



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA

**ADAPTACION PSICROFILICA DE LA ENDOGLUCANASA MESOFILICA
CEL5A DE *BACILLUS AGARADHAERENS***

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA,
MENCION QUIMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO CIVIL QUIMICO
E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGIA**

MAURICIO ALBERTO AZOCAR FIEGELIST

SANTIAGO DE CHILE
MAYO 2011



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS FISICAS Y MATEMATICAS
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA

**ADAPTACION PSICROFILICA DE LA ENDOGLUCANASA MESOFILICA
CEL5A DE *BACILLUS AGARADHAERENS***

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGISTER EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA,
MENCION QUIMICA**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TITULO DE INGENIERO CIVIL QUIMICO
E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGIA**

MAURICIO ALBERTO AZOCAR FIEGELIST

PROFESORES GUIA:

JUAN ASENJO DE LEUZE
BARBARA ANDREWS FARROW

MIEMBROS DE LA COMISION:

ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ALVARO OLIVERA NAPPA
OCTAVIO MONASTERIO OPAZO

SANTIAGO DE CHILE
MAYO 2011

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, en especial a mi mamá, por todo el cariño y apoyo que me ha entregado constantemente y por todos los sacrificios que debió hacer para que yo pudiera completar mis estudios universitarios.

A mis hermanos por todo su apoyo, en especial a mi hermano Rodrigo, quién me permitió realizar parte de mi carrera universitaria de manera más aliviada y con quién más compartí durante mis años de estudio.

A mis profesores guía (Dr. Juan Asenjo y Dra. Barbara Andrews) por la orientación, apoyo y optimismo que me entregaron durante la realización de este trabajo.

A los miembros de la comisión por todos los comentarios, sugerencias y correcciones realizadas a este trabajo.

A todos los docentes y personas que trabajan en el CIBYB por los buenos momentos compartidos y la ayuda que me brindaron cuando la necesité. En especial a la Dra. Oriana Salazar, al Dr. Álvaro Olivera y a Nancy por la permanente disposición que mostraron cuando les pedí ayuda.

A Matías Saavedra y a Fran Mercado, quienes me apoyaron constantemente durante la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros del DIQBT por todas las horas compartidas en clases y trabajos durante estos últimos 5 años.

Finalmente, al Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB) por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

RESUMEN

Las enzimas psicrófilas se caracterizan por presentar una gran actividad catalítica a bajas temperaturas (0 - 30 °C). A pesar que diversos factores y variables han sido asociados a la adaptación psicrófila enzimática, generalmente se expone que las enzimas adaptadas a bajas temperaturas presentan esta propiedad debido a un incremento de su flexibilidad estructural, el cual permite la movilidad molecular necesaria para la ocurrencia del proceso de catálisis enzimática a bajas temperaturas.

Durante los últimos años, el potencial uso de enzimas psicrófilas en diversos procesos industriales y biotecnológicos ha generado gran interés debido principalmente a los considerables ahorros de energía y recursos que éste conlleva.

El objetivo general de este trabajo de tesis es adaptar psicrófilicamente la endoglucanasa mesófila Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*, mejorando sus propiedades catalíticas a bajas temperaturas mediante la realización de mutaciones sitio dirigidas (I99A, A134Y/I99A y A134Y/I99A/N138L), las cuales se encuentran principalmente asociadas a un posible incremento de la flexibilidad estructural en la vecindad del sitio activo de esta enzima.

Se intentó generar 3 variantes de la proteína Cel5A que contienen respectivamente las mutaciones I99A, A134Y/I99A y A134Y/I99A/N138L en el dominio catalítico de Cel5A clonado en el vector de expresión pET22b(+). Posteriormente, las endoglucanasas recombinantes se expresaron y purificaron para finalmente establecer los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) y termodinámicos de activación (E_A , ΔG^\ddagger , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) de las reacciones catalizadas por estas enzimas a partir de los resultados obtenidos en los ensayos de actividad enzimática.

La mutación I99A permite mejorar en aproximadamente un 70 % promedio la constante catalítica de la enzima en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C, sin aumentar significativamente el proceso de inactivación enzimática en todo el rango de temperatura estudiado. Por otra parte, las mutaciones A134Y/I99A permiten mejorar en aproximadamente un 120 % promedio la constante catalítica de la enzima en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C, incrementando notoriamente el proceso de inactivación enzimática a partir de temperaturas superiores a los 40 °C. Finalmente, no se logró estudiar el efecto de las mutaciones A134Y/I99A/N138L sobre las propiedades catalíticas de la endoglucanasa Cel5A debido a un error en la generación de esta variante, el cual estuvo probablemente asociado a interacciones inespecíficas que ocurrieron entre el ADN molde y uno de los partidores mutagénicos en la reacción de PCR.

La variación de los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) y termodinámicos de activación (E_A , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) de las reacciones catalizadas por las endoglucanasas recombinantes permite inferir un aumento de la flexibilidad estructural en la vecindad del residuo catalítico ácido/base de todas las enzimas mutadas generadas en este trabajo de tesis, lo cual probablemente justifica la superioridad de la constante catalítica de las enzimas I99A y A134Y/I99A a bajas temperaturas (entre 5 °C y 30 °C), en comparación con la constante catalítica de la endoglucanasa nativa.

Se cumple el objetivo general del trabajo de tesis pues las dos enzimas mutadas generadas (I99A y A134Y/I99A) mejoran claramente las propiedades catalíticas de la enzima nativa a bajas temperaturas.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	III
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Microorganismos Psicrófilos	1
1.1.1. Adaptaciones celulares a bajas temperaturas	1
1.2. Enzimas Psicrófilas.....	3
1.2.1. Flexibilidad estructural.....	3
1.2.2. Estabilidad estructural	5
1.2.3. Caracterización cinética y termodinámica	7
1.2.4. Principales adaptaciones moleculares	10
1.2.5. Aplicaciones industriales y biotecnológicas	11
1.2.5.1. Detergentes	11
1.2.5.2. Industria Textil	11
1.2.5.3. Biología Molecular	11
1.2.5.4. Biocombustibles	12
1.2.5.5. Alimentos.....	12
1.3. Caracterización de la endoglucanasa Cel5A de <i>Bacillus agaradhaerens</i>	13
1.3.1. Caracterización estructural	13
1.3.2. Caracterización catalítica	14
1.4. Tesis de doctorado de Juan Matías Saavedra Salinas	15
1.5. Objetivos	16
1.5.1. Objetivo general.....	16
1.5.2. Objetivos específicos.....	16
2. METODOLOGÍA	17
2.1. Materiales	17
2.1.1. Reactivos	17
2.1.2. Cepas bacterianas	17
2.1.3. Sistemas recombinantes	18
2.1.4. Sistemas comerciales	18
2.1.5. Enzimas	18
2.1.6. Oligonucleótidos	18
2.1.7. Materiales de purificación.....	18
2.1.8. Materiales adicionales	19

2.1.9.	Equipos.....	19
2.1.10.	Medios de cultivo líquidos	20
2.1.10.1.	Medio Luria-Bertani.....	20
2.1.10.2.	Medio Molitor	20
2.1.10.3.	Medio SOB.....	20
2.1.11.	Medios de cultivo sólidos.....	20
2.1.12.	Soluciones stock	20
2.1.13.	Herramientas computacionales	20
2.2.	Métodos.....	21
2.2.1.	Cultivo de microorganismos.....	21
2.2.1.1.	Mantenimiento de microorganismos.....	21
2.2.1.2.	Crecimiento de cepas en cultivos líquidos	21
2.2.2.	Extracción de ADN plasmidial	21
2.2.3.	Mutaciones sitio-dirigidas	21
2.2.4.	Amplificación del ADN por PCR.....	22
2.2.4.1.	Oligonucleótidos.....	22
2.2.4.2.	Mezcla de reacción	22
2.2.4.3.	Programa	23
2.2.5.	Electroforesis de ADN	23
2.2.6.	Preparación de células electrocompetentes.....	23
2.2.7.	Transformación de células electrocompetentes.....	23
2.2.8.	Producción recombinante de las endoglucanasas	24
2.2.8.1.	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes	24
2.2.8.2.	Purificación de las proteínas recombinantes	24
2.2.9.	Electroforesis de proteínas SDS-PAGE	24
2.2.10.	Determinación de la concentración de proteínas.....	25
2.2.11.	Ensayos de actividad enzimática.....	25
2.2.12.	Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes.....	26
2.2.13.	Determinación de los parámetros termodinámicos de activación	26
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
3.1.	Generación de las variantes de la endoglucanasa Cel5A.....	27
3.2.	Expresión y purificación de las endoglucanasas recombinantes	30
3.3.	Caracterización cinética y termodinámica de las endoglucanasas recombinantes.....	34
3.4.	Posibles efectos estructurales de las mutaciones sitio-dirigidas realizadas.....	52
3.5.	Discusión general	55

4.	CONCLUSIONES.....	57
5.	REFERENCIAS	58
6.	ANEXOS.....	63
6.1.	Anexo A: Ecuación de Arrhenius	63
6.2.	Anexo B: Teoría del estado de transición	65
6.3.	Anexo C: Ecuaciones para el cálculo de los parámetros termodinámicos de activación.....	67
6.4.	Anexo D: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la endoglucanasa Cel5A	68
6.5.	Anexo E: Datos experimentales	70
6.5.1.	Curvas de calibración	70
6.5.2.	Velocidades de reacción enzimática	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1:	Modelo del cono de plegamiento propuesto para enzimas psicrófilas y termófilas.....	4
Figura 1.2:	Tipos de adaptación estructural de las enzimas psicrófilas.....	5
Figura 1.3:	Energía libre de estabilización de 3 α -amilasas adaptadas a distintas temperaturas.....	6
Figura 1.4:	Dependencia térmica de la constante catalítica de una enzima psicrófila y su homóloga mesófila.....	8
Figura 1.5:	Estructura tridimensional del dominio catalítico de la endoglucanasa Cel5A.....	13
Figura 1.6:	Esquema del mecanismo de la reacción catalizada por la endoglucanasa Cel5A.....	14
Figura 3.1:	Secuencia del gen de la endoglucanasa mutada A134Y/I99A/N138L.....	28
Figura 3.2:	Posible explicación del error ocurrido en la reacción de PCR durante la generación de la variante A134Y/I99A/N138L.....	29
Figura 3.3:	Análisis electroforético del total de las proteínas expresadas por las recombinantes de <i>E.coli</i> BL21(DE3).....	30
Figura 3.4:	Análisis electroforético de las proteínas purificadas a través de la resina Ni-NTA.....	31
Figura 3.5:	Imagen digitalizada del gel de poliacrilamida asociado al análisis electroforético de las endoglucanasas purificadas mediante la resina Ni-NTA.....	32
Figura 3.6:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 5 °C.....	34
Figura 3.7:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 10 °C.....	35
Figura 3.8:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 20 °C.....	36
Figura 3.9:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 30 °C.....	37
Figura 3.10:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 40 °C.....	38
Figura 3.11:	Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 50 °C.....	39
Figura 3.12:	Variación de la constante catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura.....	42
Figura 3.13:	Variación de la constante de Michaelis-Menten de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura.....	44
Figura 3.14:	Variación de la eficiencia catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura.....	45
Figura 3.15:	Gráfico de Arrhenius de las endoglucanasas recombinantes.....	46
Figura 3.16:	Estructura de la endoglucanasa Cel5A en la vecindad del residuo catalítico ácido/base.....	52
Figura 6.1:	Diagrama energético de una reacción química generalizada.....	64
Figura 6.2:	Curva de calibración del ensayo de Bradford.....	70
Figura 6.3:	Curva de calibración de la concentración de p-nitrofenol (pNF).....	70

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1:	Parámetros termodinámicos de activación de enzimas psicrófilas y mesófilas.....	9
Tabla 2.1:	Reactivos utilizados en el trabajo de tesis.....	17
Tabla 2.2:	Oligonucleótidos utilizados en el trabajo de tesis.....	18
Tabla 2.3:	Equipos utilizados en el trabajo de tesis.....	19
Tabla 2.4:	Mezcla de reacción de PCR.....	22
Tabla 3.1:	Concentración de las endoglucanasas recombinantes purificadas	31
Tabla 3.2:	Porcentaje de pureza de las endoglucanasas recombinantes purificadas.....	32
Tabla 3.3:	Concentración estimada de las endoglucanasas recombinantes purificadas.....	33
Tabla 3.4:	Parámetros cinéticos de la endoglucanasa Cel5A silvestre a distintas temperaturas.....	40
Tabla 3.5:	Parámetros cinéticos de la endoglucanasa A134Y a distintas temperaturas.....	40
Tabla 3.6:	Parámetros cinéticos de la endoglucanasa N138L a distintas temperaturas.....	41
Tabla 3.7:	Parámetros cinéticos de la endoglucanasa I99A a distintas temperaturas.....	41
Tabla 3.8:	Parámetros cinéticos de la endoglucanasa A134Y/I99A a distintas temperaturas.....	41
Tabla 3.9:	Energía de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes.....	48
Tabla 3.10:	Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 5 °C.....	48
Tabla 3.11:	Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 10 °C.....	48
Tabla 3.12:	Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 20 °C.....	49
Tabla 3.13:	Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 30 °C.....	49
Tabla 6.1:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	71
Tabla 6.2:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	71
Tabla 6.3:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	71
Tabla 6.4:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	72
Tabla 6.5:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	72
Tabla 6.6:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	72
Tabla 6.7:	Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	73
Tabla 6.8:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	73
Tabla 6.9:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	73
Tabla 6.10:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	74
Tabla 6.11:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	74
Tabla 6.12:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	74
Tabla 6.13:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	75
Tabla 6.14:	Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	75
Tabla 6.15:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	75
Tabla 6.16:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	76
Tabla 6.17:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	76
Tabla 6.18:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	76
Tabla 6.19:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	77
Tabla 6.20:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	77
Tabla 6.21:	Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	77

Tabla 6.22:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	78
Tabla 6.23:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	78
Tabla 6.24:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	78
Tabla 6.25:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	79
Tabla 6.26:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	79
Tabla 6.27:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	79
Tabla 6.28:	Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	80
Tabla 6.29:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	80
Tabla 6.30:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	80
Tabla 6.31:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	81
Tabla 6.32:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	81
Tabla 6.33:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	81
Tabla 6.34:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	82
Tabla 6.35:	Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	82
Tabla 6.36:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 20 mM.....	82
Tabla 6.37:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 15 mM.....	83
Tabla 6.38:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 10 mM.....	83
Tabla 6.39:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.....	83
Tabla 6.40:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 5 mM.....	84
Tabla 6.41:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.....	84
Tabla 6.42:	Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.....	84

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Microorganismos Psicrófilos

La mayoría de los ecosistemas presentes en la Tierra se encuentran permanentemente expuestos a temperaturas inferiores a 5 °C. Esto se debe a que aproximadamente el 70 % de la superficie terrestre se encuentra cubierta por océanos, los cuales poseen una temperatura promedio de 4 - 5 °C bajo una profundidad mayor a 1000 metros, sin importar la latitud. Por otra parte, las regiones polares adicionan otro 15 % de la superficie terrestre a los ecosistemas expuestos a bajas temperaturas, sin considerar las regiones alpinas y glaciares. Los microorganismos que han logrado colonizar estos ambientes fríos son conocidos como psicrófilos ^[1].

El concepto de psicrófilo es definido como un organismo, procarionte o eucarionte, capaz de vivir permanentemente en equilibrio térmico con el ambiente a temperaturas cercanas al punto de congelamiento del agua ^[2].

Los microorganismos psicrófilos son verdaderos extremófilos ya que generalmente se encuentran adaptados no sólo a bajas temperaturas, sino que también a otras restricciones medioambientales como por ejemplo altas presiones (baro-psicrófilos), grandes concentraciones de sal (halo-psicrófilos), radiación ultravioleta, falta de luz (trogl-psicrófilos), etc ^[1].

A pesar del gran número de limitaciones que deben enfrentar en su crecimiento, los microorganismos psicrófilos poseen diversos representantes entre las bacterias Gram-negativas (especies de *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Polaromonas*, *Moritella*, etc.), bacterias Gram-positivas (especies de *Bacillus*, *Arthrobacter*, etc.), arqueas (especies de *Methanogenium*, *Halorubrum*, etc.), levaduras (especies de *Candida*, *Cryptococcus*, etc.), hongos (*Penicillium*, *Cladosporium*, etc.) y microalgas (*Chloromonas*) ^[1].

Estos microorganismos pueden ser encontrados en diversos ambientes con temperaturas tan bajas como - 20 °C ^[3] y para poder subsistir en estas condiciones han debido desplegar un gran número de características de adaptación al frío realmente sorprendentes.

1.1.1. Adaptaciones celulares a bajas temperaturas

Durante los últimos años se ha realizado un gran número de estudios enfocados en las adaptaciones celulares de los microorganismos psicrófilos y sus respectivos mecanismos moleculares.

Estos estudios han permitido la identificación de diversas adaptaciones celulares, las cuales se encuentran asociadas principalmente con la regulación de la fluidez de la membrana celular, la mantención de la síntesis proteica, la producción de proteínas de aclimatación al frío y otros mecanismos de tolerancia a las bajas temperaturas ^[1].

La regulación de la fluidez de la membrana es un aspecto fundamental ya que el descenso de la temperatura genera una gelificación de la fase líquida-cristalina (que corresponde al estado funcional de la bicapa lipídica), lo cual conlleva a una pérdida drástica de las propiedades de la membrana. El mecanismo de adaptación de los psicrófilos en este aspecto consiste en la introducción de restricciones

estéricas que reducen el empaquetamiento de las cadenas acílicas en la membrana. Esto se logra principalmente a través de la introducción de dobles enlaces insaturados *cis* y de cadenas acílicas más cortas, lo cual reduce el contacto entre cadenas adyacentes y por ende aumenta la fluidez de la membrana ^[4].

Las bajas temperaturas también poseen un efecto negativo en los procesos de transcripción y traducción, ya que a medida que disminuye la temperatura, se incrementan las interacciones entre las hebras de ADN impidiendo la unión de la ARN polimerasa y se promueven estructuras secundarias indeseables del ARN. Para solucionar este problema, diversos microorganismos psicrófilos han aumentado notoriamente la expresión de proteínas de unión a ADN ^[5] y de la enzima ARN helicasa ^[6], las cuales disminuyen los efectos adversos de las bajas temperaturas al impedir respectivamente las interacciones adicionales entre hebras de ADN y la formación de estructuras secundarias indeseadas en el ARN.

Las proteínas de aclimatación al frío son otro importante mecanismo de adaptación de los microorganismos psicrófilos. Este conjunto de aproximadamente 20 proteínas se sintetiza permanentemente durante el crecimiento a bajas temperaturas y es esencial para la mantención del crecimiento y el correcto funcionamiento del ciclo celular ^[7].

Probablemente el principal efecto de la disminución de la temperatura en el funcionamiento celular es el fuerte descenso que ésta genera en la velocidad de las reacciones químicas. Es por lo anterior que el principal reto de los microorganismos psicrófilos es mantener una velocidad apropiada para las reacciones catalizadas enzimáticamente que se encuentran asociadas a procesos celulares esenciales. Esto se logra mediante la síntesis de enzimas muy activas a baja temperatura, pero que a su vez tienden a ser termolábiles. La gran actividad a baja temperatura de estas enzimas (enzimas psicrófilicas) parece ser obtenida a través de una desestabilización del sitio activo o de toda la proteína, permitiendo que el sitio catalítico sea más móvil y flexible a temperaturas que tienden a “congelar” los movimientos moleculares necesarios para la catálisis enzimática ^[8].

1.2. Enzimas Psicrófilicas

Las enzimas psicrófilicas producidas por los microorganismos adaptados a medioambientes de bajas temperaturas, poseen en común tres características generales^[9]:

- Curva de actividad en función de la temperatura desplazada hacia bajas temperaturas.
- Constante catalítica (k_{cat}) o eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) mayor que la de sus contrapartes mesófilicas en el rango de temperatura comprendido aproximadamente entre 0 - 30 °C.
- Estabilidad térmica reducida, la cual se ve reflejada en la inactivación de las enzimas psicrófilicas a temperaturas moderadas.

Estas características de las enzimas psicrófilicas han sido estudiadas exhaustivamente y durante los últimos años se ha planteado diversas teorías que intentan explicar las diferencias catalíticas entre las enzimas psicrófilicas y mesófilicas, mediante argumentos asociados principalmente a la flexibilidad y estabilidad estructural y a la caracterización cinética y termodinámica de estas enzimas.

1.2.1. Flexibilidad estructural

La flexibilidad de las estructuras enzimáticas ha sido ampliamente documentada y corroborada a través del uso de diversas técnicas experimentales^[10]. Una enzima activa en solución puede ser representada por una distribución estadística de microestados que poseen conformaciones espaciales ligeramente distintas, determinadas por diferencias locales en el plegamiento^[11].

La distribución de conformaciones ocupadas por una población particular de moléculas enzimáticas (población de mínima energía) es conocida como el estado nativo de la enzima, el cual puede ser influenciado por las condiciones ambientales, como por ejemplo pH, temperatura, presencia de cofactores, etc^[12].

En términos generales, una cadena polipeptídica es intrínsecamente flexible debido a que gran parte de los enlaces que permiten la unión entre los átomos de los aminoácidos poseen cierta libertad rotacional^[13].

La flexibilidad enzimática involucra dos fenómenos claramente distinguibles entre sí:

1. Movimientos moleculares a gran escala en los cuales se desplazan zonas estructurales como cuerpos rígidos. Estos movimientos generalmente están asociados con la unión de sustratos o eventos alostéricos^[14].
2. Movimientos moleculares a pequeña escala, los cuales generan un conjunto de isómeros conformacionales que constituyen el estado nativo enzimático^[14].

La necesidad de flexibilidad para el desarrollo de la actividad catalítica enzimática es una teoría que tiene una amplia aceptación en la actualidad, aunque la relación directa entre ambos aspectos no se ha logrado entender completamente^[13]. La funcionalidad de las enzimas requiere que éstas sean capaces de cubrir un amplio espacio conformacional, pues estas macromoléculas deben ser capaces de adaptar su geometría para facilitar y permitir la unión de sustratos y cofactores, acercar las especies

químicas reactivas en el complejo enzima-sustrato, liberar los productos resultantes de la reacción enzimática y en general crear un ambiente que presente las características fisicoquímicas apropiadas para lograr la catálisis dentro del sitio activo ^[10].

A bajas temperaturas (cerca de 0 °C), las enzimas generalmente pierden un porcentaje importante de su actividad catalítica. Esto se debe a que la estructura se comporta como un material rígido en el cual los átomos se encuentran anclados fuertemente adoptando un único estado conformacional. Contrariamente, cuando la temperatura es suficientemente alta, los átomos son capaces de superar las barreras energéticas que separan un estado conformacional de otro permitiendo que la estructura alcance un mayor número de distribuciones espaciales ^[15].

A partir de lo anteriormente expuesto, el incremento de la flexibilidad estructural de las enzimas psicofílicas es una de las teorías más aceptadas para explicar la adaptación a bajas temperaturas de este tipo de enzimas ^[1,3,16].

En condiciones ambientales y biológicas adecuadas, las enzimas se pliegan espontáneamente para llegar a su estructura nativa. El modelo más aceptado para explicar este evento es el “cono de plegamiento” ^[17]. Este modelo plantea que la superficie de energía potencial de una proteína posee la forma de un cono de paredes relativamente lisas, en el cual el estado plegado (conformación más probable y de menor energía) se encuentra ubicado en el fondo del cono. Es así como, sin importar la distribución espacial inicial de una molécula enzimática, ésta seguirá el gradiente de disminución de energía hasta alcanzar su estado nativo ^[18].

La figura 1.1 muestra un modelo del cono de plegamiento que ilustra diferencias importantes entre enzimas psicofílicas y termofílicas. En este modelo la flexibilidad estructural de las enzimas psicofílicas se ve reflejada en una distribución más amplia de isómeros conformacionales de mínima energía que poseen débiles barreras energéticas entre uno y otro (fondo del túnel). Esto permite que al interactuar con un sustrato, las enzimas psicofílicas sean capaces de desplazar el equilibrio hacia los isómeros conformacionales más activos a un menor costo energético, lo cual les permite mantener altas actividades catalíticas a bajas temperaturas ^[3]. Sin embargo, el gran número de isómeros conformacionales accesibles generalmente influye negativamente sobre la afinidad de la enzima por el sustrato ^[19].

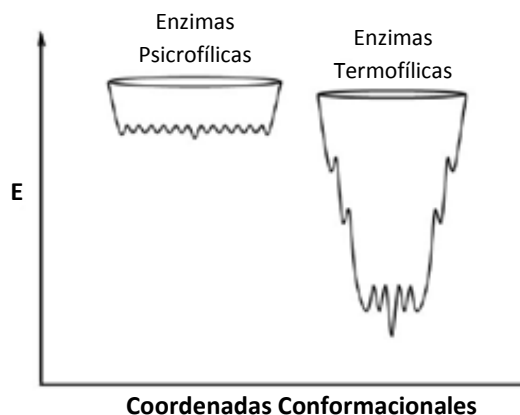


Figura 1.1: Modelo del cono de plegamiento propuesto para enzimas psicofílicas y termofílicas ^[3]. Se representa la variación de la energía potencial (E) en función de la diversidad conformacional enzimática.

Un aspecto interesante que vale la pena mencionar es que la inactivación térmica de las enzimas psicrófilas frecuentemente precede a la denaturación global de la estructura ^[1,3]. Esto no sucede con las enzimas mesófilas o termófilas, en las cuales la pérdida de actividad debido al aumento de temperatura es una consecuencia directa de la denaturación general ^[3,20]. Estos resultados permiten incorporar el concepto de “flexibilidad local”, el cual justifica la alta actividad a bajas temperaturas de las enzimas psicrófilas a partir de una disminución de la estabilidad en regiones específicas de la estructura, particularmente en la vecindad del sitio activo ^[2,16]. Sin embargo, el estudio estructural enzimático también ha mostrado en ciertas ocasiones una asociación entre el incremento global de la flexibilidad y el carácter psicrófilo de algunas enzimas ^[19].

En la figura 1.2 se pueden observar dos tipos de adaptación estructural de enzimas psicrófilas que permiten corroborar la existencia tanto de la flexibilidad global como de la flexibilidad local. En el caso de una α -amilasa psicrófila (termograma superior), toda la enzima evoluciona hacia la mínima estabilidad posible de su estado nativo (flexibilidad global) mientras que en el caso de una fosfoglicerato quinasa psicrófila (termograma inferior), sólo una región de la proteína adquiere mayor flexibilidad (flexibilidad local) lo cual justifica la aparición de dos dominios enzimáticos, uno termolábil y otro termoestable ^[21].

