



UNAP

Rectorado

Resolución Rectoral N° 0695-2020-UNAP

Iquitos, 19 de agosto de 2020

VISTO:

El oficio N° 127-VRINV-UNAP-2020, presentado el 17 de agosto de 2020, por el vicerrector de investigación, sobre aprobación de proyecto de investigación colaborativo autofinanciado;

CONSIDERANDO:

Que, la Ley Universitaria, Ley N° 30220, en su artículo 5°, señala entre otros, que son principios de la Universidad, la búsqueda y difusión de la verdad, el espíritu crítico y de investigación, la meritocracia, la pertinencia y compromiso con el desarrollo del país, la creatividad e innovación, y la pertinencia de la enseñanza e investigación con la realidad social;

Que, el artículo 6° de la Ley Universitaria N° 30220 señala entre otros, que son fines de la universidad preservar, acrecentar y transmitir de modo permanente la herencia científica, tecnológica, cultural y artística de la humanidad; realizar y promover la investigación científica, tecnológica y humanística la creación intelectual y artística; difundir el conocimiento universal en beneficio de la humanidad; promover el desarrollo humano y sostenible en el ámbito local, regional, nacional y mundial; servir a la comunidad y al desarrollo integral;

Que, el artículo 7° de la antes citada ley, señala entre otras, que son funciones de la universidad, la investigación; y contribuir al desarrollo humano;

Que, el artículo 48° de la misma ley, establece que la investigación constituye una función esencial y obligatoria de la universidad, que la fomenta y realiza, respondiendo a través de la producción de conocimiento y desarrollo de tecnologías a las necesidades de la sociedad, con especial énfasis en la realidad nacional;

Que, el artículo 7° del Estatuto de la UNAP, entre otros fines, señala realizar y promover la investigación científica, tecnológica y humanística, la creación intelectual y artística, y el artículo 8° entre otras funciones establece realizar investigación científica e innovación tecnológica y humanística articulada con la enseñanza y la proyección social, dirigida a resolver problemas económicos, sociales, tecnológicos y ambientales de la región y el país;

Que, mediante oficio de visto, don Alberto García Ruiz, vicerrector de investigación, solicita al rector aprobar el proyecto de investigación colaborativo autofinanciado titulado "Análisis estructural y funcional de enzimas de la vía biosintética de Vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* - Camu Camu", desarrollado por docentes investigadores de la Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA) de la UNAP, y del Instituto de Física de São Carlos - Universidad de São Paulo (IFSC-USP);

Que, por los argumentos expuestos, es procedente aprobar el proyecto de investigación colaborativo autofinanciado; y,

En uso de las atribuciones que confieren la Ley N° 30220 y el Estatuto de la UNAP, aprobado con Resolución de Asamblea Universitaria N° 005-2017-AU-UNAP, modificado con Resolución de Asamblea Universitaria N° 008-2017-AU-UNAP;





UNAP

Rectorado

Resolución Rectoral N° 0695-2020-UNAP

SE RESUELVE:

ARTÍCULO PRIMERO.- Aprobar el proyecto de investigación colaborativo autofinanciado titulado “Análisis estructural y funcional de enzimas de la vía biosintética de Vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* – Camu Camu”, que se desarrolla durante el año 2020 por investigadores de la Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA) de la UNAP, y del Instituto de Física de São Carlos – Universidad de São Paulo (IFSC-USP), según el siguientes detalle:

Investigadores : Por la Unidad Especialidad del Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones de Recursos Naturales (CIRNA) de la UNAP

Juan Carlos Castro Gómez
Jorge Luis Marapara Del Águila
Marianela Cobos Ruiz
Pedro Marcelino Adrianzén Julca
Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri
Jhon Antoni Vargas Santillán

Por el Instituto de Física de São Carlos – Universidad de São Paulo (IFSC-USP)

Richard Charles Garrat
Diego Antonio Leonardo Cabrejos
Humberto D’Muniz Pereira
Jhon Antoni Vargas Santillán

ARTÍCULO SEGUNDO.- Establecer que el equipo de investigadores, deberán cumplir con presentar en el Vicerrectorado de Investigación, el informe técnico de avance e informe final del proyecto ejecutado indicando las metas logradas.

Regístrese, comuníquese y archívese.



Heiter Valderrama Freyre
RECTOR



Kadhir Benzaquen Tuesta
SECRETARIO GENERAL



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA

Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA)
Unidad Especializada del Laboratorio de Investigación en Biotecnología (UELIB)

PROYECTO MULTIDISCIPLINARIO

Análisis Funcional y Estructural de Enzimas de la Vía Biosintética de Vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* “camu-camu”

INVESTIGADORES

UELIB-CIRNA-UNAP

Dr. Juan Carlos Castro Gómez
Dr. Jorge Luis Marapara del Águila
Dra. Marianela Cobos Ruiz
M.Sc. Pedro Marcelino Adrianzén Julca
Blgo. Hicler Napoleón Rodríguez Mashacuri
Blgo. Jhon Antoni Vargas Santillan

Instituto de Física de São Carlos – Universidad de São Paulo (IFSC-USP)

Dr. Richard Charles Garratt
Dr. Diego Antonio Leonardo Cabrejos
Dr. Humberto D'Muniz Pereira
Blgo. Jhon Antoni Vargas Santillan

COLABORADORES

Bach. Pedro César Vela Del Águila
Est. Gad Eid Grandez Ushiñahua
Est. Carlos Gilberto Castro Cobos

TESISTAS

Post-Grado: 01 tesista
Pre-grado: 02 tesistas

PRACTICANTES

Pre-grado: 04 practicantes

DURACIÓN: 04 años

MONTO: S/. 80,000.00

IQUITOS – PERÚ

2020

I. TÍTULO

Análisis Funcional y Estructural de Enzimas de la Vía Biosintética de Vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* "camu-camu".

1.1. ÁREA DE INVESTIGACIÓN EN EL QUE SE INSERTA EL PROYECTO

Ciencias Básicas (Biología)

1.2. DURACIÓN DEL PROYECTO

04 años

Inicio: Enero/2018

Término: Diciembre/2022

1.3. COSTO TOTAL DEL PROYECTO

S/. 80,000.00

1.4. NOMBRES Y APELLIDOS DE LOS INVESTIGADORES Y COLABORADORES

UELIB-CIRNA-UNAP

Dr. Juan Carlos Castro Gómez

Investigador Principal, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 965-017215. Correo electrónico: juan.castro@unapiquitos.edu.pe.

