

Análisis bioinformático del lactato deshidrogenasa: un enfoque hacia *Lactococcus lactis*

Gómez Marín Valeria¹,
León Rodríguez Daniel Arturo², Gaviria Arias Duverney²

RESUMEN

Las bacterias ácido lácticas juegan un papel fundamental en la fermentación de los alimentos, el ácido láctico producido por este grupo de microorganismo es de alto valor y gran parte se obtiene por la fermentación del piruvato mediante la lactato deshidrogenasa. *Lactococcus lactis* es una de las bacterias ácido lácticas más usadas en la industria de la cual se ha reportado la presencia de diferentes LDH. El objetivo de este artículo fue hacer uso de las herramientas bioinformáticas para observar y comparar las LDH encontradas en una misma cepa de *L. lactis* con el fin de determinar las diferentes secuencias codificantes para distintas LDH analizando su importancia e impacto en el ámbito industrial. Se utilizaron los programas y bases de datos NCBI para encontrar distintas LDH reportadas en una misma cepa y se corroboró que no se tratara de una misma proteína reportada varias veces. Además, Swiss model se usó para modelar las proteínas e identificar sus características y RasMol para sus aspectos estructurales. Se encontraron 3 LDH en la cepa UC063 de *L. lactis* codificadas en distintas partes del genoma con diferente secuencia de aminoácidos, se confirmó la identidad de L-LDH, LDH-2 y LDH-3 y se evidenciaron las diferentes características estructurales para cada modelamiento de las proteínas. Es importante tener en cuenta los múltiples genes ya que si se desea el redireccionamiento del flujo metabólico del microorganismo para fines industriales debe haber un múltiple silenciamiento, en cuanto al análisis proteico, es necesario evaluar las características de manera más exhausta pues en este estudio se establecieron diferencias para puntos clave como los motivos proteicos, pero no el comportamiento de cada enzima y como estas diferencias repercuten en el funcionamiento.

PALABRAS CLAVE: Lactato deshidrogenasa, *Lactococcus lactis*, sitio alostérico, gen *ldh*

¹ Estudiante de Microbiología, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre Pereira

² Docente Investigador, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Libre Pereira

Bioinformatic analysis of lactate dehydrogenase: an approach towards *Lactococcus lactis*

ABSTRACT:

Lactic acid bacteria have a fundamental role in food fermentation, the lactic acid produced by this group of microorganisms is of high value and much of it is obtained by the fermentation of pyruvate by means of lactate dehydrogenase. *Lactococcus lactis* is one of the most used lactic acid bacteria in the dairy industry, the presence of different LDH has been reported. The objective of this article was to make use of bioinformatics tools to observe and compare the LDH found in the same *L. lactis* strain in order to determine the different coding sequences for different LDH, analyzing their importance and impact in the industrial field. The NCBI programs and databases were used to find different LDH reported in the same strain and it was confirmed that it was not the same protein noted several times. Furthermore, Swiss model was used to model the proteins and identify their characteristics and RasMol for their structural aspects. Three LDHs were found in *L. lactis* strain UC063 encoded in different parts of the genome with different amino acid sequences, the identity of L-LDH, LDH-2 and LDH-3 was confirmed and the different structural characteristics for each modeling of the proteins were evidenced. It is important to take into account the multiple genes if it's required the redirection of the metabolic flow of the microorganism for industrial purposes. There must be multiple silencing. As for the protein analysis, it is necessary to evaluate the characteristics in a more exhaustive way because in this study they were established to key points such as several differences in protein motifs, but not the behavior of each enzyme and how these differences affect the structure.

KEYWORDS: Lactate dehydrogenase, *Lactococcus lactis*, allosteric site, *ldh* gen.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son definidas como microorganismos Gram-positivos, anaerobios facultativos, con bajos porcentajes de guanina-citosina que convierten principalmente las azúcares en ácido láctico(1). las BAL engloban grupos de especies filogenéticamente diversas que cumplen papeles fundamentales en diferentes tipos de fermentación en alimentos, haciéndolas importantes a nivel industrial(2).

El metabolismo de las bacterias ácido-lácticas es clasificado en homofermentativo y heterofermentativo dependiendo de la forma en la que usan los carbohidratos como fuente de energía e influenciado por las condiciones de crecimiento (fuente de carbono no limitada, aminoácidos, vitaminas, precursores de ácidos nucleicos y disponibilidad de oxígeno). La vía homofermentativa provee ácido láctico como producto final en donde la ruta Embden-Meyerhof transforma la glucosa en piruvato y luego este es reducido a lactato, mientras que las cantidades de ácido láctico, dióxido de carbono, y etanol o acetato producidas en el metabolismo heterofermentativo por la vía de la fosfocetolasa son equivalentes en concentraciones(3)

La enzima crucial para el metabolismo homofermentativo es la lactato deshidrogenasa (LDH), responsable de catalizar la reducción reversible de piruvato a lactato(4). La generación del ácido

láctico por la LDH es el paso principal que usan las BAL para la reoxidación de NADH (formado durante las etapas previas de fermentación) a NAD⁺, manteniendo de esta forma el equilibrio redox celular (**Figura 1**) (3,5). En este sentido, existe una gran cantidad de LDH dependiente de NAD en las BAL(6). De manera contraria, las BAL pueden transformar el lactato a piruvato mediante la reacción inversa que cataliza la LDH, acompañada de la regeneración del NADH(7).

Tradicionalmente, la lactato deshidrogenasa se ha clasificado con base a su producto específico de L-ácido láctico y D-ácido láctico, y por consiguiente las BAL poseen los genes *ldhL* y *ldhD* que codifican para la L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) y D- lactato deshidrogenasa(L-LDH)respectivamente(8). L-LDH ha sido estudiada a fondo debido a que el L-ácido láctico es ampliamente usado en la industria de alimentos(9). No obstante, la existencia de varios tipos de la LDH ha llevado a su agrupación en LDH dependiente de NAD (nLDH) y LDH independiente de NAD (i-LDH), esta última también conocida como LDH respiratoria que utiliza por lo general un mecanismo que depende de flavinas, y juega un rol importante en el uso de lactato en condiciones aerobias a través de la cadena de transporte de electrones (3). Las enzimas de cada grupo pueden a su vez tener la especificidad convencional por un isómero de lactato (**Figura 2**) (10).

Se ha señalado que L y D-LDH se ubican en distintas familias de enzimas y los genes que las codifican no están relacionados evolutivamente(11), los estudios de las secuencias de aminoácidos sobre estas clases revelaron una gran divergencia, dando soporte a esta teoría(12). Muchas de las L-iLDH (EC1.1.2.3) pertenecen a la familia de flavoproteínas oxidantes de α -hidroxiácidos que usan FMN para reacciones de transferencia de electrones, mientras que la mayoría de D-iLDH (EC 1.1.2.4) han sido agrupadas dentro de las oxidoreductasas-transferasas tipo 4 que usan FAD para reacciones de transferencia de electrones(10). Por otro lado, D-nLDH (EC 1.1.1.28) ha sido expuesta como miembro del 2- hidroxiaácido específico del isómero D de la superfamilia de las hidrogenasas en bacterias(12) y L-nLDH (EC 1.1.1.27) pertenece a las dehidrogenasas dependientes de NAD(3)

Los genomas de las BAL difieren en el tipo y número enzimas LDH que codifican siendo específicos para cada cepa, sin embargo, la LDH bacteriana generalmente consiste en el ensamblaje de un homotetrámero con dos sitios alostéricos en donde cada monómero tiene un sitio activo (**Figura 3**) (4). En la mayoría de BAL, LDH es alostéricamente activada por la fructosa 1,6-bifostato(FBP), un intermediario de la vía de la glicólisis.(13). La FBP provoca cambios significativos en la estructura cuaternaria de la enzima cuando está activada o desactivada, debido un reordenamien-

to secuencial entre las subunidades del tetrámero de la LDH, lo que ocasiona cambios conformacionales en esta y permite o no la unión del piruvato en su sitio activo(4).