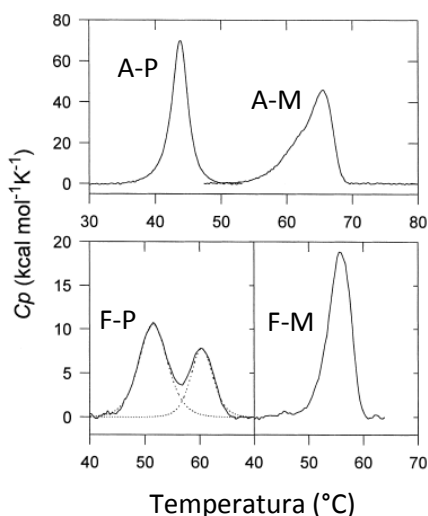


Figura 1.2: Tipos de adaptación estructural de las enzimas psicrófilas ^[21]. En el termograma superior se muestra la comparación entre una α -amilasa psicrófila (A-P) y una α -amilasa mesófila (A-M) mientras que en el termograma inferior se muestra la comparación entre una fosfoglicerato quinasa psicrófila (F-P) y una fosfoglicerato quinasa mesófila (F-M).

1.2.2. Estabilidad estructural

Como se mencionó anteriormente, en condiciones ambientales y biológicas adecuadas las proteínas se pliegan espontáneamente alcanzando su estructura nativa que corresponde a la conformación de menor energía. La energía de estabilización neta de las proteínas es usualmente muy baja y corresponde a la energía de unos pocos puentes de hidrógeno ^[22]. A partir de datos experimentales, se ha sugerido que solamente bastaría con interrumpir algunas de las interacciones débiles de una estructura enzimática para inducir su denaturación ^[15] lo cual permite suponer que la aparente inestabilidad estructural es una condición necesaria para la flexibilidad y actividad enzimática ^[23].

La mantención de un balance adecuado entre estabilidad y flexibilidad estructural es un aspecto fundamental para asegurar la función enzimática. La estabilidad es necesaria para evitar el proceso de denaturación y asegurar la geometría molecular que permite una correcta interacción enzimática con el sustrato, mientras que un nivel apropiado de flexibilidad es indispensable para la unión eficiente del sustrato, la catálisis y la liberación de los productos resultantes ^[2,24].

Es importante señalar que la estabilidad global de una proteína puede diferir bastante en comparación a la estabilidad de su sitio activo, ya que la dinámica molecular en regiones específicas cercanas al sitio activo puede variar notoriamente respecto a la dinámica general de la enzima ^[13].

Mediante diversas técnicas calorimétricas se ha demostrado que, en términos generales, las enzimas adaptadas a bajas temperaturas son menos estables que sus homólogas mesofílicas y termofílicas ^[16], lo cual genera un intervalo de temperaturas de funcionamiento más bajas para las enzimas psicofílicas.

A través del cálculo de los parámetros termodinámicos de estabilización de diversas enzimas, se ha demostrado que la energía libre de estabilización (ΔG_{EST}), que corresponde a la energía necesaria para denaturar la estructura enzimática nativa a una temperatura dada, es notoriamente menor para gran parte de las enzimas psicofílicas en comparación a sus homólogas mesofílicas y termofílicas ^[16]. Esto permite reafirmar la noción de inestabilidad estructural (mayor flexibilidad) que poseen las enzimas psicofílicas, la cual aparentemente es la principal justificación de la gran actividad que presentan estas enzimas a bajas temperaturas.

En la figura 1.3 se muestra la variación de la energía libre de estabilización de 3 α -amilasas homólogas adaptadas a distintas temperaturas ^[3]. En este gráfico se puede apreciar que la máxima energía de estabilización para las 3 enzimas ocurre a temperatura ambiente (20 - 35 °C), lo cual se debe probablemente a la optimización del efecto hidrofóbico (fundamental para el plegamiento y mantención de la estructura enzimática) en el rango de temperatura ambiental ^[25]. Por otra parte, también se puede observar que la enzima psicofílica es más sensible tanto a la denaturación por calor como a la denaturación por frío ya que las intersecciones de la curva con el eje x (donde $\Delta G_{EST} = 0$) para la enzima psicofílica ocurren en un intervalo de temperatura mucho más reducido en comparación a sus estructuras homólogas (en la figura sólo se observa en forma directa la intersección de la curva debido a la denaturación por calor).

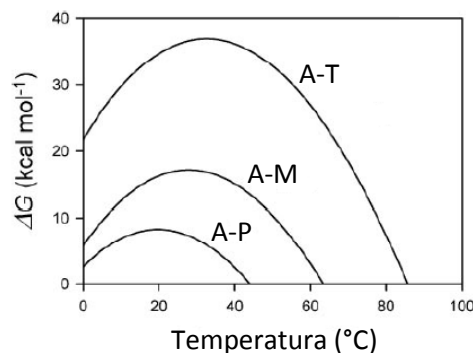


Figura 1.3: Energía libre de estabilización de 3 α -amilasas adaptadas a distintas temperaturas ^[3]. En el gráfico se muestra la comparación de la variación de la energía libre de estabilización versus temperatura para una α -amilasa psicofílica (A-P), una α -amilasa mesofílica (A-M) y una α -amilasa termofílica (A-T).

La energía de estabilización máxima de varias enzimas psicrófilas se encuentra en un rango muy cercano al límite de la denaturación (14 - 15 kJ/mol), lo cual también permite reafirmar la noción de inestabilidad estructural asociada a este tipo de macromoléculas biológicas ^[16].

Muchos de los estudios experimentales realizados con enzimas silvestres y mutantes, han corroborado la existencia de un fuerte compromiso entre estabilidad y actividad en el contexto de la adaptación enzimática a bajas temperaturas ^[19]. En el caso de numerosas enzimas, se ha observado que un incremento de la actividad a bajas temperaturas coincide con una disminución de la estabilidad, a pesar de que en algunos casos también se ha dado la situación inversa ^[2,19,26]. A partir de esto, se ha propuesto que la baja estabilidad de las enzimas psicrófilas es generada a partir de la ausencia de presión selectiva por estructuras estables en sus ambientes naturales, y no se encuentra necesariamente relacionada al proceso de adaptación de la actividad catalítica ^[27].

En términos globales, la mayor flexibilidad y baja estabilidad que poseen las enzimas psicrófilas podría constituir la estrategia más simple de adaptación al frío en ausencia de presión selectiva hacia estructuras estables, pero en presencia de una gran presión selectiva hacia la obtención de biocatalizadores más activos ^[2].

1.2.3. Caracterización cinética y termodinámica

Las bajas temperaturas disminuyen fuertemente la velocidad de las reacciones químicas. La dependencia entre la velocidad de reacción (medida a través de la constante catalítica) y la temperatura puede ser descrita mediante la teoría de Arrhenius ^[28] (Anexo A) o la teoría del estado de transición ^[29,30] (Anexo B).

$$k_{cat} = A\kappa e^{-E_A/RT} \quad (1)$$

$$k_{cat} = \kappa \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger/RT} \quad (2)$$

En las ecuaciones anteriores A es un factor pre-exponencial, κ es el coeficiente de transmisión dinámica, E_A es la energía de activación de la reacción, R es la constante de los gases ideales, T es la temperatura absoluta medida en grados Kelvin, k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y ΔG^\ddagger es la energía libre de activación.

Debido a que la temperatura se encuentra incluida en el exponente de ambas ecuaciones, se desprende que cualquier disminución de la temperatura genera una disminución exponencial de la velocidad de reacción. En la mayoría de los sistemas biológicos, la disminución de la temperatura en 10 °C induce una baja de la velocidad de reacción en un factor de 2 a 4 ^[1]. Esto corresponde al valor Q_{10} de una reacción química (razón de las velocidades de reacción medidas con una diferencia de temperatura de 10 °C) ^[2].

La variación de la velocidad de reacción en función de la temperatura es de suma importancia para el funcionamiento enzimático ya que, de acuerdo a lo expuesto anteriormente, una disminución de la temperatura desde 37 °C hasta 0 °C (similar a la diferencia entre las temperaturas de los ambientes naturales de organismos mesófilos y psicrófilos) genera una disminución de la velocidad de reacción en un factor comprendido entre 20 y 250 ^[1].

Las enzimas psicrófilas contrarrestan los impedimentos cinéticos asociados a las bajas temperaturas mediante diversas estrategias relacionadas con la flexibilidad y estabilidad estructural, pudiendo alcanzar una actividad a bajas temperaturas hasta 10 veces mayor que la exhibida por sus homólogos mesófilas o termófilas ^[2,19].

De acuerdo a la teoría de Arrhenius, la gran eficiencia catalítica de las enzimas psicrófilas a bajas temperaturas puede ser explicada a partir de una baja energía de activación, la cual es originada probablemente por el incremento de la flexibilidad local o global y una consecuente disminución de la estabilidad estructural ^[2].

En la figura 1.4 se puede observar el efecto de la variación de la temperatura sobre la actividad de una α -amilasa psicrófila y su homóloga mesófila ^[31]. En esta figura se aprecia que la temperatura óptima (temperatura a la cual se alcanza la mayor actividad enzimática en condiciones experimentales definidas) de la enzima psicrófila es claramente menor respecto a su homóloga mesófila y que en términos generales, la curva de actividad de la enzima psicrófila se encuentra desplazada hacia temperaturas más bajas en comparación a la curva de actividad de la enzima mesófila.

La termolabilidad catalítica es un aspecto generalizado dentro de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas, las cuales poseen tasas de inactivación térmica que son varios órdenes de magnitud mayor en comparación a las enzimas mesófilas ^[1].

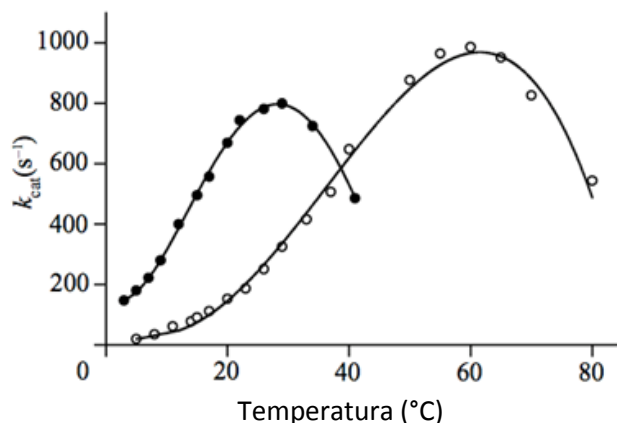


Figura 1.4: Dependencia térmica de la constante catalítica de una enzima psicrófila y su homóloga mesófila ^[31]. Los puntos negros representan una α -amilasa psicrófila y los puntos blancos representan una α -amilasa mesófila.

Otra implicancia de la mayor flexibilidad estructural exhibida por las enzimas psicrófilas se encuentra asociada a la interacción de la enzima con el sustrato. Un sitio activo móvil y flexible debiera unirse con el sustrato de manera más débil ^[1], y de acuerdo a datos experimentales, la mayoría de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas poseen menor afinidad por el sustrato (medida a través de un aumento de K_M en el mecanismo de reacción enzimática de Michaelis-Menten) en comparación a sus homólogos mesófilas ^[32]. Considerando esto, generalmente se sostiene que las enzimas psicrófilas aumentan su constante catalítica (mayor k_{cat}) a expensas de la interacción con el sustrato (mayor K_M).

En la tabla 1.1 se muestran los parámetros termodinámicos de activación de algunas enzimas psicofílicas y mesofílicas ^[21]. Al comparar los datos asociados a algunas enzimas psicofílicas y mesofílicas homólogas se aprecia que en términos generales, a bajas temperaturas las reacciones catalizadas por las enzimas psicofílicas se encuentran caracterizadas por un menor valor de ΔG^\ddagger , es decir, las enzimas psicofílicas son más activas. Sin embargo, un aspecto más importante es que a bajas temperaturas las reacciones catalizadas por estas enzimas proceden con un menor cambio de entalpía de activación (ΔH^\ddagger), lo cual indica que la actividad de las enzimas psicofílicas es menos dependiente de la temperatura en comparación a las enzimas mesofílicas. La disminución de ΔH^\ddagger corresponde a la principal adaptación cinética de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas ^[8,33] y es lograda estructuralmente mediante la disrupción de un menor número de interacciones impulsadas entálpicamente durante el proceso de catálisis enzimática ^[1]. Debido a que estas interacciones también forman parte del sitio activo, se desprende que el sitio activo de las enzimas psicofílicas es menos estable (y más termolábil) que el de las enzimas mesofílicas ^[1].

El aumento de la flexibilidad estructural de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas que genera la disminución de ΔH^\ddagger , es probablemente el factor que también explica la tendencia de las enzimas psicofílicas a presentar valores de ΔS^\ddagger más negativos en comparación a sus enzimas mesofílicas homólogas. Esto se debe probablemente a que la flexibilidad de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas genera que el complejo enzima sustrato psicofílico posea una distribución más amplia de estados conformacionales, aumentando su entropía en comparación al complejo enzima sustrato de las enzimas mesofílicas ^[21].

Dado que tanto la disminución de ΔH^\ddagger como el aumento de ΔS^\ddagger pueden generar el aumento de la constante catalítica de una enzima (a través de la disminución de ΔG^\ddagger), lo ideal sería que los parámetros termodinámicos de activación de las enzimas psicofílicas siguieran esa tendencia. Sin embargo, la variación de ambos parámetros termodinámicos se encuentra estrechamente asociada de manera directa debido a la mayor flexibilidad molecular de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas: a menor ΔH^\ddagger , menor ΔS^\ddagger . Es por esto que existe un contra efecto inevitable entre la entalpía y la entropía de activación al intentar aumentar la actividad catalítica enzimática a bajas temperaturas ^[21].

Tabla 1.1: Parámetros termodinámicos de activación de enzimas psicofílicas y mesofílicas ^[21].

Enzima	Adaptación	Temperatura (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)
Tripsina	Psicofílica	5	82	57,7	33,0	-24,5
Tripsina	Mesofílica	5	27,7	60,2	53,9	-6,2
Amilasa	Psicofílica	15	495,2	55,6	73,6	18
Amilasa	Mesofílica	15	90,5	59,7	99,6	39,9
Subtilisina	Psicofílica	15	25,4	62,7	36	-26,7
Subtilisina	Mesofílica	15	5,4	66,4	46	-20,4
Xilanasa	Psicofílica	5	14,8	61,7	45,4	-16,3
Xilanasa	Mesofílica	5	4,9	64,3	49,9	-14,4

1.2.4. Principales adaptaciones moleculares

La supuesta relación existente entre la plasticidad molecular y el aumento de actividad catalítica a bajas temperaturas, ha estimulado el análisis de los factores estructurales responsables de la estabilidad de diversas enzimas psicofílicas. Aparentemente todos los factores estructurales que estabilizan una molécula enzimática son atenuados tanto en intensidad como en cantidad en este tipo de macromoléculas biológicas ^[34].

Se ha observado que las enzimas psicofílicas tienden a presentar menor hidrofobicidad interna. Este aspecto genera un aumento en el número y volumen de cavidades, generándose estructuras menos compactas y por ende más flexibles ^[35]. Por otra parte, la superficie de estas enzimas generalmente contiene una gran cantidad de residuos hidrofóbicos ^[36,37], lo cual contribuye entrópicamente a la desestabilización de la estructura enzimática.

Diversas enzimas psicofílicas exhiben una mayor cantidad de residuos cargados negativamente en su superficie ^[35,38]. Esto incrementa las interacciones con el solvente, favoreciendo la flexibilidad a bajas temperaturas.

El análisis estructural tridimensional de numerosas enzimas psicofílicas, frecuentemente revela que el sitio activo y el sitio de unión a sustrato de estas enzimas son más amplios y accesibles en relación a los sitios respectivos de las enzimas mesofílicas o termofílicas ^[39]. Esto se logra por medio de diversas adaptaciones específicas, las cuales involucran especialmente la ausencia de “loops” al borde del sitio activo o el reemplazo de cadenas laterales voluminosas por otras más pequeñas en ubicaciones claves dentro de la estructura ^[2]. La mayor amplitud del sitio de unión a sustrato podría permitir la acomodación del sustrato a un menor costo energético y facilitar la liberación de los productos de la catálisis ^[2,40].

Otras adaptaciones generales de las enzimas psicofílicas involucran un aumento en el número de aminoácidos pequeños como glicina, la disminución del número de residuos de prolina (lo que provee mayor flexibilidad en “loops”) y arginina (capaces de formar múltiples interacciones iónicas y puentes de hidrógeno), la formación de ciertas alteraciones desfavorables que debilitan la interacción carga-dipolo en los extremos de α -hélices y una menor cantidad de interacciones electrostáticas y aromáticas ^[40].

Es importante señalar que cada enzima psicofílica adopta su propia estrategia de adaptación al frío combinando uno o más de los factores mencionados anteriormente, además de posibles factores aún desconocidos. A partir de esto se desprende que existe una gran diversidad de mecanismos efectivos para alcanzar la mayor flexibilidad estructural que caracteriza a las enzimas adaptadas a bajas temperaturas, los cuales generalmente se encuentran vinculados con la dinámica estructural de las moléculas proteicas.

1.2.5. Aplicaciones industriales y biotecnológicas

Un aspecto de gran importancia para la economía del planeta es el consumo energético. El uso eficiente de la energía no sólo disminuye los costos asociados a diversas actividades industriales y sociales, sino que también refuerza el concepto de desarrollo sustentable. En este contexto, la gran actividad catalítica a temperaturas bajas y moderadas de las enzimas psicrófilas ofrece importantes beneficios económicos potenciales, los que se refieren principalmente al ahorro energético asociado al calentamiento de reactores industriales a gran escala ^[4,41].

Otras ventajas asociadas al uso de enzimas psicrófilas en procesos industriales son la minimización de la ocurrencia de reacciones químicas indeseadas que puedan ocurrir a altas temperaturas y la optimización de los recursos disponibles al disminuir la cantidad de biocatalizador necesario en comparación al uso de enzimas mesófilas a bajas temperaturas. Por otra parte, las enzimas adaptadas a bajas temperaturas son fácilmente inactivadas a temperaturas moderadamente altas, lo cual favorece su aplicación en procesos que requieran la eliminación selectiva de la actividad enzimática sin afectar el contenido de medios complejos o productos inestables ^[42,43].

Como consecuencia de sus propiedades únicas de eficiencia catalítica y estabilidad, las enzimas adaptadas a bajas temperaturas poseen múltiples y muy variadas aplicaciones comerciales.

1.2.5.1. Detergentes

Los detergentes constituyen la principal aplicación industrial enzimática. El mercado de proteasas, lipasas, amilasas y celulasas (utilizadas comúnmente como aditivos en detergentes), representa cerca del 40 % de la venta total de enzimas para fines industriales ^[16]. Las enzimas psicrófilas poseen un gran potencial en el desarrollo de detergentes eficientes a temperatura ambiente, lo cual eliminaría la necesidad de realizar ciclos de lavado con agua caliente, minimizando notoriamente el consumo energético de los hogares.

1.2.5.2. Industria Textil

Las celulasas psicrófilas son usualmente usadas en el tratamiento de telas de algodón para restaurar la suavidad y reducir la formación de pelusas originadas a partir de fibrillas prominentes, a través de un proceso denominado “biopulido” ^[44]. Debido a su inestabilidad intrínseca, las celulasas psicrófilas pierden su actividad en forma progresiva, minimizando la pérdida de resistencia mecánica de los tejidos (inconveniente tradicional asociado al “biopulido”) ^[44,45].

1.2.5.3. Biología Molecular

A través del uso de las enzimas fosfatasa alcalina y polinucleótido quinasa, es posible efectuar el marcaje radioactivo de ácidos nucleicos. Si se usara una enzima de naturaleza psicrófila, la fosfatasa alcalina podría ser inactivada a temperaturas moderadamente altas (antes de la incorporación de la quinasa), lo cual incrementaría notoriamente el rendimiento del marcaje radioactivo ^[45].

Otra aplicación interesante de las enzimas adaptadas a bajas temperaturas corresponde al uso de ligasas psicrófilas para la unión de fragmentos de ADN. El uso de estas enzimas permite que la reacción de ligación ocurra a temperaturas más bajas, optimizando su rendimiento ^[45,46].

Actualmente se están realizando diversos estudios enfocados en el desarrollo de sistemas de expresión de proteínas a bajas temperaturas utilizando hospederos psicrófilos. Esto tiene el potencial de reducir drásticamente la formación de cuerpos de inclusión (debido al debilitamiento de las interacciones hidrofóbicas en ambientes fríos) y consecuentemente aumentar la producción de proteínas solubles correctamente plegadas ^[47].

1.2.5.4. Biocombustibles

Diversas glicosil-hidrolasas psicrófilas poseen el potencial para ser utilizadas en la producción renovable de etanol a bajo costo energético debido al ahorro en el calentamiento de reactores de gran escala ^[48].

Por otra parte, ciertas lipasas son capaces de efectuar la reacción de transesterificación de triglicéridos en presencia de alcohol para generar biodiesel ^[49]. El uso de lipasas psicrófilas permitiría disminuir la temperatura de reacción, generando un importante ahorro energético asociado al calentamiento de los reactores utilizados en este proceso ^[50].

1.2.5.5. Alimentos

La utilización de β -galactosidasas psicrófilas representa una interesante alternativa para la remoción de lactosa en la leche con el fin de incrementar su digestibilidad y dulzor ^[45]. Estas enzimas pueden ser utilizadas tanto en el proceso de transporte como durante el almacenamiento de la leche ^[45].

Por otra parte, se han utilizado xilanasas activas a bajas temperaturas en la fabricación de pan con el objetivo de asegurar un volumen atractivo del producto y aumentar la calidad de la miga ^[51].

Finalmente, existen diversos antecedentes sobre el uso de pectinasas adaptadas a bajas temperaturas en el proceso de clarificación de jugos, el uso de lipasas psicrófilas en el desarrollo de sabores debido a su alta especificidad de sustrato y el uso de proteasas adaptadas a bajas temperaturas para incrementar la digestibilidad de alimentos para animales ^[45].

1.3. Caracterización de la endoglucanasa Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*

Las glicosil-hidrolasas son un variado grupo de enzimas capaces de hidrolizar los enlaces glicosídicos presentes en diversos carbohidratos y glicósidos ^[52]. Estas enzimas usualmente presentan una estructura modular en la cual el dominio catalítico se encuentra unido a uno o más dominios sin actividad hidrolítica ^[53]. Las glicosil-hidrolasas han sido clasificadas en familias de acuerdo a la similitud de sus secuencias aminoacídicas y en clanes de acuerdo a la similitud de sus plegamientos, existiendo en la actualidad 118 familias y 14 clanes ^[54].

Las celulasas son un tipo particular de glicosil-hidrolasas. Estas enzimas son responsables de la hidrólisis de los enlaces glicosídicos β -1,4 presentes en la celulosa, que es considerado como el polímero natural más abundante en la biósfera ^[55]. Este polímero se encuentra presente en el papel, en diversos productos textiles y en materias primas para la industria de alimentos, entre otros, lo cual permite apreciar el gran potencial de aplicación industrial de estas enzimas ^[55].

1.3.1. Caracterización estructural

La endoglucanasa Cel5A de *Bacillus agaradhaerens* es una enzima multimodular compuesta por un dominio catalítico y tres dominios sin actividad hidrolítica, los cuales son responsables de la unión de la enzima a sustratos poliméricos insolubles, como por ejemplo la celulosa cristalina ^[56].

El dominio catalítico de esta enzima posee un peso molecular de aproximadamente 34,8 kDa y está compuesto por 300 aminoácidos ^[56]. Los principales residuos catalíticos son el ácido glutámico 136 (ácido/base) y al ácido glutámico 225 (nucleófilo) ^[55].

La endoglucanasa Cel5A pertenece a la familia 5, sub-familia 2, clan A de las glicosil-hidrolasas y su dominio catalítico se encuentra caracterizado por un plegamiento tipo barril $(\alpha/\beta)_8$ ^[55]. Este plegamiento consiste en un núcleo de 8 hebras β paralelas y torcidas, las cuales son conectadas por 8 α -hélices que forman la zona externa de la estructura tridimensional enzimática ^[57].

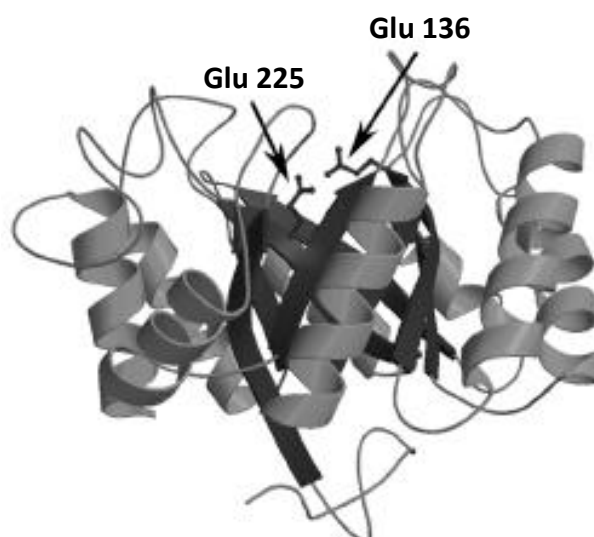


Figura 1.5: Estructura tridimensional del dominio catalítico de la endoglucanasa Cel5A ^[56]. La ubicación de los residuos catalíticos se encuentra representada mediante flechas.

1.3.2. Caracterización catalítica

La endoglucanasa Cel5A de *Bacillus agaradhaerens* presenta un mecanismo de catálisis de doble desplazamiento con retención de la configuración anomérica ^[58]. Este mecanismo de reacción ocurre en dos etapas (cada una de las cuales pasa a través de un estado de transición del tipo ión oxocarbenio) e involucra la formación de un intermediario glicosil-enzima covalente ^[58].

En la figura 1.6 se puede observar un esquema del mecanismo de la reacción catalizada por la endoglucanasa Cel5A. En la primera etapa del mecanismo, el residuo nucleófilo ataca al centro anomérico de una de las moléculas de sustrato generando el desplazamiento de una parte de ésta, y al mismo tiempo, el residuo ácido/base catalítico protona al oxígeno glicosídico, permitiendo la formación del intermediario glicosil-enzima covalente ^[58]. En la segunda etapa del mecanismo, el residuo ácido/base catalítico desprotona una molécula de agua, lo cual permite la hidrolización del intermediario de la reacción enzimática ^[58].

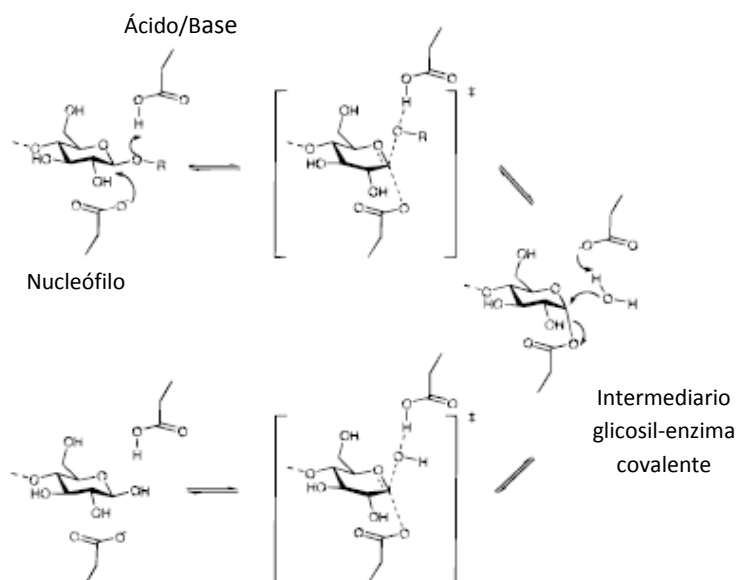


Figura 1.6: Esquema del mecanismo de la reacción catalizada por la endoglucanasa Cel5A ^[58].