Dr. Jorge Luis Marapara Del Águila

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 965-699970. Correo electrónico: jorge.marapara@unapiquitos.edu.pe.

Dra. Marianela Cobos Ruiz

Investigadora, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 990-819576. Correo electrónico: marycobosruiz@gmail.com.

M.Sc. Pedro Marcelino Adrianzen Julca

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 997-935510. Correo electrónico: pedro.adrianzen@unapiquitos.edu.pe.

Blgo. Hitler Napoleón Rodríguez Mashacuri

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 918-523207. Correo electrónico: hitler.rodriguez@unapiquitos.edu.pe.

Blgo. Jhon Antoni Vargas Santillan

Investigador, Unidad Especializada de Biotecnología (UEB), Centro de Investigaciones de Recursos Naturales de la Amazonía (CIRNA), Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP). Psje. Los Paujiles S/N, San Juan Bautista, Loreto, Perú. Teléfono: 949-877894. Correo electrónico: jhon.vargas@unapiquitos.edu.pe.

IFSC-USP

Dr. Richard Charles Garrat

Investigador, Grupo de Cristalografía, Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidad de São Paulo (USP). Avenida Joao Dagnone 1100, São Carlos, São Paulo, Brasil. Teléfono: 997-661368, correo electrónico: richard@ifsc.usp.br.

Dr. Diego Antonio Leonardo Cabrejos

Investigador, Grupo de Cristalografía, Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidad de São Paulo (USP). Avenida Joao Dagnone 1100, São Carlos, São Paulo, Brasil. Teléfono: 981-079951. Correo electrónico: dleonardo@usp.com.

Dr. Humberto D'Muniz Pereira

Investigador, Grupo de Cristalografía, Instituto de Física de São Carlos (IFSC), Universidad de São Paulo Avenida Joao Dagnone 1100, São Carlos, São Paulo, Brasil. Teléfono: 997-08-8235. Correo electrónico: hmuniz@ifsc.usp.br.

1.5. INSTITUCIONES COMPROMETIDAS

Universidad Nacional de la Amazonía Peruana (UNAP)

Cuenta con el CIRNA implementado con equipos para realizar la expresión y producción de las enzimas recombinantes del camu-camu.

Instituto de Física de São Carlos – Universidad de São Paulo (IFSC-USP)

Institución participante, que cuenta con equipos para el análisis estructural y funcional de las enzimas recombinantes del camu-camu.

II. ÍNDICE

I. TÍTULO	2
1.1. ÁREA DE INVESTIGACIÓN EN EL QUE SE INSERTA EL PROYECTO	2
1.2. DURACIÓN DEL PROYECTO	2
1.3. COSTO TOTAL DEL PROYECTO	2
1.4. APELLIDOS Y NOMBRES DE LOS INVESTIGADORES Y COLABORADORES	2
1.5. INSTITUCIONES COMPROMETIDAS	4
II. ÍNDICE	5
III. RESUMEN DEL PROYECTO	6
IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	7
V. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN	8
VI. HIPÓTESIS	10
VII. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	11
VIII. METODOLOGÍA DEL PROYECTO	12
IX. METAS POR COMPONENTES	14
X. RESULTADOS ESPERADOS	15
XI. ESTRATEGIAS A UTILIZAR PARA LA TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN DE LOS RESULT...	16
XII. IMPACTOS ESPERADOS	17
XIII. INFRAESTRUCTURA Y EQUIPOS A UTILIZARSE	19
XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES POR COMPONENTES MENSUALIZADO Y RESPONSABLES	20
XV. RESUMEN DEL PRESUPUESTO POR RUBROS, PARTIDAS Y COMPONENTES EN SOLES	21
XVI. MONITOREO Y EVALUACIÓN; MATRIZ DE MARCO LÓGICO	23
XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
XVIII. ANEXO	27

III. RESUMEN DEL PROYECTO

Estudios básicos en biología molecular realizados por nuestro equipo de investigación han permitido identificar hasta cinco vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de vitamina C en *Myrciaria dubia* "camu-camu". Asimismo, algunos de los genes, particularmente de la vía biosintética D-manosa/L-galactosa ya fueron clonados en vectores de expresión bacteriana. Por tanto, el objetivo de esta investigación es realizar el análisis funcional y estructural de tres enzimas de la vía biosintética de vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* "camu-camu". Los genes sintéticos que codifican las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) serán expresados en *Escherichia coli* y purificados con métodos de biología molecular estándares. Posteriormente, se procederá a realizar los análisis estructurales (cristalografía de rayos X y/o análisis in silico) y funcionales (análisis cinéticos) de las enzimas recombinantes puras. Este proyecto de investigación multidisciplinario colaborativo contribuirá con la formación del recurso humano e incrementar la visibilidad nacional e internacional de la UNAP mediante la publicación de los resultados que se obtengan en eventos científicos y la publicación de artículos científicos en revistas internacionales indizadas.

Palabras clave: Cristalografía, cinética enzimática, biosíntesis de vitamina C, vía D-manosa/L-galactosa.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente, nuestro equipo de investigación ha reconstruido *in silico* las cinco vías metabólicas que participan en la biosíntesis de vitamina C en *M. dubia* "camu-camu"(1). Estas cinco vías biosintéticas son: vía similar al de animales (2), vía del myo-inositol (3), vía del ácido galacturónico (4), vía de la L-gulosa (5) y la vía de la D-manosa/L-galactosa (6). Actualmente, la vía biosintética D-manosa/L-galactosa es considerada como la vía más importante en las plantas (2,4,6,7).

Sin embargo, hasta la fecha, de todas las enzimas que participan en la vía biosintética, D-manosa/L-galactosa sólo la enzima GDP-mannosa-3',5'-epimerasa de *Arabidopsis thaliana* cuenta con estructura tridimensional (8) y ha sido caracterizada funcionalmente en otras especies como *Oryza sativa* "arroz" (9). También, la enzima L-galactosa deshidrogenasa del arroz ha sido caracterizada funcionalmente (10) e investigadores japoneses lograron cristalizar esta enzima, pero no determinaron su actividad catalítica ni pudieron determinar su estructura tridimensional (11).