Los esfuerzos por mejorar el rendimiento metabólico de las bacterias ácido lácticas en función de optimizar los productos y los procesos en los que los que participan, han provisto diversas investigaciones(9,11,14–16). La tecnología inicial para la producción del ácido láctico por fermentación se ha basado en la neutralización del producto, la remoción de este o la filtración celular del medio y el control de flujo metabólico(9). No obstante, las ciencias ómicas han proporcionado herramientas que aumentan de manera exponencial el uso de las BAL en bioprocesos, salud humana y producción de alimentos(17); la genómica y la biotecnología han permitido la inactivación de ya sea el gen codificante de L-LDH o D-LDH y la inserción de plásmidos para mejorar el rendimiento de ácido láctico puro de un solo tipo con un fin específico(16). Así mismo la delección de genes puede proveer una taza menor de lactato producido por la LDH que mejoraría los problemas relacionados con la acidez excesiva en alimentos(9) y la inserción de genes a bacterias promisorias para la industria ha revelado buenos resultados(15). En relación con esto, la aplicación de nuevos conocimientos en campos como la ingeniería metabólica, es una estrategia prometedora para dar solución a proble-

mas y la mejora en el uso de las vías metabólicas de las BAL y sus enzimas.

Lactococcus lactis es una especie de microorganismos de importancia industrial que ha sido usaa por siglos en la fermentación de los alimentos, en especial en lácteos para la elaboración de yogurt y quesos(18). De *L. lactis* se destacan dos subespecies principales; *lactis* y *cremoris* (19). Además de proveer características de sabor conferidas por metabolitos producidos en pequeñas cantidades como el diacetil, el ácido láctico producido por *L. lactis* le confiere propiedades preservativas importantes a los productos fermentados, por lo cual es una de la BAL más estudiadas al día de hoy presentando gran número de reportes de ingeniería genética para mejorar su eficiencia en los procesos(20).

La enzima clave para la fermentación homoláctica de *L. lactis* es la L-nLDH codificada por el gen *ldh* presente en el operón las (por sus siglas en inglés lactic acid synthesis)(21)sin embargo, se ha evidenciado la presencia de genes homólogos de L-iLDH en algunas cepas de *L. lactis*, y otros genes (*ldhB*, *ldhX* y *hicD*) que codifican proteínas muy similares a la L-LDH, mostrando una gran variabilidad de los tipos de LDH en cada subespecie y cepa(21,22) Por otro lado, se ha reportado que el Pi y la FBP se une de manera alostérica a la enzima para desactivarla y activarla respectivamente(Figura 5), siendo parte clave del funcionamiento de la misma. Las estrategias experimentales para la modifi-

cación del flujo metabólico de *L. lactis* incluyen diversas herramientas genéticas que incrementan o disminuyen la actividad de la lactato deshidrogenasa dependiendo del metabolito requerido, o inclusive se cambia el tipo de LDH de acuerdo a las necesidades(20,23)

En los últimos años, la ingeniería metabólica en *L. lactis* se ha enfocado en priorizar una fermentación mixta re direccionando el metabolismo del piruvato al lactato para producir otras moléculas de interés industrial, (18) la interrupción de LDH codificada por el *ldh* ha sido una de las estrategias más usadas para este objetivo, en donde la inactivación de este gen produce cepas deficientes de LDH reorientando el flujo metabólico (21). Así mismo, el interés de la producción únicamente de lactato ha llevado al uso de manipulación genética de esta cepa; la tolerancia de esta bacteria al ácido láctico y su alto rendimiento ha hecho que se genere un nuevo bioproceso con cepas modificadas, a las cuales el gen endógeno para L-LDH es reemplazado con genes heterólogos de D-LDH de microorganismos como *L. delbrueckii* (20).

Las herramientas que brinda la bioinformática han sido parte de muchos de los avances y éxitos que se han mencionado, permitiendo realizar investigaciones fundamentales para el desarrollo de las técnicas discutidas mediante análisis in sílico, que dan una idea de cómo los procesos se llevan a cabo en la naturaleza. Bases de datos como BioPath han

sido usadas para evidenciar las vías bioquímicas y transformaciones metabólicas que ocurren(24); la predicción de las estructuras 3D de proteínas es hecha mediante programas como Swiss-Model; las características fisicoquímicas de estas pueden ser observadas con el uso de bases de datos como ProtParam(25); y la comparación de las secuencias de las proteínas codificadas en los genomas de diferentes especies pueden ser evaluadas mediante herramientas como OrhoMCL(19). Es por esto que el objetivo de este artículo fue hacer uso de las herramientas bioinformáticas para observar y comparar las LDH encontradas en una misma cepa de *L. lactis* con el fin de determinar las diferentes secuencias codificantes para distintas LDH analizando su importancia e impacto en el ámbito industrial.

METODOLOGÍA

Búsqueda de información.

En la base de datos PubMed, se realizó una búsqueda con los descriptores “Lactate dehydrogenase” y “Lactic acid bacteria” unidos con el conector booleano “AND”. La búsqueda se limitó a los artículos originales y de revisión de los últimos 10 años. Como otra fuente de información se utilizó los textos que PubMed relacionaba y mostraba a la hora de entrar en uno de los artículos encontrados así como las referencias de estos.

Para la información específica de *L. lactis* se utilizaron los descriptores “Lactate dehydrogenase” y “*Lactococcus lactis*” en la misma base de datos bajo los mismos parámetros de búsqueda. Las fuentes externas mencionadas anteriormente también fueron incluidas.

Análisis bioinformático

Búsqueda de secuencias de las LDH presentes en la misma cepa de L. lactis. La secuencia de aminoácidos de la LDH proveniente de *L. lactis* fue tomada del Centro Nacional de información biotecnológica NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>]; se usó la ecuación de búsqueda “*Lactococcus lactis*” AND “lactate dehydrogenase” en todas la bases de datos la cual arrojó 24 grupos idénticos de proteínas, en cada uno de estos 24 grupos se buscó la proteína que coincidía en alguna cepa en específico para identificar las diferentes LDH que podía codificar la cepa.

Confirmación de secuencias diferentes. Para corroborar que las proteínas encontradas en el NCBI fueran codificadas por diferentes genes dentro de la cepa, cada una se alineó con el genoma de *L. lactis* usando la herramienta básica de búsqueda de alineación local BLAST [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>], de esta manera, si cada una de las secuencias coincidía en diferentes posiciones dentro del genoma, se trataban de distintas LDH.

Identidad de las secuencias. Con el conocimiento previo acerca de los distintos tipos de LDH que se han evidenciado en *L. lactis*, se realizó un alineamiento por pares en BLAST con el fin de comparar las secuencias encontradas en el estudio con las secuencias anotadas en el Genk-Bank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] correspondientes a diferentes LDH(L-ldh, ldhB, ldhX), y así determinar si los resultados coincidían con los reportados en la literatura.

Alineamiento múltiple de secuencias. el alineamiento múltiple de las 4 secuencias fue realizado en Clustal Omega [<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/cluster/>] y se visualizó mostrando los colores. El alineamiento obtenido se usó para la construcción del cladograma mediante el mismo programa. Se incluyó una secuencia de una LDH perteneciente al género *Lactococcus* pero de una especie distinta a la elegida en este estudio (*Lactococcus raffinolactis*, número de acceso PCS12604.1) con el fin de obtener una mejor organización en el diagrama.

Análisis de proteínas. El modelamiento de cada proteína fue realizado con Swiss-Model [<https://swissmodel.expasy.org/>] para evidenciar sus características de modelamiento (Gráfico de Ramachandran, QMEAN...) La identificación de los dominios conservados importantes fue realizada usando la base de datos UniProt y tomando como referencia la LDH principal de las BAL [<https://www.uniprot.org/>] y la identifi-

cación de estos dominios en cada proteína se realizó mediante el alineamiento en BLAST. Algunas características estructurales para cada proteína fueron identificadas mediante RasMol [<http://www.rasmol.org/>]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Bioinformático

Identificación de la cepa de L.lactis con diferentes LDH

La base de datos del NCBI reportó 24 grupos idénticos de LDH dentro de la especie *L.lactis*. De estos, 4 grupos de proteínas con diferente longitud de la secuencia y número de acceso fueron identificados y elegidos por incluir la misma cepa bacteriana, *Lactococcus lactis subsp. lactis cepa UC06*, mostrando a priori que esta cepa podría codificar 4 LDH diferentes (**tabla 1**).

Verificación de secuencias diferentes

Cuando las 4 secuencias fueron alineadas con el genoma anotado en el NCBI de *L.lactis*, 2 de estas se encontraban en la misma posición (WP_161631171 y ARE11082) y las otras dos se localizaban en diferentes partes dentro del genoma (**tabla 2**). Las dos secuencias que coincidían en localización presentaban la cadena de aminoácidos bastante similar en cuanto a longitud (325 y 326 aa), variando en sólo uno, y así mismo, al alinear estas dos secuencias,

la identidad era del 100%, y por consiguiente se trataba de la misma proteína.

