manosidasa y la cepa M15 para los ensayos de expresión de la enzima recombinante. La cepa que contenía la construcción pQE-30Xa-*manA* se le asignó el número 70 para su manejo en el grupo de trabajo.

*C. uda* se usó para la obtención de DNA genómico, utilizado como DNA molde para amplificación del gen de la  $\beta$ -manosidasa por PCR directa. La cepa de *P. pastoris* X-33 (Invitrogen) se utilizó en los ensayos de expresión de la proteína recombinante.

#### 4.1.2. Oligonucleótidos utilizados

En la **Tabla 4** siguiente se muestran los 2 pares de oligonucleótidos para la amplificación del ORF del gen *manA* y los sitios de corte subrayados para las enzimas *EcoRI* y *XbaI*

Tabla 4. Lista de oligonucleótidos utilizados en PCR.

Oligonucleótido	Secuencia	Tm	Longitud
Man-D2	5'-CAG <u>AATTC</u> CACCACCCGGAGCACACC-3'	78.7	26
Man-R2	5'-AAT <u>CTAGAT</u> CAGCGTCCGGCGGGCGGG-3'	81.2	26
Man-EXD1	5'-GCG <u>GAATTC</u> ATGCACCACCCGGAGCACACC-3'	85.4	30
Man-EXR1	5'-CGT <u>CTAGAT</u> CAGCGTCCGGCGGGCGGGGGC-3'	87.7	29

#### 4.1.3. Vector de expresión

Los vectores utilizados para la clonación y expresión fueron los siguientes:

#### 4.1.3.1. pQE-30Xa

Este vector de expresión (Qiagen) tiene el promotor T5, dos secuencias del operador *lac*, sitio sintético de unión a ribosomas RBSII, sitio múltiple de clonación (SMC), codones de terminación de la traducción, marcador de resistencia a ampicilina para la selección de clonas transformantes, así como una etiqueta de polihistidinas (tag His6X). Este vector también contiene secuencias codificantes para cinco aminoácidos (Y R G K A) que reconoce la proteasa Xa, los cuales son adicionados a la proteína recombinante en el extremo N-terminal. Esta característica permite eliminar la etiqueta de polihistidinas (tag His6X) después de que la proteína fue purificada por cromatografía de afinidad a níquel. El mapa del vector se muestra en la **Figura 10**.

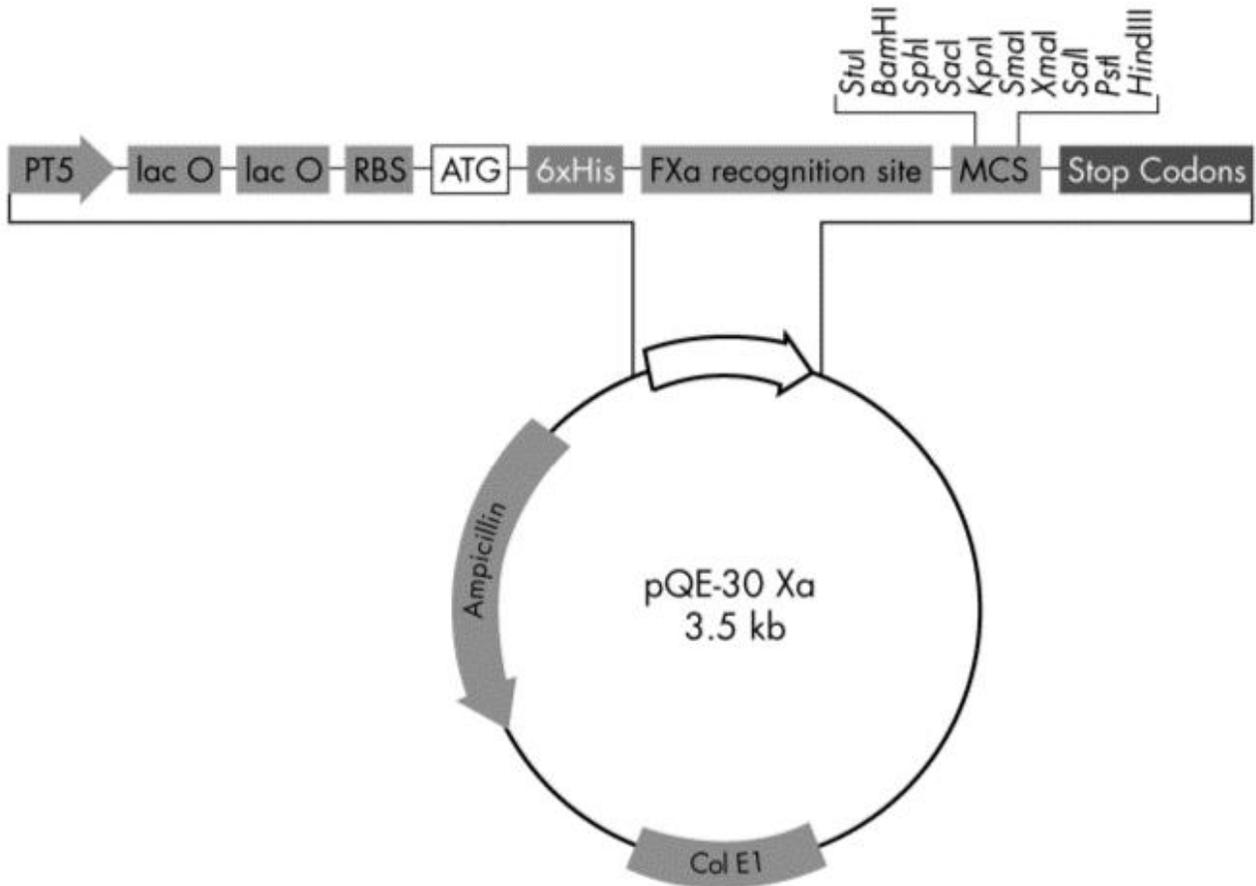


Figura 10. Mapa del vector pQE-30Xa (Qiagen).

#### 4.1.3.2 pUC57

El pUC57 (GenScript), es un vector derivado del vector pUC19, es usualmente usado para clonación en *Escherichia coli* y aislado de la cepa DH5 $\alpha$ . Tiene una longitud de 2,710 pb, el sitio múltiple de clonación del vector contiene 6 sitios de restricción, contiene el gen para resistencia a ampicilina, inicio de origen de replicación del vector pMB1 y el gen *lacZ* para la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa. El mapa del vector se muestra en la **Figura 11**.

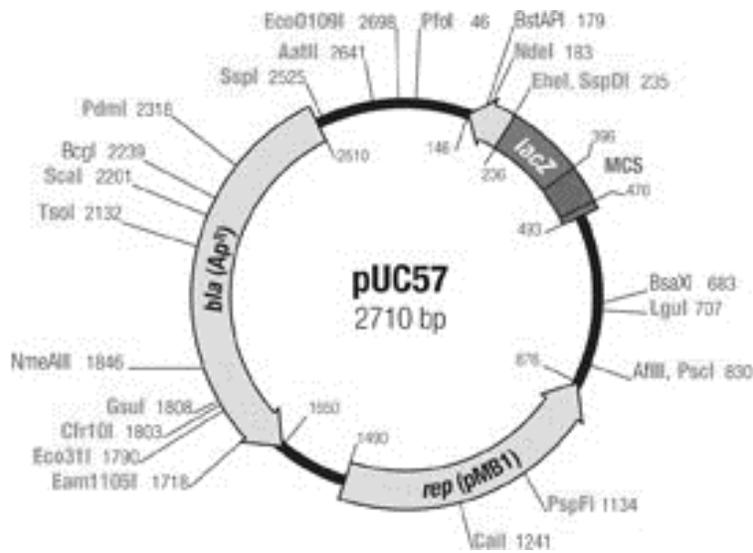


Figura 11. Mapa del vector pUC57 (GenScript).

#### 4.1.3.3 pJET1.2

El pJET1.2/Blunt (ThermoScientific) es un vector linealizado que tiene un tamaño de 2,974 pb y que acepta insertos de 6 pb a 10 kb. Este vector tiene la característica de que pueden ser ligados fragmentos con extremos romos o cohesivos. Tiene un marcador de resistencia a ampicilina y también contiene un gen letal que codifica para la enzima ECO47IR, que es interrumpido por la ligación del inserto de DNA permitiendo una selección positiva. El mapa del vector se muestra en la **Figura 12**.

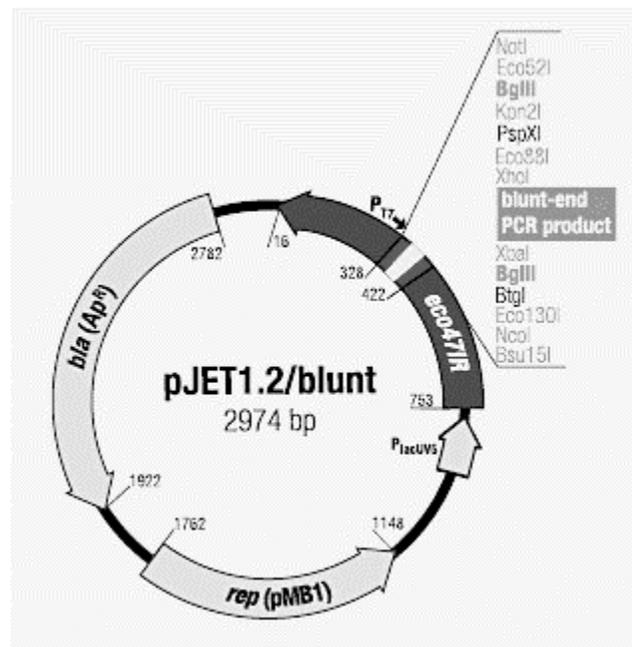


Figura 12: Mapa del vector pJET1.2/blunt (ThermoScientific).

#### 4.1.3.4. pGAPZαB

El pGAPz (Invitrogen) es un vector diseñado para expresión constitutiva en *P. pastoris*. Tiene una longitud de 3.1 kb y contiene el promotor del gen *gap* que codifica para la enzima GAPH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa), una enzima que se expresa constitutivamente en *P. pastoris*. Las proteínas recombinantes pueden ser fusionadas con un péptido que contiene el epítipo myc para su detección y con una etiqueta de histidinas para su purificación. Además, puede fusionarse el péptido señal del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*, para la secreción. Contiene un marcador de resistencia a Zeocina. El mapa del vector se muestra en la **Figura 13**.

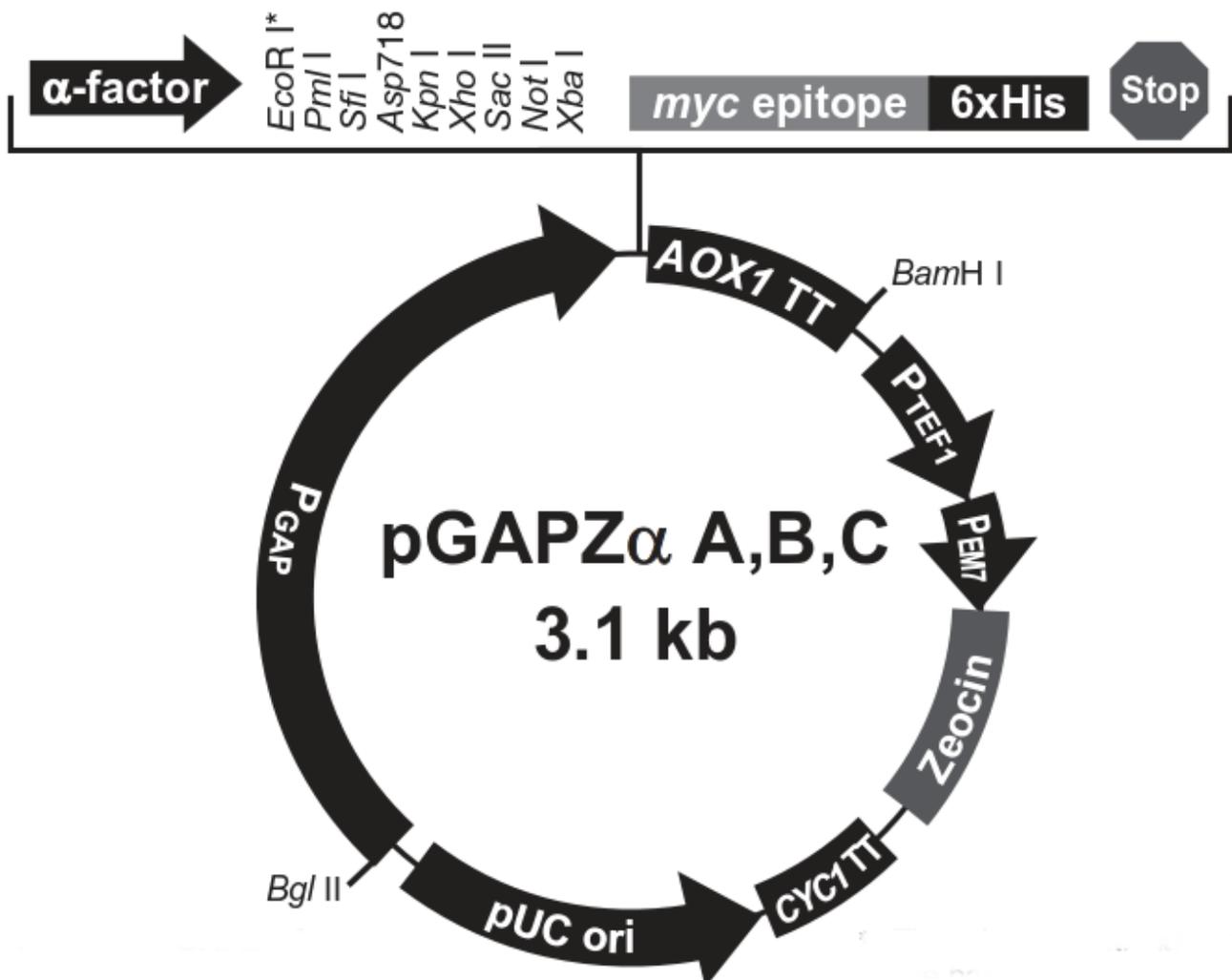


Figura 13: Mapa del vector pGAPZαB (Invitrogen).

## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Cultivo de *E. coli***

Las cepas de *E. coli* M15, se cultivaron a 37°C y 180 rpm en medio LB complementado con kanamicina y/o ampicilina según se necesitara.

### **4.2.2. Cultivo de *C. uda***

Para la producción de biomasa y la posterior extracción de DNA genómico, se empleó el medio definido descrito por Ortega-Licona (2011), inoculado al 1% de un cultivo joven a una temperatura de 37 °C por 24 h en agitación moderada (180 rpm) en un volumen de 50 ml en matraces de 250 ml.