Por tanto, para cubrir estos vacíos en el conocimiento científico básico de tres enzimas de la vía biosintética D-manosa/L-galactosa que participan la producción de vitamina C en *M. dubia*, en este proyecto formulamos la siguiente pregunta de investigación **¿Qué características funcionales y estructurales presentan las enzimas de la vía biosintética de vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* "camu-camu"?**

V. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Estudios sobre análisis funcionales de enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa

Respecto a los estudios funcionales de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa, el grupo de investigación de Mieda *et al.* (10) de la Universidad Kinki de Japón, estudiaron las propiedades enzimáticas de la enzima L-galactosa deshidrogenasa. Para ello, primero los investigadores purificaron la enzima (≈ 560 veces) a partir de las hojas de la *Spinacia olerace* "espinaca". La enzima purificada se caracterizó por formar un homodímero de 36 kDa. Adicionalmente, estos investigadores clonaron el ADN complementario del gen que estuvo constituido por un marco de lectura abierto que codifica una enzima de 322 amino ácidos y una masa molecular calculada de 35,3 kDa. La secuencia aminoacídica deducida muestra homologías de 82, 79 and 75% a las enzimas correspondientes de *Actinidia deliciosa* "kiwi", *Malus domestica* "manzana" y *Arabidopsis thaliana* "arabidopsis", respectivamente. La enzima nativa purificada tiene alta especificidad para L-galactosa con un $K_m = 116,2 \pm 3,2 \mu M$. Asimismo, la enzima presenta retro-inhibición por la vitamina C, el producto final de la vía metabólica. La cinética de inhibición, muestra una inhibición competitiva lineal con un $k_i = 133,2 \pm 7,2 \mu M$.

Adicionalmente, investigadores de la Universidad de la Prefectura de Osaka de Japón caracterizaron funcionalmente a la enzima recombinante GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18) de *Oryza sativa* "arroz" (9). Para lograr la caracterización de la enzima, los investigadores clonaron el gen y lo expresaron en *E. coli* como una proteína de fusión con la proteína de unión a manosa. La enzima recombinante catalizó la conversión de GDP-D-manosa a GDP-L-galactosa y GDP-L-gulosa. Asimismo, los investigadores demostraron que la enzima es inhibida por GDP y activada por NAD^+ . El incremento de la actividad de la enzima por el cofactor NAD^+ fue atribuida a que la variante enzimática del arroz posee el dominio de unión a NAD^+ , en contraste a la enzima de *A. thaliana*, que carece de este dominio y no es activada por este cofactor enzimático. El K_m aparente de la enzima es de $1,20 \times 10^{-5} M$ y el k_{cat} es de $0,127 s^{-1}$ en la presencia de $20 \mu M$ de NAD^+ .

Estudios sobre análisis estructurales de enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa

De las seis enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa que participan en la biosíntesis de vitamina C en las plantas, sólo ha sido reportada la estructura tridimensional de la enzima GDP-manosa-3',5'-epimerasa de *A. thaliana* (8). Para determinar la estructura 3D con resoluciones de 1,4 a 2,0 Å, los investigadores formaron complejos de la enzima recombinante con diferentes ligandos como GDP- α -D-manosa, GDP- β -L-galactosa y una mezcla de GDP- β -L-gulosa con GDP- β -L-4-ceto-gulosa. La estructura de esta enzima presenta el plegamiento

clásico de cadena corta deshidratasa/reductasa. En su actividad catalítica, la enzima establece un equilibrio entre los productos GDP- β -L-galactosa y GDP- β -L-gulosa. La reacción catalizada procede mediante la oxidación del C4' de GDP- α -D-manosa con la consecuente epimerización del C5' para generar GDP- β -L-4-ceto-gulosa. Posteriormente, este intermediario es reducido para producir GDP- β -L-gulosa o la posición C3' es epimerizado para dar GDP- β -L-4-ceto-galactosa, entonces C4' es reducido a GDP- β -L-galactosa. Adicionalmente, mediante análisis estructural acoplado a mutagénesis sitio-dirigida los investigadores determinaron que los residuos de aminoácidos cisteína 145 y lisina 217 son el par ácido/base responsable de las reacciones de epimerización.

Otro estudio reportado en 2013 por Mommaa y Fujimoto (11), quienes sobre expresaron en *Escherichia coli* y purificaron la enzima L-galactosa deshidrogenasa de *Oryza sativa* "arroz". Asimismo, estos investigadores japoneses lograron obtener cristales en forma de varilla de la enzima. Estos cristales mostraron la simetría del grupo espacial P21 (parámetros de la celda unitaria: $a = 46,8$, $b = 54,9$, $c = 56,9$ Å, $\beta = 102,3^\circ$) y difractaron con una resolución de 1,2 Å. Sin embargo, estos investigadores no lograron determinar la estructura tridimensional de la enzima, probablemente atribuible a la limitada cantidad y tamaño inadecuados de los cristales enzimáticos.

VI. HIPÓTESIS

Las enzimas recombinantes GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de *Myrciaria dubia* "camu-camu" muestran estructuras tridimensionales diferenciadas y están directamente relacionadas con su actividad catalítica en el proceso de biosíntesis de vitamina C.

VII. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

Objetivo general

Determinar las características funcionales y estructurales de las enzimas de la vía biosintética de vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de *Myrciaria dubia* "camu-camu".

Objetivos específicos

- Caracterizar funcionalmente las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*.
- Caracterizar estructuralmente las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*.

VIII. METODOLOGÍA DEL PROYECTO

Genes sintéticos y transformación de *E. coli*

Los genes sintéticos que codifican las tres enzimas: GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) serán ligados a un vector de expresión apropiado bajo el control del promotor del bacteriófago T7 y se procederá a transformar mediante electroporación con el sistema Gene Pulser Xcell™ Electroporation Systems (ver Figura 1 en anexo) o con el método de shock térmico (12) en cepas electrocompetentes o quimiocompetentes de *E. coli* (Rosetta™2(DE3)).