Un aspecto muy importante dentro de la caracterización catalítica de la endoglucanasa Cel5A corresponde a la distorsión conformacional que adopta el sustrato (${}^4C_1 \rightarrow {}^1S_3$) al interior del sitio activo de la enzima. Esta distorsión es generada por las interacciones específicas que se forman entre las moléculas de sustrato y los residuos que forman parte del sitio activo de la enzima y permite que tanto el carbono anomérico como el oxígeno glicosídico se presenten en posiciones adecuadas para el ataque de los residuos catalíticos Glu 225 y Glu 136, respectivamente ^[58].

A partir de lo anterior se desprende que si la enzima no lograra inducir la distorsión de la molécula de sustrato a una conformación 1S_3 , probablemente no se lograría realizar la catálisis enzimática, pues los residuos catalíticos no se encontrarían lo suficientemente cerca de la molécula de sustrato como para poder efectuar sus funciones catalíticas ^[58].

1.4. Tesis de doctorado de Juan Matías Saavedra Salinas

Recientemente, en el Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB) se realizó un estudio racional enfocado en la relación estructura/función del dominio catalítico de 5 endoglucanasas adaptadas a distintas temperaturas, pertenecientes a la familia 5, sub-familia 2, clan A de las glicosil-hidrolasas (GH5-2) ^[59]. En este estudio, se determinó algunos aspectos claves (bases estructurales) de la psicofilicidad ocupando como modelo experimental la celulasa mesofílica Cel5A proveniente de *Bacillus agaradhaerens* ^[59].

A partir de la comparación de las secuencias aminoacídicas y estructuras tridimensionales de los dominios catalíticos pertenecientes a las endoglucanasas adaptadas a distintas temperaturas, se propusieron y realizaron modificaciones aminoacídicas específicas con el objetivo de mejorar las propiedades catalíticas de la enzima Cel5A a bajas temperaturas mediante la alteración de interacciones ligadas a la flexibilidad y estabilidad estructural ^[59]. En términos generales, tres modificaciones aminoacídicas presentaron resultados de gran interés:

1. La mutación A134Y, cuyo objetivo era estabilizar el sitio activo de la endoglucanasa mediante la incorporación de un potencial puente de hidrógeno, empeoró notoriamente las propiedades catalíticas de la enzima, debido probablemente a impedimentos estéricos que enmascararon el efecto producido por la posible interacción adicional ^[59].
2. La mutación A134F, cuyo objetivo era establecer el efecto del aumento de volumen de la cadena lateral perteneciente al residuo ubicado en la posición 134 sobre las propiedades catalíticas de la endoglucanasa (sin incluir el efecto de la formación de un puente de hidrógeno adicional, como probablemente ocurre en la enzima mutada A134Y), mejoró levemente (en un 15 % aproximadamente) la constante catalítica de la enzima en todo el rango de temperaturas estudiado, lo cual demuestra que el posible impedimento estérico de la mutante A134Y no es debido al aumento de volumen de la cadena lateral perteneciente al residuo ubicado en la posición 134, sino que probablemente es generado por la orientación espacial que adquiere la tirosina 134 al formar un potencial puente de hidrógeno con la asparragina 103 ^[59].
3. La mutación N138L, cuyo objetivo era aumentar la flexibilidad estructural del sitio activo de la endoglucanasa mediante la pérdida de dos puentes de hidrógeno, mejoró notoriamente (en un 150 % aproximadamente) la constante catalítica de la enzima a bajas temperaturas, aumentando paralelamente el proceso de inactivación enzimática a temperaturas superiores ^[59].

A partir de los resultados expuestos anteriormente, se propuso continuar el estudio mediante la construcción de la enzima mutada A134Y/I99A con el objetivo de intentar solucionar el posible impedimento estérico generado por la mutación A134Y. Sin embargo, debido a limitaciones de tiempo, el estudio no pudo ser completado, por lo cual la creación de esta y otras enzimas mutadas quedó propuesta ^[59].

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo general

Adaptar psicrófilicamente la endoglucanasa mesofílica Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*, mejorando sus propiedades catalíticas a bajas temperaturas, mediante la realización de mutaciones sitio dirigidas seleccionadas previamente (I99A, A134Y/I99A y A134Y/I99A/N138L).

1.5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto combinado de la disminución de la compactación estructural en la vecindad del sitio activo y de la posible pérdida de interacciones hidrofóbicas en esta misma zona sobre las propiedades catalíticas de la endoglucanasa Cel5A, mediante la síntesis y caracterización de la enzima mutada I99A.
- Solucionar el posible impedimento estérico generado por la mutación A134Y en la endoglucanasa Cel5A mediante la síntesis y caracterización de la enzima mutada A134Y/I99A, para así lograr aislar y determinar de mejor manera el efecto de esta mutación sobre la actividad enzimática.
- Determinar el efecto combinado de la pérdida de dos puentes de hidrógeno en la vecindad del sitio activo (debido a la mutación N138L) y de la posible ganancia de un puente de hidrógeno en esta misma zona (debido a la mutación A134Y) sobre las propiedades catalíticas de la endoglucanasa Cel5A, mediante la síntesis y caracterización de la enzima mutada A134Y/I99A/N138L.
- Comparar el desempeño catalítico de las enzimas mutadas generadas, a través de la determinación de sus parámetros cinéticos y termodinámicos.

2. METODOLOGÍA

Es importante considerar que este trabajo de tesis corresponde a una continuación del trabajo de tesis de doctorado de Juan Matías Saavedra Salinas. En la tesis de doctorado recién mencionada se generaron 3 recombinantes de *Escherichia coli* BL21(DE3) que contienen respectivamente un plásmido recombinante derivado de pET22b(+) con el gen del dominio catalítico de la endoglucanasa Cel5A y el gen del dominio catalítico de las endoglucanasas mutadas A134Y y N138L ^[59].

Las *E. coli* recombinantes antes mencionadas fueron utilizadas como base de este trabajo, ya que la variante I99A se sintetizó a partir de la recombinante que posee el gen del dominio catalítico de la endoglucanasa nativa, la variante A134Y/I99A se obtuvo a partir de la recombinante que posee el gen del dominio catalítico de la endoglucanasa mutada A134Y y la variante A134Y/I99A/N138L se construyó a partir de la recombinante que posee el gen del dominio catalítico de la endoglucanasa mutada A134Y/I99A.

2.1. Materiales

2.1.1. Reactivos

Los reactivos utilizados en este trabajo de tesis se detallan en la tabla 2.1:

Tabla 2.1: Reactivos utilizados en el trabajo de tesis.

Reactivos	Laboratorio Proveedor
Azul de bromofenol	Amersham-Pharmacia Biotech, Suecia
Agar Difco, extracto de levadura Difco, medio Luria-Bertani Difco, triptona Difco	Beckton Dickinson, Francia
Ampicilina	Calbiochem, USA
Agarosa	Fermelo, Chile
IPTG, estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas	Fermentas, USA
EDTA, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, estándar de ADN de 1 Kbp	Invitrogen, USA
Acetato de sodio, ácido acético, ácido clorhídrico, bromuro de etidio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, imidazol, sodio di-hidrogen fosfato, carbonato de sodio, β -mercaptoetanol, metanol	Merck, Alemania
BSA, p-nitrofenil- β -D-celobiósido, hepes 99,5 %	Sigma Aldrich, USA
Acrilamida : bisacrilamida 29 : 1, tris, SDS, glicerol, glicina	Winkler, Chile

2.1.2. Cepas bacterianas

Escherichia coli BL21(DE3) de Novagen, USA.

Genotipo: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁺) gal dcm (DE3).

2.1.3. Sistemas recombinantes

Vector de expresión pET22b(+) de Novagen, USA.

Este vector cuenta con el sistema promotor del bacteriófago T7 que es reconocido por la enzima T7 ARN polimerasa, una enzima altamente activa y específica que al ser inducida recluta gran parte de los recursos celulares en la síntesis de la proteína blanco. Por otra parte, a la proteína expresada se le agrega un hexapéptido de histidinas en su extremo C-terminal, lo cual facilita su purificación mediante sistemas de afinidad por iones metálicos.

El plasmidio posee además el gen *bla* (beta-lactamasa) que otorga resistencia a ampicilina o carbenicilina y la secuencia líder *pelB* (extremo N-terminal) que dirige la proteína recombinante al espacio periplasmático. Sin embargo, la clonación del gen de la endoglucanasa Cel5A en el vector se realizó excluyendo la secuencia del péptido señal *pelB* en el extremo 5', por lo cual la endoglucanasa recombinante al ser expresada no es dirigida al espacio periplasmático.

2.1.4. Sistemas comerciales

QIAprep Spin Miniprep Kit de Qiagen Inc., USA.

2.1.5. Enzimas

KOD Hot Start ADN Polimerasa de Novagen, USA.

Enzima de restricción *DpnI* de New England Biolabs, UK.

2.1.6. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de tesis fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT), USA, y se detallan en la tabla 2.2:

Tabla 2.2: Oligonucleótidos utilizados en el trabajo de tesis. Los nucleótidos destacados con letra gruesa representan el codón asociado a las mutaciones respectivas.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
I99A_Cel5A_Fw	GTGATCATTGATTGGCAT GCCTTT CAGACAATGACCC
I99A_Cel5A_Rv	GGGTCATTGTCTGAAAG GGCAT GCCAATCAATGATCAC
N138L_Cel5A_Fw	AATGAACCG CTT GGTAGTGATGTTACGTGGGGC
N138L_Cel5A_Rv	GCCCCACGTAACATCACTACCA AG CGGTTTCATT

2.1.7. Materiales de purificación

Resina Ni-NTA agarosa de Qiagen Inc., USA.

2.1.8. Materiales adicionales

- Tubos Eppendorf de 0,6 y 1,5 ml.
- Placas BD Falcon de 96 pocillos.
- Placas de Petri estériles.
- Cubetas de polipropileno de 1,5 ml.
- Microfiltros de 0,2 μm .
- Probetas de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Pipetas de 2, 20, 200, 1000 y 5000 μl .
- Botellas de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Matraces Erlenmeyer de 500 y 1000 ml.
- Matraces aforados de 100, 250 y 500 ml.
- Vasos de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.

2.1.9. Equipos

Los equipos utilizados en este trabajo de tesis se detallan en la tabla 2.3:

Tabla 2.3: Equipos utilizados en el trabajo de tesis.

Equipos	Proveedor
Incubador Orbital S16R	Shel Lab, USA
Autoclave	Orthmann, Chile
Cámara vertical MiniProtean II Fuente de poder Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Cámara horizontal Horizon-58 Fuente de poder Model 500	GIBCO BRL Life Technologies Inc., USA
Electroporador Cell-Porator Electroporation System	
Eppendorf Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Alemania
Estufa de incubación	Gallenkamp, UK
Centrífuga RC-28S, rotor GS-3 y rotor F-28/50	Sorvall - Dupont, USA
Espectrofotómetro Genesys UV-10	Thermo Scientific, USA
Lector de placas de 96 pocillos Asys UVM 340	Biochrom Ltd., UK
Máquina de hielo	Scotsman, Italia
Sistema de purificación de agua Mili-Q	Millipore, USA
Sonicador Microson Ultrasonic Cell Disruptor	Misonix, USA
Balanza Ohaus Analytical Plus Balanza Ohaus Precision Standar	Ohaus, USA
Refrigerador 4 °C y - 20 °C	Mademsa, Chile
Refrigerador - 80 °C Ultralow freezer	Solow Environmental Equipment, USA
Termociclador PTC-100	MJ Research Inc., USA
Transiluminador UV TFX-20M	Vilber Lourmat, Francia
Agitador Vortex Type 37600 Mixer Agitador magnético termorregulado Nuova II	Thermolyne, USA
Transiluminador UV	Bio JSP, Chile
Centrífuga Boeco M-24	Boeco, Alemania

2.1.10. Medios de cultivo líquidos

2.1.10.1. Medio Luria-Bertani

El medio LB contiene por cada 100 ml de solución: 1 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura y 1 g de cloruro de sodio. Se preparó en agua Milli-Q, se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

2.1.10.2. Medio Molitor

El medio Molitor contiene por cada 100 ml de solución: 2 g de triptona, 0,5 g de extracto de levadura y 0,36 ml de glicerol. Se preparó en agua Milli-Q, se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

2.1.10.3. Medio SOB

El medio SOB contiene por cada litro de solución: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,584 g de cloruro de sodio y 0,186 g de cloruro de potasio. Se preparó en agua Milli-Q, se ajustó el pH del medio a 7, se esterilizó mediante autoclave y se almacenó a temperatura ambiente.

2.1.11. Medios de cultivo sólidos

Para la preparación de placas con medio sólido, se agregó a los medios líquidos agar al 1,5 % p/v.

2.1.12. Soluciones stock

- IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido): Solución 0,5 M en agua Milli-Q. Se esterilizó por filtración utilizando un filtro con tamaño de poro de 0,2 μ m (Advantec, USA) y posteriormente se almacenó a - 20 °C.
- Ampicilina: Solución 100 mg/ml en agua Milli-Q. Se esterilizó por filtración utilizando un filtro con tamaño de poro de 0,2 μ m (Advantec, USA) y posteriormente se almacenó a - 20 °C.

2.1.13. Herramientas computacionales

- Digiread, Microplate Instrumentation Control.
- TotalLab Quant versión 11.4.
- Microsoft Office Excel 2007.

2.2. Métodos

2.2.1. Cultivo de microorganismos

2.2.1.1. Mantenimiento de microorganismos

Para ser almacenada por períodos cortos, la cepa de *E. coli* se hizo crecer durante una noche a 37 °C en placas con medio sólido LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Estos cultivos se mantuvieron a 4 °C y se renovaron cada 30 días en caso de ser necesario.

Para almacenamientos por períodos mayores a 30 días, la cepa de *E. coli* se hizo crecer a 37 °C en medio líquido LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Estos cultivos se criopreservaron a - 80 °C en el mismo medio, suplementado con glicerol al 25 % v/v.

2.2.1.2. Crecimiento de cepas en cultivos líquidos

La cepa de *E. coli* se inoculó en los medios correspondientes y se incubó a 37 °C en un incubador orbital S16R hasta alcanzar la D.O. (densidad óptica) deseada.

2.2.2. Extracción de ADN plasmidial

El ADN plasmidial se extrajo a partir de un cultivo en 4 ml de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml, incubado por 16 horas a 37 °C y 200 RPM. Para esto se utilizó el kit QIAprep Spin Miniprep, este kit está basado en el método de lisis alcalina^[60] y en la unión específica del ADN a sílice en presencia de una elevada concentración de sal.

El protocolo de extracción del kit consta de tres etapas principales: lisis celular con SDS y NaOH, adsorción del ADN a una columna de sílice y lavado/elución del ADN. La extracción se realizó según las instrucciones del fabricante.

2.2.3. Mutaciones sitio-dirigidas

Para realizar las mutaciones sitio-dirigidas, se utilizó un procedimiento basado en el método del kit QuikChange (Stratagene)^[61]. Este método permite mutar secuencias de ADN en una gran variedad de plásmidos sin requerir sitios de restricción específicos o múltiples etapas de clonamiento.

Mediante una reacción de PCR que utiliza 2 partidores complementarios entre sí que contienen la mutación, se amplificó directamente el ADN plasmidial sobreenrollado. Para esta reacción se empleó la enzima KOD Hot Start ADN polimerasa.

Luego de la reacción de PCR, la mezcla de reacción se sometió a una digestión con la enzima *DpnI*, una endonucleasa de restricción que reconoce solo ADN metilado o hemi-metilado. Durante esta etapa se degradó en forma selectiva el plásmido original usado como molde, que se encuentra metilado por provenir de una cepa de *E. coli* dcm⁺ BL21(DE3).

La digestión del ADN molde se realizó en 2 etapas. En la primera etapa se agregó 16 unidades de enzima *DpnI* a la mezcla de reacción inmediatamente luego del término de la reacción de PCR y se dejó una noche a 37 °C. Al día siguiente, se agregó nuevamente 16 unidades de enzima *DpnI* a la mezcla de reacción y se dejó por 2 horas a 37 °C.

Posteriormente, los plásmidos que contienen los genes mutados se introdujeron en la cepa de *E. coli* receptora. Para comprobar el éxito global del procedimiento, se extrajo el ADN plasmidial de colonias seleccionadas y se constató la presencia de la mutación deseada mediante la secuenciación de muestras, la cual fue realizada por la empresa Macrogen (Corea).

2.2.4. Amplificación del ADN por PCR

Como se mencionó anteriormente, se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para generar las mutaciones sitio-dirigidas mediante el método descrito en el punto anterior. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient.

2.2.4.1. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo de tesis fueron detallados en la tabla 2.2. Es de gran importancia señalar que como parte del método asociado al kit QuikChange, se recomienda que la T_m de todos los partidores mutagénicos sea igual o superior a 78 °C. Para el cálculo de la T_m se utilizó la siguiente ecuación ^[61]:

$$T_m = 81,5 + 0,41 * (\% GC) - \frac{675}{N} - \% PBNA \quad (3)$$

En la ecuación anterior % GC corresponde al porcentaje de guaninas y citosinas en la secuencia del oligonucleótido, N es el largo del oligonucleótido (medido en número de nucleótidos) y % PBNA es el porcentaje de bases no apareadas.

2.2.4.2. Mezcla de reacción

La mezcla de reacción utilizada para los ensayos de PCR con la enzima KOD Hot Start ADN polimerasa se detalla en la tabla 2.4:

Tabla 2.4: Mezcla de reacción de PCR.

Componente	Volumen
Buffer 10X	2 µl
MgSO ₄ (25 mM)	0,8 µl
dNTP (10 mM)	0,4 µl
Partidor 1 (10 µM)	0,8 µl
Partidor 2 (10 µM)	0,8 µl
ADN molde	2 µl
KOD Hot Start ADN Polimerasa (1,0 U/µl)	0,5 µl
H ₂ O	12,7 µl
Total	20 µl

2.2.4.3. Programa

El programa de PCR utilizado para generar mutaciones sitio-dirigidas con la enzima KOD Hot Start ADN polimerasa consistió en una etapa de activación de la polimerasa (2 minutos a 95 °C), 30 ciclos de amplificación (45 segundos a 95 °C, 45 segundos a 60 °C y 9 minutos a 72 °C) y un ciclo de extensión final (10 minutos a 70 °C).

2.2.5. Electroforesis de ADN

Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con solución amortiguadora de carga 6X (glicerol 30 % p/v y azul de bromofenol 0,25 % p/v) y se cargaron en geles de agarosa al 1 % preparados con solución amortiguadora TAE 1X (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/ml.

Las electroforesis se realizaron en una cámara horizontal Horizon-58 con un voltaje constante de 100 V generado por una fuente de poder GIBCO modelo 500. Se empleó solución amortiguadora TAE 1X como solución tampón de corrida y posteriormente las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador UV TFX-20M.

2.2.6. Preparación de células electrocompetentes

Se inculó una colonia de la cepa requerida en 10 ml de medio SOB y se hizo crecer el cultivo a 37 °C con agitación de 200 RPM durante 16 horas. Se midió la D.O. del cultivo a una longitud de onda de 600 nm (utilizando como blanco medio estéril) y se inculó 1 litro de medio estéril fresco con el volumen adecuado para establecer una D.O.₆₀₀ inicial de 0,05.

Se incubó el cultivo a 37 °C con agitación de 200 RPM hasta alcanzar un valor de D.O.₆₀₀ entre 0,6 y 0,8 (2 a 4 horas aproximadamente). Posteriormente, el cultivo se enfrió en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a 5000 g y 4 °C durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC-28S con rotor GS-3.

El centrifugado se lavó 4 veces con glicerol 10 % v/v estéril preparado en agua Milli-Q. Luego del último lavado, el centrifugado se resuspendió en el residuo de glicerol y se alícuotó en volúmenes precisos para su utilización. Finalmente, las células electrocompetentes se almacenaron a -80 °C.

2.2.7. Transformación de células electrocompetentes

Se agregó 1 µl de mezcla de ligación (luego de la reacción con la enzima *DpnI*) a 20 µl de células electrocompetentes. La electroporación se realizó en un equipo Cell-Porator Electroporation System bajo las siguientes condiciones: 420 V, 330 µF, baja impedancia, tasa de carga rápida y tiempo máximo de 2,5 mseg.

Las células transformadas se mezclaron con 1 ml de medio LB precalentado a 37 °C y se incubaron con agitación (200 RPM) a la misma temperatura durante 1 hora. Luego se sembró aproximadamente 50 µl del precultivo en una placa selectiva de medio LB suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. El volumen restante del precultivo se centrifugó a 13000 RPM en una centrífuga Boeco M-24 durante 1 minuto y se descartó aproximadamente 900 µl del sobrenadante.

Posteriormente, el centrifugado se resuspendió en el medio remanente y se sembró otros 50 µl en otra placa de medio selectivo igual a la descrita anteriormente. Finalmente, los cultivos se dejaron creciendo toda la noche a 37 °C.

2.2.8. Producción recombinante de las endoglucanasas

2.2.8.1. Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes

Se inoculó una colonia de células de *E. coli* BL21(DE3) recombinantes, que contienen el vector pET22b(+) con el gen de interés, en 8 ml de medio Molitor suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. El cultivo se hizo crecer a 37 °C durante una noche con agitación de 200 RPM. Posteriormente, se inició un nuevo cultivo en 400 ml del mismo medio fresco inoculando la totalidad del pre-cultivo, y se hizo crecer en las mismas condiciones. Al alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1,45 (aproximadamente después de 7 horas), el cultivo se separó en dos fracciones idénticas de 200 ml. Una fracción se usó como control sin inducir y en la otra se indujo la expresión de proteínas recombinantes agregando IPTG a una concentración final de 0,5 mM. Las fracciones se incubaron toda la noche a 18 °C bajo las mismas condiciones de agitación.

2.2.8.2. Purificación de las proteínas recombinantes

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 5000 g durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC-28S con rotor GS-3. El sobrenadante (o fracción extracelular) se descartó. El material sedimentado, que contiene las fracciones intracelulares solubles e insolubles, se resuspendió en 10 ml de solución amortiguadora de unión (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 4 mM, pH 8), se sonicó (Sonicador Microson Ultrasonic Cell Disruptor) en baño de hielo mediante 5 pulsos de 15 segundos aplicando potencia máxima y se centrifugó a 10000 g durante 30 minutos en una centrífuga Sorvall RC-28S con rotor F-28/50. El sobrenadante, que corresponde a la fracción intracelular soluble, se guardó a 4 °C para ser utilizado en los siguientes pasos de purificación.

Las endoglucanasas recombinantes se purificaron por afinidad mediante una resina con níquel inmovilizado (resina Ni-NTA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Esta resina interactúa con la cola de poli-histidina incorporada en la proteína por el vector de expresión pET22b(+).

Se agregó 0,5 ml de resina al sobrenadante obtenido en la etapa anterior y se incubó la mezcla en un agitador orbital S16R durante una noche a 4 °C. Posteriormente, la resina se empacó en una columna, se lavó con 4 ml de solución amortiguadora de unión y se eluyó con 2,5 ml de solución amortiguadora de elución (NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, Imidazol 250 mM, pH 8). La pureza de las proteínas recombinantes fue evaluada mediante electroforesis SDS-PAGE.

2.2.9. Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Las separaciones electroforéticas en condiciones denaturantes se realizaron en una cámara vertical MiniProtean II. Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con solución amortiguadora de carga 5X (Tris/HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, β-mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1 % p/v, pH 6,8), se denaturaron mediante incubación a 100 °C durante 5 minutos y

posteriormente se cargaron en geles de acrilamida/bisacrilamida (29:1) preparados de acuerdo al procedimiento estándar ^[62].

Las electroforesis se realizaron bajo un voltaje constante de 200 V generado por una fuente de poder Bio-Rad Power Pac 1000. Como solución amortiguadora de corrida se utilizó Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1 % p/v).

Para visualizar las proteínas, cada gel se tiñó durante 30 minutos en una solución de tinción de azul de Coomassie (metanol 45 % v/v, ácido acético 10 % v/v, agua destilada 45 % v/v y 1 g/l de azul de Coomassie R) y se destiñó en una solución de destinción (metanol 45 % v/v, ácido acético 10 % v/v, agua destilada 45 % v/v) hasta la aparición de bandas bien definidas (30-60 minutos aproximadamente).

2.2.10. Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas recombinantes se determinó mediante un ensayo de Bradford ^[63] modificado, para lo cual se mezcló: 1,2 ml de agua destilada, 0,5 ml de azul de Coomassie G 1 g/l preparado en HCl 2,2 % v/v y 50 µl de muestra o proteína estándar de calibración. Se midió la absorbancia de la mezcla a 465 nm (abs_{465}) y 595 nm (abs_{595}) y se calculó la razón abs_{595} / abs_{465} (el valor control obtenido en ausencia de proteína se restó a todos los resultados). Las cuantificaciones se realizaron en base a una curva de calibración con BSA (seroalbúmina de bovino) en un rango de concentraciones entre 0,015 y 1 mg/ml.

A pesar de haber sido sometidas a etapas de purificación, las proteínas recombinantes se obtuvieron mezcladas con bajas concentraciones de otras proteínas contaminantes. Por lo tanto, para determinar la concentración real de las endoglucanasas recombinantes a partir de la información generada por los ensayos de Bradford, fue necesario establecer su porcentaje de pureza en relación al total. Para esto se utilizó el programa TotalLab Quant versión 11.4, que permite obtener una imagen digitalizada de los geles de poliacrilamida o agarosa y calcular el porcentaje de la muestra en base a la densidad de cada banda.

2.2.11. Ensayos de actividad enzimática

Para medir la actividad de las enzimas recombinantes, se utilizó el sustrato sintético p-nitrofenil-β-D-celobiosido (pNFC), cuya hidrólisis genera p-nitrofenol (pNF), un compuesto amarillo de fácil detección por medio de espectrofotometría.

Se mezcló 45 µl de pNFC (con distintas concentraciones entre 20 y 1,25 mM) preparado en solución amortiguadora Hepes 50 mM (pH 7,5) con 5 µl de endoglucanasa purificada. Se incubó la mezcla de reacción a una temperatura determinada (en el rango comprendido entre 5 °C y 50 °C) usando un termociclador PTC-100 como incubador, hasta la aparición de color amarillo (intervalos de tiempo entre 2 y 30 minutos aproximadamente). La enzima se inactivó agregando 100 µl de Na₂CO₃ 1M.