### **4.2.3. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli***

El DNA plasmídico de la cepa 70, que contiene la construcción pQE-30Xa-*manA*, se purificó por el método de lisis alcalina (Sambrook, 2001)

#### **4.2.3.1. Preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS: Minipreparación**

Se inocularon 2 ml de medio LB, con el antibiótico respectivo, con bacterias transformadas y se incubó durante 18 horas a 37°C y con agitación de 180 rpm. Se transfirieron 1.5 mL del cultivo a un tubo eppendorf. Se centrifugó a 14,000 rpm por 30 s a 4°C en la microcentrífuga. El cultivo restante sin usar se almacenó a 4°C. Cuando la centrifugación terminó, se eliminó el medio por aspiración, dejando la pastilla bacteriana lo más seca posible. Se resuspendió la pastilla en 0.25 volúmenes del cultivo original en amortiguador STE frío y se centrifugó otra vez. Se resuspendió la pastilla bacteriana en 100 µl de Solución de lisis alcalina I por agitación vigorosa en vortex. Se añadieron 200 µl de Solución de lisis alcalina II recién preparada a cada suspensión bacteriana. Se cerró el tubo herméticamente y se mezcló todo el contenido invirtiendo el tubo 5 veces rápidamente y se mantuvo en hielo. Se añadieron 150 µl Solución de lisis alcalina III fría. Se cerró el tubo y se distribuyó toda la solución a través

del lisado bacteriano viscoso invirtiendo el tubo varias veces. Se almacenó el tubo en hielo por 3-5 min. Se centrifugó el lisado bacteriano a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Se agregó un volumen de fenol:cloroformo mezclando ambas fases (orgánica y acuosa) por vortex y se centrifugó la emulsión a 14,000 rpm por 2 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo. Se precipitó el DNA plasmídico desde el sobrenadante añadiendo 2 volúmenes de etanol a temperatura ambiente. Se mezcló por vortex y se mantuvo la mezcla por 2 minutos en posición vertical a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos a 4°C para obtener un precipitado de DNA plasmídico. Se eliminó el sobrenadante como se describe en el paso 3. El tubo se mantuvo en posición invertida sobre papel absorbente para permitir que saliera todo el fluido. Se añadió 1 ml de etanol al 70% a la pastilla e invirtió el tubo varias ocasiones. Se centrifugó a 14,000 rpm por 2 minutos a 4°C para recuperar el DNA plasmídico. Nuevamente, se eliminó todo el sobrenadante como se describe en el paso 3. Se eliminó cualquier residuo de etanol y se dejó el tubo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol se evaporó (10-15 minutos) y no hubo residuos visibles en el tubo. Se disolvió el DNA plasmídico en 50 µl de amortiguador TE con 20 µg/µl de RNAsa A. Se mezcló suavemente por vortex por un par de segundos y se almacenó a -20°C.

#### **4.2.2.2. Preparación de DNA plasmídico por lisis alcalina con SDS: Midipreparación**

Se inocularon 10 ml de medio LB, con el antibiótico respectivo, con la bacteria transformada. El cultivo se incubó toda la noche a 37°C a con agitación vigorosa (180 rpm). Para asegurarse que el cultivo estuviera lo suficientemente aireado, se cuidó que el volumen del tubo de cultivo fuera cuando menos 4 veces mayor que el volumen del cultivo y que la agitación fuera vigorosa. El cultivo se transfirió en un tubo de 15 ml y se centrifugó a 2000 g por 10 min a 4°C para formar la pastilla bacteriana. El medio se eliminó por aspiración y se dejó la pastilla bacteriana lo más seca posible. La pastilla se resuspendió en 0.25 volúmenes del cultivo original en amortiguador STE frío y se centrifugó otra vez. Nuevamente se resuspendió en 200 µl de Solución de lisis alcalina I por agitación vigorosa en vortex. Se añadieron 400 µl de Solución de lisis alcalina II recién preparada a cada suspensión bacteriana. El tubo se cerró herméticamente y se mezcló todo el contenido invirtiendo el tubo 5 veces rápidamente y se mantuvo en hielo. Se añadieron 150 µl Solución de lisis alcalina III

fría y se distribuyó toda la solución a través del lisado bacteriano viscoso invirtiendo el tubo varias veces. El tubo se almacenó en hielo por 3-5 min y se centrifugó el lisado bacteriano a 14,000 rpm por 5 min a 4°C. Después, 600 µl del sobrenadante se transfirieron a un tubo nuevo. Se añadió un volumen de fenol:cloroformo, se mezclaron ambas fases (orgánica y acuosa) por vortex y se centrifugó la emulsión a 14,000 rpm por 2 minutos a 4°C. La fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó el DNA plasmídico desde el sobrenadante añadiendo 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente. La solución se mezcló por vortex y luego se mantuvo la mezcla por 2 min en posición vertical a temperatura ambiente. Para obtener un precipitado de DNA plasmídico se centrifugó a 14,000 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante como se describe en el paso 3. Para permitir que saliera todo el fluido, se mantuvo el tubo en posición invertida sobre papel absorbente. Para recuperar el DNA plasmídico se añadió 1 mL de etanol al 70% a la pastilla y centrifugar a 14,000 rpm por 2 min a temperatura ambiente. Nuevamente, se eliminó todo el sobrenadante como se describe en el paso 3. Todo residuo de etanol se eliminó cuidadosamente y el tubo se mantuvo abierto a temperatura ambiente hasta que el etanol restante se evaporó (10-15 min). El DNA plasmídico se disolvió en 100 µl de amortiguador TE (pH 8.0 y con 20 µg/µl de RNAsa A) y se almacenó a -20°C.

#### **4.2.3. Extracción de DNA genómico de *C. uda***

La extracción de DNA genómico se realizó con el *kit* “DNA easy blood and tissue” de Qiagen. Se centrifugaron 1.5 ml de cultivo a 5000 xg por 10 min y se desechó el sobrenadante. La pastilla bacteriana se resuspendió en 180 µl de “Enzymatic lysis buffer”. La pastilla ya resuspendida se incubó a 37 °C por al menos 30 min. Se añadieron 25 µl de proteinasa K y 200 µl de amortiguador AL y se mezcló por vórtex. Se incubó a 56 °C por 30 min. Posteriormente, se añadieron 200 µl de etanol 96-100% a la muestra y se mezcló totalmente por agitación en vórtex. Se transfirió la mezcla a la columna de adsorción insertada en un tubo de colecta de 2 ml. Se centrifugó a  $\geq 6000$  xg por 1 min y se desechó el sobrenadante colectado junto con el tubo de colecta. La columna se insertó en un nuevo tubo de colecta de 2 ml y se añadieron 500 µl de amortiguador AW1 y se centrifugó por 1 min a  $\geq 6000$  xg. Se desechó el sobrenadante colectado junto con el tubo de colecta. La columna se insertó en un nuevo tubo de colecta de 2 ml y se añadieron 500 µl de amortiguador AW2 y se centrifugó

por 3 min a 20,000 xg para secar la membrana de la columna. Se desechó el sobrenadante colectado junto con el tubo de colecta. La columna se insertó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se añadieron 200 µl de amortiguador AE directamente en la membrana de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y posteriormente se centrifugó por 1 min a  $\geq 6000$  xg para eluir el DNA genómico.

#### **4.2.3. Purificación y caracterización bioquímica de la $\beta$ -manosidasa expresada en *E. coli*.**

##### **4.2.3.1. Inducción de la expresión $\beta$ -manosidasa.**

La inducción se realizó bajo los siguientes pasos y se basó en el manual “The QIAExpressionist” de Qiagen.

Se cultivó la cepa *E.coli* M15 con la construcción pQE-30Xa-*manA* en agar LB suplementado con ampicilina a una concentración de 200 µg/ml y kanamicina a una concentración de 30 µg/ml durante 18 h, a 37°C y 180 rpm. Con estas colonias se inocularon 50 ml de medio LB líquido suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y kanamicina a una concentración de 30 µg/ml, en un matraz bafleado, a 37 °C y 180 rpm durante 18 h. Del inóculo anterior, se tomaron 10 ml del cultivo y se inoculó 1 l de medio LB líquido suplementado con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y kanamicina a una concentración de 30 µg/ml en un matraz bafleado a 37°C y 180 rpm hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub>= 0.6. En este punto se agregó IPTG a una concentración final de 1 mM. El cultivo se incubó a 30 °C por 5 h y 120 rpm.

##### **4.2.3.2. Pruebas de solubilidad.**

La pastilla de los cultivos inducidos se resuspendió en amortiguador de lisis, en una proporción de 1 ml de amortiguador por cada 20 ml del cultivo original. Se adicionó inhibidor de proteasas PMSF a una concentración final de 0.1 mM. Se agregaron 10 µl de lisozima (10

mg/ml) por cada 1 ml de amortiguador de lisis. Se incubó a 4 °C durante 30 min. Se centrifugó a 8,000 rpm durante 20 min. A 50 µl del sobrenadante se le adicionaron 100 µl de amortiguador de muestra y 5 % de β-mercaptoetanol, para su posterior análisis en SDS-PAGE. La pastilla se resuspendió en amortiguador de lisis. A 50 µl de esta muestra se le adicionaron 100 µl de amortiguador de muestra y 5 % de β-mercaptoetanol, para su posterior análisis por SDS-PAGE.

#### **4.2.3.3. Ensayo de actividad de la β-manosidasa.**

La actividad de β-manosidasa se determinó en la fracción soluble del lisado bacteriano de células de *E. coli* M15 pREP4 transformadas con la construcción pQE30Xa-man, previamente inducidas con IPTG 1 mM. La mezcla de reacción enzimática contenía 400 µl de *p*-nitrofenyl-β-D-manopiranosido disueltos en amortiguador de fosfato de sodio (1 M, pH 7) y 100 µl de la muestra de enzima. La mezcla se incubó a 37 °C durante 20 min y la reacción se detuvo agregando 200 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1 M). La liberación de *p*-nitrofenol se midió por Absorbancia a una λ=405 nm (A<sub>405nm</sub>), utilizando una absortividad molar de 18,000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. Una unidad es definida como los µM liberados de *p*-nitrofenol por ml/min.

#### **4.2.3.4. Purificación de la β-manosidasa.**

La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad a níquel con columna “Ni-Sepharose” de BioRad, utilizando un equipo de purificación con bomba peristáltica capaz de generar gradientes y un colector de muestra de BioRad bajo el siguiente programa de purificación:

- 1) Equilibrio de la columna con 5 volúmenes de amortiguador A, a un flujo de 1 ml/min.
- 2) Inyección de la muestra a un flujo de 0.5 ml/min.
- 3) 5 volúmenes de amortiguador A, a un flujo de 1 ml/min.
- 4) Gradiente: 5 volúmenes de amortiguador A/amortiguador B a un flujo de 0.5 ml/min.
- 5) Lavado 1: 2 volúmenes de amortiguador B a un flujo de 1 ml/min.
- 6) Lavado 2: 1 volumen de amortiguador A a un flujo de 1 ml/min.

7) Paso final: 1 volumen de amortiguador A a un flujo de 1 ml/min.

#### 4.2.4. Amplificación por PCR a partir de DNA genómico de *C. uda*

La mezcla y las condiciones para la amplificación del gen por PCR se muestran en la **Tabla 5**.

**Tabla 5. Condiciones para la PCR a partir de DNA genómico.**

<b>Condiciones</b>			
<b>Buffer 10x</b>	10 µl		
<b>Sol. Q</b>	20 µl	Activación	5 m 95°C
<b>DNTP's</b>	2 µl	Desnaturalización	1 m 94°C
<b>Primer Man-D2</b>	2 µl	Alineamiento	1 m 65-75°C
<b>Primer Man-R2</b>	2 µl	Extensión	2:45 s 72°C
<b>Taq Plus</b>	0.5 µl	Paso final	10 m 72°C
<b>H2O</b>	61.5 µl	30 ciclos	
<b>DNA</b>	2 µl		
<b>Total</b>	100 uL		

#### 4.2.5. PCR a partir de DNA plasmídico

Con el fin de clonar el gen *manA* a partir de la construcción realizada por Ortega-Licona (2011) se realizó una PCR usando como molde el DNA plasmídico de *E. coli* M15 que contiene la construcción pQE30X-*manA*. Para ello se utilizó DNA plasmídico purificado y los oligonucleótidos mencionados en la sección 4.1.2. La mezcla y las condiciones de la PCR para la amplificación del gen se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Condiciones de la PCR a partir de DNA plasmídico.**

<b>Condiciones</b>			
<b>Amortiguador 10x</b>	10 µl		
<b>Sol. Q</b>	20 µl	Activación	5 min, 95 °C
<b>DNTP's</b>	2 µl	Desnaturalización	1 min, 94 °C
<b>Primer Man- EXD1</b>	2 µl	Alineamiento	1 min, 65-75 °C
<b>Primer Man-EXR1</b>	2 µl	Extensión	2.75 min, 72 °C
<b>Taq Plus</b>	0.5 µl	Paso final	10 min, 72 °C
<b>H2O</b>	61.5 µl	30 ciclos	
<b>DNA</b>	2 µl		
<b>Total</b>	100 uL		

#### 4.2.6. Purificación de DNA a partir de agarosa de bajo punto de fusión

La banda de interés se purificó a partir de agarosa bajo punto de fusión al 0.8% mediante el empleo del *kit* “GEL EXTRACTION” (Qiagen), de acuerdo al siguiente procedimiento:

El fragmento de DNA de interés se cortó del gel de agarosa de bajo punto de fusión. El gel se pesó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se adicionaron tres volúmenes de amortiguador QG por cada volumen del gel. El tubo se incubó a 50 °C por 10 min. Se mezcló cada 2 minutos. Se adicionó un volumen de isopropanol y se mezcló. Se vertió el sobrenadante en una columna de adsorción de 1 ml. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min en un volumen máximo de 800 µl. Se decantó el eluido. Se repitió del paso anterior hasta filtrar la totalidad del volumen de la muestra. Se lavó la columna de adsorción con 750 µl de amortiguador PE. Se centrifugó a 12,000 rpm por 1 min. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. Se colocó la columna en un tubo de microcentrífuga estéril de 1.5 ml. Se adicionó el amortiguador de elución EB en el centro de la membrana en un volumen de 20 a 50 µl. Se centrifugó a 13,000 rpm por 1 min. El DNA eluido se almacenó a –20 °C hasta su uso. La eficiencia de la extracción se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

#### 4.2.7. Ligación en el vector pJETt1.2

La ligación del DNA obtenido a partir de la purificación desde agarosa de bajo punto de fusión con extremos cohesivos y romos se llevó a cabo de la siguiente manera.