Producción y purificación de las enzimas recombinantes

Las colonias de *E. coli* portadoras del plásmido recombinante apropiado serán inoculadas en 5 mL de caldo Luria Bertani (LB) fresco suplementado con 50 µg/mL de ampicilina (amp), cloranfenicol 34 µg/mL y pre-incubado a 37°C por 12 h con agitación a 100 rpm. Posteriormente, los cultivos serán transferidos a 1 L de caldo LB + 50 µg/mL de amp y cloranfenicol 34 µg/mL e incubado a 37°C con agitación permanente a 250 rpm. Cuando el cultivo tenga una densidad óptica adecuada ($DO_{600nm} \approx 0,6$) se adicionará Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) $\approx 1-3$ mM para inducir la expresión de los genes codantes de las enzimas. Después de 12 h de inducción de la expresión se procederá a colectar las bacterias por centrifugación (4000 rpm x 45 min a 4°C). Luego, las células bacterianas serán resuspendido con tampón de lisis (Tris H-Cl, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 5%), lisados por sonicación y centrifugados (13 000 x 40 min a 4°C). La fracción soluble será filtrada (poro del filtro de 0,2 µm) y transferido a una columna de agarosa-Ni²⁺-NTA para su purificación por afinidad con el sistema de purificación ÄKTA star (GE Healthcare Bio-Sciences). La columna conteniendo la matriz de afinidad será lavada con 4 volúmenes de tampón de lavado (Tris H-Cl, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 5%). Las enzimas recombinantes con marcas de polihistidina serán eluidas de la columna empleando tampón de elución (Tris H-Cl, pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerol 5%, con gradiente de imidazol de 50, 100, 250 y 500 mM). Finalmente, las enzimas serán purificadas con una columna de exclusión molecular (Sephacryl S-200) y concentradas (~ mg/mL) con Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Concentrators (Millipore®, USA). Volúmenes de 10 µL de la enzima eluida serán almacenadas a -80°C. La cuantificación de las enzimas se determinará con el Nanodrop (se brindará el coeficiente de extensión molar y peso en Kda de las proteínas) y el análisis por SDS-PAGE se realizará de acuerdo a Laemmli (14) en un gel de poliacrilamida al 10%, usando el sistema de electroforesis vertical Mini-

PROTEAN® 3 cell (Biorad, USA). Las proteínas serán visualizadas después de tratarlas con azul brillante de coomassie R-250 al 0,1%.

Caracterización funcional de las enzimas

La actividad catalítica de las enzimas se medirá empleando aproximaciones metodológicas previamente establecidas por Major *et al.* (8), Hancock *et al.* (15), Oba *et al.* (16) y Mieda *et al.* (10) y Watanabe *et al.* (9). Los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes (K_m y V_{max}) serán calculados de acuerdo a la ecuación de Michaelis-Menten ($V_o = V_{max}[\text{Sustrato}]/K_m + [\text{Sustrato}]$) en base a la actividad enzimática con diferentes concentraciones del sustrato (17). El número de recambio de las enzimas se calculará con la ecuación: $K_{cat} = V_{max}/[\text{Enzima}]$ y la eficiencia catalítica de cada enzima se estimará con la ecuación: $E_c = K_{cat}/K_m$ (18). Para mediar la actividad de las enzimas, una unidad de actividad enzimática (U) es equivalente a la cantidad de enzima que convierte 1 μmol de sustrato en producto en un tiempo de un minuto. El control negativo de reacción constará en una de las tres enzimas hidrolizadas con proteinasa K (x 30 min) y tratada a 100°C x 10 min para desnaturalizar las enzimas y eliminar cualquier actividad residual de las enzimas.

Caracterización estructural de las enzimas

Se realizará en el Instituto de Física de São Carlos (IFSC) – USP. Los cristales de las enzimas se obtendrán con y sin sus sustratos empleando múltiples parámetros de cristalización (19) en gotas sentadas en cámaras termoestables (4°C o 18°C). Este proceso se hará de manera automatizada empleando un robot de microcristalización *Crystal Gryphon* (Art Robbins Instruments). La colecta de datos se ejecutará en las líneas de cristalografía de proteínas del Sincrotrón de cuarta generación (Sirius; Campinas - Brasil) empleando la tecnología de detección de arreglo de píxeles. La estructura tridimensional de las enzimas se obtendrá a partir de los patrones de difracción de rayos X empleando técnicas del patrón de sustitución molecular y/o mediante la inclusión de residuos de aminoácidos de selenocisteína (y/o de metales pesados) en las enzimas recombinantes para utilizar métodos estándares de ajuste de fases. La data será analizada con los programas MOSFLM y AIMLESS de CCP4 (20) o XDS (21). Para una mejor resolución y refinamiento de las estructuras tridimensionales de las enzimas se utilizarán los programas Phenix (22) y CCP4. Para visualizar los mapas de las densidades electrónicas y construcción de los modelos tridimensionales se utilizará el programa COOT (23). Todas las estructuras tridimensionales generadas en esta investigación serán depositadas en el banco de datos de estructuras de proteínas (24,25).

IX. METAS POR COMPONENTES

Componentes	Metas por año				
	2018	2019	2020	2021	2022
Caracterización estructural de las enzimas	Se ha sintetizado los genes que codifican las enzimas GDP-manosa-3,5-epimerasa (E.C. 5.1.3.16), L-galactosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3).	Se ha clonado los genes y purificado las enzimas recombinantes GDP-manosa-3,5-epimerasa (E.C. 5.1.3.16), L-galactosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3).	Se ha caracterizado estructuralmente la enzima GDP-manosa-3,5-epimerasa (E.C. 5.1.3.16).	Se ha caracterizado estructuralmente la enzima L-galactosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.316).	Se ha caracterizado estructuralmente la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3).
Caracterización funcional de las enzimas			Se ha caracterizado funcionalmente la enzima GDP-manosa-3,5-epimerasa (E.C. 5.1.3.16).	Se ha caracterizado funcionalmente la enzima L-galactosa deshidrogenasa (E.C. 1.1.1.316).	Se ha caracterizado funcionalmente la enzima L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3).
Formación de recursos humanos	Un estudiante del UELB-CIRNA realiza su pasantía en el IFSC-USP, un bachiller elabora, revisa la ejecución de su plan de Tesis.	Un estudiante del UELB-CIRNA realiza su pasantía en el IFSC-USP, un bachiller finaliza la ejecución de su Tesis.	Un estudiante del UELB-CIRNA realiza su pasantía en el IFSC-USP, Un tesista de Maestría del IFSC elabora su Proyecto de Tesis, Realización de un curso teórico-práctico.	Dois estudantes de pré-graduação realizam práticas pré-profissionais, um bachiller formula y ejecuta su Tesis, el tesista de Maestría inicia la ejecución de su Proyecto de Tesis, Realización de un curso teórico-práctico.	Dois estudantes de pré-graduação realizam suas práticas pré-profissionais, Um bachiller formula y ejecuta su Tesis y el tesista de Maestría finaliza la ejecución de su proyecto de Tesis, Realización de un curso teórico-práctico.
Difusión de resultados				Se ha expuesto los avances de las investigaciones en 1 encuentro científico internacional.	Se ha expuesto los avances de las investigaciones en 1 encuentro científico internacional. Se ha enviado un artículo para su publicación en revista internacional indexada.