Posteriormente, se traspasó una alícuota de 100 µl a microplacas desechables de 96 pocillos para determinar su absorbancia a 405 nm en un lector de placas Asys UVM 340.

La concentración de pNF generado se calculó a partir de los valores de absorbancia, en base a una curva de calibración construida con distintas concentraciones del mismo compuesto entre 0,049 y 0,78 mM. A todos los valores experimentales obtenidos se les restó el valor del blanco, consistente en la mezcla de reacción sin enzima, sometida a los mismos tratamientos que las muestras.

2.2.12. Determinación de los parámetros cinéticos de las enzimas recombinantes

Los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_M se calcularon a partir de una regresión no lineal de las curvas de saturación (velocidad inicial de reacción v/s concentración de sustrato) utilizando la ecuación cinética de Michaelis-Menten.

La k_{cat} se calculó en base a las siguientes ecuaciones:

$$V_{m\acute{a}x} = k_{cat} \cdot [E]_{saturada} \quad (4)$$

$$k_{cat} = \frac{V_{m\acute{a}x}}{[E]_{saturada}} \quad (5)$$

En las ecuaciones anteriores $V_{m\acute{a}x}$ corresponde a la velocidad máxima de conversión de sustrato y $[E]_{saturada}$ corresponde a la concentración de enzima utilizada en condiciones de sustrato saturantes.

2.2.13. Determinación de los parámetros termodinámicos de activación

La energía de activación (E_A) de las reacciones enzimáticas se calculó a partir de la pendiente del gráfico de Arrhenius utilizando un rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C.

Aplicando logaritmo natural a la ecuación de Arrhenius (ecuación (1)) se obtiene la siguiente expresión:

$$\ln k_{cat} = \frac{-E_A}{RT} + \ln A \quad (6)$$

En el gráfico de Arrhenius, que expone la dependencia del logaritmo natural de la constante catalítica en función del inverso de la temperatura, la pendiente de la línea recta en un intervalo de temperaturas apropiado, corresponde a $-E_A/R$.

Por otra parte, los parámetros termodinámicos de activación se calcularon usando las siguientes ecuaciones ^[21] (Anexo C):

$$\Delta G^\# = RT[\ln(k_B T/h) - \ln k_{cat}] \quad (7)$$

$$\Delta H^\# = E_A - RT \quad (8)$$

$$\Delta S^\# = (\Delta H^\# - \Delta G^\#)/T \quad (9)$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Generación de las variantes de la endoglucanasa Cel5A

En este trabajo de tesis se propuso generar 3 variantes de la proteína Cel5A:

1. La variante I99A, que contiene la mutación I99A en el dominio catalítico de Cel5A clonado en el plasmidio pET22b(+).
2. La variante A134Y/I99A, que contiene las mutaciones A134Y/I99A en el dominio catalítico de Cel5A clonado en el plasmidio pET22b(+).
3. La variante A134Y/I99A/N138L, que contiene las mutaciones A134Y/I99A/N138L en el dominio catalítico de Cel5A clonado en el plasmidio pET22b(+).

La generación de las variantes I99A y A134Y/I99A se realizó sin mayores dificultades experimentales. En términos generales, la generación de ambas variantes tuvo una gran eficiencia, lo cual se reflejó principalmente en 2 aspectos:

- La obtención de un gran número de colonias aisladas en las placas de medio selectivo luego del proceso de electroporación.
- La presencia de la mutación deseada en gran parte de las colonias analizadas a través del proceso de secuenciación.

Por otra parte, la generación de la variante A134Y/I99A/N138L no se pudo realizar satisfactoriamente a pesar de haber obtenido un gran número de colonias aisladas en las placas de medio selectivo luego del proceso de electroporación. El problema asociado a la generación de la variante A134Y/I99A/N138L se notó en los resultados del proceso de secuenciación, los cuales indicaron que esta variante presentó una secuencia nucleotídica del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa mutada que contiene repeticiones sucesivas de la secuencia de los partidores utilizados en la reacción de PCR.

Las repeticiones sucesivas de la secuencia de los partidores dentro de la secuencia nucleotídica del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa A134Y/I99A/N138L no permiten la expresión de una enzima funcional al traducir el gen mutante, por lo cual en estas condiciones se hace imposible poder caracterizar la enzima A134Y/I99A/N138L para así poder establecer el efecto combinado de estas mutaciones sobre la actividad catalítica enzimática.

Es muy importante señalar que una vez detectado el problema mencionado anteriormente, se intentó generar la variante A134Y/I99A/N138L en una segunda oportunidad. Sin embargo, nuevamente se obtuvo el mismo error en la secuencia nucleotídica del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa mutada por lo cual a partir de este resultado se decidió continuar el trabajo sin incluir la endoglucanasa mutada A134Y/I99A/N138L debido a inconvenientes de tiempo.

En la figura 3.1 se muestra un ejemplo del resultado de la secuenciación del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa A134Y/I99A/N138L con el partidor “T7 Promoter”, en el cual se pueden observar 5 repeticiones sucesivas de la secuencia del partidor N138L_Cel5A_Fw. Además se puede observar que las repeticiones de la secuencia del partidor no generan la pérdida de ninguna zona de la secuencia original del ADN molde (Anexo D).

```

ANNNTNTNNGAANGTCCCTCTAGAATAATTTTGTACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGTTG
TAGAAGAACATGGGGCAATTAAGTATTAGTAACGGTGAATTAGTCAATGAACGAGGCGAACCAAGTTCA
GTTAAAAGGGATGAGTCCCATGTTTTGCAATGGTACGGTCAATTTGAAACTATGAAAGTATGAAATG
GCTAAGAGATGATTGGGAATAAATGATTCCGAGCAGCAATGTATACCTCTCAGGAGGATATATTG
ATGATCCATCAGTAAAGGAAAAAGTAAAAGAGGCTGTTGAAGCTGCGATAGACCTTGATATATATGTG
ATCATTGATTGGCATGCCCTTTAGACAATGACCCAAATATATATAAAGAAGAAGCGAAGGATTTCTTT
GATGAAATGTCAGAGTTGATGGAGACTATCCGAATGTGATATACGAAATTTACAATGAACCGCTTGGT
AGTGATGTTACGTGGGGCAATGAACCGCTTGGTAGTGATGTTACGTGGGGCAATGAACCGCTTGGTAG
TGATGTTACGTGGGGCAATGAACCGCTTGGTAGTGATGTTACGTGGGGCAATGAACCGCTTGGTAGTG
ATGTTACGTGGGGCAATCAAATAAAACCGTATGCATAGGAAGTCATTCCGGTTATTCGTAACAATGACC
CTAATAACATTATTATTGTAGGTACAGGTACATGGAGTCAGGATGTCCATCATGCAACCTGATAATCAG
CTTGAGATCCTAACGTGATGATGCATTTATTTTATGCAGCGGACACATGGTCAAATTTACGAGAC
CAAGTAGATTATGCATTAGATCATGGAGCAAGCAGACTATTTGTTAGTGAATGGCGAACCGATGCAGC
TACTGGTGATGGTGGCGTGGCTTTAAGATGATGCACATCGTGCGGATTGAACCTTGA

```

Figura 3.1: Secuencia del gen de la endoglucanasa mutada A134Y/I99A/N138L. En colores se muestran las repeticiones sucesivas de la secuencia del partidor N138L_Cel5A_Fw dentro de la secuencia del gen.

El problema ocurrido en la generación de la variante A134Y/I99A/N138L estuvo probablemente asociado a la reacción de PCR debido a interacciones inespecíficas que ocurrieron entre el ADN molde y el partidor mutagénico N138L_Cel5A_Rv.

Al analizar la secuencia del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa Cel5A se pudo observar que río abajo de la zona de la secuencia a la cual debiera unirse el partidor N138L_Cel5A_Rv, existe complementariedad de 5 bases entre el ADN molde y el extremo 3' de este partidor. Esto podría generar que el partidor N138L_Cel5A_Rv se uniera inespecíficamente en esa zona y por ende la polimerización se realizara en forma errónea incluyendo más de una copia de la secuencia del partidor en la secuencia del gen.

El problema mencionado anteriormente también podría ser favorecido por la secuencia de los partidores utilizados para la generación de la mutación N138L. Si se observa la secuencia del partidor N138L_Cel5A_Rv, se puede observar que éste solamente posee 9 bases antes del codón asociado a la mutación por el extremo 3' (que corresponde al extremo por el cual se une la polimerasa). Esto podría favorecer la unión inespecífica del partidor a la secuencia de ADN molde, ya que mientras el partidor posea menos bases por el extremo 3' antes del codón asociado a la mutación, es más probable que éste sea capaz de establecer complementariedad y por ende uniones inespecíficas con otras zonas del ADN molde.

Si se analizan las variaciones de temperatura en cada ciclo de amplificación de la reacción de PCR, se puede plantear una explicación para el fenómeno de unión inespecífica del partidor N138L_Cel5A_Rv con el ADN molde. Cada ciclo de amplificación contó con una etapa de denaturación a 95 °C, una etapa de hibridación a 60 °C y una etapa de extensión a 72 °C. En la etapa de hibridación la

polimerasa probablemente es capaz de comenzar la polimerización a partir de la unión inespecífica del partidor con el ADN molde debido a la complementariedad de 5 bases existentes entre ambas cadenas de ADN (figura 3.2 A). Por otra parte, en la etapa de extensión ocurre un aumento de temperatura de 12 °C por lo cual es posible que debido a este aumento de temperatura se rompan las interacciones que unen inespecíficamente el partidor con el molde (estas interacciones son bastante débiles considerando que la unión sólo se encuentra constituida por 5 bases) mientras la polimerasa continúa la polimerización de una de las hebras de ADN. Producto de lo anterior, el partidor sólo quedaría unido a la cadena que está siendo extendida por la polimerasa sin cubrir ninguna zona del ADN molde (figura 3.2 B), lo cual podría explicar la generación de múltiples copias del partidor en los distintos ciclos de amplificación de la reacción de PCR del ADN plasmidial sin perder ninguna zona de la secuencia original del ADN molde.

Es importante considerar que el problema asociado a la generación de la variante A134Y/I99A/N138L fue producto de un mal diseño en la construcción de los partidores utilizados en la reacción de PCR. Este problema podría haber sido evitado si las secuencias hubieran sido analizadas con el programa Vector NTI de Invitrogen, ya que este programa permite detectar uniones inespecíficas entre el ADN molde y los partidores mutagénicos.

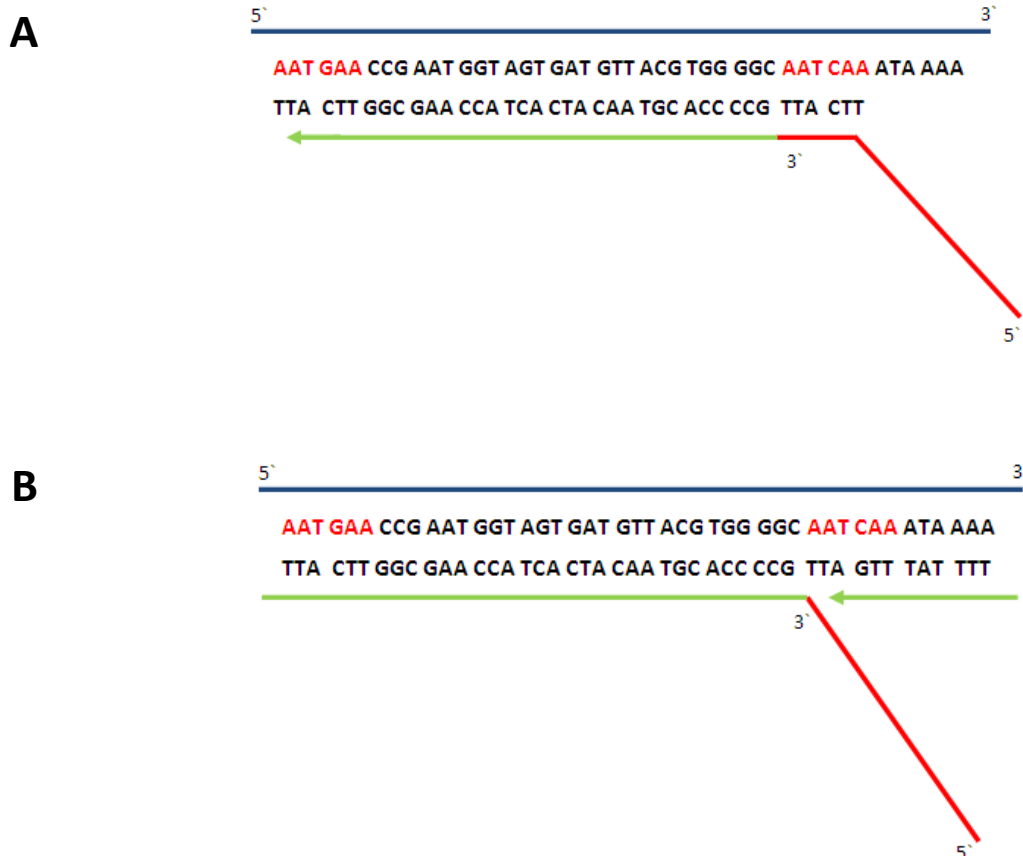


Figura 3.2: Posible explicación del error ocurrido en la reacción de PCR durante la generación de la variante A134Y/I99A/N138L. En azul se representa una zona de la secuencia del ADN molde, en rojo se representa el partidor N138L_Cel5A_Rv, en verde se representa la extensión de una hebra de ADN por parte de la polimerasa y en letras rojas se representan las zonas de complementariedad del molde con el extremo 3' del partidor N138L_Cel5A_Rv.

3.2. Expresión y purificación de las endoglucanasas recombinantes

Una vez completada la generación de las variantes de la proteína Cel5A, el trabajo de tesis prosiguió a través de la expresión y purificación de las endoglucanasas recombinantes. En la figura 3.3 se puede observar el análisis electroforético del total de las proteínas expresadas por las distintas recombinantes de *E. coli* BL21(DE3).

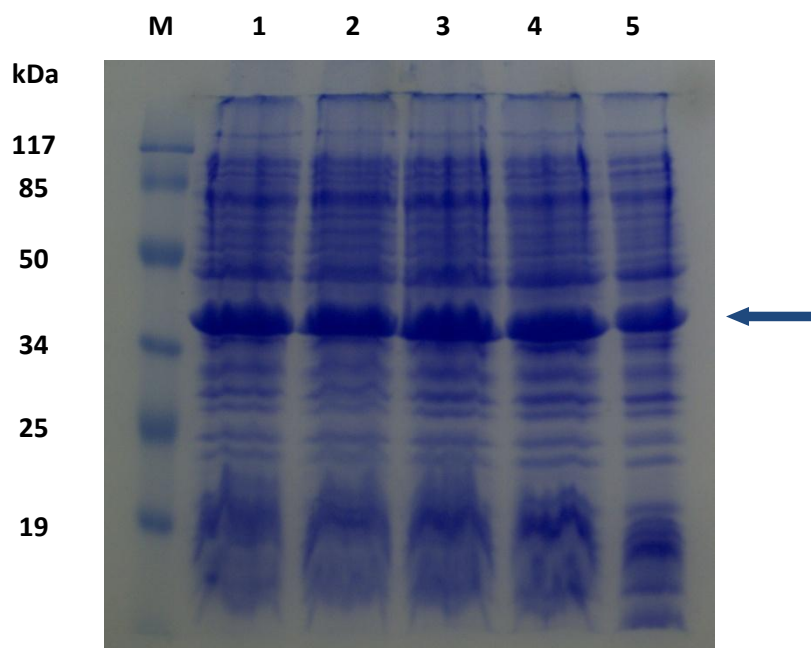


Figura 3.3: Análisis electroforético del total de las proteínas expresadas por las recombinantes de *E. coli* BL21(DE3). El carril M corresponde al marcador preteñido de masa molecular de proteínas, el carril 1 corresponde a la enzima Cel5A silvestre, el carril 2 corresponde a la variante A134Y, el carril 3 corresponde a la variante I99A, el carril 4 corresponde a la variante N138L y el carril 5 corresponde a la variante A134Y/I99A. Los resultados del control sin inducción con IPTG no se muestran en la figura.

En la figura 3.3 se puede apreciar una marcada banda de masa molecular ligeramente superior a 34 kDa en los 5 carriles correspondientes a las variantes de Cel5A (flecha azul en figura 3.3). Esta banda puede corresponder al dominio catalítico de las endoglucanasas recombinantes, ya que la masa molecular estimada del dominio catalítico de la endoglucanasa Cel5A es de 34,8 kDa^[56].

Para establecer la calidad del sistema de expresión de las endoglucanasas recombinantes compuesto por la cepa bacteriana *Escherichia coli* BL21(DE3) y el vector de expresión pET22b(+), se intentó determinar el porcentaje de pureza asociado a la expresión de las endoglucanasas de interés en relación al total de las proteínas expresadas, a través de la utilización del programa TotalLab Quant versión 11.4. A pesar de que la imagen del gel de la figura 3.3 posee un gran número de contaminantes, que dificultan la determinación de bandas digitalizadas por parte del programa, se pudo determinar que las endoglucanasas recombinantes representan aproximadamente un 20 % del total de las proteínas expresadas por cada recombinante de *Escherichia coli* BL21(DE3). Este es un valor relativamente bueno considerando los porcentajes de expresión que se obtienen normalmente para proteínas recombinantes^[64] y probablemente puede estar asociado a una buena eficiencia de los procesos de transcripción y traducción del gen del dominio catalítico de las endoglucanasas recombinantes al utilizar el sistema de expresión mencionado anteriormente.

Luego de la expresión de las endoglucanasas recombinantes, se realizó una purificación de éstas mediante el uso de una resina de níquel inmovilizado capaz de interactuar con la cola de poli-histidina incorporada a las enzimas a través del vector de expresión pET22b(+). En la figura 3.4 se muestra el análisis electroforético de las proteínas purificadas a través de la resina Ni-NTA.

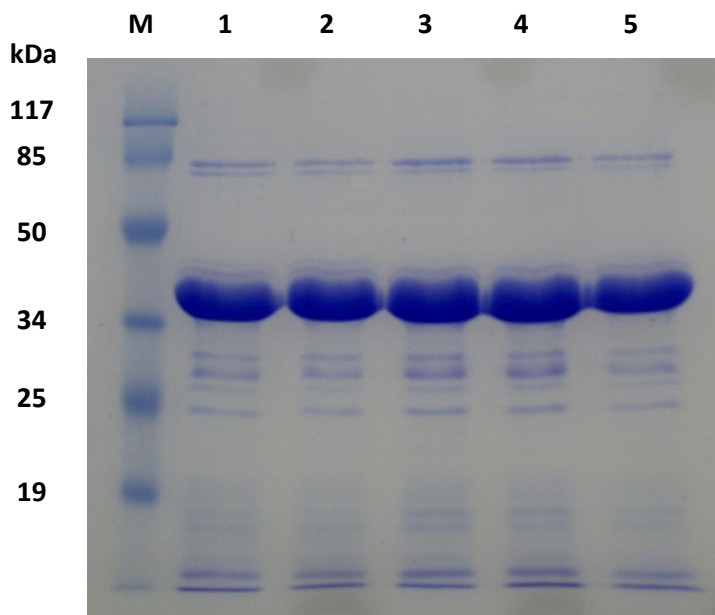


Figura 3.4: Análisis electroforético de las proteínas purificadas a través de la resina Ni-NTA. El carril M corresponde al marcador preteñido de masa molecular de proteínas, el carril 1 corresponde a la purificación de la endoglucanasa Cel5A silvestre, el carril 2 corresponde a la purificación de la endoglucanasa A134Y, el carril 3 corresponde a la purificación de la endoglucanasa I99A, el carril 4 corresponde a la purificación de la endoglucanasa N138L y el carril 5 corresponde a la purificación de la endoglucanasa A134Y/I99A.

Al observar la figura 3.4 se puede corroborar que la banda de masa molecular ligeramente superior a 34 kDa corresponde al dominio catalítico de las endoglucanasas recombinantes. Además se puede apreciar que a pesar de la etapa de purificación mediante la resina Ni-NTA, las proteínas recombinantes se obtuvieron mezcladas con bajas concentraciones de otras proteínas contaminantes.

Por otra parte, a partir del ensayo de Bradford realizado para determinar la concentración de las endoglucanasas recombinantes luego de la etapa de purificación mediante la resina Ni-NTA, se obtuvieron los resultados expuestos en la tabla 3.1:

Tabla 3.1: Concentración de las endoglucanasas recombinantes purificadas.

Enzima	Concentración (mg/ml)
Cel5A Silvestre	1,37
A134Y	1,28
N138L	1,6
I99A	1,36
A134Y/I99A	1,43

Concentración obtenida mediante el método de Bradford.

Considerando la baja contaminación de las endoglucanasas recombinantes luego de la etapa de purificación, se determinó su concentración real a partir de la información generada por los ensayos de Bradford, estableciendo su porcentaje de pureza en relación al total. Para esto se utilizó nuevamente el programa TotalLab Quant versión 11.4, el cual permite obtener una imagen digitalizada del gel y así calcular el porcentaje de la muestra representado por cada banda.

En la figura 3.5 se puede observar la imagen digitalizada del gel de poliacrilamida asociado al análisis electroforético de las endoglucanasas purificadas a través de la resina Ni-NTA. En esta figura se pueden apreciar todas las bandas digitalizadas de cada carril, a partir de las cuales se calculó la pureza de las enzimas recombinantes obtenidas (tabla 3.2).

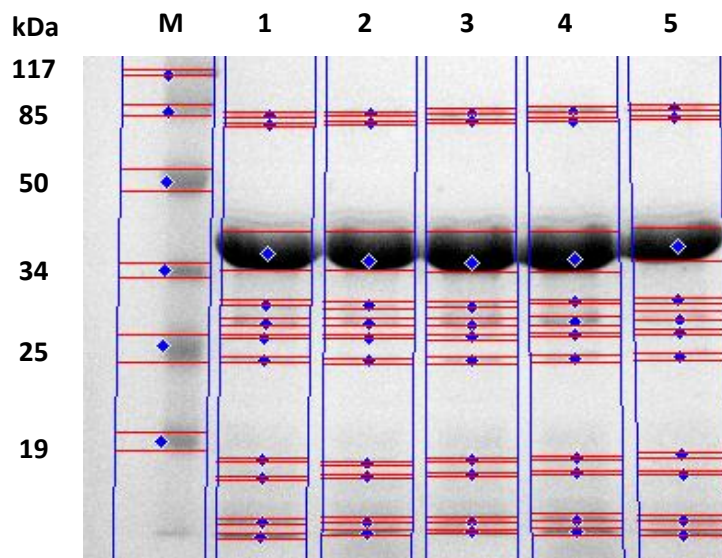


Figura 3.5: Imagen digitalizada del gel de poliacrilamida asociado al análisis electroforético de las endoglucanasas purificadas mediante la resina Ni-NTA. El carril M corresponde al marcador preteñido de masa molecular de proteínas, el carril 1 corresponde a la purificación de la endoglucanasa Cel5A silvestre, el carril 2 corresponde a la purificación de la endoglucanasa A134Y, el carril 3 corresponde a la purificación de la endoglucanasa I99A, el carril 4 corresponde a la purificación de la endoglucanasa N138L y el carril 5 corresponde a la purificación de la endoglucanasa A134Y/I99A.

Tabla 3.2: Porcentaje de pureza de las endoglucanasas recombinantes purificadas.

Enzima	Pureza Estimada (%)
Cel5A Silvestre	57,65
A134Y	58,84
N138L	55,26
I99A	57,73
A134Y/I99A	52,17

Pureza obtenida mediante la digitalización del gel de poliacrilamida.

Tomando en consideración la pureza de las endoglucanasas recombinantes purificadas expuesta anteriormente, se calculó su concentración real a partir de los resultados obtenidos en el ensayo de Bradford (tabla 3.3).

Tabla 3.3: Concentración estimada de las endoglucanasas recombinantes purificadas.

Enzima	Concentración (mg/ml)
Cel5A Silvestre	0,79
A134Y	0,75
N138L	0,88
I99A	0,79
A134Y/I99A	0,75

Al analizar visualmente el gel de la figura 3.4 se puede apreciar que la pureza de las endoglucanasas recombinantes se encuentra en alrededor de un 90 %. El hecho de que la pureza calculada a partir de la digitalización de las bandas del gel de poliacrilamida sea considerablemente menor a la pureza estimada visualmente, podría deberse a que la banda principal del gel esté sobrecargada por lo que al digitalizar se obtiene un error en las proporciones y por ende en los porcentajes de pureza.

El problema mencionado en el párrafo anterior podría haberse solucionado mediante la realización de diluciones de las muestras cargadas en el gel, ya que de esta manera el gel no tendría bandas sobrecargadas y por ende las proporciones digitalizadas serían más certeras.

A pesar de que la subestimación de la pureza de las endoglucanasas recombinantes genera una sobreestimación de la constante catalítica de éstas, este problema no genera un efecto muy relevante en términos de comparación relativa pues tanto las concentraciones obtenidas mediante el método de Bradford como los porcentajes de pureza obtenidos mediante la digitalización del gel de todas las endoglucanasas recombinantes son bastante similares.

3.3. Caracterización cinética y termodinámica de las endoglucanasas recombinantes

Los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_M se calcularon mediante una regresión no lineal de las curvas de saturación enzimática (velocidad inicial de reacción v /s concentración de sustrato) usando la ecuación cinética de Michaelis-Menten. Se ajustó ambos parámetros de manera tal de minimizar la suma del error cuadrático existente entre los valores experimentales de velocidad de reacción y los valores teóricos obtenidos a partir de la ecuación de velocidad de Michaelis-Menten.

En las figuras 3.6 a 3.11 se muestran gráficamente las curvas de saturación de todas las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis a distintas temperaturas. Es importante señalar que la composición final de la solución amortiguadora utilizada en los ensayos actividad correspondió a Hepes 45 mM, NaH_2PO_4 5 mM, NaCl 30 mM, Imidazol 25 mM (pH 7,65) y el sustrato artificial utilizado fue p-nitrofenil- β -D-celobiosido (pNFC).