La diferencia de la longitud en las proteínas se explica debido a que en la de 326 aminoácidos se identifica el codón que codifica para metionina dos veces al inicio de la secuencia, por lo cual la secuencia más corta excluyó uno de estos. Sin embargo, La base de datos Uniprot para esta secuencia, indica que el iniciador de MET se excluye en la cadena final de la proteína, resultando de 324 aminoácidos(26).

Identidad de las secuencias

El alineamiento de cada secuencia con los distintos tipos de LDH reportados en la literatura(22,27) and its main end products of fermentation under these conditions were acetate and acetoin. However, under anaerobic conditions, the growth of these cells was strongly retarded while the main end products of fermentation were acetate and ethanol. Upon prolonged subculturing of this strain under anaerobic conditions, both the growth rate and the ability to produce lactate were recovered after a variable number of generations. This recovery was shown to be due to the transcriptional activation of a silent *ldhB* gene coding for an Ldh protein (LdhB se muestra en la (tabla 3). Se encontró que la proteína reportada dos veces corresponde a la L-LDH, pues ambas secuencias se alinearon perfectamente con esta proteína. Esta enzima en espe-

cífico es la más común en la especie de *Lactococcus lactis* y la principal encargada de llevar a cabo la producción de ácido láctico a partir del piruvato durante el proceso fermentativo cuando no hay alteraciones en el flujo metabólico(21). Esto coincide con el resultado de nuestra búsqueda, pues los grupos idénticos de proteínas donde se encontró la secuencia en la cepa elegida abarcan 55 y 344 entradas diferentes para WP_161631171 y ARE11082 respectivamente, mostrando una gran cantidad de cepas con la capacidad de producir esta proteína.

Por otro lado, la enzima con el número de acceso WP_003131609 tuvo un alto porcentaje de identidad con la secuencia de la enzima LDH-2 (96,82%), y de manera similar se comportó el alineamiento de WP_003132070 con la enzima LDH-3 (98,96%), ambas con un valor E de 0.0, estableciendo entonces la identidad de las secuencias con estas. De estas dos proteínas se ha reportado su codificación a partir de los genes *ldhB* y *ldhX* respectivamente, que cuentan con al menos un 30% de identidad de la secuencia de aminoácidos con el producto del gen *ldh*, es decir, la L-LDH principal analizada anteriormente(21). Nuestro alineamiento realizado de la secuencia de L-LDH principal con la LDH-2 y LDH-3 por separado usando BLAST, obtuvo una identidad del 45% y 44% para cada una respectivamente, siendo consistente con lo previamente mencionado

Análisis múltiple de secuencias

Los resultados del análisis múltiple de secuencias se muestran en la (Figura 5). En el alineamiento nuevamente se observa la misma secuencia de aminoácidos en las dos L-LDH, y así mismo se pueden evidenciar una gran cantidad de residuos conservados entre esta enzima, la LDH-2 y la LDH-3 a lo largo de la secuencia, que podrían dar una idea de los sitios importantes para el proceso biológico que lleva a cabo la enzima como los sitios catalíticos, alostéricos o de unión a NAD(28,29).

Además, en el árbol filogenético (Figura 6) se puede observar la división por secuencias más similares; la primera rama corresponde a la LDH codificada *Lactococcus raffinolactis* y se incluyó en el árbol para poder tener un mejor acercamiento a la similitud entre las secuencias de las LDH de la cepa y su agrupación. Se evidencian diferencias que podrían ser significativas entre la L-LDH y las LDH-2 y 3, que como se discutió anteriormente, presentan un 45 y 44% de identidad con la LDH. Finalmente se evidencia el mismo comportamiento en el árbol para las dos secuencias de L-LDH principal.

Los resultados obtenidos aquí demuestran que la cepa elegida para este estudio, *L.lactis UC06*, tiene la capacidad de codificar diferentes tipos de lactato deshidrogenasa, al igual que otras cepas reportadas con esta característica(21,27,30)although this polyol

was a poorer substrate for growth than glucose. When compared to glucose, the metabolism of mannitol caused an NADH burden due to formation of an additional NADH molecule at the reaction catalysed by mannitol-1-phosphate dehydrogenase (Mtl1PDH. La importancia de estos resultados radica en que *L. lactis* es uno de los microorganismos más representativos en la industria láctea, no solo porque como parte de su metabolismo homofermentativo natural produce altas concentraciones de ácido láctico, un producto de alto valor involucrado en el sabor, textura y preservación de los alimentos(22)the enzyme responsible for lactate utilization in this process has not yet been identified. As genes for fermentative NAD-dependent l-lactate dehydrogenase (l-nLDH, sino también porque el amplio conocimiento acerca de su genética y fisiología combinada con su estado de “Generalmente reconocida como segura” o GRAS, su metabolismo simple y su pequeño genoma han convertido a esta especie es uno de los modelos más atractivos y usados en las estrategias de ingeniería metabólica(31)and particularly disruption of the las-located lactate dehydrogenase (ldh. Esto ha permitido el cambio del flujo metabólico de la especie para la formación de productos diferente al lactato, donde la disrupción del gene *ldh* que codifica para LDH es la estrategia más común. No obstante autores como Bongers *et al*(27) y Henriksen y Nilsson(32) han reportado la producción de lactato en igual o menor cantidad en cepas deficientes de LDH, lo cual es ex-

plicado por estas secuencias diferentes a la LDH principal que se encuentran en *L.lactis* y pueden ser expresadas cuando el gen *ldh* no está activo. Debido a esto es importante que la ingeniería genética y metabólica no solo esté enfocada en el silenciamiento o represión del gen *ldh* y tenga en cuenta los genes *ldhB* y *ldhX* para evitar que el microorganismo restablezca su habilidad de producir ácido láctico. La regulación transcripcional del gen *ldh* es la estrategia más común, en donde se realiza la represión de catabolitos de carbono y por consiguiente, la proteína de control de catabolito de carbono A o CcpA se encarga de la regulación positiva y negativa de la transcripción mediante la unión a los sitios *cre* en el cromosoma (33,34).

Por otro lado, los mecanismos de expresión o silenciamiento de los genes *ldhB* y *ldhX* y las estrategias que se pueden implementar no están tan bien caracterizados como las del gen *ldh*, aun cuando se sabe un poco más acerca de los mecanismos de *ldhB* que de *ldhX*. Es conocido que los elementos de secuencias de inserción (IS) pueden ser responsables de reordenamientos genéticos que incluyen la inactivación y activación de genes, y se ha demostrado que en *L.lactis* la activación de la transcripción de *ldhB* es el resultado de la inserción de IS981 orientada y específica en la región aguas arriba de este gen, generando una secuencia promotora(27). Estos conocimientos pueden ser aplicados en la generación de estrategias para el silenciamiento del gen. En cuanto al gen *ldhX*,

la alternativa utilizada para su represión se ha basado en la generación de cepas con la delección de este(31)and particularly disruption of the las-located lactate dehydrogenase (*ldh*). Teniendo en cuenta los mecanismos genéticos anteriores es importante buscar alternativas y métodos que permitan el silenciamiento definitivo de los múltiples genes codificantes para las LDH y así generar cepas de un alto valor para la industria.

Análisis de proteínas

El modelamiento de las tres LDH se muestra en la (Tabla 4).

L-LDH

La proteína modelada a partir de la secuencia que corresponde según nuestros resultados a la L-LDH principal en las bacterias ácido lácticas, se construyó por homología con la estructura alostérica de la L-Lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei* (entrada 2zqy.1.A en Swiss model) con una identidad del 69,8%. El QMEAN tuvo un valor de 0,54 y la calidad absoluta tanto global como local del modelo fue de manera general buena; en la calidad local del modelo se pueden observar algunos residuos que puntúan por debajo de 0,6 infiriendo una mala calidad en este punto, sin embargo, para un análisis más detallado es necesario evidenciar la ubicación de estos residuos dentro del a estructura cuaternaria de la enzima y que tanta importancia toman en aspectos como el sitio activo, el sitio alostérico,

etc.(35)as compared to sequence-based methods. However, these methods are challenged by large families defined by ‘promiscuous’ (or ‘mobile’. Y así comprender sin son diferencias importantes que lleguen a alejar de la realidad la enzima que se está modelando. La información recién descrita se puede observar con más detalle en el (**Anexo 1**). Por otro lado, el modelamiento no predice ligandos para la proteína, no obstante se conoce la función y por lo tanto sus ligandos, y la homología con la estructura alosterica de la LDH de *Lactobacillus casei* también estima que esta proteína es activada y desactivada por el FPB y el Pi como se ha descrito en la literatura y se menciona en la introducción(4,29,36).