X. RESULTADOS ESPERADOS

Al término del Proyecto de investigación se ha obtenido las características estructurales y funcionales de las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*. Asimismo, se ha contribuido significativamente con la formación del recurso humano, mediante la realización de tres cursos teóricos-prácticos, asesoramiento de voluntariados (4 estudiantes), prácticas pre-profesionales (4 estudiantes) y realización de dos tesis de pre-grado y una tesis de Maestría. También, se ha logrado difundir los hallazgos de nuestras investigaciones en eventos científicos internacionales y mediante el envío de un artículo para su publicación en revista internacional indizada. En conjunto, con el conocimiento científico generado estaremos contribuyendo en establecer las bases para el desarrollo de procesos para la producción biotecnológica de vitamina C en base a los genes de *M. dubia*.

XI. ESTRATEGIAS A UTILIZAR PARA LA TRANSFERENCIA Y COMUNICACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los conocimientos científicos generados en este Proyecto se difundirán mediante un artículo científico sometido para publicación en revista internacional indizada. Asimismo, los resultados obtenidos serán difundidos en encuentros científicos internacionales. Adicionalmente, los resultados del proyecto estarán disponibles en el repositorio institucional de la UNAP y del IFSC-USP. Adicionalmente, los conocimientos científicos básicos generados serán compartidos con los docentes y estudiantes de las diferentes Facultades de la UNAP en las disciplinas de Bioquímica, Biología Celular y Molecular, Procesos Biotecnológicos y Genética General, Genética Vegetal, Mejoramiento Genético entre otras disciplinas relacionadas.

XII. IMPACTOS ESPERADOS

a) Mejora de las capacidades técnicas

La ejecución del presente Proyecto aportará significativamente en la mejora de las capacidades técnicas y científicas de las instituciones participantes, particularmente de la UNAP. Porque para cumplir con las metas y objetivos propuestos requerirá el uso de tecnologías de última generación empleados en la clonación molecular de genes, producción y purificación de las enzimas, el análisis estructural y funcional de las tres enzimas. Por tanto, el recurso humano (voluntarios, practicantes, tesis de pre- y post-grado y docentes investigadores) será fortalecido con estas nuevas tecnologías que mejorarán el nivel de nuestras investigaciones. Asimismo, la red de colaboración científica internacional con el Instituto de Física de São Carlos (IFSC) será fortalecida y estimulará el desarrollo de nuevas investigaciones con *M. dubia* y otras especies de la diversidad amazónica.

b) Formación de investigadores jóvenes

Nuestro equipo de investigación contribuirá con la formación de jóvenes investigadores que estará constituida por lo menos de 4 voluntarios, 4 practicantes, 2 tesis de pre-grado y 1 de post-grado (nivel de Maestría) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNAP.

c) Tesis de pregrado y/o postgrado

De acuerdo a nuestra misión como docentes investigadores apoyaremos con la realización de 2 tesis de pre-grado y 1 tesis de post-grado (nivel de Maestría). Este apoyo será constante desde la elaboración y presentación del Proyecto de Tesis, asesoramiento en el desarrollo de experimentos y trabajos de Laboratorio, redacción del informe final de tesis y sustentación.

d) N° de personas capacitadas

Estimamos que con el desarrollo de tres cursos teóricos-prácticos previstos en el Proyecto capacitaremos un aproximado de 75 personas. Además, teniendo en cuenta que los resultados de nuestras investigaciones fortalecerán las actividades académicas de asignaturas como bioquímica, bioquímica y nutrición, biología celular y molecular, procesos biotecnológicos y genética, entonces estaremos contribuyendo con la capacitación de unos 300 estudiantes.

e) Acceso para servicios especializados

Para el desarrollo de los dos componentes experimentales del Proyecto se requerirá el acceso a servicios especializados como la síntesis de tres genes, la producción de las tres enzimas recombinantes y análisis cristalográfico de las enzimas en el Instituto de Física de São Carlos (IFSC)-USP.

f) Publicaciones, eventos científicos

Nuestro equipo de investigadores con frecuencia presenta los resultados de sus investigaciones científicas en revistas nacionales e internacionales indizadas. Asimismo, hemos participado en encuentros científicos internacionales para mostrar los resultados de nuestras investigaciones. Por tanto, en este proyecto en particular, se elaborará y someterá a una revista internacional indizada de por lo menos un artículo científico. Asimismo, participaremos en por lo menos 2 encuentros científicos internacionales.

g) Generación de conocimientos o producción de nuevas tecnologías

Los resultados de investigación básica generados en este Proyecto tendrán un importante impacto científico y tecnológico. Primero, al resolver la estructura tridimensional de las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa estableceremos un hito sin precedentes sobre la maquinaria molecular de biosíntesis de vitamina C en el camu-camu y en las plantas en general. Asimismo, evaluando la actividad catalítica de estas tres enzimas, podremos comprender sus mecanismos catalíticos. Todos estos avances permitirán el desarrollo de aplicaciones biotecnológicas mediante ingeniería genética, ingeniería metabólica e ingeniería de proteínas para la producción biotecnológica de vitamina C en base a la información genética del camu-camu.

XIII. INFRAESTRUCTURA Y EQUIPOS A UTILIZARSE

La Unidad Especializada de Biotecnología del CIRNA tiene equipos para realizar técnicas bioquímicas y de biología molecular consideradas en el Proyecto, tales como PCR en Tiempo Real, Microcentrífugas refrigeradas, Fluorómetro de microplacas, Analizador Genético 3130XL (para el secuenciamiento del ADN), equipos de electroforesis, y un Sistema de Fotoregistro BioDocAnalyze.