##### 4.2.7.1. Para los extremos cohesivos

Se preparó la mezcla de reacción en hielo, tal como se presenta en la **Tabla 7**:

Tabla 7. Componentes para la ligación en pJET con extremos cohesivos.

Componente	Cantidad
Buffer de reacción 2X	10 µl
Producto de PCR	1 µl
Agua libre de nucleasas	6 µl
Enzima DNA blunting	1 µl

La mezcla se centrifugó por 3-5 s, posteriormente se incubó a 70 °C y se enfrió en hielo. La mezcla de reacción se mantuvo en hielo y se agregaron los componentes que se muestran en la **tabla 8**:

**Tabla 8. Componentes para la ligación en pJET con extremos cohesivos.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Vector pJET1.2	1 µl
T4 DNA ligasa	1 µl

La mezcla de ligación se incubó a 22 °C por 30 min.

#### **4.2.7.2. Para los extremos romos**

Se preparó la mezcla de la reacción en hielo, tal como se presenta en la **Tabla 9**:

**Tabla 9. Componentes para la ligación en pJET con extremos romos.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Buffer de reacción 2X	10 µl
Producto de PCR	1 µl
Vector pJET1.2	1 µl
Agua libre de nucleasas	7 µl
T4 DNA ligasa	1 µl
Volumen total	20 µl

Se incubó la mezcla de ligación a 22 °C por 30 min. La mezcla de ligación se utilizó directamente para la transformación.

#### **4.2.8. Preparación de células competentes**

La preparación de células competentes se presenta a continuación:

Se inocularon 0.5 ml. de un inóculo en 50 ml de medio LB. Se crecieron las células con

agitación a 37 °C hasta que llegaron a una densidad óptica de 0.6 a una longitud de onda de 600 nm. Se enfrió el cultivo en hielo por 10 min, se centrifugó la suspensión celular a 6,000 xg a 4 °C por 5 min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en la mitad del volumen original de una solución fría y estéril de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8. Se incubaron durante 15 min en hielo y después se centrifugó la suspensión a 6,000 xg por 5 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1/15 del volumen original de la solución fría y estéril de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8. Se repartieron alícuotas de 50 µl en tubos pre-enfriados y se almacenaron a -70 °C.

#### **4.2.9. Transformación de células competentes *E. coli* DH5α por choque térmico.**

Se descongelaron los tubos necesarios de células competentes desde -70°C en hielo y se calentaron a temperatura ambiente. Se añadió 1-2 µl de mezcla de reacción por tubo de células competentes. Se mezcló ligeramente y se incubó en hielo por 5 min. El tubo se pasó a 42 °C por 30-90 segundos sin agitar y posteriormente se incubó en hielo por dos minutos. Se añadieron 250 µl de medio SOC a temperatura ambiente por tubo y se dejó incubando a 37 °C por 3 h para finalmente sembrar cajas Petri con medio LB con agar y ampicilina (100 µg/ml).

#### **4.2.10. Transformación de células competentes *E. coli* DH5α por electroporación.**

Se descongelaron las células en hielo. Para cada muestra a ser transformada por electroporación se utilizó un tubo de 1.5 ml y una cubeta de electroporación de 0.1 cm. En el tubo que se mantuvo en frío, se mezclaron 40 µl de las células electrocompetentes con 1-2 µl de DNA. El DNA debe estar disuelto en un buffer de baja fuerza iónica, como TE o en H<sub>2</sub>O. Se mezcló e incubó por 1 min en hielo. Se seleccionó la opción “Ec1” para *E. coli*. La mezcla de células y DNA se transfirió a la cubeta y se pasó la mezcla hasta el fondo de la misma. Y la cubeta se pasó a la cámara de la electroporación hasta ponerse entre los electrodos y dar el pulso eléctrico. Inmediatamente se sacó la cubeta de la cámara de electroporación y rápidamente se añadió 1 ml de medio SOC a la cubeta. Rápida y suavemente se resuspendieron las células, ya que se ha observado que el periodo entre aplicar el pulso y

añadir el medio es crucial para la recuperación de transformantes de *E. coli*. (Dower *et al.* 1998). Se transfirió la mezcla a un tubo de 15 ml y se incubó a 37 °C por 3 h a 180 rpm.

#### 4.2.11. Expresión de la $\beta$ -manosidasa en *P. pastoris*

Para generar la secuencia de nucleótidos del gen con codones optimizados, se utilizó la herramienta “Translate tool” de ExPASy ([http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna\\_aa](http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa))

##### 4.2.11.1 Ligación en pGAPZ $\alpha$ B

Ligación con la enzima T4 DNA ligasa

En un tubo de 1.5 ml se realizó la mezcla de acuerdo a la **Tabla 10**.

**Tabla 10. Componentes para la ligación en pGAPZ $\alpha$ B.**

<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
Buffer 10x	2 $\mu$ l
pGAPz	50 ng
Inserto de DNA	37.5 ng
Agua libre de nucleasas	Hasta 17 $\mu$ l
T4 DNA ligasa	1 $\mu$ l
Volumen total	20 $\mu$ l

La reacción se mezcló pipeteando todo el volumen y centrifugando un par de segundos. Se incubó a 16 °C por 2 h y se inactivó por calor a 65 °C por 10 min. Finalmente, la mezcla se enfrió en hielo y se utilizaron 1-5  $\mu$ l en 50  $\mu$ l de células competentes.

##### 4.2.11.2 Transformación de *P. pastoris* por electroporación

*P. pastoris* se cultivó en 5 ml de medio YPD en un tubo cónico de 50 ml a 30 °C toda la noche. En un matraz de 2 l se inocularon 500 ml de medio fresco con 0.1-0.5 ml del pre-inóculo y se mantuvo toda la noche hasta lograr una D.O. de 1.3-1.5 a 600 nm. Las células se centrifugaron a 1500  $xg$  por 5 min a 4 °C. La pastilla

resultante se resuspendió con 500 ml de agua a 0 °C. Una vez más, las células resuspendidas se volvieron a centrifugar y la pastilla resultante se resuspendió en 250 ml de agua a 0 °C. Se centrifugaron las células nuevamente y la pastilla resultante se resuspendió ahora en 20 ml de agua fría a 0 °C con sorbitol 1 M. Se centrifugaron las células por última ocasión y la pastilla resultante se resuspendió en 1 ml de agua a 0 °C con sorbitol 1 M para un volumen final de 1.5 ml. Estas células se mantuvieron en hielo hasta su uso en el mismo día. Se mezclaron 80 µl de las células del paso anterior con 5-10 µg de DNA linearizado, que se encuentra en 5-10 µl de agua estéril, y se mantuvo en el vaso de electroporación a 0 °C. El vaso de electroporación se incubó con las células por 5 min y se realizaron los pulsos necesarios para la transformación. Inmediatamente se añadió 1 ml de sorbitol 1 M enfriado en hielo al vaso de electroporación y el contenido se transfirió a un tubo de 15 ml estéril. Se incubó el tubo a 30 °C sin agitar por 1-2 h y a partir de este tubo, se sembraron 10, 25, 50, 100 y 200 µl del resultado de la transformación en cajas Petri con YPDS con 100 µg/ml de Zeocina. Las cajas se incubaron por 2-3 días a 30 °C hasta que hubo crecimiento de colonias. Se picaron 10 colonias y se transfirieron a medio YPD con 100 µg/ml de Zeocina.

#### 4.2.11.3. Evaluación de colonias transformadas por PCR a partir de colonia

Para verificar si las cepas que mostraron crecimiento tenían la construcción dentro de su genoma, se realizó una PCR a partir de colonia bajo las siguientes condiciones que se muestran en la **Tabla 11**.

**Tabla 11. Condiciones de la PCR Colonia desde *Pichia pastoris*.**

Condiciones			
HotStarTaq Master Mix	50 µl	Activación	15 min, 95 °C
Primer Man-EXD1	2 µl	Desnaturalización	1 min, 94 °C
Primer Man-EXR1	2 µl	Alineamiento	1 min, 64 °C
H2O	46 µl	Extensión	3 min, 72 °C
Total	100 µL	Paso final	10 min, 72 °C
			35 ciclos

# Capítulo 5

## Resultados y discusión

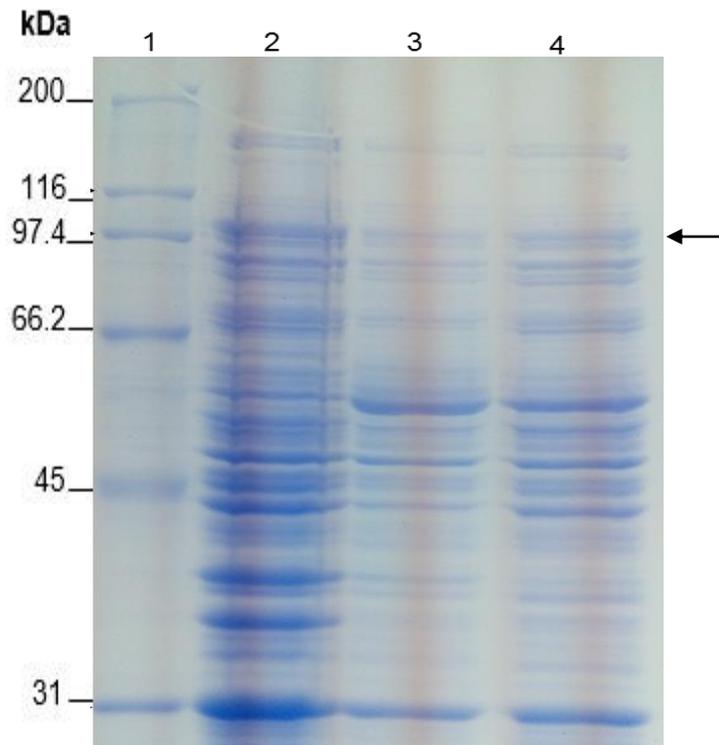
## Resultados

### 5.1. Purificación y caracterización de la $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas uda* expresada en *E. coli*.

Con el fin de caracterizar las propiedades bioquímicas de la  $\beta$ -manosidasa ManA de *C. uda* expresada en *E. coli*, esta se expresó en células de *E. coli* M15/pREP4 transformadas con la construcción pQE30Xa-*manA*, la cual fue obtenida por Ortega-Licona (2012). Posteriormente, se preparó la fracción soluble para ser purificada mediante cromatografía de afinidad a Níquel. Las fracciones que presentaron mayor actividad se colectaron para su análisis.

#### 5.1.1 Expresión y purificación de la $\beta$ -manosidasa de *C. uda* expresada en *E. coli*.

La enzima ManA se expresó en células de *E. coli* M15/pREP4 transformadas con la construcción pQE30Xa-*manA*, por inducción con IPTG 1 mM. La inducción de la  $\beta$ -manosidasa recombinante se siguió por análisis del perfil proteico de las fracciones solubles, antes y después de la inducción con IPTG, por SDS-PAGE en geles al 10%. Esto permitió identificar la sobreexpresión de una banda de 94 kDa, de acuerdo al peso esperado, después de las 5 y 10 h de inducción (**Figura 14**).

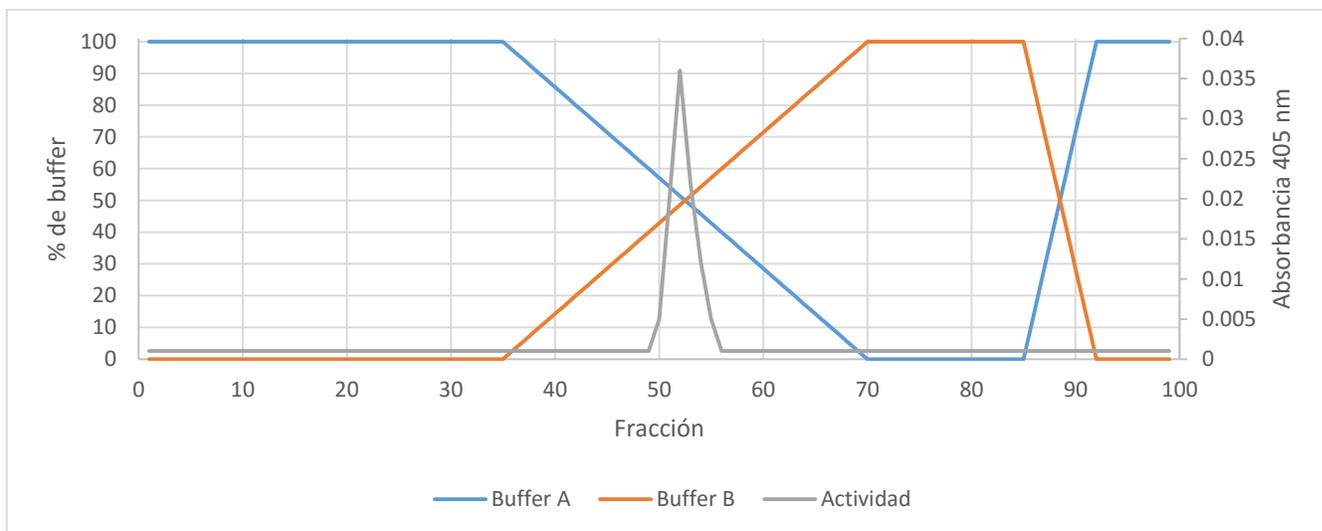


**Figura 14.** Análisis electroforético de las fracciones solubles después de la inducción con IPTG 1mM. Carril 1. Marcador de PM. Carril 2. Sin inducción. Carril 3: Inducción con IPTG por 5 h. Carril 4: Inducción con IPTG por 10 h.

En la inducción se esperaba una banda de 94 kDa más intensa que en la fracción soluble, sin embargo, sólo se observó un ligero aumento.