El diagrama de Ramachandran (**Figura 7**) obtenido se evidencia en la imagen que gran parte de los residuos se ubican en la región favorecida como las hojas β paralelas y la hélices α dextrógiras con un puntaje del 95,98%, sin embargo, en la imagen se observan unos pocos residuos con conformaciones que no están permitidas.

LDH-2

El modelamiento de la proteína se hizo por homología de la lactato deshidrogenasa en su forma de unión a ligando proveniente de *Enterococcus mundti* (entrada 3wsw.1.A), mostrando entonces sitios de unión para FBP (**Figura 10**) así como para NAD (**Figura 11**) es decir, esta LDH es dependiente de

NAD. La identidad de la secuencia fue de 72,6%. Siguiendo con las características el QMEAN en este caso también se mostró favorable, y la calidad absoluta local fue generalmente buena a excepción de pocos residuos. Esta información más detallada se muestra en el (**Anexo 2**).

El diagrama de Ramachandran (**Figura 8**) fue favorecido al 96,05% aunque a diferencia del caso anterior, este presentó valores atípicos en un 0,65%. **LDH-3**

El modelamiento de la proteína se hizo con respecto al mutante de lactato deshidrogenasa (A85R) de *Staphylococcus aureus* complejo con NAD y piruvato (entrada 3h3j.1.A), corroborando una vez más la información consultada acerca de sus ligandos. La identidad de la secuencia fue baja en comparación de los otros modelamientos con un 42,04%, pero es importante volver a reiterar que los residuos que definen que tan preciso es el modelo es gran parte son los involucrados en sitios importantes de la proteína. El QMEAN mostró un valor del -1,16 que sigue siendo bueno. Los resultados más detallados se encuentran en (**Anexo 3**).

En cuanto al diagrama de Ramachandran (**Figura 9**), tuvo un favorecimiento del 94, 73% y como se esperaba por las características mencionadas previamente, unos valores atípicos del 1,43%.

En general en el diagrama de Ramachandran, la distribución de los ami-

noácidos para las tres enzimas tuvo un comportamiento parecido, y este resultado es apoyado al analizar las características estructurales en RasMol, pues la cantidad de hélices α y hojas β es parecida; la L-LDH tiene un total de 4 865 hélices y 1 752 hojas; LDH-2, 4 941 hélices y 1 716 hojas; y por último, LDH-3, 4 998 hélices y 1 796 hojas. También es importante reiterar que la longitud de los aminoácidos es similar lo cual puede sustentar estos resultados, la distribución de estas hélices y hojas en la proteína es similar (**Tabla 5**)

Motivos proteicos

UniProt permitió identificar por medio de la Base de datos de huellas dactilares de Protein Motif, 5 motivos proteicos que están conservados en las LDH procarionotas y eucariotas (**Tabla 6**) que funcionan como huella digital y que rodean el sitio activo y por lo tanto son esenciales para la actividad catalítica de la enzima, debido a esto se esperaba que estos residuos estuvieran conservados en nuestras 3 proteínas, sin embargo el alineamiento de estos motivos sólo obtuvo una alta identidad con la secuencia correspondiente a la L-LDH principal (**Tabla 7**), lo cual es lógico al ser que mayor actividad metabólica lleva, pero las otras dos secuencias correspondientes a LDH-2 y LDH-3, tuvieron coincidencias muy bajas para estos motivos, a pesar de ser objetivas para la misma función que la L-LDH. Estos resultados obtenidos hacen necesario un análisis más profundo, simulaciones y recurrir a

otras herramientas que permitan identificar en la estructura cuaternaria las posibles interacciones entre los residuos de estas enzimas y el sustrato para entender su modo de acción a pesar de no poseer los dominios tan conservados. Gaspar et al.(21) compararon experimentalmente y por medio de simulaciones la L-LDH con la LDH-B y. Encontraron una alta similitud en los residuos de los sitios alostéricos de las enzimas, no obstante no se mencionan los residuos correspondientes al sitio activo.

CONCLUSIONES

Este estudio confirmó que al igual que otras cepas, *Lactococcus lactis* UC063 contiene en su genoma la información para codificar más de una lactato deshidrogenasa, y que se deben buscar nuevos métodos genéticos con la capacidad de silenciar los múltiples genes encargados de generar estas encima para evitar problemas en la industria láctea donde se busca inhibir la producción de ácido láctico si es el caso. Sin embargo, aunque la tres proteínas coinciden en varias características generales como el número de aminoácidos, la cantidad aproximada de hélices y hojas, los 4 dominios, etc, en este trabajo no se pudo evidenciar la similitud entre los motivos proteicos que conforman el sitio de catálisis, una de las características principales para que cumplan la misma función, por esto es necesario profundizar más en el análisis bioinformático y la modelación de la proteínas para así identificar y entender el comportamiento de cada enzima

y como estas diferencias repercuten en el funcionamiento y darle aplicabilidad a estos saberes.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sano A, Takatera M, Kawai M, Ichinose R, Yamasaki-Yashiki S, Katakura Y. Suppression of lactate production by aerobic fed-batch cultures of *Lactococcus lactis*. *J Biosci Bioeng*. 2020;
2. Jia B, Pu ZJ, Tang K, Jia X, Kim KH, Liu X, et al. Catalytic, Computational, and Evolutionary Analysis of the d -Lactate Dehydrogenases Responsible for d -Lactic Acid Production in Lactic Acid Bacteria. *J Agric Food Chem*. 2018;66(31):8371–81.
3. Bleckwedel J, Mohamed F, Mozzi F, Raya RR. Major role of lactate dehydrogenase D-LDH1 for the synthesis of lactic acid in *Fructobacillus tropaeoli* CRL 2034. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2020 Sep;104(17):7409–26.
4. Feldman-Salit A, Hering S, Messiha HL, Veith N, Cojocar V, Sieg A, et al. Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. *J Biol Chem*. 2013 Jul;288(29):21295–306.
5. Valvona CJ, Fillmore HL, Nunn PB, Pilkington GJ. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. Vol. 26, *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 3–17.
6. Hoefnagel MHN, Starrenburg MJC, Martens DE, Hugenholtz J, Kleerebezem M, Van Swam II, et al. Metabolic engineering of lactic acid bacteria, the combined approach: Kinetic modelling, metabolic control and experimental analysis. *Microbiology*. 2002;148(4):1003–13.
7. Guo T, Zhang L, Xin Y, Xu Z, He H, Kong J. Oxygen-Inducible Conversion of Lactate to Acetate in Heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC 367. *Appl Environ Microbiol*. 2017 Nov;83(21).
8. Zheng Z, Sheng B, Ma C, Zhang H, Gao C, Su F, et al. Relative Catalytic Efficiency of ldhL-and ldhD-Encoded Products Is Crucial for Optical Purity of Lactic Acid Produced by *Lactobacillus* Strains. 2012;
9. Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. Vol. 41, *Process Biochemistry*. Elsevier; 2006. p. 991–1000.
10. Jiang T, Guo X, Yan J, Zhang Y, Wang Y, Zhang M, et al. A bacterial multidomain NAD-independent D-lactate dehydrogenase utilizes flavin adenine dinucleotide and Fe-S clusters as cofactors and quinone as an electron acceptor for D-lac-