El Instituto de Física de São Carlos (IFSC) en el Área de Cristalografía está equipado para cumplir con todas las etapas necesarias para la resolución de estructuras de las tres enzimas por difracción de rayos X. Entre otros equipos, cuenta con tres sistemas Äkta de purificación de proteínas (General Electric), centrífugas y ultracentrífugas (Sorvall), termocicladores (C100, BioRad), equipos de electroforesis (BioRad, General Electric), espectrofotómetros (Cary Series, Agilent), cámaras de cristalización termoestabilizadas (construcción propia), cámara fría, robot de cristalización (*Crystal Gryphon (Art Robbins Instruments)*), microscopios y estereoscopios (Olympus SZ61, Leica MZ 125), sistema BiacoreX para SPR (Biacore/GE), fermentadores y dos sistemas para colecta de datos de difracción de rayos X con ánodos rotatorios (Rigaku microMaz 007 con RAXIS IV++ell).

XIV. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES POR COMPONENTES MENSUALIZADO Y RESPONSABLES

Componentes/Actividades/Responsables	Año																			
	2018					2019					2020					2021				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Caracterización estructural de las enzimas																				
Análisis bioinformáticos para la optimización y síntesis de genes/JC, MC, HR																				
Clonación molecular de genes y purificación de enzimas/DL, JV																				
Cristalización de enzimas y determinación de la estructura 3D/RG, DL, JV																				
Caracterización funcional de las enzimas																				
Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas/HD, DL, JV																				
Formación de recursos humanos																				
Asesoramiento de voluntarios y practicantes/Todos																				
Asesoramiento de tesis de pre- y post-grado/RG, DH, DL, JC, JV																				
Realización de cursos teóricos-prácticos/Todos																				
Difusión de resultados																				
Participación como ponentes en encuentros científicos/Todos																				
Publicación de artículo científico en revista internacionales indexadas/Todos																				

Leyenda: DL: Diego Leonardo, HD: Humberto D' Muniz, HR: Hicler Rodríguez, JM: Jorge Marapana, JC: Juan Castro, MC: Marianela Cobos, PA: Pedro Adrianzen, RG: Richard Garra

XV. RESUMEN DEL PRESUPUESTO POR RUBROS, PARTIDAS Y COMPONENTES EN SOLES

Presupuesto por rubros

RUBRO	MONTO (S/.)	%
a) Desarrollo de los componentes y actividades	42.000,00	52,50
b) Movilidad local para el equipo de investigadores	6.000,00	7,50
c) Pasajes y viáticos para capacitación	7.000,00	8,75
d) Adquisición de accesorios para equipos	10.000,00	12,50
e) Mantenimiento preventivo y reparación de equipos	5.000,00	6,25
f) Servicios de terceros vinculados a las actividades del Proyecto	3.000,00	3,75
g) Pago para adquirir bibliografía especializada	500,00	0,63
h) Organización de seminarios, talleres y similares	1.500,00	1,88
i) Gastos operativos del Proyecto	5.000,00	6,25
TOTAL S/.	80.000,00	100,00

Presupuesto por partidas genéricas y componentes

PARTIDA	DESCRIPCIÓN	COMPONENTES				TOTAL (S/.)
		Caracterización estructural de las enzimas	Caracterización funcional de las enzimas	Formación de recursos humanos	Difusión de resultados	
23.12.11	Vestuario, accesorios y prendas diversas	250,00	250,00	0,00	0,00	500,00
23.15.12	De oficina	750,00	750,00	750,00	0,00	2.250,00
23.15.31	Aseo, limpieza y tocador	500,00	500,00	0,00	0,00	1.000,00
23.15.41	Electricidad, Iluminación y electrónica	2.500,00	2.500,00	0,00	0,00	5.000,00
23.16.199	Otros accesorios y repuestos para maquinari.	5.000,00	5.000,00	0,00	0,00	10.000,00
23.18.21	Material, insumos, instrumental y acc. Médico	15.000,00	20.000,00	0,00	0,00	35.000,00
23.19.11	Libros, textos y otros materiales impresos	1.500,00	1.500,00	2.000,00	0,00	5.000,00
23.21.11	Pasajes y gastos de transporte Internacional	0,00	0,00	3.000,00	0,00	3.000,00
23.21.22	Viaticos y asignaciones en el exterior	0,00	0,00	2.500,00	0,00	2.500,00
23.21.299	Movilidad Local	2.000,00	2.000,00	0,00	0,00	4.000,00
23.22.44	servicio de impresiones, encuadernación y en	0,00	0,00	250,00	500,00	750,00
23.24.15	Servicios de mantenimiento, acondicionamier	2.500,00	2.500,00	0,00	0,00	5.000,00
23.27.101	Seminarios, talleres y similares	0,00	0,00	1.500,00	0,00	1.500,00
23.27.1199	Servicios diversos	500,00	500,00	0,00	3.500,00	4.500,00
TOTAL (S/.)		30.500,00	35.500,00	10.000,00	4.000,00	80.000,00

Presupuesto por componentes

COMPONENTE	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	MONTO (\$/.)
Caracterización estructural de las enzimas	Base de datos	1	30.500,00
Caracterización funcional de las enzimas	Base de datos	1	35.500,00
Formación de recursos humanos	Informes	4 voluntarios	10.000,00
	Informes	4 practicantes	
	Tesis	2 tesis de pre-grado	
	Tesis	1 tesis de Maestría	
	Afiches	2 cursos teóricos-prácticos	
Difusión de resultados	Certificados	2 encuentros científicos	500,00
	Artículos	1 artículo científico	3.500,00
TOTAL \$/.			80.000,00

Presupuesto por partidas y componentes					
COMPONENTE	UNIDAD DE MEDIDA	CANTIDAD	MONTO (\$/.)	MONTO (\$/.)	MONTO (\$/.)
Caracterización estructural de las enzimas	Base de datos	1	30.500,00	30.500,00	30.500,00
Caracterización funcional de las enzimas	Base de datos	1	35.500,00	35.500,00	35.500,00
Formación de recursos humanos	Informes	4 voluntarios	10.000,00	10.000,00	10.000,00
	Informes	4 practicantes			
	Tesis	2 tesis de pre-grado			
	Tesis	1 tesis de Maestría			
	Afiches	2 cursos teóricos-prácticos			
Difusión de resultados	Certificados	2 encuentros científicos	500,00	500,00	500,00
	Artículos	1 artículo científico	3.500,00	3.500,00	3.500,00
TOTAL \$/.			80.000,00	80.000,00	80.000,00