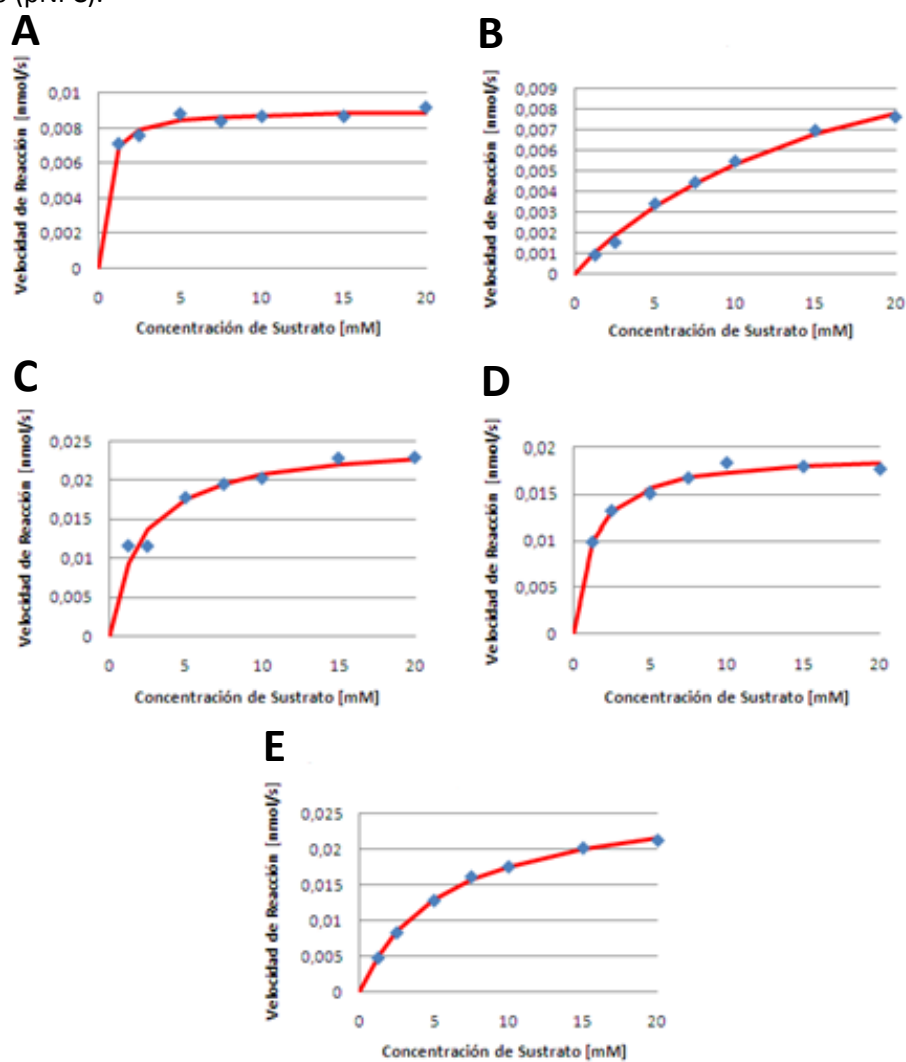


Figura 3.6: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 5 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Cel5A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

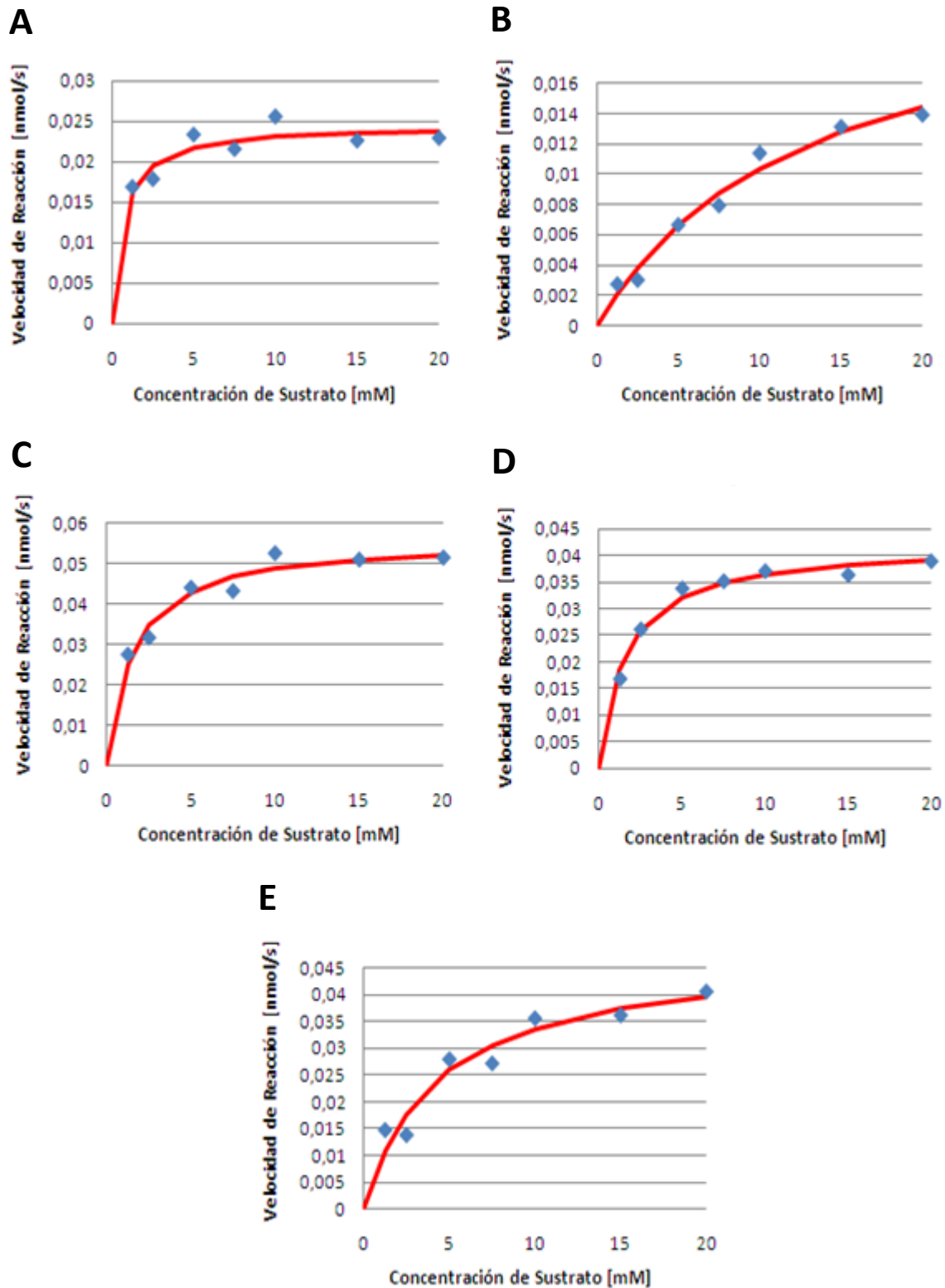


Figura 3.7: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 10 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Cel5A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

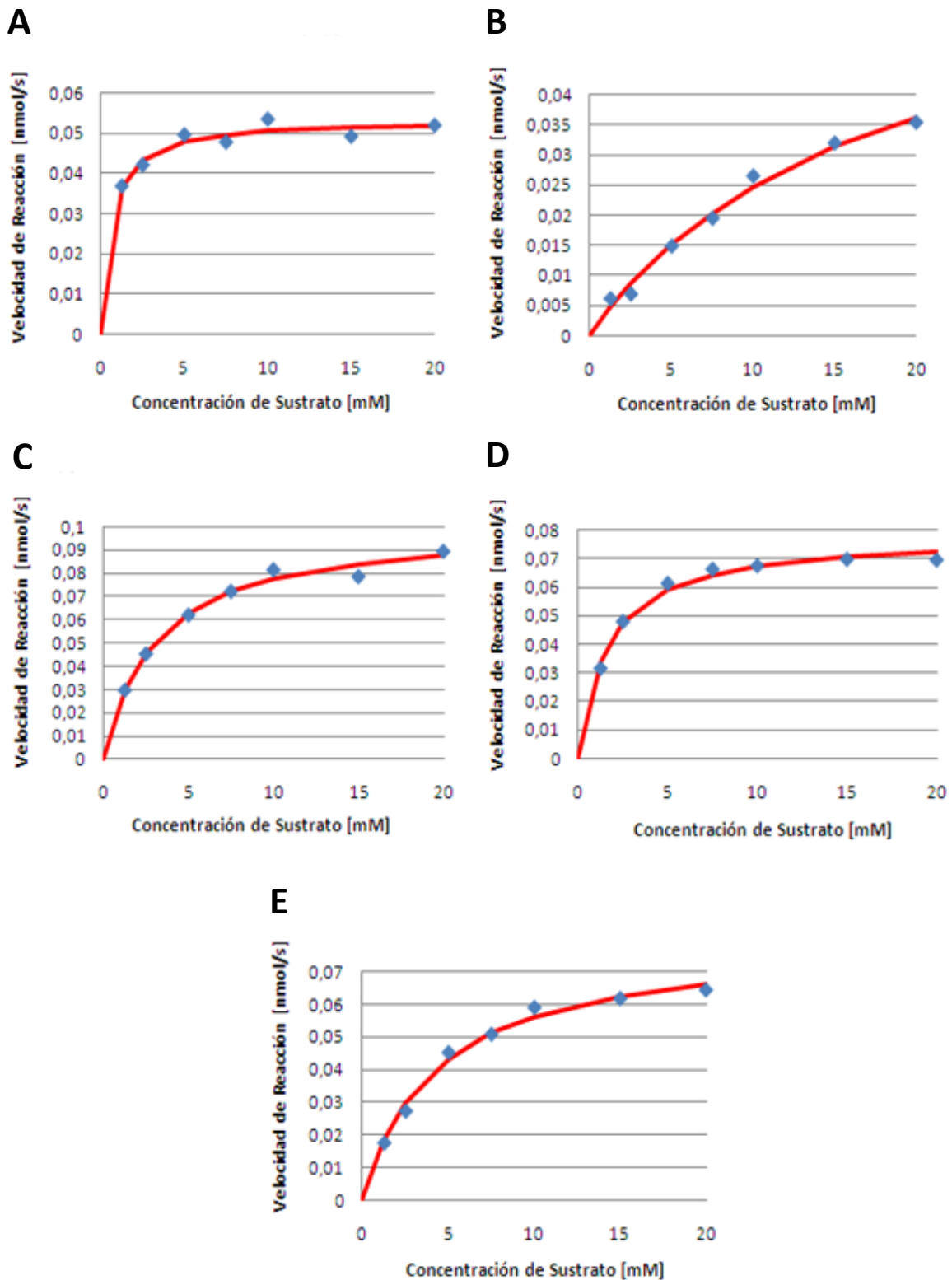


Figura 3.8: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 20 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Ce15A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

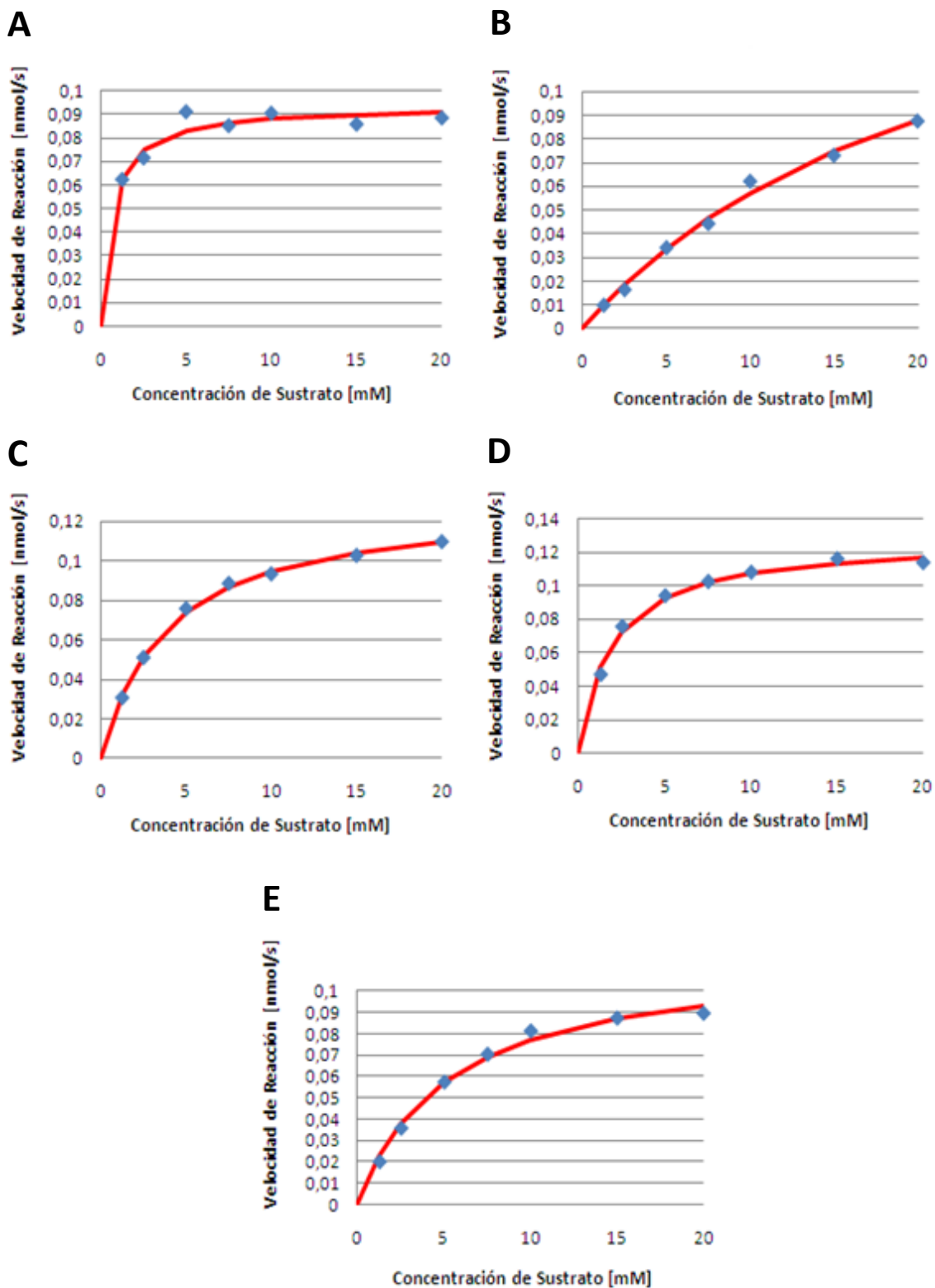


Figura 3.9: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 30 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Ce15A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

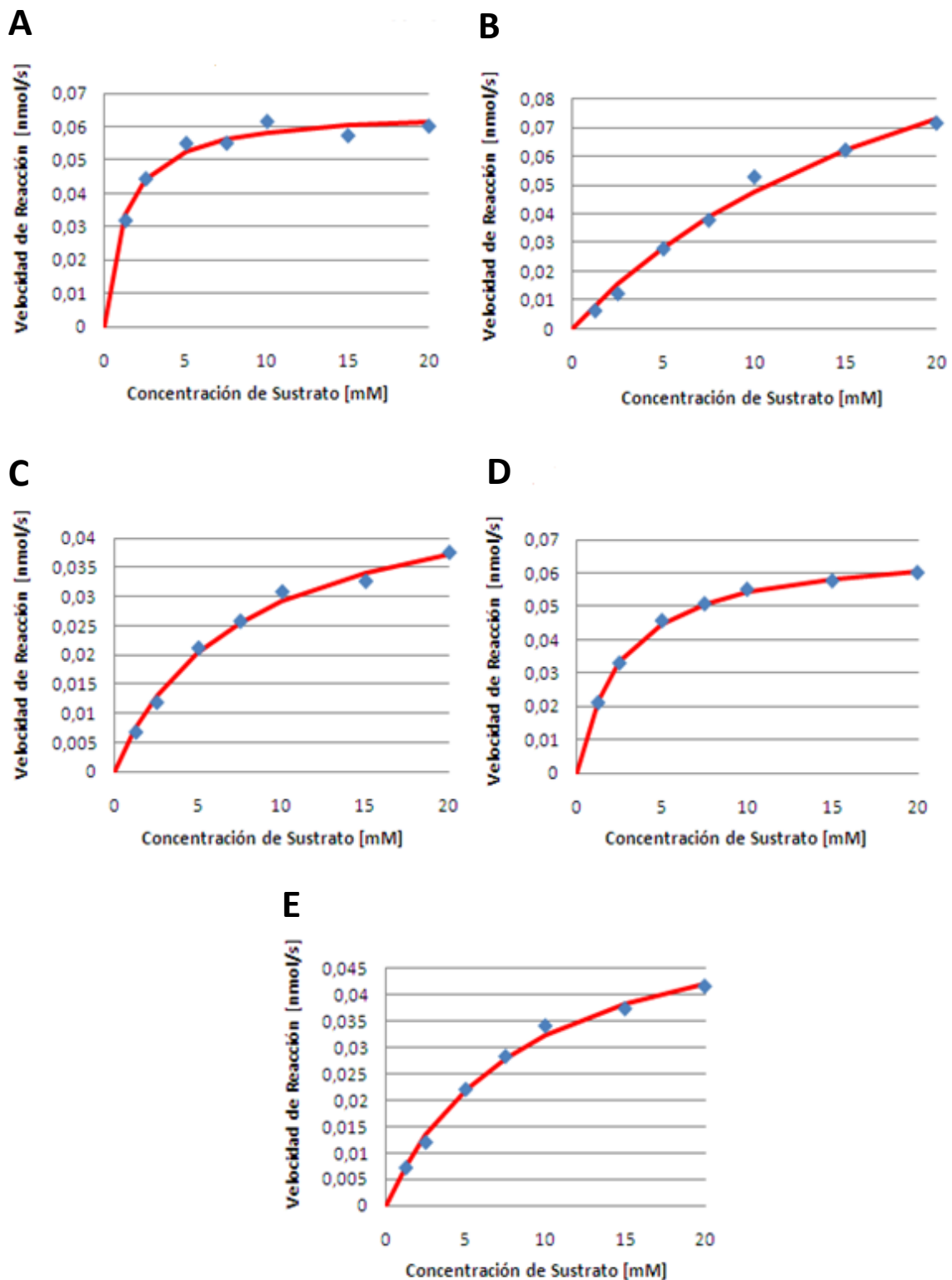


Figura 3.10: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 40 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Cel5A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

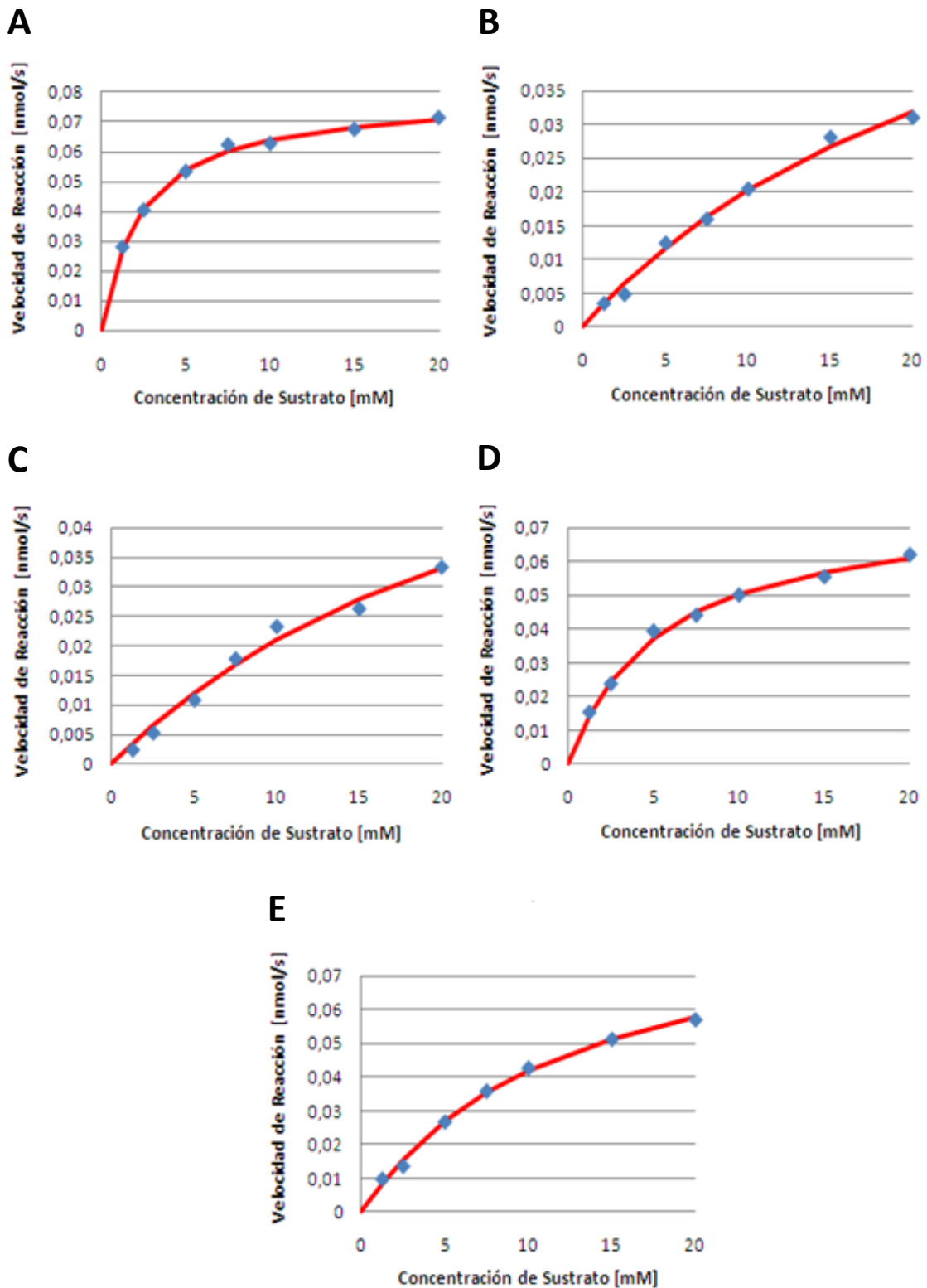


Figura 3.11: Variación de la velocidad de reacción enzimática en función de la concentración de sustrato a 50 °C. En puntos azules se representan los valores experimentales y en líneas rojas se representan los valores teóricos (Michaelis-Menten). La figura A representa a la enzima Cel5A silvestre, la figura B representa a la enzima A134Y, la figura C representa a la enzima N138L, la figura D representa a la enzima I99A y la figura E representa a la enzima A134Y/I99A.

Si se observan las regresiones no lineales expuestas en las figuras anteriores, se puede apreciar que en términos generales los valores de velocidad de reacción experimentales son muy bien representados a través de la cinética de Michaelis-Menten luego del ajuste de los parámetros cinéticos $V_{m\acute{a}x}$ y K_M . Sin embargo, si se observan en detalle las curvas de saturación de la endoglucanasa Cel5A silvestre entre 5 °C y 30 °C, se puede observar que no existen puntos experimentales alrededor del 50 % de la velocidad máxima de reacción, por lo tanto el valor estimado de la K_M de esta enzima entre las temperaturas mencionadas anteriormente está sujeto a error.

Es de gran relevancia considerar que la cinética de Michaelis-Menten posee una suposición muy importante: estado pseudoestacionario. Esta suposición puede considerarse válida en el caso de los ensayos de actividad realizados para determinar los valores de velocidad de reacción experimentales, ya que estos ensayos tuvieron una duración prolongada (superior a los 5 minutos en casi la totalidad de éstos) y considerando que el transiente de los ensayos de actividad catalítica dura máximo un par de segundos ^[65], éste puede ser despreciado al representar solamente una pequeña fracción del tiempo de ocurrencia de los ensayos.

A partir de los valores de velocidad máxima de reacción ($V_{m\acute{a}x}$), se calculó el valor de la constante catalítica (k_{cat}) de las endoglucanasas recombinantes mediante la utilización de la ecuación (5). Es importante señalar que los valores obtenidos de la constante catalítica de estas enzimas corresponden a valores aparentes debido al error en la estimación de la concentración final de las endoglucanasas recombinantes.

En las tablas 3.4, 3.5, 3.6, 3.7 y 3.8 se muestra un resumen de los principales parámetros cinéticos (constante catalítica, constante de Michaelis-Menten y eficiencia catalítica) de cada una de las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis a distintas temperaturas.

Tabla 3.4: Parámetros cinéticos de la endoglucanasa Cel5A silvestre a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
5	0,11	0,36	0,3
10	0,29	0,63	0,47
20	1,29	0,58	2,23
30	4,52	0,61	7,46
40	12,57	1,17	10,73
50	30,46	2,32	13,14

Tabla 3.5: Parámetros cinéticos de la endoglucanasa A134Y a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s^{-1})	K_M (mM)	k_{cat}/K_M ($s^{-1} mM^{-1}$)
5	0,17	16,52	0,01
10	0,28	13,14	0,021
20	0,8	17,37	0,046
30	2,23	22,82	0,098
40	3,69	22,56	0,16
50	3,54	26,64	0,13

Tabla 3.6: Parámetros cinéticos de la endoglucanasa N138L a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
5	0,32	2,1	0,15
10	0,71	1,54	0,46
20	2,55	3,02	0,84
30	6,55	3,75	1,75
40	10,28	7,41	1,39
50	16,11	27,9	0,58

Tabla 3.7: Parámetros cinéticos de la endoglucanasa I99A a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
5	0,23	1,2	0,19
10	0,51	1,61	0,32
20	1,89	1,61	1,18
30	6,18	1,89	3,27
40	13,27	2,67	4,97
50	29,68	5,24	5,67

Tabla 3.8: Parámetros cinéticos de la endoglucanasa A134Y/I99A a distintas temperaturas.

Temperatura (°C)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ mM ⁻¹)
5	0,37	5,80	0,064
10	0,65	4,34	0,15
20	2,15	4,31	0,5
30	6,31	5,3	1,19
40	12,99	8,76	1,48
50	19,95	12,31	1,62

Considerando la relevancia de los resultados expuestos en las tablas anteriores, es fundamental poder apreciar visualmente la variación de la constante catalítica (k_{cat}), la constante de Michaelis-Menten (K_M) y la eficiencia catalítica (k_{cat}/K_M) de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura, ya que la comparación de la variación de estos parámetros cinéticos en función de la temperatura para cada una de las enzimas permite evaluar el desempeño catalítico global de éstas para así lograr determinar las características de psicofilicidad de cada variante.