- tate oxidization. *J Bacteriol.* 2017 Nov;199(22):342–59.
11. Zhang J, Gong G, Wang X, Zhang H, Tian W. Positive selection on D-lactate dehydrogenases of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus*. *IET Syst Biol.* 2015;9(4):172–9.
 12. Cristescu ME, Egbosimba EE. Evolutionary history of d-lactate dehydrogenases: A phylogenomic perspective on functional diversity in the fad binding oxidoreductase/transferase type 4 family. *J Mol Evol.* 2009 Sep;69(3):276–87.
 13. Matoba Y, Miyasako M, Matsuo K, Oda K, Noda M, Higashikawa F, et al. An alternative allosteric regulation mechanism of an acidophilic l-lactate dehydrogenase from *Enterococcus mundtii* 15-1A. *FEBS Open Bio.* 2014;4:834–47.
 14. Cheng X, Dong Y, Su P, Xiao X. Improvement of the Fermentative Activity of Lactic Acid Bacteria Starter Culture by the Addition of Mn²⁺. *Appl Biochem Biotechnol.* 2014;174(5):1752–60.
 15. Ancy J, Shimpei A, Kengo S, Yota T, Fumio M, Tsutomu T, et al. Utilization of Lactic Acid Bacterial Genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the Production of Lactic Acid. *Biotechnol Biochem.* 2013;77(5):966–70.
 16. Žunar B, Trontel A, Svetec Miklenić M, Prah JL, Štafa A, Marđetko N, et al. Metabolically engineered *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 as a novel producer of optically pure L- and D-lactate. *World J Microbiol Biotechnol.* 2020;36(8).
 17. Pfeiler EA, Klaenhammer TR. The genomics of lactic acid bacteria. Vol. 15, *Trends in Microbiology.* Trends Microbiol; 2007. p. 546–53.
 18. Song AAL, In LLA, Lim SHE, Rahim RA. A review on *Lactococcus lactis*: From food to factory. Vol. 16, *Microbial Cell Factories.* BioMed Central Ltd.; 2017. p. 55.
 19. Wels M, Siezen R, Van Hijum S, Kelly WJ, Bachmann H. Comparative genome analysis of *Lactococcus lactis* indicates niche adaptation and resolves genotype/phenotype disparity. *Front Microbiol.* 2019 Jan;10(-JAN):4.
 20. Aso Y, Hashimoto A, Ohara H. Engineering *Lactococcus lactis* for D-Lactic Acid Production from Starch. *Curr Microbiol.* 2019 Oct;76(10):1186–92.
 21. Gaspar P, Neves AR, Shearman CA, Gasson MJ, Baptista AM, Turner DL, et al. The lactate dehydrogenases encoded by the *ldh* and *ldhB* genes in *Lactococcus lactis* exhibit distinct regulation and catalytic properties - Comparative modeling

- to probe the molecular basis. *FEBS J.* 2007 Nov;274(22):5924–36.
22. Zhao R, Zheng S, Duan C, Liu F, Yang L, Huo G. NAD-dependent lactate dehydrogenase catalyses the first step in respiratory utilization of lactate by *Lactococcus lactis*. *FEBS Open Bio.* 2013;3:379–86.
 23. Van Niel EWJ, Palmfeldt J, Martin R, Paese M, Hahn-Hägerdal B. Reappraisal of the Regulation of Lactococcal L-Lactate Dehydrogenase. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Mar;70(3):1843–6.
 24. Liu M, Bienfait B, Sacher O, Gasteiger J, Siezen RJ, Nauta A, et al. Combining Chemoinformatics with Bioinformatics: In Silico Prediction of Bacterial Flavor-Forming Pathways by a Chemical Systems Biology Approach “Reverse Pathway Engineering.” Cirino PC, editor. *PLoS One.* 2014 Jan;9(1):e84769.
 25. Guo C, Wang Y, Huang X, Wang N, Yan M, He R, et al. Molecular cloning and bioinformatics analysis of lactate dehydrogenase from *Taenia multiceps*. *Parasitol Res.* 2017 Oct;116(10):2845–52.
 26. *ldh1* - L-lactate dehydrogenase 1 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (strain IL1403) - *ldh1* gene & protein.
 27. Bongers RS, Hoefnagel MHN, Starrenburg MJC, Siemerink MAJ, Arends JGA, Hugenholtz J, et al. IS981-mediated adaptive evolution recovers lactate production by *ldhB* transcription activation in a lactate dehydrogenase-deficient strain of *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol.* 2003 Aug;185(15):4499–507.
 28. Nadeem MS, Al-Ghamdi MA, Khan JA, Sadath S, Al-Malki A. Recombinant production and biochemical and in silico characterization of lactate dehydrogenase from *Geobacillus thermodenitrificans* DSM-465. *Electron J Biotechnol.* 2018;35:18–24.
 29. Ito S, Takeya M, Osanai T. Substrate Specificity and Allosteric Regulation of a d-Lactate Dehydrogenase from a Unicellular Cyanobacterium are Altered by an Amino Acid Substitution. *Sci Rep.* 2017 Dec;7(1):1–9.
 30. Neves AR, Ramos A, Shearman C, Gasson MJ, Santos H. Catabolism of mannitol in *Lactococcus lactis* MG1363 and a mutant defective in lactate dehydrogenase. Vol. 148, *Microbiology. Society for General Microbiology*; 2002. p. 3467–76.
 31. Gaspar P, Neves AR, Gasson MJ, Shearman CA, Santos H. High yields of 2,3-butanediol and mannitol in *Lactococcus lactis* through engineering of NAD + cofactor recycling. *Appl Environ Microbiol.* 2011 Oct;77(19):6826–35.

32. Henriksen CM, Nilsson D. Redirection of pyruvate catabolism in *Lactococcus lactis* by selection of mutants with additional growth requirements. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;56(5–6):767–75.
33. Liu J, Chan SHJ, Chen J, Solem C, Jensen PR. Systems biology - A guide for understanding and developing improved strains of lactic acid bacteria. *Front Microbiol*. 2019 Apr;10(APR):876.
34. De Vos WM, Hugenholtz J. Engineering metabolic highways in *Lactococci* and other lactic acid bacteria. *Trends Biotechnol*. 2004;22(2):72–9.
35. Lee B, Lee D. Protein comparison at the domain architecture level. *BMC Bioinformatics*. 2009 Dec;10(SUPPL. 15):S5.
36. Furukawa N, Miyanaga A, Togawa M, Nakajima M, Taguchi H. Diverse allosteric and catalytic functions of tetrameric d-lactate dehydrogenases from three Gram-negative bacteria. *AMB Express*. 2014 Dec;4(1):1–12.

TABLAS.

Tabla 1. Diferentes proteínas LDH encontradas en una misma cepa de *L.lactis* en la base de datos del NCBI.

Microorganismo	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis cepa UC063</i>	
Proteína	Número de acceso	Longitud de la cadena
Lactato deshidrogenasa	WP_161631171	326
Lactato deshidrogenasa	WP_003131609	314
Lactato deshidrogenasa	ARE11082	325
Lactato deshidrogenasa	WP_003132070	323

Tabla 2. Ubicación de las secuencias que codifican para LDH encontradas en *Lactococcus lactis subsp.lactis cepa UC063* dentro del genoma de la especie.

Número de acceso	Ubicación dentro del genoma (pb)
WP_161631171	De 1303742 a 1304722
WP_003131609	De 396955 a 397899
ARE11082	De 1303742 a 1304719
WP_003132070	De 1097827 a 1098798

Tabla 3. Resumen del alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la LDH encontrada en *Lactococcus lactis subsp.lactis cepa UC063* con los distintos tipos de LDH anotados en el GenBank

Número de acceso secuencia de estudio	Secuencia de alineamiento	Identidad de la se- cuencia	Porcentaje de identidad	Valor E
WP_161631171	Q01462	L-LDH	100%	0.0
WP_003131609	AAP49572	LDH2 o B-LDH	96,82%	0.0
ARE11082	Q01462	L-LDH	100%	0.0
WP_003132070	GFO79016	LDH3 o X-LDH	98,76%	0.0

Tabla 4. Resultado del modelamiento de los tres tipos de lactato deshidrogenasa encontrados en la cepa de estudio, cada una con cuatro cadenas diferenciadas por colores. En la imagen correspondiente a la LDH-2 se pueden observar los ligandos FBP y NAD

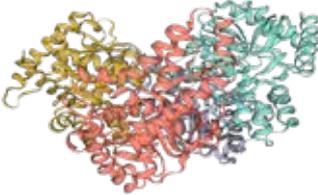
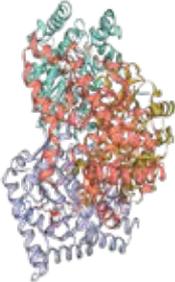
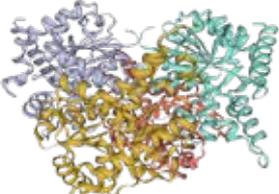
L-LDH	LDH-2	LDH-3
		

Tabla 5. Estructura de las proteínas, en púrpura se observan las hélices α y en verde la hojas β

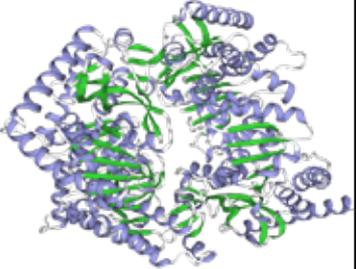
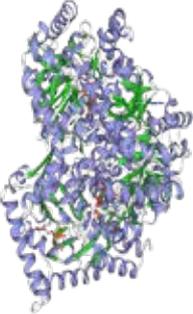
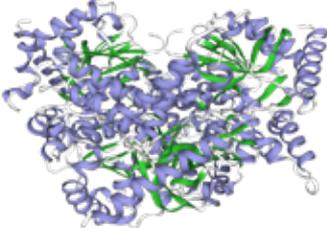
L-LDH	LDH-2	LDH-3
		