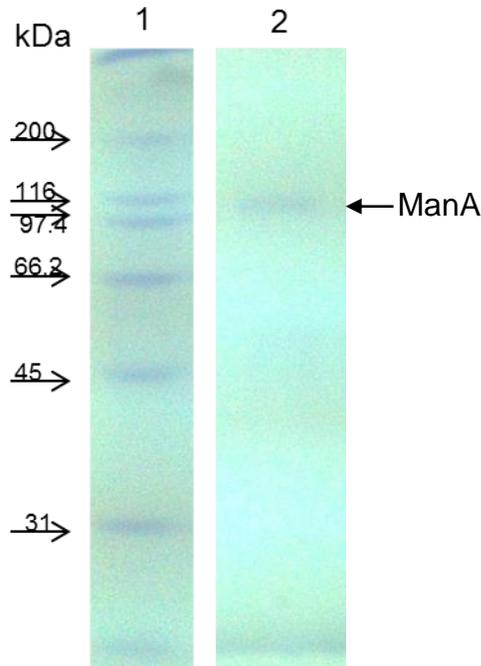
Posteriormente a la inducción, se prosiguió a la purificación por medio de la cromatografía de afinidad a níquel. El vector pQE30-Xa, utilizado para obtener la construcción pQE30Xa-*manA*, contiene secuencias codificantes para una cola de histidinas, la cual se adiciona a las enzimas recombinantes expresadas con este vector. Por tanto, la presencia de esta cola de histidinas se aprovechó para purificar la  $\beta$ -manosidasa recombinante por cromatografía de afinidad al níquel. La  $\beta$ -manosidasa recombinante, con un PM estimado de 94 kD, se eluyó de la columna con un gradiente lineal de 20-300 mM de imidazol.

Las fracciones obtenidas se analizaron por concentración de proteína, determinada por Absorbancia a 280 nm, y por análisis de actividad  $\beta$ -manosidasa utilizando *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido como sustrato, de acuerdo al ensayo de actividad de la  $\beta$ -manosidasa descrito en la sección de Materiales y Métodos. El cromatograma obtenido se muestra en la **Figura 15**.



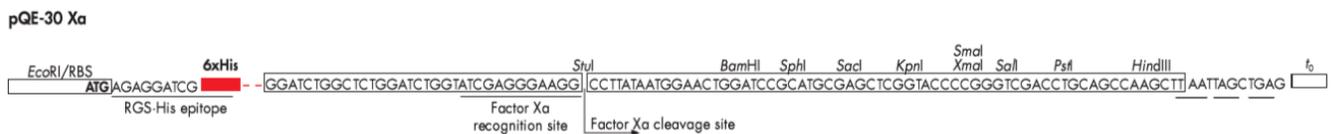
**Figura 15. Cromatograma de la purificación de la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* por cromatografía de afinidad a níquel. La cromatografía se llevó a cabo con amortiguador de fosfatos 0.2 M, NaCl 300 mM. Las proteínas se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol (20 a 500 mM) en amortiguador de fosfatos 0.2 M, NaCl 300 mM.**

Se obtuvo un pico de actividad a concentración aproximada de 270 mM de imidazol. Posteriormente, se realizó un análisis por SDS-PAGE para verificar el PM de la proteína (**Figura 16**).



**Figura 16. Análisis electroforético por SDS-PAGE de la proteína purificada. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2: Proteína purificada con un peso teórico aproximado de 94 kDa**

Se esperaba una banda de aproximadamente 94 kDa correspondiente a la  $\beta$ -manosidasa recombinante, aunque se observó una banda en una posición más arriba de lo esperado. Esto posiblemente debido a que el vector pQE-30Xa agrega a la enzima recombinante una metionina como iniciador de la traducción, 6 residuos de histidina y su epítipo y un sitio de reconocimiento para proteasas “Factor Xa”, agregando un total de 27 aminoácidos (aprox. 3 kDa) a la enzima recombinante, aumentando su peso molecular a 97 kDa aproximadamente. Los elementos que se añaden a la enzima recombinante se muestran en la **Figura 17**.



**Figura 17. Elementos añadidos a la enzima recombinante por el vector pQE-30 Xa**

### 5.1.2. Caracterización bioquímica de la $\beta$ -manosidasa recombinante.

Con el fin de caracterizar bioquímicamente a la  $\beta$ -manosidasa, se determinaron: pH óptimo, temperatura óptima, termoestabilidad, los parámetros cinéticos  $K_M$ , y  $V_{max}$ , y el efecto de iones metálicos sobre la actividad de la enzima, mediante el ensayo de actividad descrito en la sección 4.2.12.3, y por triplicado.

#### 5.1.2.1 pH óptimo

Para medir el valor de pH óptimo, se utilizó el buffer fosfatos a una concentración de 200 mM. El ensayo de actividad se realizó en un intervalo de pH de 3 a 8. Dentro de este análisis, se obtuvo una actividad máxima a un pH de 5.5, como se observa en la **Figura 18**.

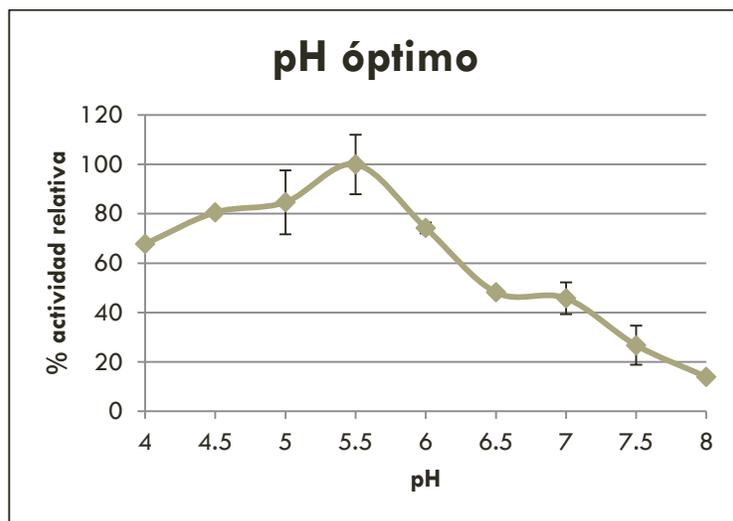


Figura 18. Actividad de la  $\beta$ -manosidasa a diferentes valores de pH.

Este valor es acorde a otros reportes de  $\beta$ -manosidasas de otras especies encontradas en la literatura tal como se muestra en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Valores de pH óptimo de  $\beta$ -manosidasas de otras especies.

Organismo	pH óptimo	Referencia
<i>Aspergillus sulphureus</i>	2.4	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Trichoderma reesei</i>	3.5	Kulminskaya <i>et al.</i> , 1999
<i>Solanum lycopersicum</i> (Tomate)	5.0	Mo <i>et al.</i> , 2002
<i>Thircosporon cutaneum</i>	6.5	Oda <i>et al.</i> , 1996
<i>Phlebia radiata</i> (Hongo)	5.5	Prendecka <i>et al.</i> , 2007
<i>Cellulomonas uda</i> (extracto crudo)	7.0	Pavón-Orozco, 2007
<i>Thermotoga neapolitana</i>	7.7	Parker <i>et al.</i> , 2001
<b><i>Cellulomonas uda</i> (enzima recombinante purificada)</b>	<b>5.5</b>	<b>Este trabajo</b>

La mayor parte de las enzimas con un pH óptimo similar al de la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* son enzimas pertenecientes al reino de las plantas (BRENDA). Cabe destacar que las enzimas reportadas en la literatura hasta la fecha, tienen pH óptimos que van desde 2.4 hasta 7.7. Este resultado no es muy similar al obtenido de la  $\beta$ -manosidasa nativa en el trabajo de Pavón-Orozco (2007) en el cual se trabajó con la fracción soluble de un lisado celular de *C. uda*, y a partir del cual se observó un pH óptimo de 7.

#### 5.1.2.2. Temperatura óptima.

Dentro de este análisis, se analizó la actividad de la  $\beta$ -manosidasa en un intervalo de temperaturas de 30 a 70 °C. Se obtuvo una actividad máxima a una temperatura de 55 °C como se observa en la **Figura 19**. ManA retuvo más del 40% de su actividad en el rango de actividad de 50-60 °C decreciendo hasta cerca de un 20% de actividad a temperaturas de hasta 70 °C.

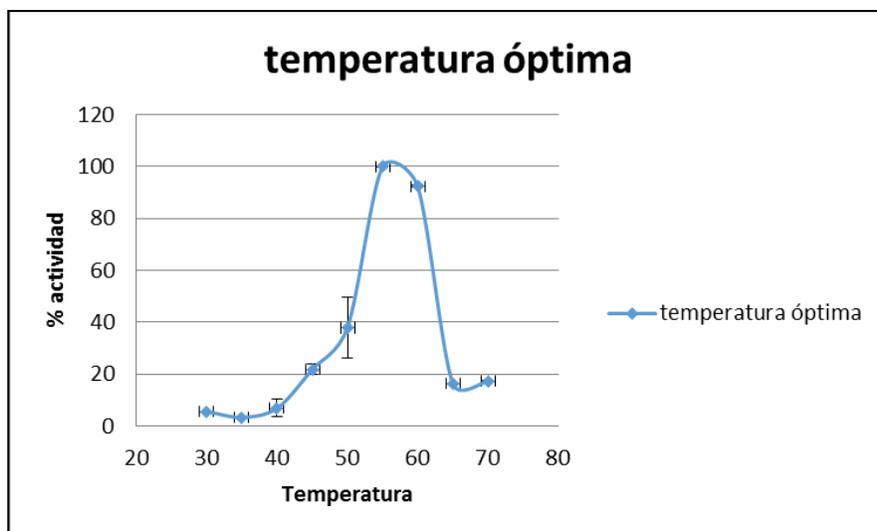


Figura 19. Actividad de la  $\beta$ -manosidasa ManA a diferentes temperaturas.

La temperatura óptima mostrada por ManA recombinante es similar a temperaturas óptimas de  $\beta$ -manosidasas de *Cellulomonas fimi*, sin embargo, se tienen enzimas más termoestables como las de las especies *Aspergillus niger* (70°C) y *Thermotoga neapolitana* (87°C) como se muestra en la **Tabla 13**.

Tabla 13. Temperatura óptima de  $\beta$ -manosidas de otras especies.

Organismo	Temperatura óptima (°C)	Referencia
<i>Homo sapiens</i> .	37	Samra <i>et al.</i> , 2008
<i>Solanum lycopersicum</i>	40	Mo <i>et al.</i> , 2002
<i>Bacillus</i> sp.	50	Akino <i>et al.</i> , 1988
<i>Cellulomonas uda</i>	50	Pavón-Orozco, 2007
<i>Cellulomonas fimi</i>	55	Stoll <i>et al.</i> , 1999
<i>Aspergillus niger</i>	70	Ademark <i>et al.</i> , 1999
<i>Thermotoga neapolitana</i>	87	Parker <i>et al.</i> , 2001
<b><i>Cellulomonas uda</i></b>	<b>55</b>	<b>Este trabajo</b>

Cabe destacar que la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* tiene una temperatura óptima igual

que *Cellulomonas fimi* y similar a los resultados de la  $\beta$ -manosidasa nativa de *C. uda* de Pavon-Orozco (2007).

### 5.1.2.3 Termoestabilidad.

Dentro del análisis de la termoestabilidad, se midió la actividad de la enzima a temperaturas de 40 a 60 °C, en intervalos de 10 °C, obteniendo los siguientes resultados que se muestran en la **Figura 20**.

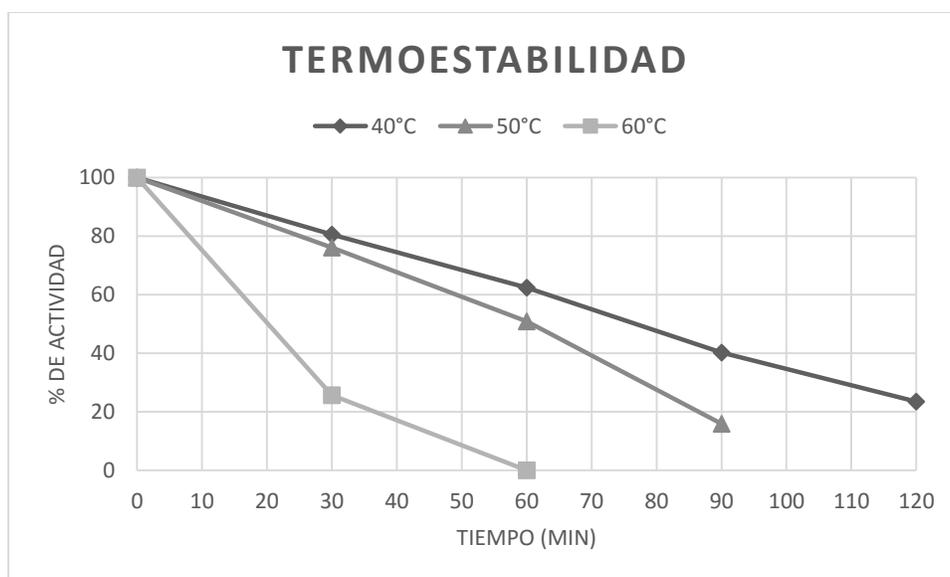


Figura 20: Termoestabilidad la  $\beta$ -manosidasa de *Cellulomonas uda*

Dentro de estos resultados se observó que a 50 y 60 °C la  $\beta$ -manosidasa pierde el 50% de la actividad inicial ( $t_{1/2}$ ) en un tiempo de 60 minutos. A 40 °C la enzima presentó una  $t_{1/2}$  de 80 minutos aproximadamente.

Comparando estos resultados con los reportados en la literatura, se observa que en temperaturas cercanas a la temperatura óptima de la enzima, tienen un bajo porcentaje de actividad relativa. Cabe destacar el ejemplo de *A. sulphureus* donde a 40 y 60 °C se pierde toda la actividad a los 30 min y en el otro extremo al ejemplo de *Thermotoga neapolitana* con una vida media de 18 horas a 85°C. (Tabla 14).

Tabla 14. Termoestabilidad de  $\beta$ -manosidasas de otras especies.

Organismo	Intervalo ( $^{\circ}\text{C}$ )	Observación	Referencia
<i>Bacillus</i> sp.	40-60	40 $^{\circ}\text{C}$ : 55% de actividad máxima por 60 min 60 $^{\circ}\text{C}$ : 65% de actividad máxima por 60 min.	Akino <i>et al.</i> , 1987
<i>Aspergillus sulphureus</i>	40-60	Pérdida de actividad a los 30 min.	Chen <i>et al.</i> , 2008.
<i>Thermotoga neapolitana</i>	70-90	85 $^{\circ}\text{C}$ vida media de 18 h.	Duffaud <i>et al.</i> , 1997
<b><i>Cellulomonas uda</i></b>	<b>40-60</b>	<b>Pérdida de 50% de actividad a los 60 min a 40 y 60 <math>^{\circ}\text{C}</math>.</b>	<b>Este trabajo</b>

#### 5.1.2.4. Estabilidad ante iones metálicos.

Para evaluar la estabilidad de la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* en presencia de iones metálicos, se determinó la actividad de la  $\beta$ -manosidasa utilizando los siguientes metales:  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{LiCl}$ ,  $\text{CsCl}_2$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{AgNO}_3$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  y  $\text{CaCl}_2$ , a una concentración final de 5 mM de cada catión, por separado. Se obtuvieron los resultados mostrados en la **Figura 21**.