XVI.MONITOREO Y EVALUACIÓN: MATRIZ DE MARCO LÓGICO

OBJETIVOS	INDICADORES VERIFICABLES	MEDIOS DE VERIFICACIÓN	SUPUESTOS DE IMPORTANCIA
FIN Incrementar significativamente el conocimiento básico de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>Myrciania dubia</i> "camu-camu" para establecer las bases del desarrollo de procesos para la producción biotecnológica de vitamina C en la Amazonia	Se produce industrialmente la vitamina C mediante procesos biotecnológicos basados en las enzimas biosintéticas del camu-camu	Registros estadísticos de SUNAT, ADEX, INEI, Artículos científicos publicados en revistas nacionales e internacionales indizadas, libros, tesis de pre y post-grado, informes	Apoyo de las autoridades de la UNAP para la realización de investigaciones científicas básicas y aplicadas sobre <i>M. dubia</i>
PROPÓSITO Determinar las características estructurales y funcionales de las enzimas de la vía biosintética de vitamina C (D-manosa/L-galactosa) de <i>Myrciania dubia</i> "camu-camu"	Base de datos con resultados del análisis estructural y funcional de las enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa	Artículo publicado en revista internacional indizada, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, informes finales de tesis de pre y post grado, Resúmenes de eventos científicos, posters científicos y memorias anuales del Vicerrectorado de Investigación	Priorización de la investigación científica en la UNAP. Existe agilidad en los trámites administrativos. Condiciones eléctricas adecuadas.
RESULTADOS/PRODUCTOS Caracterizar estructuralmente las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i>	Se ha caracterizado estructuralmente a las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%	Cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, artículo publicado en revista internacional indizada	Se dispone de cantidades suficientes de materiales y reactivos, no hay recorte presupuestal
Caracterizar funcionalmente las enzimas GDP-manosa-3',5'-epimerasa (E.C. 5.1.3.18), L-galactosa deshidrogenasa (EC 1.1.1.316) y L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (E.C. 1.3.2.3) de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i>	Se ha caracterizado funcionalmente a las tres enzimas de la vía D-manosa/L-galactosa de <i>M. dubia</i> en un 100%	Bases de datos, artículo publicado en revista internacional indizada, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, tesis de pre y post grado publicadas.	No hay recorte presupuestal, las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, la importación de reactivos y materiales es rápida, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Formación de recursos humanos	Al finalizar el proyecto se habrá adiestrado a 4 voluntarios y 4 practicantes. Además, 2 tesis de pre y 1 tesis de Maestría han sustentado sus tesis. También, se habrán realizado 3 cursos teóricos-prácticos	Tesis de pre y post-grado sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio, artículo publicado en revistas internacional indizada	Las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, reactivos y materiales en buen estado, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado
Difusión de resultados	Al cabo del quinto año del Proyecto se ha participado como ponentes en 2 encuentros científicos internacionales y se tendrá 1 artículo en proceso de publicación en revista internacional indizada	Certificados como ponentes de 2 encuentros científicos, 1 artículo en proceso de publicación en revista internacional indizada	Apoyo de las autoridades para la difusión de los resultados, desembolso oportuno de los fondos

ACTIVIDADES

Caracterización estructural de las enzimas

Análisis bioinformático para la optimización y síntesis de genes
Clonación molecular de genes y purificación de enzimas
Cristalización de enzimas y determinación de la estructura 3D

Al finalizar el Proyecto se ha caracterizado estructuralmente las tres enzimas la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*. El presupuesto requerido es de S/ 30,500.00

Cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, registros de datos del citómetro de flujo, artículos publicados

Se dispone de cantidades suficientes de materiales y reactivos

Caracterización funcional de las enzimas

Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas

Al término del Proyecto se ha caracterizado funcionalmente las tres enzimas la vía D-manosa/L-galactosa de *M. dubia*. El presupuesto requerido es de S/ 35,500.00

Bases de datos, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas, cuadernos de laboratorio, informes de prácticas pre-profesionales, tesis de pre y post grado publicadas.

Las autoridades priorizan el apoyo de la investigación, la importación de reactivos y materiales es rápida, condiciones eléctricas adecuadas, equipos están en buen estado

Formación de recursos humanos

Asesoramiento de voluntarios y practicantes
Asesoramiento de tesis de pre- y post-gradó
Realización de cursos técnicos-prácticos

Al finalizar el proyecto se ha adiestrado a 4 voluntarios y 4 practicantes. Además, 2 tesis de pre y 1 de Maestría han sustentado sus tesis. También, se habrán realizado 3 cursos técnicos-prácticos. El presupuesto requerido es de S/ 10,000.00

Tesis de pre y post-gradó sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio, artículos publicados en revistas nacionales e internacionales indexadas

Apoyo permanente de las autoridades de las instituciones participantes en la formación del recurso humano vinculado al Proyecto

Difusión de resultados

Participación como ponentes en encuentros científicos
Publicación de artículo científico en revista internacionales indizadas

Al finalizar el Proyecto hemos participado como ponentes en 2 encuentros científicos internacionales y se tendrá 1 artículo en proceso de publicación en revistas internacional indizada. El presupuesto requerido es de S/ 4,000.00

Certificados como ponentes de 2 encuentros científicos, 1 artículo en proceso de publicación, Tesis de pre y post-gradó sustentadas y publicadas, informes de prácticas pre-profesionales, cuadernos de laboratorio

Apoyo de las autoridades de las instituciones participantes para la difusión de los resultados, desembolso oportuno de los fondos