Tabla 6. Motivos proteicos relevantes para la actividad catalíticas de la LDH

Motivo	Secuencia	Longitud
1	KVILVGDGAVGSSYAFALVNQGIAQ	25
2	ELGIVDLFKEKTQGDAEDLSHALAF	25
3	LVAANPVDILTYATWKFSGFP	21
4	VVGSGLDRTARFRQALAE	19
5	YIMGEHGDSEFAVW	14

Tabla 7. Alineamientos de los motivos de LDH (Query) con las proteínas de estudio L-LDH (ARE11082); LDH-2 (WP_003131609) y LDH-3 (WP_003132070)

Motivo 1	Query	1	KVILVGDG--AVGSSYAFALVNQGIAQ	25
	ARE11082.1	8--.....	32
	WP_003132070.1	7	..VI..A.-.....T..HN..	25
	WP_003131609.1	7	..VVI.T.--F..T.I.YSMI...	28
Motivo 2	Query	1	ELGIVDLFKEKTQGDAEDLSHALAF	25
	ARE11082.1	33	57
	WP_003131609.1	32	..VLI.VNQD.AE.E.L..	50
	WP_003132070.1	49	..L...	54
Motivo 3	Query	1	LVAANPVDILTYATWKFSGFP	21
	ARE11082.1	119	139
	WP_003131609.1	120	I.S.....VA.	133
	WP_003132070.1	123	...S....V.	132
Motivo 4	Query	1	VVGSGLDRTARFRQALAE	19
	ARE11082.1	143	161
	WP_003131609.1	143	I..T..T...T...KE..	160
	WP_003132070.1	147	.I.T..L.E.S.M..IV..	165
Motivo 5	Query	1	YIMGEHGDSEFAVW	14
	ARE11082.1	173	186
	WP_003131609.1	173	..I.....V...	186
	WP_003132070.1	177	.VLA...K.S..A.	190

FIGURAS.

Figura 1. Reacción reversible de piruvato a lactato con reducción de NADH. Tomada de: *The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor*. Vol. 26, *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd; 2016. p. 3–17.(5)

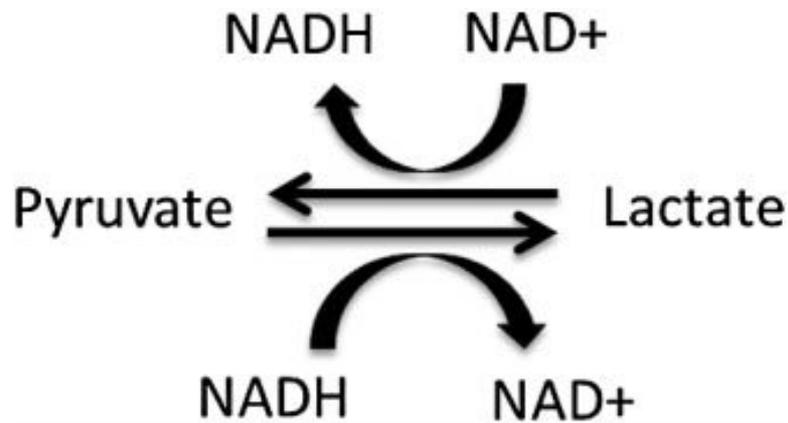
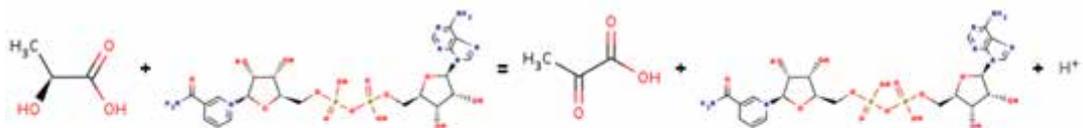
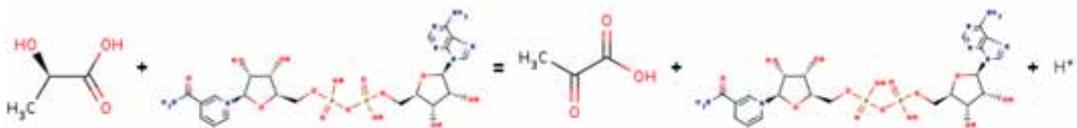


Figura 2. Reacciones catalíticas por los diferentes tipos de LDH. En **A** y **B** se muestra la reacción química reversible catalizada por D-nLDH y L-nLDH respectivamente. La figura **C** y **D** muestra la reacción catalizada por D-iLDH y L-iLDH respectivamente, donde la diferencia radica en el uso de FAD para D-iLDH y FMN para L-iLDH como cofactor. Tomada de: <https://www.brenda-enzymes.org/index.php>



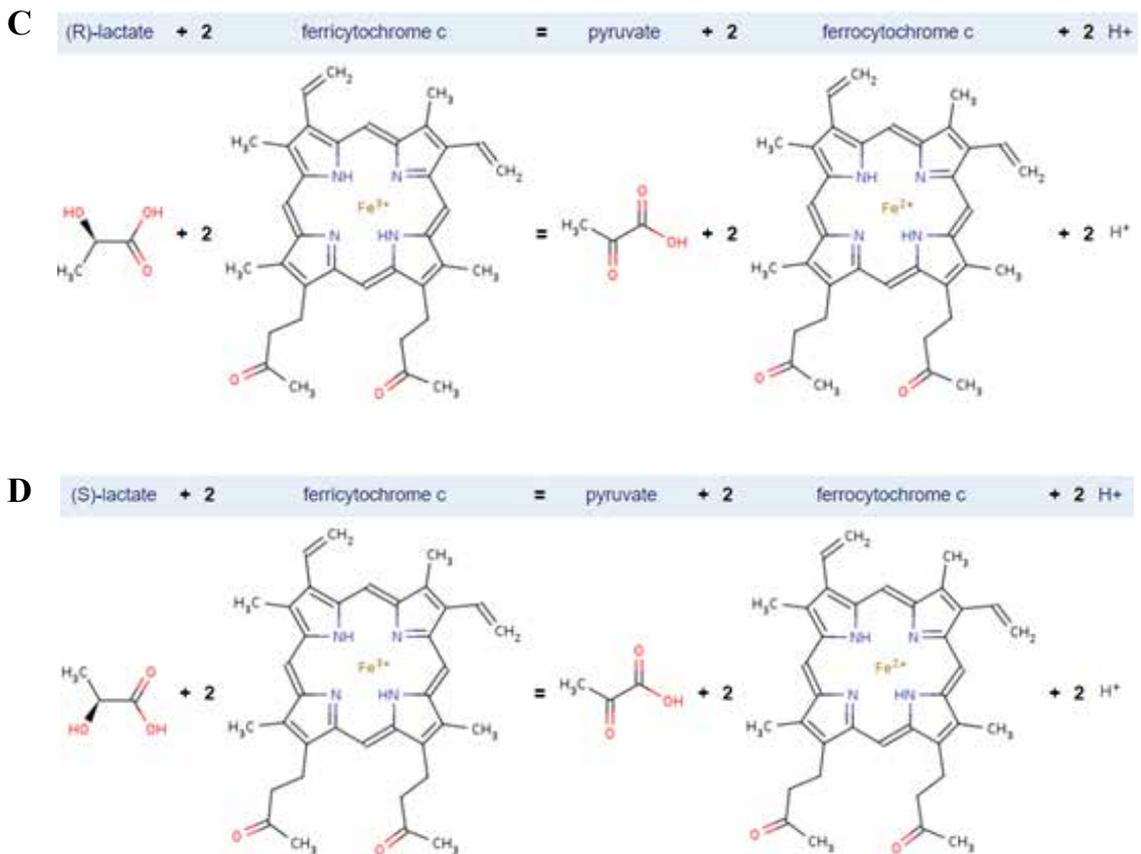


Figura 3. Estructura cristalina de una LDH bacteriana. La estructura cuaternaria homotetramérica y la estructura homodimérica, se muestran en **A** y **B**, respectivamente. Los sitios de unión catalíticos y alostéricos se señalan. Las moléculas de FBP se muestran como esferas en los sitios de unión alostéricos. El NAD, que se muestra en naranja, y el sustrato se muestra en azul, están unidos en los sitios de unión catalíticos. Tomada de: Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. *J Biol Chem*(4).