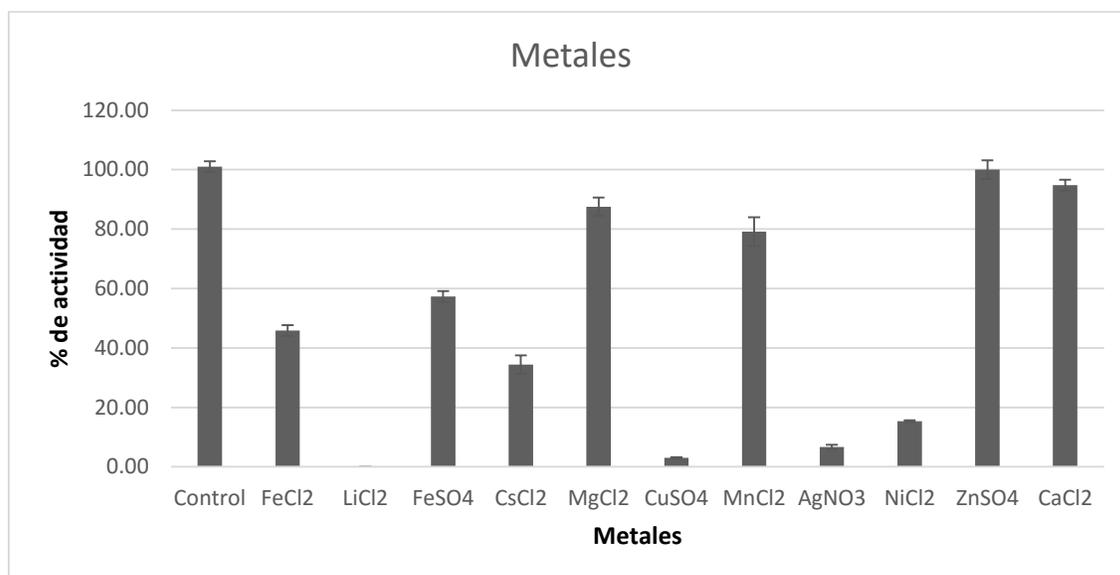


Figura 21. Efecto de iones metálicos sobre actividad de la enzima.

De los iones metálicos utilizados, el ZnSO<sub>4</sub> y el CaCl<sub>2</sub> no mostraron efecto en la actividad de la enzima contrastando con el NiCl<sub>2</sub>, AgNO<sub>3</sub>, CuSO<sub>4</sub> y LiCl<sub>2</sub> que tuvieron un efecto en la actividad reduciendo a menos del 20 % de la actividad comparado con el control.

Comparando los resultados obtenidos con la literatura (**Tabla 15**), se observó que los iones ZnSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub> que no tuvieron efecto inhibitorio en la β-manosidasa de *C. uda*, generaron un aumento en la actividad de la β-manosidasa de *Tremella fuciformis* a una concentración de 0.5 mM, que es una concentración 10 veces menor a la utilizada en este trabajo para evaluar el efecto del ZnSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub> en la β-manosidasa de *C. uda*.

Tabla 15. Iones con efecto en β-manosidasas.

Organismo	Ion	Observación	Referencia
<i>Tremella fuciformis</i>	CaCl <sub>2</sub>	Aumento de actividad en 22 % a 0.5 mM	Sone <i>et al.</i> , 1998
<i>Tremella fuciformis</i>	MgSO <sub>4</sub>	Aumento de actividad en 26 % a 10 mM	Sone <i>et al.</i> , 1998

<i>Tremella fuciformis</i>	ZnSO <sub>4</sub>	Aumento de actividad en 25 % a 0.5 mM	Sone <i>et al.</i> , 1998
<i>Trichoderma reesei</i>	CaCl <sub>2</sub>	Aumento de actividad en 15 % a 12 mM.	Kulminskaya <i>et al.</i> , 1999.
<i>Trichoderma reesei</i>	MnCl <sub>2</sub>	Aumento de actividad en 15 % a 12 mM.	Kulminskaya <i>et al.</i> , 1999.

### 5.1.2.5. $K_M$ y $V_{max}$

Para medir los parámetros cinéticos ( $K_M$  y  $V_{max}$ ) de la  $\beta$ -manosidasa, se midió la actividad a concentraciones finales de sustrato de 1 mM hasta 50 mM. En la **Figura 22** se muestra gráfica de velocidad sobre concentración de sustrato para determinar la  $K_M$  y la  $V_{max}$ .

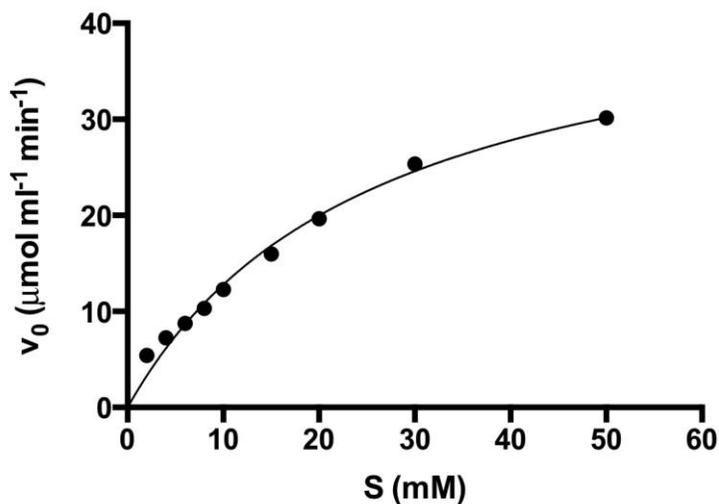


Figura 22: Gráfica de velocidad contra concentración de sustrato.

Con esta gráfica y con el uso del programa PRISM, se pudo determinar una  $K_M$  de 21.18 mM y una  $V_{max}$  de 42.02 mmol/min.

Cabe destacar que la mayoría de los valores de  $K_M$  reportados en la literatura de  $\beta$ -manosidasas de especies, como bacterias y hongos, se encuentra por debajo de 2 mM utilizando el mismo sustrato que se utilizó en los ensayos de actividad. Esta comparación se muestra en la **Tabla 16**.

Tabla 16. Valores de  $K_M$  de otras especies.

Organismo	Sustrato	$K_M$ (mM)	Referencia
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2,4-dinitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido	0.09	Tailford <i>et al.</i> , 2007
<i>Cyamopsis tetragonoloba</i>	o-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido	3	Kaper <i>et al.</i> , 2002
<i>Cellvibrio mixtus</i>	p-nitrofenil- $\beta$ -D-mannopiranosido	6.1	Dias <i>et al.</i> , 2004
<i>Capra hircus</i>	p-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido	9	Frei <i>et al.</i> , 1988
<i>Pyrococcus horikoshii</i>	4-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido	30.4	Elbein <i>et al.</i> , 1997
<b><i>Cellulomonas uda</i></b>	p-nitrofenil- $\beta$ -D-manopiranosido	<b>21.18</b>	<b>Este trabajo</b>

Los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica de la  $\beta$ -manosidasa muestran una enzima con poca actividad comparado con la literatura como se muestra en la **Tabla 8**, una  $K_M$  alta en comparación con otras especies reportadas en la literatura que utilizan el mismo sustrato. Sin embargo, puede llegar a ser cercana a la  $K_M$  de otras especies como *P. horikoshi* que utilizan un sustrato similar.

También muestra una  $V_{max}$  alta en comparación con  $\beta$ -manosidasas de otras especies, a diferencia de *Thermotoga neapolitana*, como se puede ver en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Valores de  $V_{max}$  de otras especies.

Organismo	$V_{max}$ (mmol/min)	Referencia
<i>Thermobifida fusca</i>	5.96	Kukolya <i>et al.</i> , 2003
<i>Aplysia kurodai</i>	3.75	Ojima <i>et al.</i> , 2012
<i>Thermotoga thermarum</i> DSM 5069	227.27	Wang <i>et al.</i> , 2013
<b><i>Cellulomonas uda</i></b>	<b>42.02</b>	<b>Este trabajo</b>

Finalmente, se concluyó la caracterización bioquímica de la enzima con una  $K_M$  de 21.18 mM y una  $V_{max}$  de 42.02 mmol/min, una temperatura óptima de 55 °C y un pH óptimo de 5.5. Esto es similar a los resultados obtenidos por Pavón-Orozco (2007), excepto en el pH óptimo. Cabe señalar que Pavón-Orozco (2007) realizó una caracterización preliminar de la actividad  $\beta$ -manosidasa nativa de *C. uda*, a partir de un lisado celular, asociando la actividad  $\beta$ -manosidasa a una banda con peso molecular estimado de 94 kDa, y observando un máximo de actividad enzimática a un pH óptimo de 7 y a una temperatura óptima de 50 °C. Ya anteriormente, en nuestro grupo de trabajo, se ha observado que los parámetros bioquímicos de una enzima cambian al momento de expresarse en un sistema heterólogo.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo y de acuerdo a observaciones previas realizadas por Ortega-Licona (2011), encontramos que la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* se expresa en *E. coli* como una enzima activa y soluble, pero a un bajo nivel de expresión; mientras que la mayor parte de la enzima se agrega formando cuerpos de inclusión (Ortega-Licona (2011)). En el grupo de trabajo se han solubilizado los cuerpos de inclusión de  $\beta$ -manosidasa, pero la

enzima se degrada fácilmente y resulta difícil su purificación (Santiago-Hernández, comunicación personal).

## 5.2 Expresión del gen de la $\beta$ -manosidasa de *C. uda* en *P. pastoris*

Para la expresión del gen de la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* en *P. pastoris* se clonó el gen a partir de DNA genómico de *C. uda*.

### 5.2.1 Extracción de DNA genómico de *C. uda*.

Para la extracción de DNA genómico de *C. uda* se cultivó bajo las condiciones mencionadas en la sección 4.2.1 y se obtuvo DNA genómico con el *kit* "DNA Tissue & Blood" (**Figura 23**).

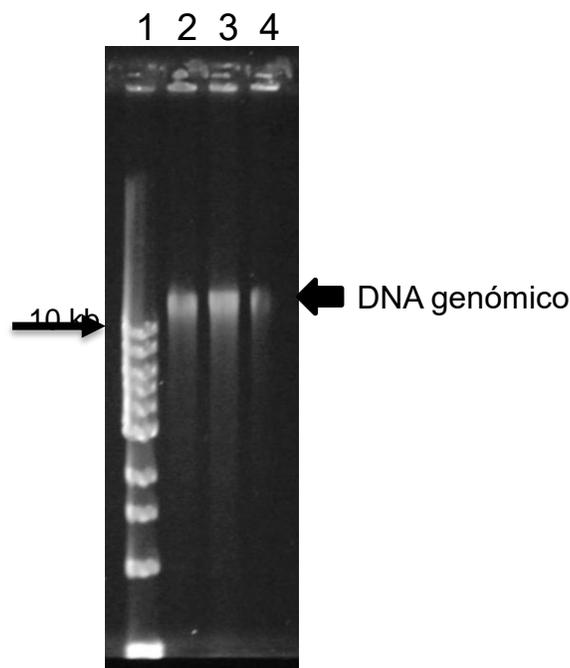
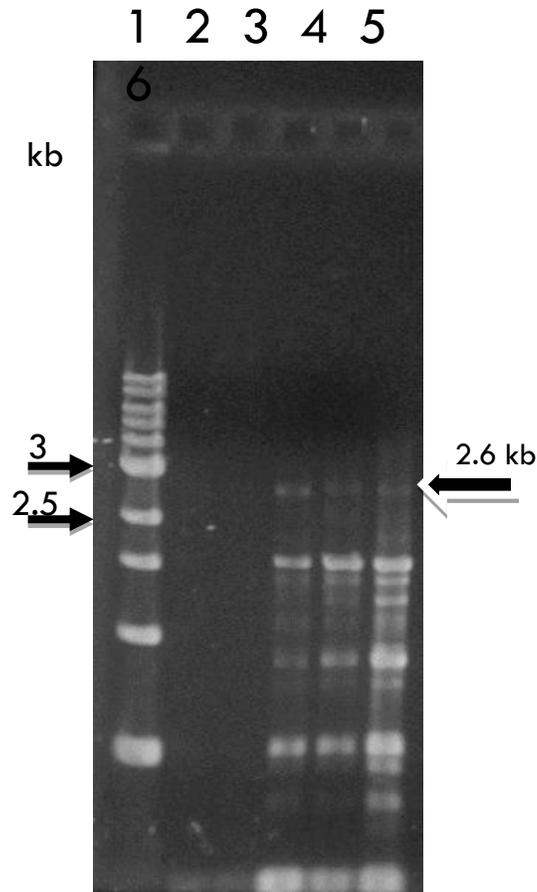


Figura 23. Análisis electroforético del DNA genómico de *C. uda*. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2-4: DNA genómico.

### 5.2.2. PCR a partir de DNA genómico

Con el DNA genómico purificado, se amplificó por PCR el gen de la  $\beta$ -manosidasa utilizando las condiciones mencionadas en la sección 4.2.4 y se obtuvo el siguiente resultado (**Figura 24**).



**Figura 24.** Análisis electroforético de la PCR a partir de DNA genómico de *C. uda*. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2-6: Gradiente de temperaturas 65-75 °C

Se obtuvo una banda del tamaño esperado, sin embargo la amplificación fue no específica ya que se amplificaron fragmentos de otros tamaños. Esto puede deberse principalmente a un contenido de GC del 74% haciendo que se obtuvieran resultados positivos en la PCR a temperaturas mayores que a la que trabaja la polimerasa.

Ante esta problemática se optó por sintetizar el gen con una modificación en la secuencia nucleotídica utilizando codones optimizados para su expresión en *P. pastoris*, sin alterar la secuencia aminoacídica.

La secuencia del gen sintético con codones optimizados para la expresión en *P. pastoris* se muestra continuación dentro de la clonación virtual que incluye a toda la construcción pGAPZ $\alpha$ B-*manA*. La secuencia de la proteína se muestra en aminoácidos, en negritas se resaltan los sitios de corte *Pst*I para el extremo 3' y *Xba*I para el extremo 5' y en subrayado se muestra el péptido señal.