En la figura 3.12 se puede observar la variación de la constante catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura:

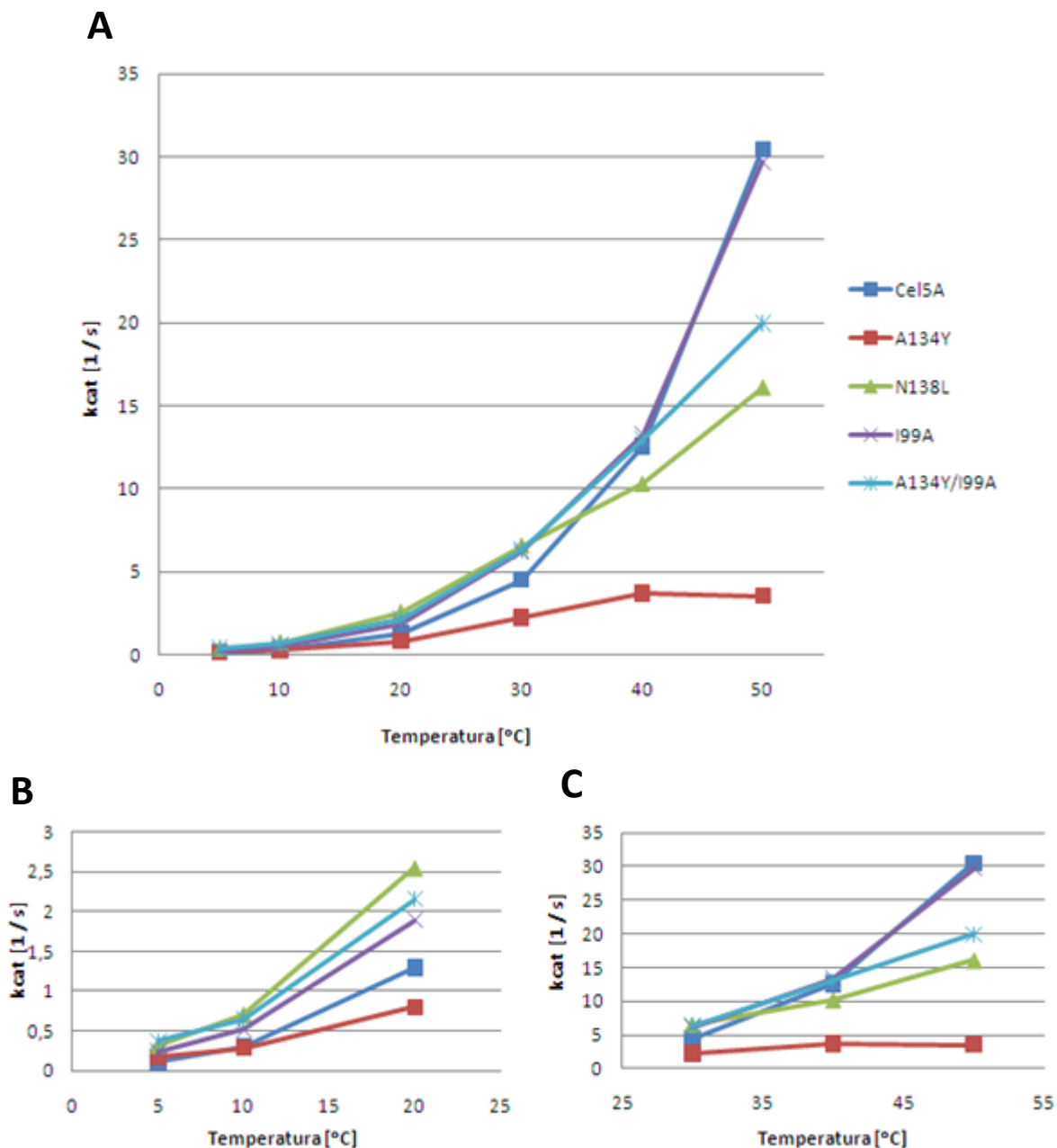


Figura 3.12: Variación de la constante catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura. La figura A representa la variación de k_{cat} en el rango global de temperatura comprendido entre 5 °C y 50 °C, la figura B representa la variación de k_{cat} en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 20 °C y la figura C representa la variación de k_{cat} en el rango de temperatura comprendido entre 30 °C y 50 °C.

Al observar la figura 3.12 se puede apreciar que las variantes N138L, A134Y/I99A e I99A poseen una constante catalítica notoriamente mayor que la de la endoglucanasa Cel5A silvestre en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C. Estas variantes mejoran en promedio la constante catalítica de la enzima nativa en un 120 %, un 117 % y un 68 % respectivamente en el rango de

temperatura mencionado anteriormente, lo cual apunta a que estas enzimas mutadas corresponden a adaptaciones psicrófilicas de la endoglucanasa nativa.

En esta figura también se puede observar que la endoglucanasa Cel5A silvestre mantiene un notorio aumento de su constante catalítica a medida que aumenta la temperatura en todo el rango de temperatura estudiado. Este aumento global de la constante catalítica es solamente comparable con el aumento que muestra la enzima I99A, la cual presenta valores de k_{cat} extremadamente parecidos en promedio a la endoglucanasa nativa en el rango de temperatura comprendido entre 40 °C y 50 °C (variación menor a un 2 %). Lo anterior permite notar las excelentes características catalíticas de la enzima I99A ya que esta enzima mejora evidentemente la constante catalítica de la endoglucanasa nativa a bajas temperaturas y mantiene los valores de constante catalítica de la endoglucanasa nativa a altas temperaturas, mostrando un notorio incremento de este parámetro al aumentar la temperatura en todo el rango de temperatura estudiado.

Por otra parte, al observar la variación de la constante catalítica de la enzima N138L en función de la temperatura, se aprecia que esta enzima posee valores de k_{cat} menores en comparación a la endoglucanasa nativa en el rango de temperatura comprendido entre 40 °C y 50 °C. Lo anterior permite sostener que el incremento de temperatura entre 30 °C y 50 °C, no posee un efecto tan significativo en el aumento de k_{cat} de esta enzima como ocurre en el caso de las endoglucanasas Cel5A silvestre e I99A y por ende la enzima N138L sólo supera catalíticamente a la enzima nativa en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C.

La variación de la constante catalítica de la enzima A134Y/I99A en función de la temperatura, permite determinar que esta enzima posee un valor de k_{cat} muy parecido al de la endoglucanasa Cel5A silvestre a 40 °C y un menor valor de k_{cat} con respecto a la enzima nativa a 50 °C. Esto permite sostener que el incremento de temperatura entre 40 °C y 50 °C, no posee un efecto tan trascendental sobre k_{cat} para esta enzima como ocurre en el caso de las endoglucanasas Cel5A silvestre e I99A y por ende la enzima A134Y/I99A sólo supera catalíticamente a la enzima nativa en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 40 °C.

Finalmente, la variación de la constante catalítica de la enzima A134Y en todo el rango de temperatura estudiado, permite observar que esta enzima presenta en general una baja constante catalítica (sólo es comparable catalíticamente a Cel5A silvestre a 5 °C y 10 °C debido a que a estas temperaturas la enzima nativa presenta una actividad bastante baja). Este resultado permite corroborar el posible impedimento estérico planteado anteriormente ^[59], el cual probablemente impide un buen funcionamiento de la catálisis enzimática de la enzima A134Y. Además es importante señalar que al observar la variación de k_{cat} de esta enzima entre 40 °C y 50 °C, se puede apreciar que la constante catalítica disminuye al aumentar la temperatura, lo cual permite asumir que en este rango de temperatura ocurre un marcado proceso de inactivación enzimática.

En la figura 3.13 se muestra la variación de la constante de Michaelis-Menten de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura:

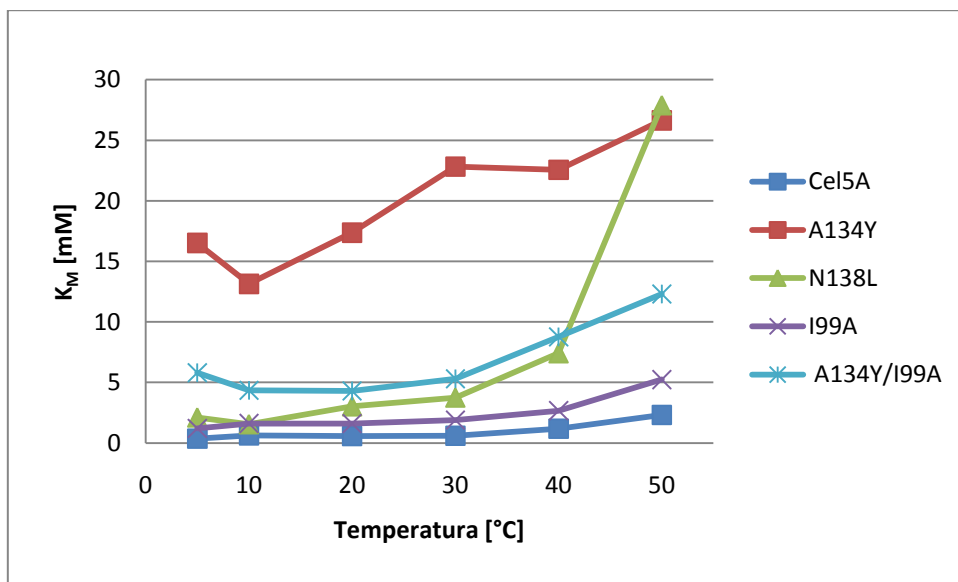


Figura 3.13: Variación de la constante de Michaelis-Menten de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura.

Al observar la variación de K_M en función de la temperatura para todas las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis, se puede determinar que en todas las enzimas mutadas generadas se aumenta significativamente (al menos en un 172 % promedio) la constante de Michaelis-Menten en comparación a la endoglucanasa Cel5A silvestre en todo el rango de temperaturas estudiado.

A partir de lo expuesto anteriormente se desprende que todas las endoglucanasas mutadas generadas presentan en general una menor afinidad por el sustrato en relación a la enzima nativa. Es importante señalar que la asociación del valor de K_M y la afinidad de la enzima por el sustrato está sujeta a la ocurrencia de un equilibrio rápido entre la enzima y el complejo enzima sustrato, ya que el valor de la constante de Michaelis-Menten solamente es capaz de reflejar la afinidad de la enzima por el sustrato cuando la constante cinética de la reacción inversa del equilibrio enzima/enzima-sustrato es significativamente mayor a la constante cinética de la reacción de formación de producto.

Cabe destacar que la mutación A134Y presenta un efecto fuerte sobre el aumento de K_M ya que justamente las dos enzimas mutadas que contienen esta mutación (A134Y y A134Y/I99A) son aquellas que presentan los valores de K_M más elevados.

A partir de la figura 3.13 también se puede observar que todas las enzimas aumentan su K_M al aumentar la temperatura. Esto puede deberse principalmente a dos aspectos:

- A mayor temperatura aumentan las vibraciones y movimientos moleculares, los cuales poseen un efecto negativo en la formación de enlaces e interacciones entre la enzima y el sustrato.

- Se ha demostrado que las interacciones predominantes entre la endoglucanasa Cel5A y el sustrato corresponden a interacciones electrostáticas (puentes de hidrógeno principalmente) ^[55], las cuales disminuyen su intensidad con el aumento de temperatura.

Es importante notar el gran aumento de K_M que presenta la enzima N138L al incrementar la temperatura desde 40 °C hasta 50 °C. Este hecho permite asumir la pérdida de gran parte de la afinidad por el sustrato de la enzima N138L debido a este aumento de temperatura, lo cual probablemente puede deberse a algún cambio estructural importante en la vecindad del sitio activo enzimático que impide una interacción favorable entre la enzima y el sustrato.

En la figura 3.14 se puede apreciar la variación de la eficiencia catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura:

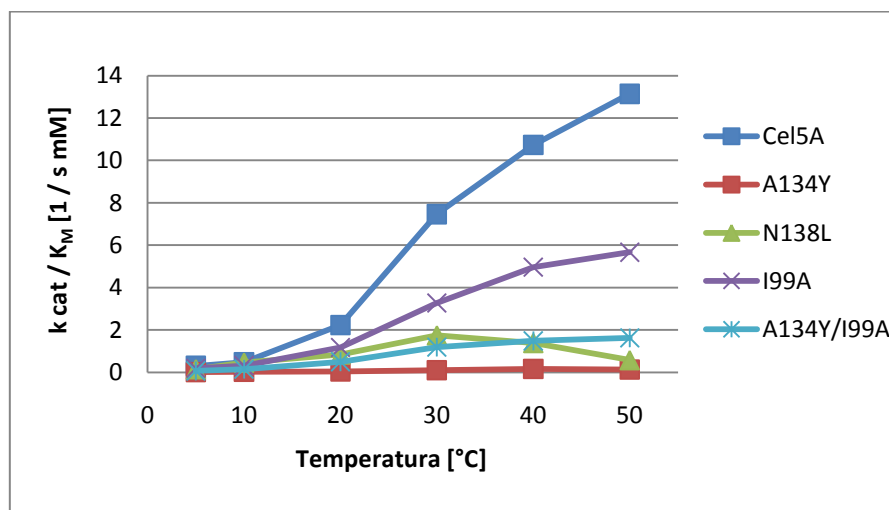


Figura 3.14: Variación de la eficiencia catalítica de las endoglucanasas recombinantes en función de la temperatura.

La variación de la eficiencia catalítica de todas las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis en función de la temperatura, permite determinar que todas las endoglucanasas mutadas poseen una menor eficiencia catalítica en comparación a Cel5A silvestre en todo el rango de temperatura estudiado. Esto se debe principalmente a la gran diferencia de K_M presente entre la enzima nativa y las mutadas, ya que como la eficiencia catalítica es definida como el cociente k_{cat}/K_M , el bajo valor de K_M que presenta la enzima Cel5A silvestre en todo el rango de temperatura estudiado impide que las enzimas mutadas superen su valor de eficiencia catalítica.

Es importante señalar que tanto la diferencia como las razones de eficiencia catalítica entre la enzima nativa y las variantes N138L, I99A y A134Y/I99A se incrementan a medida que aumenta la temperatura. Esto se debe a que a bajas temperaturas, estas enzimas mutadas presentan valores de K_M y k_{cat} mayores en comparación a Cel5A silvestre, por lo cual se puede compensar la variación entre ambos parámetros cinéticos para obtener valores de eficiencia catalítica comparables con los de la enzima nativa. Sin embargo, a altas temperaturas las enzimas mutadas poseen valores de K_M mayores y valores de k_{cat} menores (o similares en el caso de I99A) en comparación a Cel5A silvestre, por lo cual en estas condiciones es imposible que las enzimas mutadas logren tener una eficiencia catalítica comparable a la de la enzima nativa.

Si se observa los valores de la eficiencia catalítica de la enzima A134Y (tabla 3.5 y figura 3.14), se puede apreciar que ésta es muy cercana a 0 en todo el rango de temperatura estudiado. Esto se debe a que la variante A134Y presenta las peores características enzimáticas posibles desde el punto de vista de la eficiencia catalítica: bajos valores de k_{cat} y altos valores de K_M .

El hecho de que todas las endoglucanasas mutadas presenten una eficiencia catalítica tan baja en comparación a la enzima nativa no tiene demasiada relevancia ya que las endoglucanasas generalmente realizan su función catalítica en concentraciones de sustrato saturantes ^[65], por lo cual el parámetro más relevante en la caracterización cinética de estas enzimas corresponde a la constante catalítica.

En la figura 3.15 se muestra el gráfico de Arrhenius de todas las endoglucanasas recombinantes utilizadas en este trabajo de tesis:

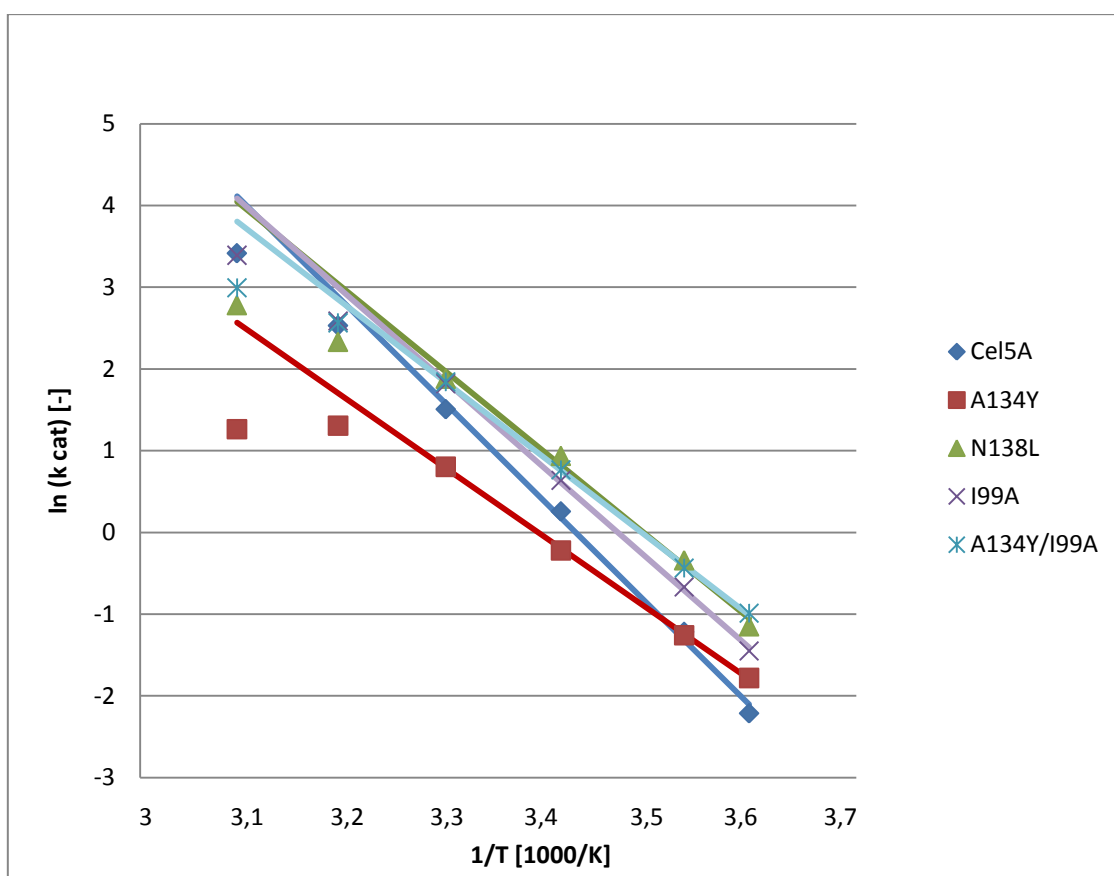


Figura 3.15: Gráfico de Arrhenius de las endoglucanasas recombinantes.

Al observar en detalle la figura 3.15 se puede apreciar que ninguna de las endoglucanasas recombinantes es capaz de mantener la tendencia lineal esperada para la variación de $\ln(k_{cat})$ v/s $1/T$ en todo el rango de temperatura estudiado. La tendencia lineal expresada anteriormente sólo se cumple en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C para todas las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis, ya que a temperaturas más altas ocurre un alejamiento de la tendencia hacia valores de k_{cat} más bajos.

Este alejamiento de la tendencia en la variación de k_{cat} permite suponer la ocurrencia de un posible proceso de inactivación enzimática observable a partir de los 40 °C. Es importante señalar que en este trabajo no es posible asociar el proceso de inactivación con la termolabilidad enzimática, ya que no se realizaron estudios de estabilidad que permitirían establecer el efecto del aumento de la temperatura sobre la estructura enzimática.

Si se analiza en detalle el grado de desviación con respecto a la tendencia lineal que presenta cada enzima en sus valores de $\ln(k_{cat})$ a partir de los 40 °C, se puede establecer cualitativamente la magnitud del proceso de inactivación enzimática que sufre cada endoglucanasa con el aumento de temperatura.

En términos generales, se observa que las enzimas Cel5A silvestre e I99A presentan la menor desviación respecto a sus tendencias lineales respectivas a los 40 °C y 50 °C, lo cual permite suponer que en estas enzimas el proceso de inactivación enzimática ocurre pero no es extremadamente relevante en el rango de temperatura comprendido entre 30 °C y 50 °C.

Por otra parte, la enzima A134Y/I99A se aleja relativamente poco de su tendencia lineal a los 40 °C, sin embargo, a los 50 °C ocurre una desviación muy significativa. Esto refleja que el proceso de inactivación enzimática de la variante A134Y/I99A se hace evidente a partir de temperaturas superiores a los 40 °C.

La variación del $\ln(k_{cat})$ de la enzima N138L muestra que esta enzima se aleja bastante de su tendencia lineal tanto a los 40 °C como a los 50 °C. Esto permite suponer que el proceso de inactivación enzimática de la variante N138L se hace relevante a partir de temperaturas superiores a los 30 °C.

Finalmente, se observa que para la enzima A134Y su valor de $\ln(k_{cat})$ disminuye al aumentar la temperatura desde 40 °C hasta 50 °C por lo cual se desprende que esta enzima presenta el mayor proceso de inactivación enzimática dentro de todas las endoglucanasas ocupadas en este trabajo de tesis debido a ser la única enzima que presenta una baja en el valor de su constante catalítica al aumentar la temperatura desde 40 °C hasta 50 °C.

Es importante señalar que la pérdida de la linealidad de la tendencia en el gráfico de Arrhenius es análoga a la pérdida de la tendencia exponencial en el gráfico que expone la variación de la constante catalítica en función de la temperatura. Es así como el posible proceso de inactivación enzimática, puede ser considerado responsable de la notoria disminución de la tasa de aumento de k_{cat} de las enzimas N138L y A134Y/I99A a medida que aumenta la temperatura desde 30 °C y 40 °C respectivamente (debido a la pérdida de moléculas de enzima activas dentro del sistema de reacción), lo cual genera que ambas enzimas mutadas no sean capaces de superar catalíticamente a Cel5A silvestre en todo el rango de temperatura estudiado.

Otra aplicación importante del gráfico de Arrhenius expuesto en la figura 3.15 corresponde a la obtención de la energía de activación (E_A) de la reacción catalizada por cada una de las endoglucanasas recombinantes a partir de la pendiente de la tendencia lineal que presenta cada enzima entre 5 °C y 30 °C (se excluyen los valores de $\ln(k_{cat})$ a 40 °C y 50 °C ya que de esta forma se pueden separar los procesos de catálisis y desactivación enzimática para así obtener solamente la E_A de la reacción de catálisis). Por otra parte, a partir de la energía de activación se pueden calcular los parámetros

termodinámicos de activación de la reacción catalizada por cada una de las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis: energía libre de activación (ΔG^\ddagger), entalpía de activación (ΔH^\ddagger) y entropía de activación (ΔS^\ddagger).

En la tabla 3.9 se puede observar el valor de la energía de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas utilizadas en este trabajo de tesis:

Tabla 3.9: Energía de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes.

Enzima	E_A (kJ/mol)
Cel5A Silvestre	103,3
A134Y	72,5
N138L	84,7
I99A	91,2
A134Y/I99A	80

Por otra parte, en las tablas 3.10, 3.11, 3.12 y 3.13 se muestran los valores de los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a distintas temperaturas:

Tabla 3.10: Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 5 °C.

Enzima	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)
Cel5A Silvestre	73,1	101	27,9
A134Y	72,1	70,1	-2
N138L	70,6	82,3	11,7
I99A	71,3	88,9	17,6
A134Y/I99A	70,2	77,7	7,5

Tabla 3.11: Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 10 °C.

Enzima	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)
Cel5A Silvestre	72,1	100,9	28,8
A134Y	72,2	70,1	-2,1
N138L	70	82,3	12,3
I99A	70,8	88,9	18,1
A134Y/I99A	70,3	77,7	7,4

Tabla 3.12: Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 20 °C.

Enzima	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)
Cel5A Silvestre	71,1	100,8	29,7
A134Y	72,3	70	-2,3
N138L	69,5	82,2	12,7
I99A	70,2	88,8	18,8
A134Y/I99A	69,9	77,6	7,7

Tabla 3.13: Parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes a 30 °C.

Enzima	ΔG^\ddagger (kJ/mol)	ΔH^\ddagger (kJ/mol)	$T\Delta S^\ddagger$ (kJ/mol)
Cel5A Silvestre	70,5	100,7	30,2
A134Y	72,3	69,9	-2,4
N138L	69,5	82,1	12,6
I99A	69,7	88,7	19
A134Y/I99A	69,6	77,5	7,9

Antes de discutir los valores obtenidos de la energía de activación y de los parámetros cinéticos de activación de las reacciones catalizadas por cada una de las endoglucanasas recombinantes, es muy importante considerar el significado de estos parámetros ^[21]:

1. La energía de activación en la ecuación de Arrhenius es equivalente a la entalpía de activación en la teoría del estado de transición ya que ambos parámetros representan la diferencia energética en términos de contenido calórico entre el estado de transición y el complejo enzima-sustrato.
2. La energía libre de activación representa la variación de energía libre de Gibbs entre el estado de transición y el complejo enzima-sustrato.
3. La entropía de activación representa la diferencia en “términos de desorden” entre el estado de transición y el complejo enzima-sustrato.

Si se observan los datos expuestos en las tablas 3.9 a 3.13, se puede determinar que la reacción catalizada por la endoglucanasa Cel5A silvestre se encuentra caracterizada por altos valores de E_A y ΔH^\ddagger . Esto refleja que la constante catalítica de esta enzima presenta una gran dependencia con respecto a la temperatura (como se puede apreciar en la figura 3.12), lo cual impide que esta enzima sea muy activa a bajas temperaturas. Por otra parte, también se puede apreciar que la reacción catalizada por la enzima Cel5A silvestre se encuentra caracterizada por un alto valor de ΔS^\ddagger debido probablemente a la formación de un complejo enzima-sustrato muy ordenado, lo cual favorece la velocidad de catálisis enzimática al disminuir el valor de la energía libre de activación.

Al observar los valores de E_A y ΔH^\ddagger de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes (tablas 3.9 a 3.13), se puede apreciar que las reacciones catalizadas por todas las enzimas mutadas se encuentran caracterizadas por valores menores de E_A y ΔH^\ddagger en comparación a la reacción catalizada por Cel5A silvestre. Esto genera que todas las enzimas mutadas posean una menor variación de su constante catalítica en función de la temperatura respecto a la variación de la constante catalítica de la enzima nativa, lo cual se puede visualizar en la figura 3.12.

Lo expuesto en el párrafo anterior permite justificar la tendencia observada en la comparación de los valores de k_{cat} entre la endoglucanasa nativa y la mayor parte de las enzimas mutadas. Es de esperarse que si la reacción catalizada por la enzima Cel5A silvestre presenta altos valores de E_A y ΔH^\ddagger , la enzima nativa presente valores bajos de k_{cat} a bajas temperaturas y valores altos de este parámetro cinético a temperaturas superiores. Por el contrario, las enzimas mutadas (cuyas reacciones catalizadas presentan valores menores de E_A y ΔH^\ddagger en comparación a la reacción catalizada por Cel5A silvestre) debieran presentar una menor variación de k_{cat} en función de la temperatura, por lo cual es de esperarse que estas enzimas presenten por lo general una constante catalítica mayor a la de Cel5A silvestre a bajas temperaturas y una constante catalítica menor a la de la enzima nativa a altas temperaturas, que es justamente la tendencia que se observa en la figura 3.12 para el caso de las enzimas N138L, I99A y A134Y/I99A.