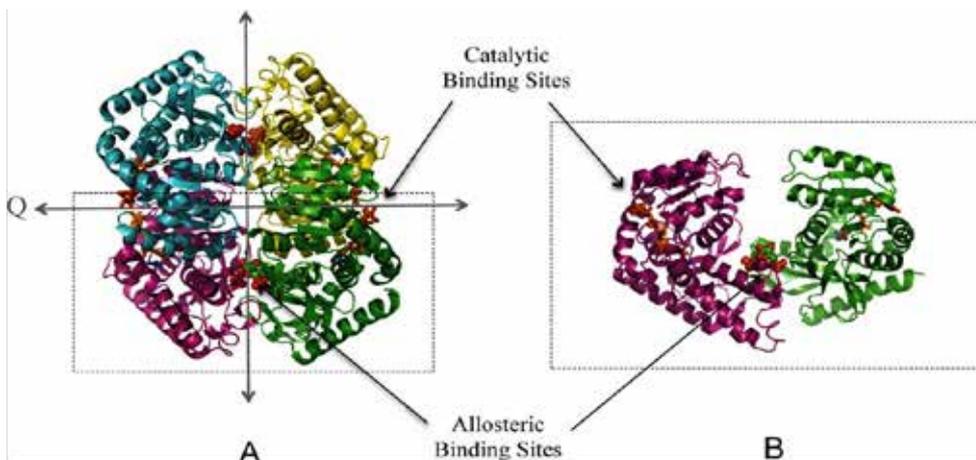


Figura 4. Modelo propuesto para la inactivación y activación de LDH en *L.lactis*. Se muestra el homodímero de la enzima con los sitios catalíticos indicados en blanco en cada monómero y el sitio alostérico en la interfaz en malva (misma vista que la Fig. 1B). La inhibición y la activación se indican mediante líneas rojas y verdes, respectivamente. Tomada de: Regulation of the activity of lactate dehydrogenases from four lactic acid bacteria. J Biol Chem (4)

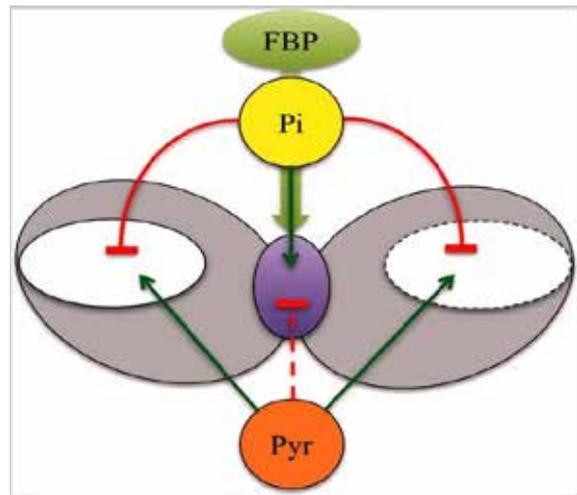


Figura 5. Alineamiento múltiple de las 4 LDH estudiadas por medio de la herramienta Clustal. Los aminoácidos que presentan un “*” en la parte inferior corresponden a alineamientos perfectos; “:” corresponde a grupos de aminoácidos con gran similitud; “.” Corresponde a grupos de aminoácidos con similitud débil; y “-” corresponde a la inserción de un gap.

LDH-3.L.lactis	--MKINNKVVIVGAGAVGSTYAHNLVDDLADEIAIINTNKSKASANSLLHALPYLN	58
L-LDH.L.lactis	MMADKQRKKVILVGDGAVGSSYAFALVNQGIAGELGIVDLFKETQGD AEDLSHALAFTS	60
L.LDH.L.lactis	-MADKQRKKVILVGDGAVGSSYAFALVNQGIAGELGIVDLFKETQGD AEDLSHALAFTS	59
LDH-2.L.lactis	--MKITSRKVVVIGTGFVGTSTAYSMINQGLVNLVLDVNVQDKAEGEALDLLDGVSWGQ	58
	. : ** : : * * * : : . : : : : : * : : : : : * : : : : * * : : : . :	
LDH-3.L.lactis	AAPKNIYAADYSDVSDADIVVLSANAPSATFGKNPDRQLLENVEMIRDITRK TMDAGF	118
L-LDH.L.lactis	-PKKI-YSADYSDASDADLVVLTSGAPQK---PGETRLDLVEKNLRITKDWTKIVASGF	115
L.LDH.L.lactis	-PKKI-YSADYSDASDADLVVLTSGAPQK---PGETRLDLVEKNLRITKDWTKIVASGF	114
LDH-2.L.lactis	-ENVIVRAGDYKCKNADIVVVTAGVNOK---PGQSRDLVNTNAKIMRSIVTVQMDSGF	114
	. : * * * . : * * * : : : . : . : * * * : : * : : : : : : : * * :	
LDH-3.L.lactis	DGIFLVA SNPVDVLAQVVAEVSGLPKHRVIGTGTLL ETSRMRQIVAEKLIQINPKSIHGYY	178
L-LDH.L.lactis	KGIFLVAANPVDILTYATWKFSGFPKNRVVGSSTLDARFRQALAEKVVDVARSIHAYI	175
L.LDH.L.lactis	KGIFLVAANPVDILTYATWKFSGFPKNRVVGSSTLDARFRQALAEKVVDVARSIHAYI	174
LDH-2.L.lactis	DGIFVVIASNPVDILTYAVWETSGLDQSRIVGTGTTLDTRFRKELATKLEIDPRSVHGYY	174
	* * * : : * * * * * : . : : * * : : * : * * * * * * * * : * * * : : * * * :	
LDH-3.L.lactis	LAEHGKSSFAAWSNVTVGAIP LTTWLKKYPNPEFPTFDEIDQEIREVGLDIFMQGNTSY	238
L-LDH.L.lactis	MGEHGDSEFAVWSHANVAGVKLEQWFQENDYLN EAEIVELFESVRDAAYSIIAKKGATFY	235
L.LDH.L.lactis	MGEHGDSEFAVWSHANVAGVKLEQWFQENDYLN EAEIVELFESVRDAAYSIIAKKGATFY	234
LDH-2.L.lactis	IGEHGDSEVAVWSHTTVGGKPILEFIVK NKKIGVEDLSNLSNKKVNAAYEIIDKKQATYY	234
	. : * * * * * . : * * * : : : : : : : : : : : : : * : * * * :	
LDH-3.L.lactis	GIAASLARLTRAIFRNESVILPVSA YLGTGEYGF DLYTGS PAIIDRTGVRVLELELTQE	298
L-LDH.L.lactis	GVAVALARITKAILDDEHAVLPVS VFQDGQYGVSDCYLGQPAVVGAE GVVNPIHIPLNDA	295
L.LDH.L.lactis	GVAVALARITKAILDDEHAVLPVS VFQDGQYGVSDCYLGQPAVVGAE GVVNPIHIPLNDA	294
LDH-2.L.lactis	GIGMSTARIVKAILNNEQAILPVSA YLRGEYQEGVFTGVPSIVNQNQVREIIEI LNIDAY	294
	* . : : * * : * * * : * : * * * : * * * . : * * : : : * * : : : * * : : :	
LDH-3.L.lactis	EQEKFKASTVLLKENFDSIKEKCTL-----	323
L-LDH.L.lactis	EMQKMEASGAQLKAIIDEAFAKEEFASAVKN	326
L.LDH.L.lactis	EMQKMEASGAQLKAIIDEAFAKEEFASAVKN	325
LDH-2.L.lactis	EKKQFEKSVSQLKEVIESIK-----	314
	* : : : * * * : : . :	

Figura 6. Arbol real construido por medio Clustal Omega. En este árbol se puede observar la agrupación de las secuencias con respecto a la similitud entre ellas. La secuencia “PCS12604.1” corresponde a la LDH de *Lactococcus raffinolactis*

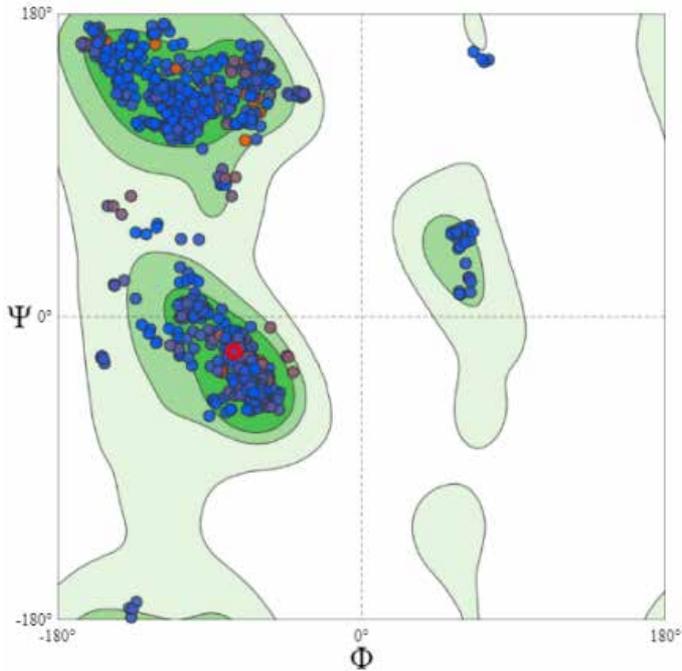
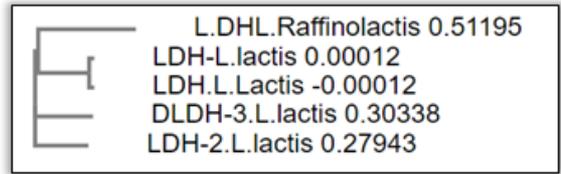


Figura 7. Diagrama de Rama-chandran obtenido en el modelamiento de la L-LDH.