AGATCTTTTTTGTAGAAATGTCTTGGTGTCTCGTCCAATCAGGTAGCCATCTCTGAAATATCTGGCTCCGT  
 TGCAACTCCGAACGACCTGCTGGCAACGTAAAATTCTCCGGGGTAAAACCTTAAATGTGGAGTAATGGAACCA  
 GAAACGTCTCTTCCCTTCTCTCCTTCCACCGCCCGTTACCGTCCCTAGGAAATTTTACTCTGCTGGAGAG  
 CTTCTTCTACGGCCCCCTTGAGCAATGCTCTTCCCAGCATTACGTTGCGGGTAAAACGGAGGTCTGTACC  
 CGACCTAGCAGCCCAGGGATGGAAGTCCCAGCCGTCGCTGGCAATAATAGCGGGCGGACGCATGTCATGA  
 GATTATTGGAAACCACCAGAATCGAATATAAAAAGGCGAACACCTTTCCCAATTTTGGTTTCTCTGACCCAA

1 ATGAGATTTCCTTCA ATTTTTACTGCTGTT TTATTTCGAGCATCC TCCGCATTAGCTGCT CCAGTCAACACTACA  
 1 **M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N T T**  
 76 ACAGAAGATGAAACG GCACAAATTCGGCT GAAGCTGTCATCGGT TACTCAGATTAGAA GGGGATTTCGATGTT  
 26 **T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V**  
 151 GCTGTTTTGCCATT TCCAACAGCACAAAT AACGGGTTATTGTTT ATAAATACTACTATT GCCAGCATTGCTGCT  
 51 **A V L P F S N S T N N G L L F I N T T I A S I A A**  
 226 AAAGAAGAAGGGGTA TCTCTCGAGAAAAGA GAGGCTGAAGCT**TGCA** GGTCAACCACCTGAG CACACACACGATTTG  
 76 **K E E G V S L E K R E A E A A G H H P E H T H D L**  
 301 CCTGACCTGCCGAT GGATGGCTTTTGACA GCTACCGCCGGAACC CCTGGAGACTTGGAT CCAGCTTTGGCTGCC  
 101 **P D L A D G W L L T A T A G T P G D L D P A L A A**  
 376 GCACCTTGCTGCCGA GTCCCAGCAGCTGTT CCTGGTACATCTCAT ACCGCATTGCTTGAT GCTGGTTTGATTCCA  
 126 **A L A A G V P A A V P G T S H T A L L D A G L I P**  
 451 GACCCTTACCTTGAT AGAAACGAAGAGGCA TTGGCTTGGATGAGA CATGTTGATTGGAGA TATGAAAGACCATTG  
 151 **L P Y L D R N E E A L A W M R H V D W R Y E R P L**  
 526 GACGAGCTGCCGCA GCTCACGACGAAAAGA GTTGATTGGCATTG GACGGTATCGATACT GTTGCTACTACATCT  
 176 **D E P A A A H D E R V D L A F D G I D T V A T T S**  
 601 TTGGTTGCTCGTGA GATGCCCATGTTCTT GGTAGAACAGCTAAC CAGCACAGATCCTAC AGATTTCGATGTCAGA  
 201 **L V V A F D A H V L G R T A N Q H R S Y R F D V R**  
 676 GCTTTGGTTGGAAGA GCCGGTACTACTTTG AGAGTTGACCTTGCC TCTGCATTGCATCAC GCTGAAGCCGAAGAG  
 226 **A L V G R A G T T L R V D L A S A L H H A E A E E**  
 751 GCCAGATTGGGTCAT AGACCTCTTGCATAC CCACAACCTTTCAAC ATGGTTAGAAAGATG GCTTGTTCCTTCGGA  
 251 **A R L G H R P L A Y P Q P F N M V R K M A C S F G**  
 826 TGGGACTGGGGTCCA GATTTGCAGACTGCT GGACTTTGGAGACCT GTTAGAGTCGAAAAGA TGGAGAGTCGCAAGA  
 276 **W D W G P D L Q T A G L W R P V R V E R W R V A R**  
 901 TTGGCTCAAGTTAGA CCAGTTGTCACCTTG GGTGCAGATGGAACCT GGTAGAGCTGAATTG CACGTTACAGTCGAG  
 301 **L A Q V R P V V T L G A D G T G R A E L H V T V E**  
 976 AGATCAGGATTGCCA GGTGGAGACGCTCCT CTTACCGTCAGAGCC CAGGTTGCAGGTGTT GTCGCAGTTGCTAGT  
 326 **R S G L P G G D A P L T V R A Q V A G V V A V A S**  
 1051 TTGGCTCCTGATGAA GACGCCGCAACTTTG GTTGTCGAGGTTCCA GATGCTCCTGTCTGG TGCCAGTTGGACAT  
 351 **L A P D E D A A T L G V E V P D A P V W W P V G H**  
 1126 GGTGATCAACCTTTG GTTGATGCTACAGTT ACCCTTGCTGCCGCA GGACATGATGACTTG GGTAGATGGCACAGA  
 376 **G D Q P L V D A T V T L A A A G H D D L G R W H R**  
 1201 AGACTTGGATTAGA GACGTTAGAGTCGAT AGAAACAGAGACGAA CACGTTACTAGATTT ACATTTCGTTGTC AAC  
 401 **R L G F R D V R V D R N R D E H G T R F T F V V N**  
 1276 GGAAGACCAGTTTTTC GTCAGAGGTGCTAAT TGGATTCTCTGATGAC CATTGCTTACCAGA ATCACTAGAAAAGA  
 426 **G R P V F V R G A N W I P D D H L L T R I T R E R**

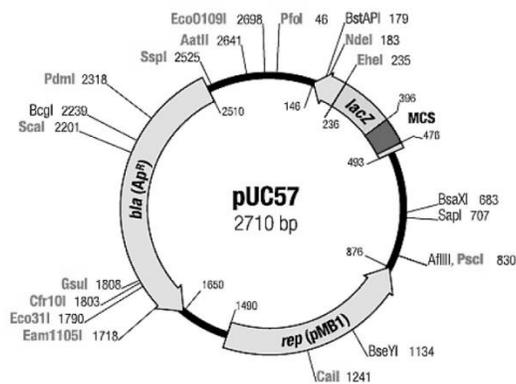
1351 TTGGAGAGAAGAGTT GATCAGGCTCTTGGG GCCACTTGAATTTG CTTAGAGTTTGGGGT GGAGGTATTTACGAA  
451 L E R R V D Q A L G A H L N L L R V W G G G I Y E  
1426 TCTGATGACTTGAT GACGTTTGTGATGAG AGAGGTGTTTGGTC TGGCAAGATTTCTTG CTTGCTTGCCTGCC  
476 S D D L Y D V C D E R G V L V W Q D F L L A C A A  
1501 TACCCAGAAGAGTCC CCTTTGCTTGAAGAG ATCGAAGCCGAGGCA AGAGAAAACGTTGTC AGATTGGCATCTCAT  
501 Y P E E S P L L E E I E A E A R E N V V R L A S H  
1576 GCTTCCTTGGTTCTT TGGAAATGGTGGTAAC GAAAATGTTTGGGGA CACGAGGATTGGGGT TGGAAAGACGAGTTG  
526 A S L V L W N G G N E N V W G H E D W G W K D E L  
1651 GATGGAAGAACTGG GGTTCATAGACACGCT ACAGAATTGCTTCCA GCCGTTGTCGAGAA TTGGACCCATCCAGA  
551 D G R T W G H R H A T E L L P A V V A E L D P S R  
1726 CCATACGCTGACAAC TCACCATATAGTCTT GGATTTGCCCTGAT GAAGTTCATCCAGAT GACCCTGCCTCATGGT  
576 P Y A D N S P Y S P G F A P D E V H P D D P A H G  
1801 ACTCATACCAATGG GAGGTCTGGAACAGA GTTGATTACTCAT TACAGAGATGACGTT CCAAGATTCTGTTCT  
601 T H H Q W E V W N R V D Y T H Y R D D V P R F C S  
1876 GAATTTGGATTCCAA GGTCCACCTACTTGG TCCACTTGGACAAGA GCTGTTAGAGATGAA CAGGGTGCCTTGGTT  
626 E F F G P P F G P P T R A V R D E Q G A R A V  
1951 GTTGATAAGGAGCAT CCTACTTTCTTGGCC CACCAAAAGGCAGAA GATGGAAACGGTAAA CTTGACAGAGGATTG  
651 V D K E H P T F L A H Q K A E D G N G K L D R G L  
2026 GCTCCACATCTTGGT GTTCTGAGGACTTC ACAGATTGGCACTGG GCTACCCAATTGAAT CAGGCTAGAGCCGTT  
676 A P A D N V P E D F T D W H W A T Q L N Q A R A V  
2101 GCATACGCAGCTACC CATCACAGATCATGG TGGCCAAGAAGTCTG GGAAGTGTGTCTGG CAATTGAACGATTGC  
701 A Y A A T H H R S W W P R T A G S V V W Q L N D C  
2176 TGGCCTGTCACTTC TGGGCCGAGTTGAT GGTGACGAAAGAGTC AAACCATTGTGGTGG GCTCTTAGACACGCT  
726 W P V T S W A V R D G D E R V K P L W W A L R H A  
2251 AACGCCCTAGATTG CTTACTGTTCCAGGAG AGAGATGGTCTCCA GTTGTGCGCGTTGTC AATGACACAGCAGAT  
751 N A P R L L T V Q E R D G A P V V A V V N D T A D  
2326 GCTTGGACCGAAGA TTGGCTGTTTCAAGA CAAACATTGACGCGT GACGAAAGAGCCAGT GCAACCTTGGCTGTT  
776 A W T G R L A V S R Q T F D G D E R A S A T L A V  
2401 GATGTCCACCTAGA GAGGTTAGAATTTG CCATTCCTGATGAC GTTGTAGAGCCCAA GACGTGCTAGAGAA  
801 D V P P R E V R I L P L P D D V A R A Q D V A R E  
2476 GCCTTGGTTGTGAGA CTTGATGACGCTTCT TCCGTTCAATTGCTT GCAGAGGATGTTGCT TTGGATCTTGACCCA  
826 A L V L R L D D A S S V H L L A E D V A L D L D P  
2551 GATCCTTTGTGACGA AGTGCTACTCCAGTT CCTGGAGGTTATGCT GTTACCCTCACTGCC AGATCATTGGCAAGA  
851 D P L S A S A T P V P G G Y A V T V T A R S L A R  
2626 GATGTTACTGTCTTG GTTGACAGACTTGAT CCAGTGCCACAGTC GATGACGCTTGGTT GATCTTCTGCGCGT  
876 D V T V L V D R L D P A A T V D D A L V D D L P A G  
2701 GCAAGTGTCACTTTC CACGTTAGAACAGAC GCCGTTTGGACCCA GATGCACTTACTTCT CCACCTGTTTGTAGA  
901 A S V T F H V R T D A V L D P D A L T S P P V L R  
2776 TCCGCTAATGATGTT GTTGTTCAGCCGCC AGACCAGCCGTCGCT TCAGGAGCCCCAGCC GCAGGTAGATGA  
926 S A N D V V V P A A R P A V A S G A P A A G R \*

**TCTAGA**ttACAAAACTCATCTCAGAAGAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGAGTT  
TTAGCCTTAGACATGACTGTTTCTCAGTTCAAGTTGGGCACTTACGAGAAGACCCGGTCTTGCTAGATTCTAAT  
CAAGAGATGTGAGAATGCCATTTGCCTGAGAGATGCAGGCTTCATTTTTGATACTTTTTTATTTGTAACCTA  
TATAGTATAGGATTTTTTTTGTCAATTTTGTCTTCTTCGTAAGGACTTGCACGCTTGTCTCCTGATCCTATCTCGCAGC  
TGATGAATATCTTGTGGTAGGGGTTTTGGGAAAAATCATTCGAGTTTGATGTTTTTCTTGGTATTTTCCCACCT  
CTTCAGAGTACAGAAGATTAAGTGAGACCTTCGTTTGTGCGGATCCCCACACACCATAGCTTCAAAAATGTTT  
CTACTCCTTTTTTTACTCTTCCAGATTTTTCTCGGACTCCGCGCATCGCCGTACCACTTCAAAAACACCCAAGCAC  
AGCATACTAAATTTTTCCCTCTTTCTTCTCTAGGGTGTGCTTAATTACCCGTAATAAAGGTTTTGGAAAAAGAAA  
AAAGAGACCGCTCGTTTTCTTTTTCTTCGTCGAAAAAGGCAATAAAAATTTTTATCACGTTTTCTTTTTCTTGA  
AATTTTTTTTTTTAGTTTTTTTTCTTTTCAGTGACCTCCATTGATATTTAAGTTAATAAACGGTCTTCAATTT  
CTCAAGTTTCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATTACAACTTTTTTTTACTTCTTGTTCATTAGAAAGAAAGCATA  
GCAATCTAATCTAAGGGCGGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATAACGACAAGG  
TGAGGAATAAACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCGGTGCTCACCGCGCGGACGTCGCCGGAGCGGT  
CGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTCTCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGAC  
GACGTGACCCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGC  
GCGGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTTCGGAGGTGCTGTCCACGAACTTCCGGGACGCTCCGGGCGGGC  
CATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGCGACCCGGCCGGCAACTGCGTGCAC  
TTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACACGTCCGACGGCGGCCACGGGTCCCAGGCTCGGAGATCCGTCCCCC  
TTTTCTTTGTGATATCATGTAATTAGTTATGTACGCTTACATTCACGCCCTCCCCCACATCCGCTCTAA  
CCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAG  
AACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTTTTCTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATATACTGAAA  
ACCTTGCTTGGAGAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTAATTTGCAAGCTGGAGACCAACATGTGAGCAAAAAG  
GCCAGCAAAAAGGACCGTA AAAAGGCCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGA  
GCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACCAGGCGTTTTCCC

CCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT  
 CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCT  
 GGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAC  
 CCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCG  
 GTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCT  
 GCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGT  
 GGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA  
 CGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGCATGAGATC

### 5.2.3 Construcción pGAPzaB-*manA*

El gen sintético se recibió dentro de la construcción pUC57-*manA* con los sitios de corte *PstI* y *XbaI* que se encuentran en los extremos 3' y 5', respectivamente. El mapa del vector pUC57 se muestra en la **Figura 25**.