Ciertamente, la tendencia mencionada en el párrafo anterior se ve afectada tanto por la magnitud de la diferencia de energía de activación existente entre la reacción catalizada por la enzima nativa y las reacciones catalizadas por las enzimas mutadas como por la presencia de otros fenómenos enzimáticos (como por ejemplo la inactivación enzimática). Esto permite explicar que la enzima I99A presente en términos generales los valores de k_{cat} más cercanos a los de la enzima nativa en todo el rango de temperatura estudiado ya que la reacción catalizada por esta enzima mutada posee la segunda E_A más alta (luego de la reacción catalizada por Cel5A silvestre) y además esta enzima presenta un leve proceso de inactivación enzimática entre 30 °C y 50 °C (levemente superior al de la enzima nativa). Por otra parte, las reacciones catalizadas por las enzimas N138L y A134Y/I99A presentan energías de activación notoriamente más bajas que las reacciones catalizadas por la enzima nativa e I99A por lo cual es esperable que estas enzimas mutadas presenten una menor variación de la constante catalítica en función de la temperatura y además ambas enzimas mutadas presentan un mayor proceso de inactivación enzimática en comparación a Cel5A silvestre e I99A, lo cual explica el aumento en la diferencia de k_{cat} de las enzimas N138L y A134Y/I99A con respecto a Cel5A silvestre e I99A a medida que aumenta la temperatura desde 40 °C hasta 50 °C.

Por otra parte, al observar los valores de ΔS^\ddagger de la reacción catalizada por las endoglucanasas recombinantes (tablas 3.9 a 3.13), se puede determinar que las reacciones catalizadas por todas las enzimas mutadas se encuentran caracterizadas por un menor valor de ΔS^\ddagger en comparación a la reacción catalizada por Cel5A silvestre. Este es un aspecto probablemente asociado a un aumento en el grado de desorden del complejo enzima-sustrato de las enzimas mutadas, el cual contrarresta la disminución de ΔH^\ddagger ya que impide que las reacciones catalizadas por las enzimas mutadas alcancen valores más bajos de ΔG^\ddagger (lo cual permitiría aumentar la actividad catalítica enzimática).

Con respecto a la variación de energía libre de activación entre las reacciones catalizadas por las endoglucanasas recombinantes, ésta sólo refleja la comparación de actividad enzimática ya que a medida que la reacción posea menor energía libre de activación (menor variación de energía libre de Gibbs entre el estado de transición y el complejo enzima-sustrato) la enzima es más activa, ya que posee una mayor constante catalítica.

Los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por la enzima A134Y presentan valores marcadamente distintos a los observados en las demás reacciones enzimáticas estudiadas. En primer lugar, esta reacción posee claramente los menores valores de E_A y ΔH^\ddagger dentro de todas las reacciones enzimáticas estudiadas lo cual justifica la mínima variación general que presenta la constante catalítica de la enzima A134Y en todo el rango de temperatura estudiado (sin considerar el notorio proceso de inactivación enzimática que presenta esta enzima entre 40 °C y 50 °C). Por otra parte, la reacción catalizada por la enzima A134Y presenta una enorme disminución de ΔS^\ddagger en comparación a las reacciones catalizadas por las demás enzimas mutadas, lo cual hace que esta enzima sea en términos generales menos activa que el resto de las endoglucanasas utilizadas en este trabajo de tesis debido al incremento que este hecho genera en el valor de ΔG^\ddagger de la reacción catalizada.

3.4. Posibles efectos estructurales de las mutaciones sitio-dirigidas realizadas

Generalmente se expone que la principal adaptación de las enzimas psicrófilas corresponde a una disminución de ΔH^\ddagger en sus reacciones de catálisis, lo cual se logra estructuralmente a través del requerimiento de la disrupción de un menor número de interacciones impulsadas entálpicamente durante el proceso de catálisis enzimática^[1,21]. Debido a que estas interacciones también forman parte del sitio activo, se desprende que el sitio activo de las enzimas psicrófilas es más flexible (y menos estable) que el de las enzimas mesófilas, lo cual tiende a afectar negativamente la afinidad de las enzimas psicrófilas por el sustrato (a partir de esto generalmente se afirma que las enzimas psicrófilas aumentan k_{cat} a expensas de K_M)^[1].

Producto del aumento de la flexibilidad de las enzimas psicrófilas, el complejo enzima-sustrato de estas enzimas es capaz de abarcar una mayor distribución de estados conformacionales lo cual podría aumentar la entropía de este complejo en comparación a las enzimas mesófilas. Lo anterior probablemente justifica el hecho de que las reacciones catalizadas por enzimas psicrófilas generalmente se caractericen por un valor menor de ΔS^\ddagger en comparación a las reacciones catalizadas por enzimas mesófilas^[21].

En la figura 3.16 se puede observar la estructura de la endoglucanasa Cel5A en la vecindad del residuo catalítico ácido/base:

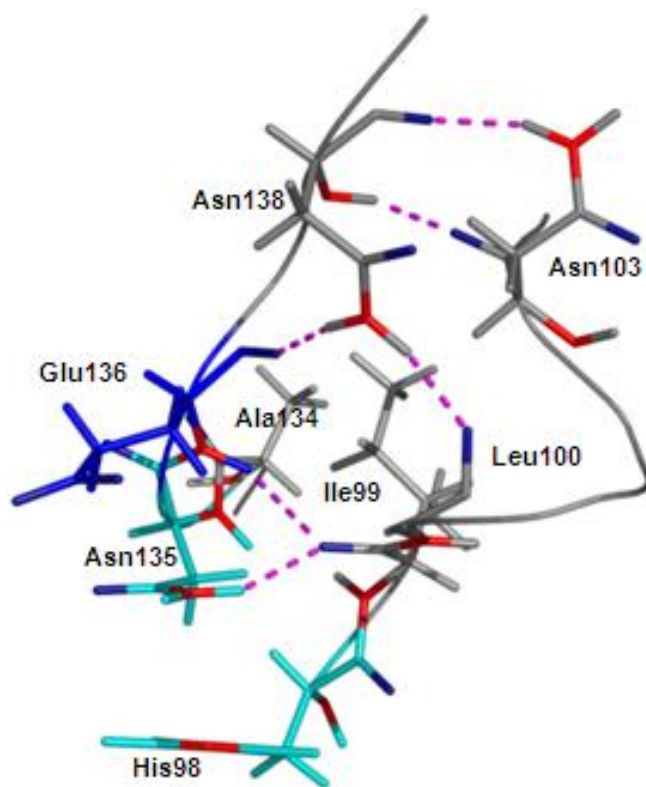


Figura 3.16: Estructura de la endoglucanasa Cel5A en la vecindad del residuo catalítico ácido/base^[59]. El residuo catalítico ácido/base se muestra en color azul, los residuos que interactúan con el sustrato se muestran en color celeste y los átomos de oxígeno y nitrógeno se exponen en color azul oscuro y rojo, respectivamente. Los puentes de hidrógeno existentes entre aminoácidos se representan mediante líneas punteadas.

Los altos valores de los parámetros termodinámicos de activación (ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) obtenidos en la reacción catalizada por la endoglucanasa Cel5A silvestre, permiten inferir que el sitio activo de esta enzima es bastante estable. Esto se justifica principalmente por dos aspectos:

1. Durante el proceso de activación enzimática se deben romper diversas interacciones impulsadas entálpicamente para poder alcanzar la conformación del estado de transición (alto valor de ΔH^\ddagger).
2. El complejo enzima-sustrato posee probablemente una conformación muy ordenada y estable, lo cual permite que éste posea una entropía muy baja en comparación a la entropía del estado de transición (alto valor de ΔS^\ddagger).

La mutación A134Y tuvo por objetivo estabilizar el sitio activo de la endoglucanasa Cel5A a través de la formación de un potencial puente de hidrógeno adicional entre la tirosina 134 y la asparragina 103. A partir de los valores de k_{cat} y K_M expuestos en la tabla 3.5, se puede corroborar la idea de un posible impedimento estérico entre los aminoácidos tirosina 134 e isoleucina 99 (planteado originalmente en ^[59]), ya que claramente la enzima A134Y presenta una constante catalítica sumamente baja en todo el rango de temperatura estudiado y además posee una afinidad por el sustrato mucho menor en comparación a las demás endoglucanasas utilizadas en este trabajo de tesis. El impedimento estérico mencionado anteriormente es probablemente generado a partir de un cambio conformacional local inducido para mantener el potencial puente de hidrógeno entre la tirosina 134 y la asparragina 103.

Por otra parte, si se observan los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por la enzima A134Y se puede apreciar una notoria disminución de E_A , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger en comparación a los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por la enzima nativa (mayor disminución dentro de todas las endoglucanasas mutadas utilizadas en este trabajo de tesis). Este hecho permite inferir que el impedimento estérico generado por esta mutación en la vecindad del residuo catalítico ácido/base probablemente genera la pérdida de diversas interacciones en esta zona debido un reacomodo aminoacídico local. La pérdida de diversas interacciones y el consecuente aumento de la flexibilidad local, también podrían justificar el marcado proceso de inactivación enzimática que sufre esta enzima, la cual disminuye su constante catalítica al aumentar la temperatura desde 40 °C hasta 50 °C.

La mutación N138L tuvo por objetivo aumentar la flexibilidad estructural de la vecindad del sitio activo de la endoglucanasa Cel5A mediante la pérdida de dos puentes de hidrógeno existentes entre la asparragina 138 y los residuos ácido glutámico 136 y leucina 100, respectivamente (figura 3.16). La pérdida de dos puentes de hidrógeno aparentemente permite aumentar la flexibilidad del sitio activo incrementando la constante catalítica de la enzima a bajas temperaturas (hasta 30 °C), disminuyendo la afinidad de la enzima por el sustrato en todo el rango de temperatura estudiado y aumentando notoriamente el proceso de inactivación enzimática en comparación a la enzima nativa a partir de temperaturas superiores a los 30 °C.

Al observar los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por la enzima N138L nuevamente se aprecia una disminución de E_A , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger en comparación a los parámetros termodinámicos de activación de la reacción catalizada por la enzima nativa, lo cual permite corroborar

la posible pérdida de interacciones aminoacídicas en la vecindad del residuo catalítico ácido/base y el consecuente aumento de la flexibilidad local de esta enzima.

La mutación I99A tuvo por objetivo determinar el efecto combinado de la disminución de la compactación estructural en la vecindad del sitio activo y de la posible pérdida de interacciones hidrofóbicas en esta misma zona sobre las propiedades catalíticas de la endoglucanasa Cel5A. En la figura 3.16 se puede observar que la isoleucina 99 posee una cadena lateral bastante voluminosa dirigida hacia el residuo catalítico ácido/base, la cual probablemente es capaz de establecer interacciones hidrofóbicas tanto con la cadena lateral de la alanina 134 como con el anillo pirrolidina de la prolina 105 ya que en ambos casos los átomos de carbono se encuentran a una distancia inferior a los 2,5 Angstrom. Al reemplazar la isoleucina por una alanina, no sólo se perderían las interacciones mencionadas anteriormente sino que también disminuiría notoriamente la compactación estructural en la vecindad del sitio activo debido a la menor voluminosidad de la cadena lateral de la alanina en comparación a la isoleucina.

Los parámetros cinéticos y termodinámicos de activación de la reacción catalizada por esta enzima mutada siguen la tendencia esperada ya que se corrobora el posible aumento de la flexibilidad estructural de esta enzima a través de un aumento de k_{cat} a bajas temperaturas, un pequeño incremento de K_M en todo el rango de temperatura estudiado y una leve disminución de los parámetros termodinámicos de activación en comparación a la enzima nativa. Sin embargo, la variación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de activación permite suponer que la mutación I99A no posee un efecto estructural tan significativo como las demás mutaciones en la vecindad del sitio activo ya que esta enzima es la que presenta las características cinéticas y termodinámicas de activación más parecidas a la enzima nativa en todo el rango de temperatura estudiado.

La mutación A134Y/I99A tuvo por objetivo solucionar el posible impedimento estérico generado por la mutación A134Y en la endoglucanasa Cel5A mediante el reemplazo de la isoleucina 99 por un aminoácido de cadena lateral más pequeña (alanina) ya que de esta manera la cadena lateral de la tirosina 134 probablemente podría establecer el puente de hidrógeno con la asparragina 103 sin generar un reacomodo aminoacídico tan significativo en la vecindad del sitio activo. Al observar las características cinéticas y termodinámicas de activación de la reacción catalizada por la enzima A134Y/I99A se puede apreciar que esta enzima presenta una k_{cat} similar o incluso superior a la de las enzimas Cel5A silvestre, N138L e I99A en todo el rango de temperatura estudiado por lo cual se infiere que el reemplazo de la isoleucina 99 por una alanina permite solucionar el posible impedimento estérico generado por la mutación A134Y. Por otra parte, esta enzima presenta una mayor afinidad por el sustrato en comparación a la mutante A134Y y la entalpía y entropía de activación de su reacción de catálisis son más elevadas en comparación a la reacción de catálisis de la enzima A134Y. Lo anterior permite suponer que el reemplazo de la isoleucina 99 por una alanina permite restablecer gran parte de las interacciones posiblemente perdidas en la enzima A134Y debido al impedimento estérico, pero no todas ya que si se comparan las propiedades catalíticas de las enzimas A134Y/I99A e I99A se observa que la primera presenta mayor actividad a bajas temperaturas y menor afinidad por el sustrato, lo cual apunta a una mayor flexibilidad estructural.

3.5. Discusión general

Los ensayos de actividad realizados en este trabajo de tesis presentaron 2 características muy importantes que permiten justificar la obtención de curvas de avance lineales para todas las endoglucanasas recombinantes a cualquier temperatura y concentración de sustrato. Estas características corresponden a la detención de los ensayos de actividad en tiempos relativamente pequeños y a la obtención de concentraciones pequeñas de producto al final de cada ensayo.

El efecto estructural de las mutaciones sitio-dirigidas realizadas en este trabajo de tesis fue determinado a partir del conocimiento de la estructura tridimensional de la enzima nativa y de las propiedades de los residuos aminoacídicos modificados. Es así como la variación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de activación de las reacciones catalizadas por las endoglucanasas recombinantes sólo puede ser atribuida de manera cualitativa a los cambios estructurales inferidos ya que se desconoce la nueva estructura tridimensional de las enzimas mutantes como para lograr identificar los factores estructurales específicos relacionados con su proceso de catálisis.

A pesar de que es imposible saber con certeza si la variación de los parámetros termodinámicos de activación de las reacciones catalizadas por las endoglucanasas recombinantes se debe a cambios referidos al complejo enzima-sustrato o al estado de transición, se ha expuesto que los parámetros termodinámicos del estado de transición tienden a mantenerse en un rango muy estable en cada reacción de catálisis enzimática ^[21]. Considerando esto, es más probable que las variaciones de la entalpía y entropía de activación de las reacciones catalizadas por las enzimas mutadas generadas en este trabajo de tesis se encuentren asociadas a cambios estructurales referidos al complejo enzima-sustrato.

Es importante señalar el hecho de que las mutaciones seleccionadas en este trabajo de tesis para adaptar psicófilicamente la endoglucanasa Cel5A no consideran residuos directamente relacionados con la reacción enzimática o la unión al sustrato. Las modificaciones estructurales de las enzimas adaptadas a distintas temperaturas generalmente se encuentran fuera del sitio activo, el cual permanece altamente conservado ^[40,66]. Es así como la presencia de cambios aminoacídicos en posiciones periféricas puede modular los parámetros de actividad, modificando las propiedades dinámicas y conformacionales del centro reactivo enzimático ^[40].

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permiten corroborar los resultados publicados en un estudio de mutagénesis de una lactato deshidrogenasa, en el cual se demostró que la constante de Michaelis-Menten siempre varía en forma inversa a la energía de activación cuando las mutaciones ocurren en la vecindad del sitio activo ^[67].

Por otra parte, los resultados obtenidos en este trabajo también permiten demostrar que una modificación aminoacídica puntual puede cambiar dramáticamente las propiedades catalíticas y termodinámicas enzimáticas. Este hecho ha sido diversamente documentado en numerosas publicaciones científicas, las cuales atribuyen importantes adaptaciones térmicas enzimáticas a modificaciones estructurales muy sutiles ^[31,67,68].

Finalmente, a partir de las propiedades cinéticas y termodinámicas de las endoglucanasas recombinantes se puede apreciar que la totalidad de las endoglucanasas psicrófilas generadas en este trabajo de tesis siguen el principio general de “trade-off” existente entre aumento de actividad catalítica a bajas temperaturas y disminución de estabilidad conformacional.

4. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo de tesis consistió en adaptar psicofílicamente la endoglucanasa mesofílica Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*, mejorando sus propiedades catalíticas a bajas temperaturas mediante la realización de mutaciones sitio dirigidas (I99A, A134Y/I99A y A134Y/I99A/N138L), las cuales estuvieron principalmente asociadas a un posible incremento de la flexibilidad estructural en la vecindad del sitio activo de esta enzima.

A partir de la caracterización de la enzima mutada I99A, se determinó que la disminución de la compactación estructural en la vecindad del sitio activo de la endoglucanasa Cel5A y la posible pérdida de interacciones hidrofóbicas en esta misma zona permiten mejorar en aproximadamente un 70 % promedio la constante catalítica de la enzima en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C, sin aumentar significativamente el proceso de inactivación enzimática en todo el rango de temperatura estudiado.

Se solucionó el posible impedimento estérico generado por la mutación A134Y en la endoglucanasa Cel5A a través de la incorporación de la mutación I99A. La enzima mutada A134Y/I99A presenta una constante catalítica superior en aproximadamente un 120 % promedio con respecto a la constante catalítica de la enzima nativa en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C y además se caracteriza por un notorio aumento del proceso de inactivación enzimática a partir de temperaturas superiores a los 40 °C.

A través de la comparación de los parámetros cinéticos de las enzimas mutadas I99A y A134Y/I99A, se determinó que la mutación A134Y aporta a la adaptación psicofílica de la endoglucanasa Cel5A ya que probablemente permite aumentar la flexibilidad estructural en la vecindad del sitio activo mediante la pérdida de interacciones, lo cual se ve reflejado en una mayor actividad a bajas temperaturas y menor afinidad por el sustrato de la enzima mutada A134Y/I99A en comparación a la enzima mutada I99A.

Se corroboraron las propiedades catalíticas de las enzimas mutadas A134Y y N138L establecidas en la tesis de doctorado de Matías Saavedra^[59]. La enzima A134Y presenta una constante catalítica muy baja y una constante de Michaelis-Menten extremadamente alta (aproximadamente 21 veces la de la enzima nativa) en todo el rango de temperatura estudiado (5 °C a 50 °C). Por otra parte, la enzima N138L presenta una constante catalítica superior en aproximadamente un 120 % promedio con respecto a la constante catalítica de la enzima nativa en el rango de temperatura comprendido entre 5 °C y 30 °C y además se caracteriza por un notorio aumento del proceso de inactivación enzimática a partir de temperaturas superiores a los 30 °C.

La variación de los parámetros cinéticos (k_{cat} y K_M) y termodinámicos de activación (E_A , ΔH^\ddagger y ΔS^\ddagger) de las reacciones catalizadas por las endoglucanasas recombinantes permite inferir un aumento de la flexibilidad estructural en la vecindad del residuo catalítico ácido/base de todas las enzimas mutadas generadas en este trabajo de tesis, lo cual probablemente justifica la superioridad de la constante catalítica de las enzimas N138L, A134Y/I99A e I99A a bajas temperaturas (entre 5 °C y 30 °C) en comparación a la constante catalítica de la endoglucanasa nativa.

En términos generales se logró adaptar psicofílicamente la endoglucanasa mesofílica Cel5A de *Bacillus agaradhaerens*, pues las dos enzimas mutadas generadas en este trabajo de tesis (I99A y A134Y/I99A) mejoran claramente las propiedades catalíticas de la enzima nativa a bajas temperaturas.

5. REFERENCIAS

- [1] Feller G. y Gerday C. 2003. Psychrophilic enzymes: hot topics in cold adaptation. *Microbiology Nature Reviews* 1: 200-208.
- [2] Hoyoux A., Blaise V., Collin T., D'Amico S., Gratia E., Huston A.L., Marx J.C., Sonan G., Zeng, Yinxin, Feller G. y Gerday C. 2004. Extreme catalysts from low-temperature environments. *J. Biosci. Bioeng.* 98: 317-330.
- [3] D'Amico S., Marx J.C., Gerday C. y Feller G. 2003. Activity-stability relationships in extremophilic enzymes. *J. Biol. Chem.* 278: 7891-7896.
- [4] Deming J.W. 2002. Psychrophiles and polar regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 301-309.
- [5] Michel V. 1997. The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid-binding proteins. *J. Bacteriol.* 179: 7331-7342.
- [6] Lim J., Thomas T. y Curmi P. 2000. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the antarctic archaeon, *Methanococoides burtonii*. *J. Mol. Biol.* 297: 553-567.
- [7] Hébraud M. y Potier P. 2000. Cold shock, response and adaptation. Horizon Scientific UK, 41-60.
- [8] Somero G.N. 1995. Proteins and temperature. *Annu. Rev. Physiol.* 57: 43-68.
- [9] Feller G., Narinx E., Arpigny J.L., Aittaleb M., Baise M., Ganicot S. y Gerday G. 1996. Enzymes from psychrophilic organisms. *FEMS Microbiol. Reviews* 18: 189-202.
- [10] Fields P. 2001. Protein function at thermal extremes: balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol.* 129: 417-431.
- [11] Wooll J.O., Wrabl J.O. y Hilser V.J. 2000. Ensemble modulation as an origin of denaturant-independent hydrogen exchange in proteins. *J. Mol. Biol.* 301: 247-256.
- [12] Kumar S., Ma B., Tsai C.J., Sinha N. y Nussinov R. 2000. Folding and binding cascades: Dynamic landscapes and population shifts. *Prot. Sci.* 9: 10-19.
- [13] Daniel R.M., Dunn R.V., Finney J.L. y Smith J.C. 2003. The role of dynamics in enzyme activity. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 32: 69-92.
- [14] Kumar S., Wolfson H. y Nussinov R. 2001. Protein flexibility and electrostatic interactions. *IBM J. Res & Dev.* 45: 499-512.
- [15] Zaccai G. 2000. How soft is a protein? A protein dynamics force constant measured by neutron scattering. *Science* 288: 1604-1607.

- [16] Marx J.C., Collins S., D'Amico S., Feller C. y Gerday C. 2007. Cold-adapted enzymes from marine antarctic microorganisms. *Mar. Biotech.* 9: 293-304.
- [17] Bryngelson J.D., Onuchic J.N., Socci N.D. y Wolynes, P.G. 1995. Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis. *Proteins* 21: 167-195.
- [18] Rose G., Fleming P., Banavar, Jayanth y Maritan A. 2006. A backbone-based theory of protein folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 16623-16633.
- [19] Siddiqui K.S. y Cavicchioli R. 2006. Cold-adapted enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 403-433.
- [20] Collins T., Meuwis M.A., Gerday C. y Feller, G. 2003. Activity, stability and flexibility in glycosidases adapted to extreme thermal environments. *J. Mol. Biol.* 328: 419-428.
- [21] Lonhienne T., Gerday C. y Feller G. 2000. Psychrophilic enzymes: revisiting the thermodynamic parameters of activation may explain local flexibility. *Biochim. Biophys. Acta* 1543: 1-10.
- [22] Jaenicke R. 2000. Stability and stabilization of globular proteins in solution. *J. Biotechnol.* 79: 193-203.
- [23] Zavodszky P., Kardos J., Svingor A. y Petsko G. 1998. Adjustment of conformational flexibility is a key event in the thermal adaptation of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7406-7411.
- [24] Henzler-Wildman K., Lei M., Thai V., Kerns S.J., Karplus M. y Kern D. 2007. A hierarchy of timescales in protein dynamics is linked to enzyme catalysis. *Nature* 450: 913-918.
- [25] Kumar S., Tsai C.J. y Nussinov R. 2002. Maximal stabilities of reversible two-state proteins. *Biochemistry* 41: 5359-5374.
- [26] Zecchinon L., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Delille D., Feller G., Georlette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuwis M.A., Sonan G. y Gerday C. 2001. Did psychrophilic enzymes really win the challenge? *Extremophiles* 5: 313-321.
- [27] Wintrode P.L. y Arnold F.H. 2000. Temperature adaptation of enzymes: lessons from laboratory evolution. *Adv. Protein Chem.* 55: 161-225.
- [28] Arrhenius S. 1889. On the reaction velocity of the inversion of cane sugar by acids. *J. Phys. Chem.* 4: 226-248.
- [29] Eyring H. 1935. The activated complex in chemical reactions. *J. Chem. Phys.* 3: 107-115.
- [30] Laidler K.J. y King M.C. 1983. The development of Transition-State-Theory. *J. Phys. Chem.* 87: 2657-2664.
- [31] D'Amico S., Gerday C. y Feller G. 2002. Structural determinants of cold adaptation and stability in a psychrophilic α -amylase. *Biologia, Bratislava* 57: 213-219.

- [32] Xu Y., Feller G., Gerday C. y Glansdorff N. 2003. Metabolic enzymes from psychrophilic bacteria: challenge of adaptation to low temperatures in ornithine carbamoyltransferase from *Moritella abyssi*. *J. Bacteriol.* 185: 2161-2168.
- [33] Low P.S., Bada J.L. y Somero G.N. 1973. Temperature adaptation of enzymes: roles of the free energy, the enthalpy and the entropy of activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 430-432.
- [34] Smalas A.O., Leiros H.K., Os V. y Willassen N.P. 2000. Cold-adapted enzymes. *Biotechnol. Annu. Rev.* 6: 1-57.
- [35] Garsoux G., Lamotte J., Gerday C. y Feller, G. 2004. Kinetic and structural optimization to catalysis at low temperatures in a psychrophilic cellulase from the antarctic bacterium *Pseudomonas haloplanktis*. *Biochem. J.* 384: 247-253.
- [36] Smalas A.O., Heimstad E.S., Hordvik A., Willassen N.P. y Male R. 1994. Cold adaptation of enzymes: structural comparison between salmon and bovine trypsins. *Proteins* 20: 149-166.
- [37] Bae E. y Phillips G.N. 2004. Structures and analysis of highly homologous psychrophilic, mesophilic and thermophilic adenylate kinases. *J. Biol. Chem.* 279: 28202-28208.
- [38] Leiros H.K., Willassen N.P. y Smalas A.O. 2000. Structural comparison of psychrophilic and mesophilic trypsins. Elucidating the molecular basis of cold-adaptation. *Eur. J. Biochem.* 267: 1039-1049.
- [39] Russell R.J., Gerike U., Danson M.J., Hough D.W. y Taylor G.L. 1998. Structural adaptations of the cold-active citrate synthase from an antarctic bacterium. *Structure* 6: 351-361.
- [40] Feller G. 2003. Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 648-662.
- [41] Gounot A.M. 1991. Bacterial life at low temperature: physiological aspects and biotechnological implications. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 386-397.
- [42] Cavicchioli R., Siddiqui K.S., Andrews D. y Sowers K.R. 2002. Low-temperature extremophiles and their applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 253-261.
- [43] Margesin R., Feller G., Gerday C. y Russell, N. 2002. Cold-adapted microorganisms: adaptation strategies and biotechnological potential. In Bitton G. (ed.), *The encyclopedia of environmental microbiology*, New York, John Wiley & Sons, 871-885.
- [44] Gerday C., Aittaleb M., Bentahir M., Chessa J.P., Claverie P., Collins T., D'Amico S., Dumont J., Garsoux G., Georgette D., Hoyoux A., Lonhienne T., Meuwis M.A. y Feller G. 2000. Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends Biotechnol.* 18: 103-107.
- [45] Lonhienne T., Zoidakis J., Vorgias C.E., Feller G., Gerday C. y Bouriotis V. 2001. Modular structure, local flexibility and cold-activity of a novel chitobiase from a psychrophilic antarctic bacterium. *J. Mol. Biol.* 310: 291-297.