Figura 8. Diagrama de Rama-chandran obtenido en el modelamiento de la LDH 2

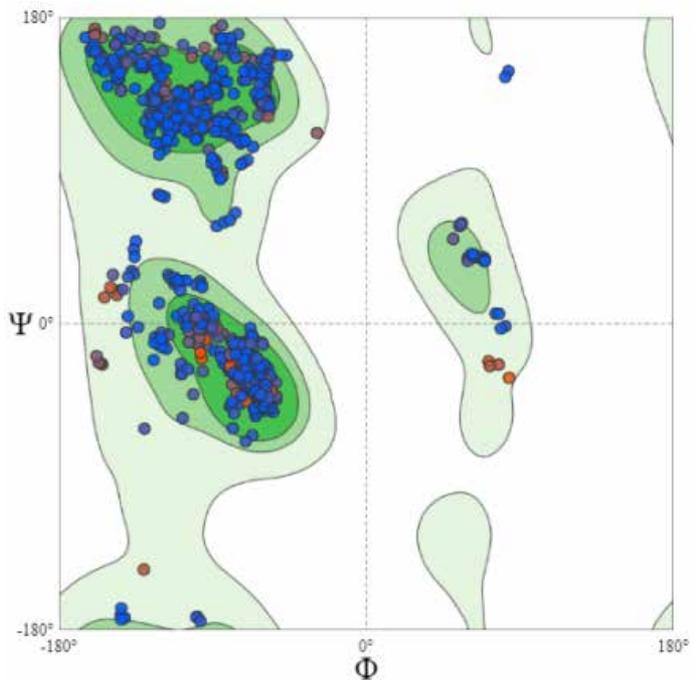


Figura 9. Diagrama de Ramachandran obtenido en el modelamiento de la LDH 3

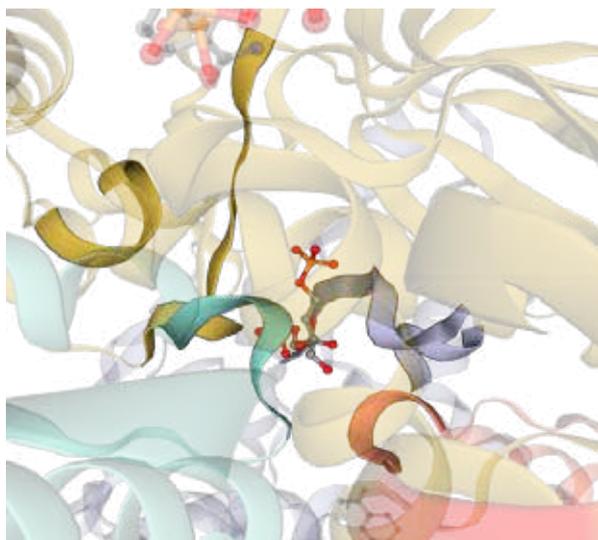
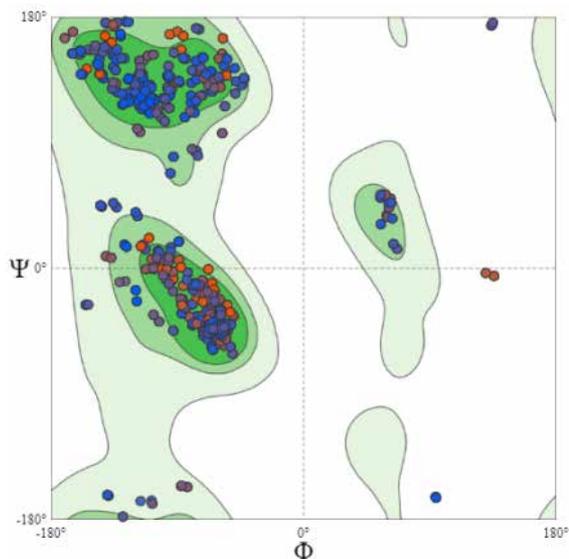
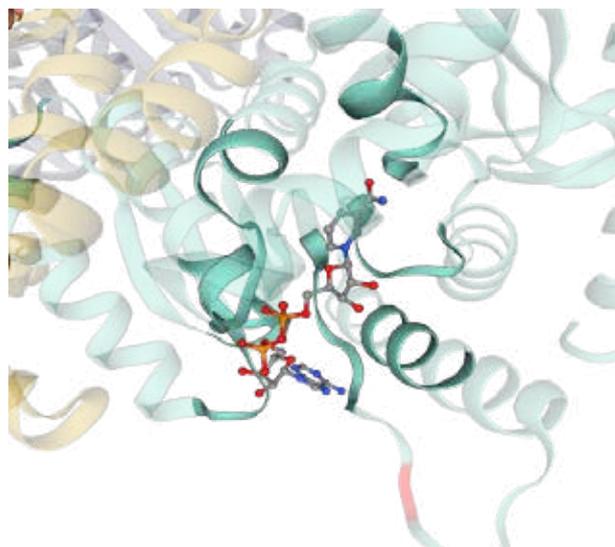


Figura 10. FPB como ligando de la LDH-2, las 4 cadenas de la proteína están implicadas en esta interacción, donde se diferencian por colores

Figura 11. NAD como ligando de 1 de las 4 cadenas de la LDH-2



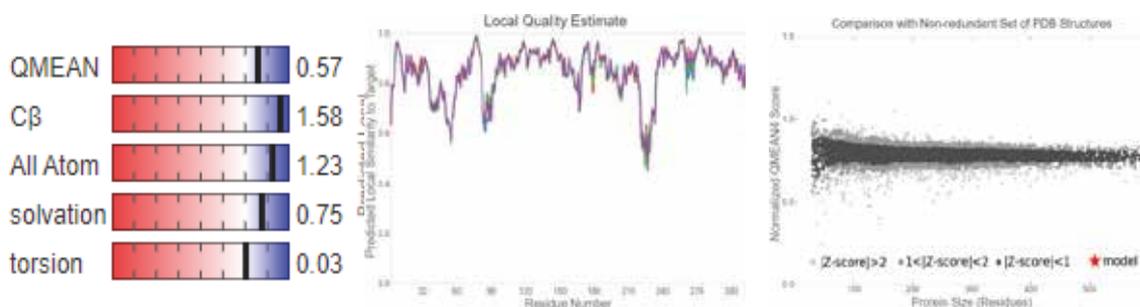
ANEXOS

Anexo 1. Información sobre el modelamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la L-LDH



Template	Seq Identity	Coverage	Description
2zqy.1.A	69.28%	<div style="width: 80%;"></div>	L-lactate dehydrogenase T-state structure of allosteric L-lactate dehydrogenase from Lactobacillus casei

Anexo 2. Información sobre el modelamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la LDH-2



Template	Seq Identity	Coverage	Description
3wsw.1.A	72.61%	<div style="width: 80%;"></div>	L-lactate dehydrogenase Crystal structure of minor L-lactate dehydrogenase from Enterococcus mundtii in the ligands-bound form

Anexo 3. Información sobre el modelamiento de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la LDH-3

Template	Seq Identity	Coverage	Description
3h3j.1.A	42.04%		L-lactate dehydrogenase 1 Crystal structure of lactate dehydrogenase mutant (A85R) from staphylococcus aureus complexed with NAD and pyruvate