**Figura 25.** Mapa del vector pUC57.

A partir de esta construcción, se liberó del gen por medio de digestión con las enzimas de restricción, *XbaI* y *PstI* que flanquean el gen y se obtuvo el siguiente resultado (**Figura 26**):

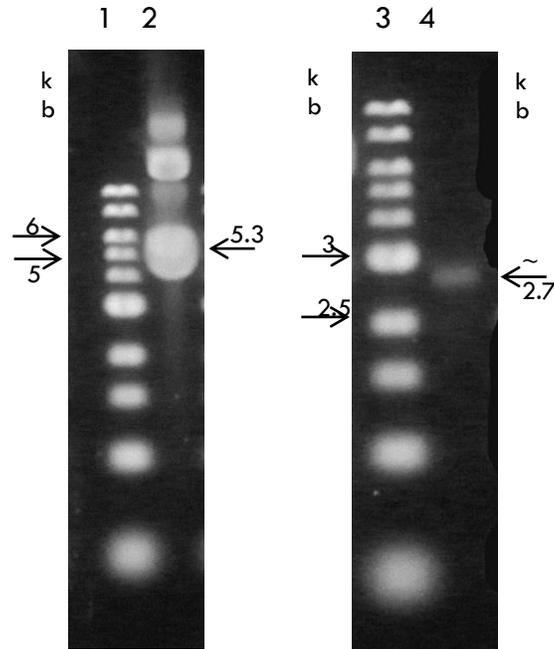
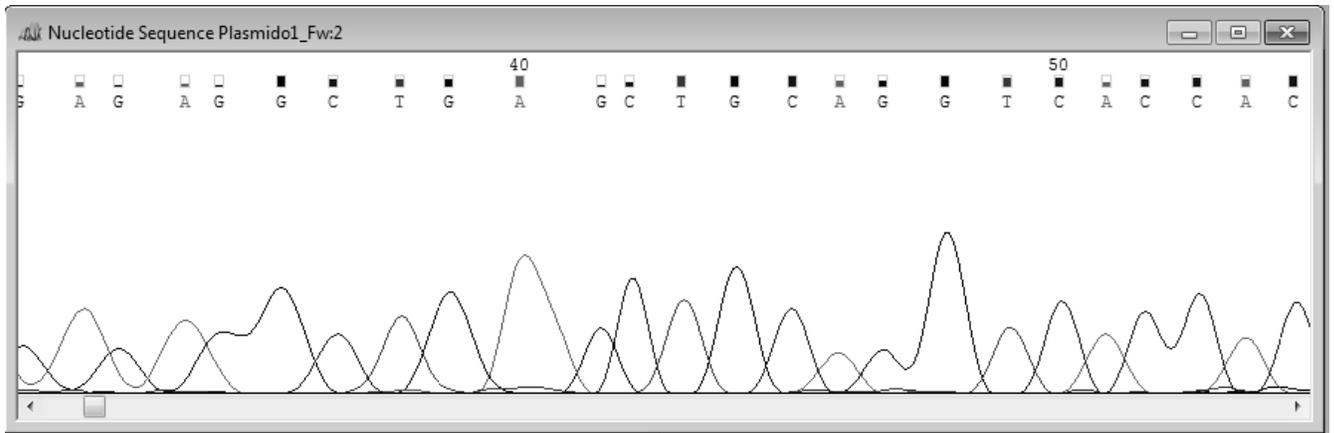


Figura 26. Análisis electroforético de la digestión con *Pst*I y *Xba*I. Carril 1 y 3: Marcador de PM. Carril 2. pUC57-*manA*. Carril 4: Digestión de *Pst*I y *Xba*I.

Como se observa, el vector es de un tamaño muy similar al del gen sintético, por lo que se logra ver una sola banda después de la digestión. A partir de la digestión con *Pst*I y *Xba*I se purificó el DNA a partir de agarosa, con la metodología descrita en la sección 4.2.7.

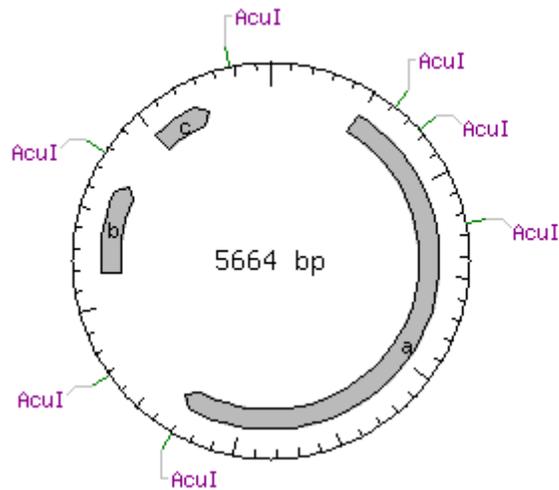
Con el fin de obtener la construcción pGAPZ $\alpha$ B-*manA*, se analizaron más de 100 clonas de *E. coli* transformadas de las cuales sólo 1 tenía la construcción pGAPZ $\alpha$ B-*manA*. De esta clona, se purificó DNA plasmídico y se secuenció.

De los resultados obtenidos de la secuenciación, se observó que estaba presente una deleción en la posición 40 de la construcción como se muestra en la **Figura 27**.



**Figura 27: Electroferograma de la secuenciación de la construcción pGAPzαB-manA.**

A partir de estos datos, la delección se comprobó mediante una digestión con la enzima *Acul*, puesto que su sitio de reconocimiento de corte es CTGAAG. La digestión se realizó en la misma construcción que se secuenció y se esperaba tener 6 sitios de corte con 7 bandas, de acuerdo a los resultados arrojados mediante análisis *in silico* por NEB Cutter (**Figura 28**).



#	Ends	Coordinates	Length (bp)
1	AcuI-AcuI	1251-3296	2046
2	AcuI-AcuI	3691-4772	1082
3	AcuI-AcuI	5480-617	802
4	AcuI-AcuI	4773-5479	707
5	AcuI-AcuI	774-1250	477
6	AcuI-AcuI	3297-3690	394
7	AcuI-AcuI	618-773	156

Figura 28: Digestión *in silico* de la construcción pGAPzB-*manA* con *AcuI*.

Si la deleción de la adenina en la posición 40 (**Figura 27**) se encontraba presente, no se obtendría el fragmento número 3 de 802 pb (**Figura 28**). Los resultados de la digestión si muestran este fragmento tal como se ve en la **Figura 29**.

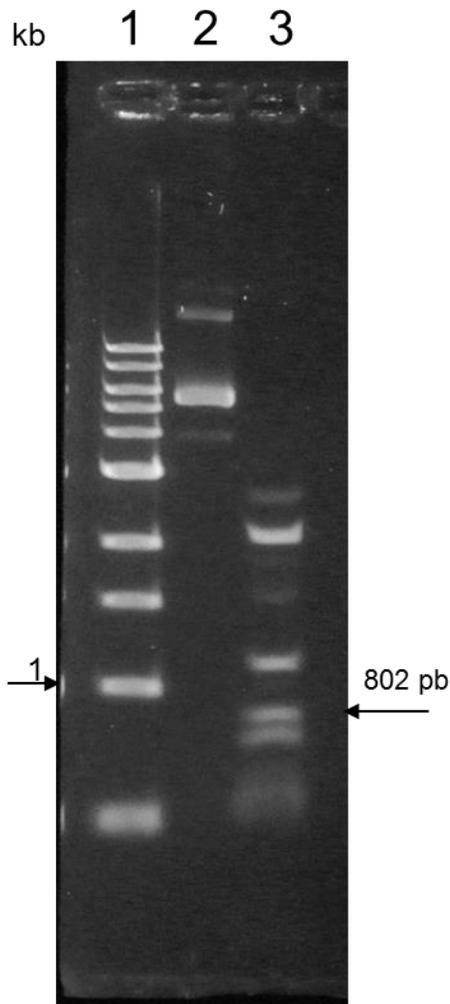
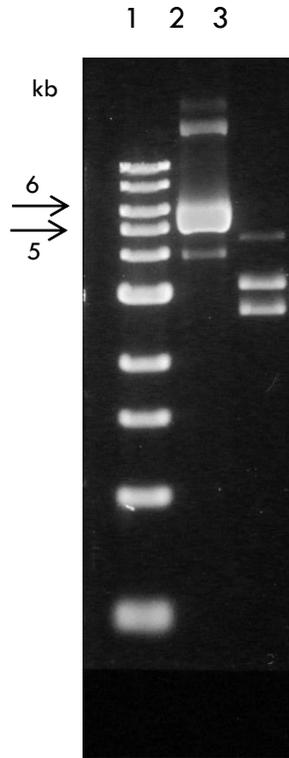


Figura 29. Análisis electroforético de la digestión de la construcción pGAPzaB-*manA* con *AclI*. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: construcción pGAPzaB-*manA*. carril 3: Digestión con *AclI*.

La construcción se corroboró por medio de digestión con las enzimas *PstI*, *XbaI*, para separar el gen del vector, y las enzimas *ApaI*, *AatII* y *BamHI* para compararse con digestiones *in silico*.

En la **Figura 30**, se observa la digestión con *PstI* y *XbaI*.



**Figura 30.** Análisis electroforético de la digestión con *Pst*I y *Xba*I. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2. pGAPZaB. Carril 3: Digestión con *Pst*I y *Xba*I

Se observó la liberación de un fragmento de 2.7 kb que concuerdan con el tamaño esperado para el gen *manA*. Posteriormente, se corroboró la construcción por medio de cortes con las enzimas *Apa*LI, *Aat*II y *Bam*HI para compararse con digestiones *in silico* (**Figura 31**).

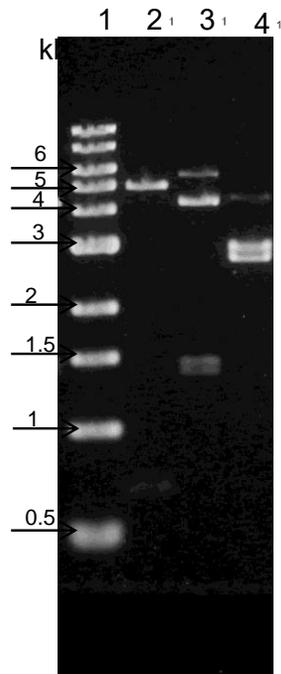
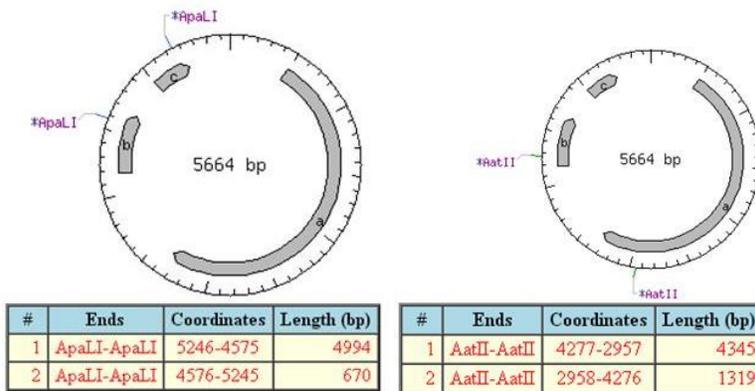


Figura 31. Análisis electroforético de la construcción pGAPZaB con múltiples digestiones. Carril 1. Marcador de PM. Carril 2: Digestión con *Apa*LI. Carril 3. Digestión con *Aat*II. Carril 4: Digestión con *Bam*HI.

A partir del análisis *in silico* de digestión, se esperaban dos fragmentos por cada enzima, tal como se muestra en las figuras 32 a,b,c.



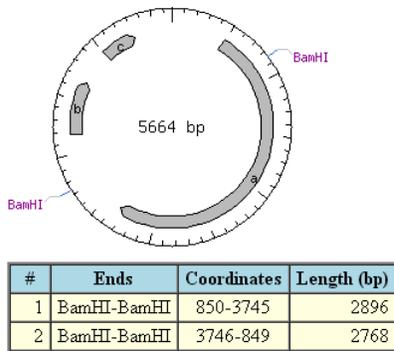


Figura 32. A) Digestion con *Apa*I. b) Digestión con *Aat*I c) Digestión con *Bam*HI.

A partir de estos resultados, se corroboró que teníamos la construcción deseada y continuó con la transformación de *P. pastoris*.

#### 5.2.4 Transformación de *P. pastoris*

Una vez obtenida la construcción pGAPzαB-*manA*, se transformaron células de *P. pastoris* electrocompetentes por medio de electroporación. Con la electroporación se obtuvieron más de 1000 colonias repartidas en 15 cajas con medio YPD. Para seleccionar posibles clonas transformadas, se seleccionaron las colonias de mayor crecimiento a los 2 días de incubación y se pasaron a concentraciones mayores de Zeocina pasando por 200, 500 y finalmente hasta 1000 µg/ml de Zeocina para seleccionar las cepas que tuvieran múltiples copias de la gen *manA* obteniendo los siguientes resultados (**Figura 33**).

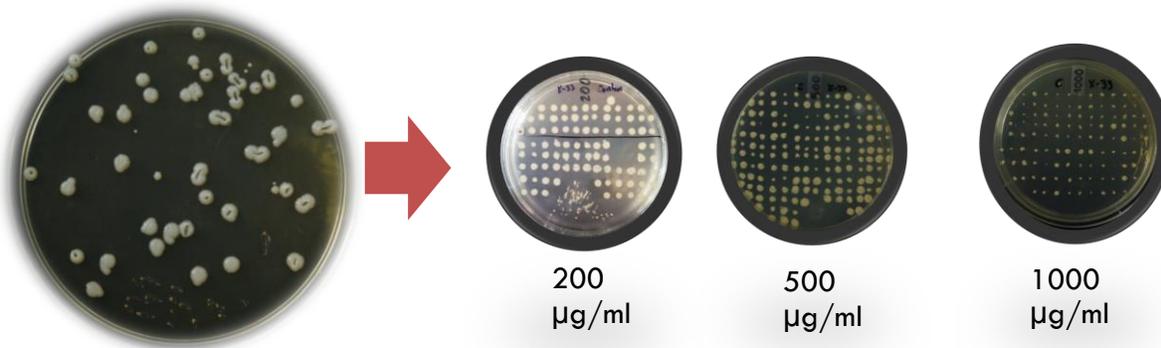


Figura 33. Selección de clones de *P. pastoris* transformadas a diferentes concentraciones de Zeocina.

Las colonias que presentaron un mayor crecimiento a la mayor concentración de Zeocina utilizada, se seleccionaron y resembraron en medio líquido para medir actividad con resultados negativos. Los resultados se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17. Actividad de cepas transformadas de *Pichia pastoris*.

Clona	Actividad ( $A_{405}$ )
Control	0.001
1	0.003
2	0.001
3	0.000
4	0.002
5	0.001
6	0.002

Para corroborar la presencia del gen *manA* dentro del genoma de las colonias seleccionadas, se realizó una PCR a partir de colonia. Las condiciones de esta PCR se mencionan en los apartados 4.2.1 y 4.2.6 y los resultados se muestran en la **Figura 34**.