XVII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Castro JC, Maddox JD, Cobos M, Requena D, Zimic M, Bombarely A, et al. De novo assembly and functional annotation of *Myrciaria dubia* fruit transcriptome reveals multiple metabolic pathways for L-ascorbic acid biosynthesis. *BMC Genomics*. 2015;16:997.
2. Smirnoff N, Wheeler GL. Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2000;35(4):291-314.
3. Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol*. 2004;134(3):1200-5.
4. Valpuesta V, Botella MA. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci*. 2004;9(12):573-7.
5. Wolucka BA, Van Montagu M. GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the de novo biosynthesis of vitamin C in plants. *J Biol Chem*. 2003;278(48):47483-90.
6. Wheeler GL, Jones MA, Smirnoff N. The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature*. 1998;393(6683):365-9.
7. Smirnoff N, Conklin PL, Loewus FA. Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001;52:437-67.
8. Major LL, Wolucka BA, Naismith JH. Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: an enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *J Am Chem Soc*. 2005;127(51):18309-20.
9. Watanabe K, Suzuki K, Kitamura S. Characterization of a GDP-D-mannose 3'',5''-epimerase from rice. *Phytochemistry*. 2006;67(4):338-46.
10. Mieda T, Yabuta Y, Rapolu M, Motoki T, Takeda T, Yoshimura K, et al. Feedback inhibition of spinach L-galactose dehydrogenase by L-ascorbate. *Plant Cell Physiol*. 2004;45(9):1271-9.
11. Momma M, Fujimoto Z. Expression, crystallization and preliminary X-ray analysis of rice L-galactose dehydrogenase. *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun*. 2013;69(Pt 7):809-11.
12. Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Second. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. 2344 p.
13. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.
14. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-5.
15. Hancock RD, McRae D, Haupt S, Viola R. Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biol*. 2003;3:7.
16. Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T. Purification and properties of L-galactono-gamma-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J Biochem (Tokyo)*. 1995;117(1):120-4.

17. Johnson KA, Goody RS. The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*. 2011;50(39):8264-9.
18. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5th edition. New York: *W. H. Freeman*; 2008. 1100 p.
19. Bergfors T, editor. *Protein Crystallization*, Second Edition. 2nd edition. La Jolla, Calif: *International University Line*; 2009. 504 p.
20. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2011;67(Pt 4):235-42.
21. Kabsch W. XDS. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 2):125-32.
22. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 2):213-21.
23. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2010;66(Pt 4):486-501.
24. Dutta S, Burkhardt K, Young J, Swaminathan GJ, Matsuura T, Henrick K, et al. Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank. *Mol Biotechnol*. 2009;42(1):1-13.
25. RCSB Protein Data Bank - RCSB PDB [Internet]. [citado 01 de agosto de 2020]. Disponible en: <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

Análisis bioinformático para la optimización
y síntesis de genes



Clonación Molecular de Genes

XVIII. ANEXO

Producción y purificación de las
enzimas recombinantes



Análisis funcional de las
enzimas recombinantes

Análisis estructural de las
enzimas recombinantes

Figura 1. Diagrama de flujo que muestra el proceso de producción y purificación de las
enzimas recombinantes.

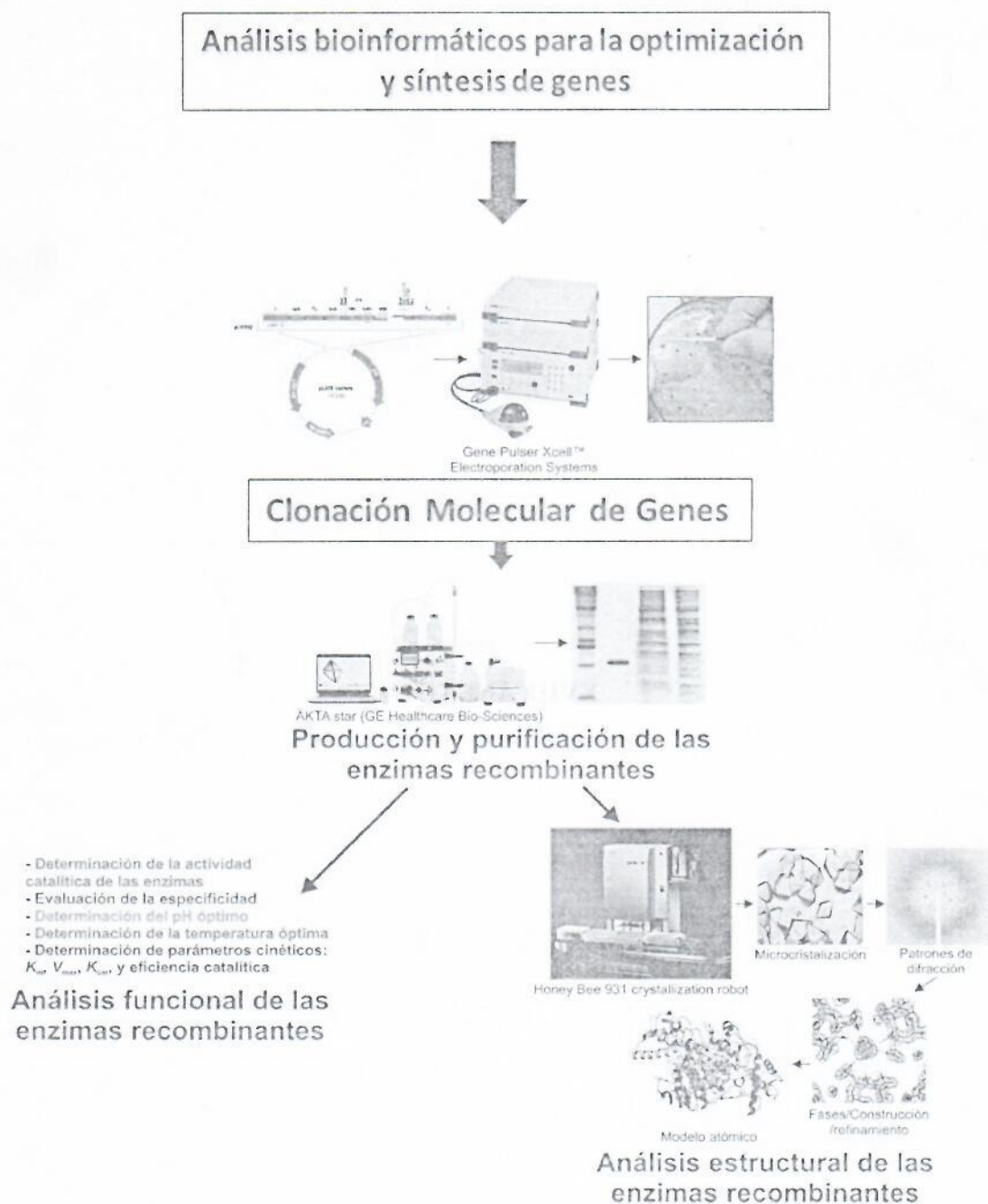


Figura 1. Flujoograma de procedimientos que se emplearán en el proyecto para cumplir con los objetivos propuestos.