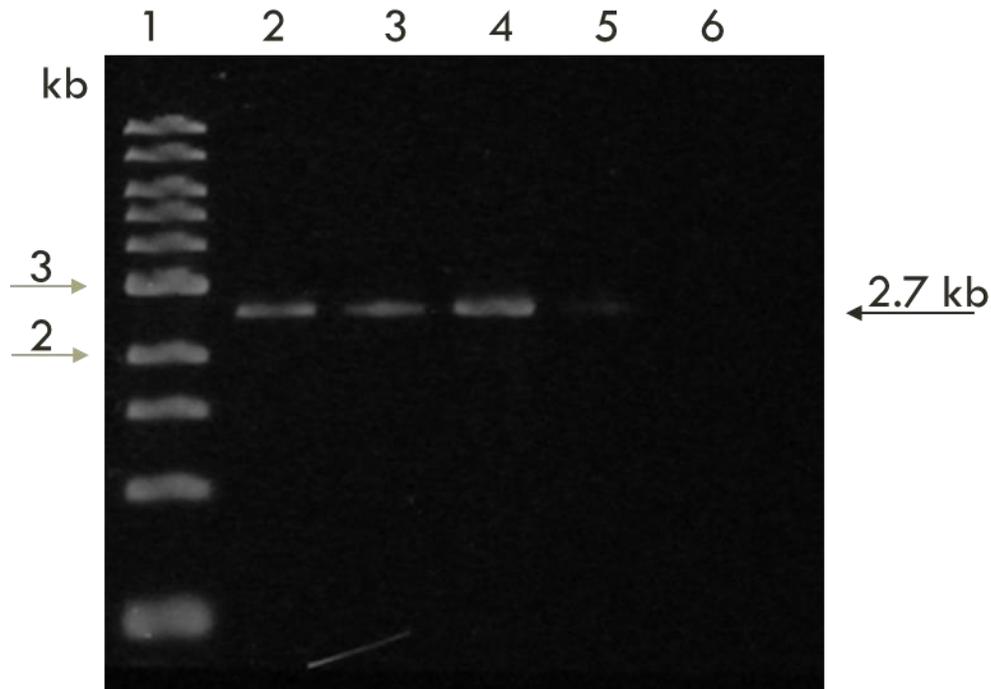


Figura 34. Análisis electroforético de resultados de PCR Colonia. Carril 1: Marcador de PM. Carril 2-5: PCR a partir de clonas seleccionadas aleatoriamente. Carril 6: Control negativo.

Se observó una amplificación de 2.7 kb que coincide con el gen *manA* de 2.7 kb.

Se realizaron ensayos de actividad de  $\beta$ -manosidasa, sin embargo, no se obtuvo actividad cuantificable. De acuerdo a la literatura, los factores que podrían estar involucrados son:

- No se insertó en el sitio exacto de la recombinación homóloga.
- Afecta en la pared celular de *P. pastoris*, pues polímeros de manosa se encuentran conformando la pared celular.
- La actividad es mínima por lo que es difícilmente detectable.

# Capítulo 6

## Conclusiones

Se purificó y se caracterizó bioquímicamente la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* expresada en *E. coli*. La enzima recombinante presentó actividad óptima a pH 5.5 y a una temperatura de 55 °C, y los parámetros cinéticos observados fueron una  $K_M$  de 21.18 mM y una  $V_{max}$ : 42.02 mmol/min, utilizando **¿??... como sustrato.**

Termoestabilidad y efecto de iones

El gen *manA*, con optimización de codones para su expresión en *P. pastoris*, se clonó en el vector de expresión pGAPz $\alpha$ B, obteniéndose la construcción pGAPz $\alpha$ B-*manA*.

La construcción pGAPz $\alpha$ B-*manA* se transfirió a células de *P. pastoris* X-33, sin embargo no se detectó actividad enzimática.

# Capítulo 7

## Perspectivas del proyecto

La principal perspectiva que se tiene de este proyecto es la expresión del gen *manA* de *C. uda* en *P. pastoris* y la optimización de su expresión.

Purificar y caracterizar bioquímicamente la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* expresada en *P. pastoris*.

Determinar si la  $\beta$ -manosidasa de *C. uda* tiene actividad de transglicosilación, ya que de ser así, tendría una gran aplicación, por ejemplo, en la industria farmacéutica.

# Capítulo 8

## Bibliografía

## Bibliografía

- Ademark, P., Lundqvist, J., Hägglund, P., Tenkanen, M., Torto, N., Tjerneld, F., & Stålbrand, H. (1999). Hydrolytic properties of a  $\beta$ -mannosidase purified from *aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 75(2-3), 281-289.
- Al-Ghazzewi, F. H., Khanna, S., Tester, R. F. and Piggott, J. (2007). The potential use of hydrolysed konjac glucomannan as a prebiotic. *J. Sci. Food Agric.*, 87: 1758–1766.
- Aparicio, R., Eneiskaya, E. V., Kulminskaya, A. A., Savel'ev, A. N., Golubev, A. M., Neustroev, K. N., Polikarpov, I. (2000). Crystallization and preliminary X-ray study of  $\beta$ -mannosidase from *trichoderma reesei*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 56(3), 342-343.
- Brondyk WH (2009). "Selecting an appropriate method for expressing a recombinant protein". *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 463: 131–47
- Cornelis, P. (2000). Expressing genes in different *escherichia coli* compartments. *Current Opinion in Biotechnology*, 11(5), 450-454.
- Cuevas W.A., Kantelinen A., Tanner P., Bodie B., Leskinen S (1996) Purification and characterization of novel mannanases used in pulp bleaching. *Proc 6th Int Conf Biotechnol Pulp Paper Ind Chem*. 186-189.
- Dea ICM, Morrison A. (1975) Chemistry and interaction of seed galactomannans. *Adv Carbohydr Chem Biochemistry*. 31:241–312.
- Del Carmen Rodríguez-Gacio, M., Iglesias-Fernández, R., Carbonero, P., & Matilla, Á. J. (2012). Softening-up mannan-rich cell walls. *Journal of Experimental Botany*, 63(11), 3975-3988.
- Dhawan, S., & Kaur, J. (2007). Microbial mannanases: An overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(4), 197-216.
- Dhugga, K. S. (2012). Biosynthesis of non-cellulosic polysaccharides of plant cell walls. *Phytochemistry*, 74, 8-19.
- Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinze, T. (2005). Hemicellulose.

- Fliedrova B, et al. (2012) Production of *Aspergillus niger* beta-mannosidase in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif* 85(2):159-64
- G. M. Gübitz, A. Sachslehner, & D. Haltrich. (2000). Microbial Mannanases: Substrates, Production, and Applications *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*.236-262
- Glazer AN, Nikaido H (2007) *Microbial Biotechnology*, 2nd edition. Cambridge University Press.
- Hogan, C. (2014). *Bacteria*.
- Hongpattarakere T. (2002). Hyperthermostable cellulolytic and hemicellulolytic enzymes and their biotechnological applications. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 24: 481–491
- Juturu, V. and Wu, J. C. (2013), Insight into microbial hemicellulases other than xylanases: a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 88: 353–363.
- Li, Y. M., Li, D. J., Xu, X. J., Cui, M., Zhen, H. H., & Wang, Q. (2014). Effect of codon optimization on expression levels of human cystatin C in *pichia pastoris*. *Genetics and Molecular Research*, 13(3), 4990-5000.
- Liu, G., Qin, Y., Li, Z., & Qu, Y. (2013). Development of highly efficient, low-cost lignocellulolytic enzyme systems in the post-genomic era. *Biotechnology Advances*, 31(6), 962-975.
- Pauly, M., Gille, S., Liu, L., Mansoori, N., de Souza, A., Schultink, A., & Xiong, G. (2013). Hemicellulose biosynthesis. *Planta*, 238(4), 627-642.
- Peng, F., Peng, P., Xu, F., & Sun, R. -. (2012). Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. *Biotechnology Advances*, 30(4), 879-903.
- Russell, David W.; Sambrook, Joseph (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sachslehner, A., Foidl, G., Foidl, N., Gübitz, G., & Haltrich, D. (2000). Hydrolysis of isolated coffee mannan and coffee extract by mannanases of *sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 80(2), 127-134.
- Saha, B. C. (2003). Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 279-291.

- Saittagaroon, S., Kawakishi, S. and Namiki, M. (1983), Characterisation of polysaccharides of copra meal. *J. Sci. Food Agric.*, 34: 855–860.
- Shallom, D., & Shoham, Y. (2003). Microbial hemicellulases. *Current Opinion in Microbiology*, 6(3), 219-228.
- Stoll, D., He, S., Withers, S. G., & Warren, R. A. J. (2000). Identification of glu-519 as the catalytic nucleophile in  $\beta$ -mannosidase 2A from *cellulomonas fimi*. *Biochemical Journal*, 351(3), 833-838.
- Timell, T. E. (1965). Wood and bark polysaccharides in: *Cellular Ultrastructure of Woody plants*. 127-156.
- Whistler, R. L. (2014). Hemicellulose. *AccessScience*.
- Yamabhai, M., Sak-Ubol, S., Srila, W., & Haltrich, D. (2014). Mannan biotechnology: From biofuels to health. *Critical Reviews in Biotechnology*,
- Yang, Z., Zhang, L., Zhang, Y., Zhang, T., Feng, Y., Lu, X., Wang, X. (2011). Highly efficient production of soluble proteins from insoluble inclusion bodies by a two-step-denaturing and refolding method. *PLoS ONE*, 6(7)

# Capítulo 9

Apéndice

## **Apéndice**

### **9.1 Medios de cultivo**

#### **9.1.1. Medio LB**

- 10 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 20 g de agar (Medio LB-agar)

- 1) Disolver 10 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en 900 ml de agua desionizada. Agregar 20 g de agar para preparar medio LB-agar.
- 2) Ajustar el pH con una solución de NaOH 1 N.
- 3) Llevar a un volumen final de 1 l y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- 4) Enfriar hasta 50 °C para añadir el antibiótico deseado.
- 5) Almacenar las placas de medio LB-agar con papel aluminio en un lugar oscuro y frío.

#### **9.1.2. Medio LB bajo en sales**

- 5 g de NaCl
- 10 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 15 g de agar (Medio LB bajo en sales-agar)

- 1) Disolver 5 g de NaCl, 10 g de triptona y 5 g de extracto de levadura en 900

ml de agua desionizada. Agregar 15 g de agar para preparar medio LB-agar.

- 2) Ajustar el pH a 7.5 con una solución de NaOH 1 N.
- 3) Llevar a un volumen final de 1 litro y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min.
- 4) Enfriar hasta 50 °C para añadir Zeocina a una concentración de 25 µg/ml.
- 5) Almacenar las placas de medio LB-agar con papel aluminio en un lugar oscuro y frío.

#### **9.1.3. Medio 2TY**

- 5 g de NaCl
- 16 g de triptona
- 10 g de extracto de levadura
- 900 ml de agua desionizada

- 1) Ajustar el pH con una solución de NaOH 1 N.
- 2) Llevar a un volumen final de 1 litro y esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.

#### **9.1.4. Medio SOC**

- 20 g de triptona
- 5 g de extracto de levadura
- 4.8 g MgSO<sub>4</sub>
- 3.603 g de dextrosa
- 0.5 g NaCl
- 0.186 g KCl

- 1) Disolver los 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 4.8 g de  $MgSO_4$ , 0.5 g de NaCl y 0.186 g de KCl en 900 ml de agua.
- 2) Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- 3) Agregar 100 ml con 3.603 de dextrosa.
- 4) El medio líquido se almacena a temperatura ambiente.

#### **9.1.5. Medio YPD**

- 10 g de extracto de levadura
- 20 g de peptona
- 20 g de dextrosa

- 1) Disolver los 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 ml de agua. Agregar 20 g de agar si se desea preparar medio YPD solidificado.
- 2) Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
- 3) Agregar 100 ml de dextrosa al 20 %.
- 4) El medio líquido se almacena a temperatura ambiente.

#### **9.1.6. Medio YPDS con Zeocina y agar**

- 10 g de extracto de levadura
- 20 g de peptona
- 20 g de dextrosa
- 182.2 g de sorbitol
- 20 g de agar
- 1 ml de Zeocina 100 mg/ml

- 1) Disolver 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona, 182.2 g de sorbitol

- y 20 g de agar en 900 ml de agua desionizada.
- 2) Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 min.
  - 3) Agregar los 20 g de dextrosa.
  - 4) Enfriar a 55 °C o menos y añadir 1 ml de Zeocina 100 mg/ml.

## **9.2 Amortiguadores**

### **9.2.1. Solución de lisis alcalina I**

- 50 mM de glucosa
- 25 mM de Tris-Cl
- 10 mM de EDTA

Preparar la solución desde un stock en lotes de 100 mL, esterilizar por 15 minutos a 15 psi y almacenar a 4 °C.

### **9.2.2. Solución de lisis alcalina II**

- 0.2 N de NaOH (recién diluida de un stock de 10 N)
- 1 % (p/v) de SDS

Preparar la solución fresca y usar a temperatura ambiente.

### **9.2.3. Solución de lisis alcalina III**

- 5 M de acetato de potasio (60.0 mL)
- Ácido acético glacial (11.5 mL)
- H<sub>2</sub>O (28.5 mL)

La solución restante es 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. Almacenar la solución a 4 °C y transferir a hielo justo antes de su uso.

#### **9.2.4. Amortiguador STE**

- 10 mM de Tris-Cl (pH8.0)
- 100 mM de NaCl
- 1 mM de EDTA (pH 8.0)

Esterilizar por 15 minutos a 15 psi y almacenar a 4°C

#### **9.2.5. Amortiguador TE**

- Tris-Cl 100 mM, pH 8.0
- EDTA 10 mM, pH 8.0

Esterilizar por 20 minutos a 15 psi y almacenar a temperatura ambiente.

#### **9.2.6. Amortiguador de lisis**

- Tris-Cl 20 mM, pH 8.0
- 2 mM EDTA 2 mM
- Tritón X-100 1.2%

Inmediatamente antes de usar, añadir 20 mg/ml de lisozima.

#### **9.2.7 Amortiguador A**

- 5.3 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M
- 94.7 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2M
- NaCl 300 mM
- Imidazol 20 mM

- 1) Las sales de fosfato se disuelven en 100 ml de agua desionizada.
- 2) Se agregan a los 200 ml resultantes, el NaCl y el imidazol

### **9.2.6. Amortiguador B**

- 5.3 ml de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.2 M
- 94.7 ml de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.2M
- NaCl 300 mM
- Imidazol 500 mM

Las sales de fosfato se disuelven en 100 ml de agua desionizada y se agregaron a los 200 ml resultantes, el NaCl y el imidazol.