- [46] Georlette D., Blaise V., Dohmen C., Bouillenne F., Damien B., Depiereux E., Gerday C., Uversky V.N. y Feller G. 2003. Cofactor binding modulates the conformational stabilities and unfolding patterns of NAD(+)-dependent DNA ligases from *Escherichia coli* and *Thermus scotoductus*. *J. Biol. Chem.* 278: 49945-49953.
- [47] Duilio A., Tutino M.L. y Marino G. 2004. Recombinant protein production in Antarctic Gram-negative bacteria. *Meth. Mol. Biol.* 267: 225-237.
- [48] Hildebrandt P., Wanarska M. y Kur J. 2009. A new cold-adapted β -D-galactosidase from the antarctic *Arthrobacter sp.* 32c – gene cloning, overexpression, purification and properties. *BMC Microbiol.* 9: 151-161.
- [49] Fukuda H., Kondo A. y Noda H. 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 405-416.
- [50] Luo Y., Zheng Y., Jiang Z., Ma Y. y Wei D. 2006. A novel psychrophilic lipase from *Pseudomonas fluorescens* with unique property in chiral resolution and biodiesel production via transesterification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73: 349-355.
- [51] Collins T.H., Dutron A., Georis J., Genot B., Dauvrin T., Arnaut P., Gerday C. y Feller G. 2006. Use of glycoside hydrolase family 8 xylanases in baking. *J. Cereal Sci.* 43: 79-84.
- [52] Varrot A., Schulein M. y Davies G.J. 2000. Insights into ligand-induced conformational change in Cel5A from *Bacillus agaradhaerens* revealed by a catalytically active crystal form. *J. Mol. Biol.* 297: 819-828.
- [53] Bortoli-German I., Haiech J., Chippaux M. y Barras F. 1995. Informational suppression to investigate structural, functional and evolutionary aspects of the *Erwinia chrysanthemi* cellulase EGZ. *J. Mol. Biol.* 246: 82-94.
- [54] Henrissat B., Coutinho P.M., Rancurel C. y Lombard V. 2010. Carbohydrate-active enzymes database [en línea] <<http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>> [Consulta: 27 de Septiembre de 2010]
- [55] Davies G.J., Dauter M., Marek Brzozowski A., Eskelund M., Andersen K. y Schulein M. 1998. Structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 5 endoglucanase at 1,6 Å and its cellobiose complex at 2,0 Å resolution. *Biochemistry* 37: 1926-1932.
- [56] Varrot A. y Gideon G.J. 2003. Direct experimental observation of the hydrogen-bonding network of a glycosidase along its reaction coordinate revealed by atomic resolution analyses of endoglucanase Cel5A. *Biol. Cryst.* 59: 447-452.
- [57] Henn-Sax M., Hocker B., Wilmanns M. y Sterner R. 2001. Divergent evolution of $(\beta\alpha)_8$ -barrel enzymes. *Biol. Chem.* 382: 1315-1320.
- [58] Davies G.J., Mackenzie L., Varrot A., Dauter M., Marek Brzozowski A., Schulein M. y Withers S. 1998. Snapshots along an enzymatic reaction coordinate: analysis of a retaining β -glycoside hydrolase. *Biochemistry* 37: 11707-11713.

- [59] Saavedra J.M. 2010. Bases Estructurales de la Psicofilicidad: Predicción e Ingeniería de una Endoglucanasa. Tesis del Programa de Doctorado en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química. Santiago, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 146p.
- [60] Birnboim H.C. y Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7: 1513-1523.
- [61] Agilent Technologies. 2009. Quikchange site-directed mutagenesis kit manual [en línea] <<http://www.westlab.org/protocols/protocols/quikchange.pdf>> [Consulta: 20 de Octubre de 2010]
- [62] Bollag D.M., Rozycki M.D. y Edelman S.J. 1996. *Protein methods*. 2ª edición, New York, Wiley-Liss, Inc. 415p.
- [63] Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- [64] Dra. Oriana Salazar. 2010. Comunicación personal.
- [65] Dr. Álvaro Olivera. 2010. Comunicación personal.
- [66] Zeng R., Xiong P. y Wen J. 2006. Characterization and gene cloning of a cold-active cellulase from a deep-sea psychrotrophic bacterium *Pseudoalteromonas sp.* DY3. *Extremophiles* 10: 79-82.
- [67] Fields P.A. y Houseman D.E. 2004. Decreases in activation energy and substrate affinity in cold-adapted A₄-lactate dehydrogenase: Evidence from the antarctic notothenioid fish *Chaenocephalus aceratus*. *Mol. Biol. Evol.* 21: 2246-2255.
- [68] Taguchi S., Komada S. y Momose H. 2000. The complete amino acid substitutions at position 131 that are positively involved in cold adaptation of subtilisin BPN. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1410-1415.
- [69] Dill K. y Bromberg S. 2002. *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in chemistry and biology*. New York, Garland Science. 686p.

6. ANEXOS

6.1. Anexo A: Ecuación de Arrhenius

La velocidad de las reacciones químicas presenta una fuerte dependencia con respecto a la variación de la temperatura, la cual puede ser explicada a partir de la ecuación de Arrhenius.

La tasa de generación de producto de una reacción química binaria puede expresarse a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{d[P]}{dt} = k_R \cdot [A] \cdot [B] \quad (10)$$

En la ecuación anterior [P] corresponde a la concentración del producto de la reacción química, [A] y [B] corresponden a las concentraciones de los reactantes de la reacción química, t representa el tiempo y k_R representa la constante cinética de la reacción. Por definición, k_R es independiente de las concentraciones de los reactantes, sin embargo, es altamente dependiente de la temperatura.

Se ha observado que la dependencia de la constante cinética de una reacción química con respecto a la temperatura es mucho mayor de lo esperable al suponer un incremento normal de los movimientos térmicos de las moléculas ^[69]. En 1889, el físico y químico sueco Svante Arrhenius propuso una explicación para este fenómeno basándose en la ecuación de van't Hoff, la cual describe la dependencia entre el equilibrio químico y la temperatura. Arrhenius propuso que las constantes cinéticas de las reacciones químicas también poseen la forma de la ecuación de van't Hoff ^[28]:

$$\frac{\partial(\ln(k_R))}{\partial T} = \frac{E_A}{RT^2} \quad (11)$$

En la ecuación anterior E_A corresponde a la energía de activación de la reacción química, T representa la temperatura, R representa la constante de los gases ideales y k_R representa la constante cinética de la reacción química.

De acuerdo a la teoría de Arrhenius, la cinética de las reacciones químicas no depende de la energía promedio de los reactantes, sino que de las altas energías de las moléculas activas.

En la figura 6.1 se puede apreciar un diagrama energético de una reacción química generalizada en el cual se pueden observar dos plataformas energéticas correspondientes a los reactantes y productos, respectivamente. Además se puede observar un máximo de energía, llamado "estado de transición", el cual representa la barrera energética que deben alcanzar las moléculas activadas para transformarse de reactantes a productos.

De acuerdo a la ley de distribución de Boltzmann, un pequeño aumento de la temperatura es capaz de producir un gran aumento en la proporción de moléculas pertenecientes a un estado energético alto, lo cual concuerda completamente con la teoría expuesta por Arrhenius.

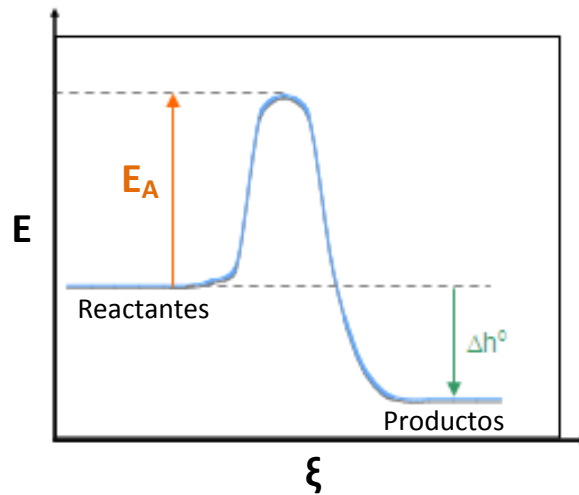


Figura 6.1: Diagrama energético de una reacción química generalizada. ξ representa la coordenada de progreso de la reacción, E representa la energía total, E_A representa la energía de activación de la reacción química y Δh° representa la entalpía molar parcial estándar.

A través de la integración de la ecuación (11) se puede obtener la ecuación de Arrhenius, la cual permite apreciar la relación exponencial existente entre la constante cinética de una reacción química y la temperatura:

$$k_R = Ae^{-E_A/RT} \quad (12)$$

En la ecuación anterior A corresponde a un factor pre-exponencial.

6.2. Anexo B: Teoría del estado de transición

La teoría del estado de transición supone la existencia de un intermediario de alta energía a lo largo de las coordenadas de reacción. Este intermediario es muy inestable por lo cual puede desplazarse hacia los reactantes o hacia los productos con igual facilidad y como consecuencia de su alta energía, existe en una proporción sumamente baja.

La constante cinética de una reacción química derivada de la ecuación de Arrhenius también puede ser calculada a partir de la teoría del estado de transición. Suponiendo nuevamente una reacción química binaria, ésta puede ser representada a través de la siguiente ecuación:



La primera etapa de la reacción química corresponde a un equilibrio entre los reactantes y el estado de transición $(AB)^\#$, la cual posee una constante de equilibrio $K^\#$. Por otra parte, la segunda etapa de la reacción consiste en un paso directo desde el estado de transición hasta el producto, la cual posee una constante cinética $k^\#$.

Un aspecto crítico dentro de la teoría del estado de transición es la presunción de un estado de equilibrio entre los reactantes y las especies activadas, lo cual se puede apreciar en la constante $K^\#$. Es importante señalar que este equilibrio químico en la realidad no existe ya que la estabilidad de las especies activadas es extremadamente baja a lo largo de las coordenadas de reacción.

$$K^\# = \frac{[(AB)^\#]}{[A][B]} \quad (14)$$

La tasa de generación de producto de la reacción química binaria expuesta anteriormente puede ser expresada a través de la siguiente ecuación:

$$\frac{d[P]}{dt} = k^\# [(AB)^\#] = k^\# K^\# \cdot [A] \cdot [B] \quad (15)$$

Combinando las ecuaciones (10) y (15) se obtiene que:

$$k_R = k^\# K^\# \quad (16)$$

Por otra parte, al ser $K^\#$ una constante de equilibrio, ésta puede ser expresada en función de la energía libre de Gibbs de acuerdo a la siguiente expresión:

$$K^\# = e^{-\Delta G^\# / RT} \quad (17)$$

En la ecuación anterior, $\Delta G^\#$ corresponde al cambio de energía libre de Gibbs estándar molar que describe el equilibrio entre los reactantes y el estado activado, R corresponde a la constante de los gases ideales y T representa la temperatura.

La tasa a la cual el estado activado se descompone en el producto de la reacción química (medida a través de la constante cinética k^\ddagger), corresponde a la frecuencia de vibración del enlace que se está rompiendo (ν):

$$k^\ddagger = \nu \quad (18)$$

Otra suposición fundamental de la teoría del estado de transición, corresponde a que la frecuencia de vibración (ν) del enlace del estado de transición puede ser obtenida a partir de la equivalencia entre las energías de un oscilador, calculadas mediante la teoría cuántica (ecuación (19)) y la física clásica (ecuación (20)).

$$E = h\nu \quad (19)$$

$$E = k_B T \quad (20)$$

$$\nu = \frac{k_B T}{h} \quad (21)$$

En las ecuaciones anteriores k_B es la constante de Boltzmann, h es la constante de Planck y E corresponde a la energía total de un oscilador.

Combinando las ecuaciones (16), (17), (18) y (21) se obtiene una expresión detallada para la constante cinética homóloga a la ecuación de Arrhenius:

$$k_R = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^\ddagger / RT} \quad (22)$$

Producto de que el estado de transición en una reacción química no puede ser detectado debido a su extrema inestabilidad, el equilibrio químico entre éste y los reactantes sólo debe ser considerado en forma cualitativa.

6.3. Anexo C: Ecuaciones para el cálculo de los parámetros termodinámicos de activación

La influencia de la temperatura sobre la constante catalítica de las reacciones químicas puede ser descrita mediante la ecuación de Arrhenius (ecuación (12)) o la teoría del estado de transición (ecuación (22)).

El valor de la energía libre de activación de una reacción química (ΔG^\ddagger) se puede obtener directamente a partir del reordenamiento de los términos de la ecuación (22):

$$\Delta G^\ddagger = RT[\ln(k_B T/h) - \ln k_R] \quad (23)$$

Por otra parte, considerando las ecuaciones (24) y (25) se puede obtener el valor de la entalpía de activación de una reacción química (ΔH^\ddagger):

$$\ln(k_R) = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) - \frac{\Delta G^\ddagger}{RT} = \ln\left(\frac{k_B T}{h}\right) - \frac{\Delta H^\ddagger}{RT} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} \quad (24)$$

$$\frac{\partial(\ln(k_R))}{\partial T} = \frac{E_A}{RT^2} = \frac{\Delta H^\ddagger}{RT^2} + \frac{1}{T} = \frac{\Delta H^\ddagger + RT}{RT^2} \quad (25)$$

$$\Delta H^\ddagger = E_A - RT \quad (26)$$

Finalmente, la entropía de activación de una reacción química (ΔS^\ddagger) se puede obtener a partir de la expresión de la energía libre de Gibbs (ecuación (27)):

$$\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T\Delta S^\ddagger \quad (27)$$

$$\Delta S^\ddagger = (\Delta H^\ddagger - \Delta G^\ddagger)/T \quad (28)$$

6.4. Anexo D: Secuencia nucleotídica y aminoacídica de la endoglucanasa Cel5A

A continuación se presenta la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la endoglucanasa Cel5A. En celeste se destaca la secuencia aminoacídica del péptido señal original, en amarillo se destaca la secuencia aminoacídica del linker entre el dominio catalítico y un dominio de unión a celulosa, en verde se destaca la secuencia aminoacídica de uno de los módulos de unión a celulosa y en rojo se destacan los residuos asociados a las mutaciones realizadas en este trabajo de tesis.

AUGAAAAAGAUAAACUACUAUUUUUGUCGUAUUGCUUAUGACAGUGGCGUUGUUCAGUAUA 60

M K K I T T I F V V L L M T V A L F S I

GGAAACACGACUGCUGCUGAUAAUGAUUCAGUUGUAGAAGAACAUGGGCAAUUAAGUAUU 120

G N T T A A D N D S V V E E H G Q L S I

AGUAACGGUGAAUUAGUCAAAUGAACGAGGCGAACAAGUUCAGUUAAAAGGGAUGAGUUCC 180

S N G E L V N E R G E Q V Q L K G M S S

CAUGGUUUGCAAUGGUACGGUCAUUUGUAAACUAUGAAAGUAUGAAAUGGCUAAGAGAU 240

H G L Q W Y G Q F V N Y E S M K W L R D

GAUUGGGGAAUAAAUGUAUUCGAGCAGCAAUGUAUACCUCUUCAGGAGGAUAUAUUGAU 300

D W G I N V F R A A M Y T S S G G Y I D

GAUCCAUCAGUAAAGGAAAAAGUAAAAGAGGCUGUUGAAGCUGCGAUAGACCUUGAUUA 360

D P S V K E K V K E A V E A A I D L D I

UAUGUGAUCAUUGAUUGGCAUAUCCUUUCAGACAAUGACCCAAAUAUAUAAAAGAAGAA 420

Y V I I D W H I L S D N D P N I Y K E E

GCGAAGGAUUUCUUUGAUGAAAUGUCAGAGUUGUAUGGAGACUAUCCGAAUGUGAUUAC 480

A K D F F D E M S E L Y G D Y P N V I Y

GAAAUUGCAAUGAACCGAAUGGUAGUGAUUUACGUGGGCAAUCAAAUAAAACCGUAU 540

E I A N E P N G S D V T W G N Q I K P Y

GCAGAGGAAGUCAUUCGAAUUAUCGUAACAAUGACCCUAAUAACAUAUUAUUGUAGGU 600

A E E V I P I I R N N D P N N I I I V G

ACAGGUACAUGGAGUCAGGAUGUCCAUAUGCAGCUGAUAAUCAGCUUGCAGAUCCUAAC 660

T G T W S Q D V H H A A D N Q L A D P N

GUCAUGUAUGCAUUUCAUUUUUAUGCAGGGACACAUGGUCAAAAUUUACGAGACCAAGUA 720

V M Y A F H F Y A G T H G Q N L R D Q V

GAUUAUGCAUUAGAUAAGGAGCAGCGAUUUUUAGUGAAUGGGGAACAAGUGCAGCU 780
D Y A L D Q G A A I F V S E W G T S A A
ACAGGUGAUGGUGGCGUGUUUUAGAUGAAGCACAAGUGUGGAUUGACUUUAUGGAUGAA 840
T G D G G V F L D E A Q V W I D F M D E
AGAAAUUUAAGCUGGGCCAACUGGUCUCUAACGCAUAAAGAUGAGUCAUCUGCAGCGUUA 900
R N L S W A N W S L T H K D E S S A A L
AUGCCAGGUGCAAAUCCAACUGGUGGUUGGACAGAGGCUGAACUAUCUCCAUCUGGUACA 960
M P G A N P T G G W T E A E L S P S G T
UUUGUGAGGGAAAAAUAAGAGAAUCAGCAUCUAUUCGCCAAGCGAUCCAACACCGCCA 1020
F V R E K I R E S A S I P P S D P T P P
UCUGAUCCAGGAGAACCGGAUCCAACGCCCCCAAGUGAUCCAGGAGAGUAUCCAGCAUGG 1080
S D P G E P D P T P P S D P G E Y P A W
GAUCCAAAUCAAAUUUACACAAAUGAAAUUGUGUACCAUAACGGCCAGCUAUGGCAAGCA 1140
D P N Q I Y T N E I V Y H N G Q L W Q A
AAAUGGUGGACACAAAUCAAGAGCCAGGUGACCCGUACGGUCCGUGGGAACCACUCAAU 1200
K W W T Q N Q E P G D P Y G P W E P L N

6.5. Anexo E: Datos experimentales

6.5.1. Curvas de calibración

A continuación se presentan las curvas de calibración utilizadas para la determinación de la concentración de proteínas en el ensayo de Bradford (figura 6.2) y para la determinación de la concentración de p-nitrofenol generado en los ensayos de actividad enzimática (figura 6.3).

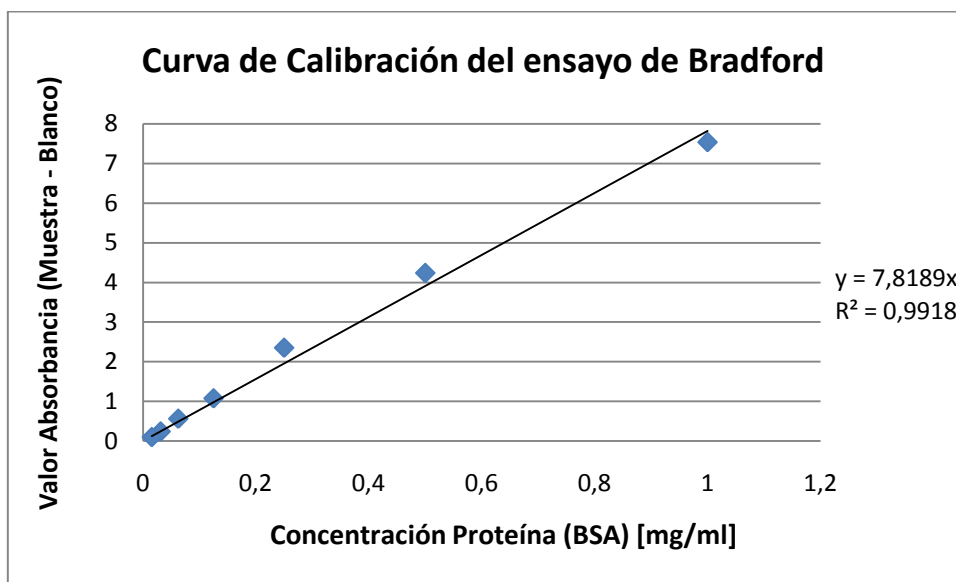


Figura 6.2: Curva de calibración del ensayo de Bradford.

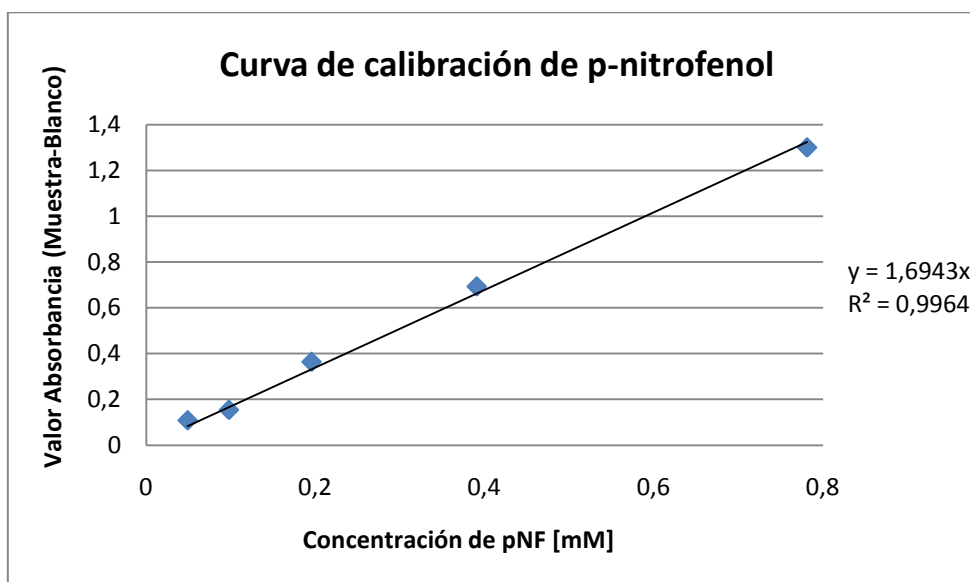


Figura 6.3: Curva de calibración de la concentración de p-nitrofenol (pNF).

6.5.2. Velocidades de reacción enzimática

A continuación se presentan los resultados obtenidos de la velocidad de reacción enzimática de todas las enzimas utilizadas en este trabajo de tesis a distintas temperaturas y distintas concentraciones de sustrato:

Tabla 6.1: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,335	0,464	0,839	0,792	0,952
pNF Producido [mM]	0,1977	0,2739	0,4952	0,4674	0,5619
Cantidad pNF producido [nmol]	9,8861	13,6930	24,7595	23,3725	28,0942
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0092	0,0076	0,0229	0,0177	0,0213

Tabla 6.2: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,317	0,424	0,835	0,805	0,904
pNF Producido [mM]	0,1871	0,2503	0,4928	0,4751	0,5336
Cantidad pNF producido [nmol]	9,3549	12,5125	24,6414	23,7561	26,6777
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0087	0,0070	0,0228	0,0180	0,0202

Tabla 6.3: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,317	0,333	0,741	0,823	0,785
pNF Producido [mM]	0,1871	0,1965	0,4373	0,4857	0,4633
Cantidad pNF producido [nmol]	9,3549	9,8271	21,8674	24,2873	23,1659
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0087	0,0055	0,0202	0,0184	0,0175

Tabla 6.4: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,307	0,271	0,713	0,748	0,722
pNF Producido [mM]	0,1812	0,1599	0,4208	0,4415	0,4261
Cantidad pNF producido [nmol]	9,0598	7,9974	21,0411	22,0740	21,3067
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0084	0,0044	0,0195	0,0167	0,0161

Tabla 6.5: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,322	0,208	0,65	0,676	0,572
pNF Producido [mM]	0,1900	0,1228	0,3836	0,3990	0,3376
Cantidad pNF producido [nmol]	9,5024	6,1382	19,1820	19,9492	16,8801
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0088	0,0034	0,0178	0,0151	0,0128

Tabla 6.6: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,278	0,094	0,422	0,591	0,369
pNF Producido [mM]	0,1641	0,0555	0,2491	0,3488	0,2178
Cantidad pNF producido [nmol]	8,2040	2,7740	12,4535	17,4408	10,8895
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0076	0,0015	0,0115	0,0132	0,0082

Tabla 6.7: Velocidades de reacción enzimática a 5 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	18	30	18	22	22
Tiempo ensayo [seg]	1080	1800	1080	1320	1320
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,261	0,057	0,424	0,441	0,21
pNF Producido [mM]	0,1540	0,0336	0,2503	0,2603	0,1239
Cantidad pNF producido [nmol]	7,7023	1,6821	12,5125	13,0142	6,1972
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0071	0,0009	0,0116	0,0099	0,0047

Tabla 6.8: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,372	0,511	0,63	0,715	0,746
pNF Producido [mM]	0,2196	0,3016	0,3718	0,4220	0,4403
Cantidad pNF producido [nmol]	10,9780	15,0800	18,5917	21,1002	22,0150
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0229	0,0140	0,0516	0,0391	0,0408

Tabla 6.9: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,367	0,482	0,624	0,668	0,665
pNF Producido [mM]	0,2166	0,2845	0,3683	0,3943	0,3925
Cantidad pNF producido [nmol]	10,8304	14,2242	18,4147	19,7132	19,6246
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0226	0,0132	0,0512	0,0365	0,0363

Tabla 6.10: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,415	0,418	0,643	0,681	0,654
pNF Producido [mM]	0,2449	0,2467	0,3795	0,4019	0,3860
Cantidad pNF producido [nmol]	12,2469	12,3355	18,9754	20,0968	19,3000
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0255	0,0114	0,0527	0,0372	0,0357

Tabla 6.11: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,35	0,291	0,529	0,646	0,5
pNF Producido [mM]	0,2066	0,1718	0,3122	0,3813	0,2951
Cantidad pNF producido [nmol]	10,3287	8,5876	15,6112	19,0639	14,7554
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0215	0,0080	0,0434	0,0353	0,0273

Tabla 6.12: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,379	0,244	0,539	0,621	0,514
pNF Producido [mM]	0,2237	0,1440	0,3181	0,3665	0,3034
Cantidad pNF producido [nmol]	11,1846	7,2006	15,9063	18,3262	15,1685
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0233	0,0067	0,0442	0,0339	0,0281

Tabla 6.13: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,29	0,11	0,388	0,48	0,255
pNF Producido [mM]	0,1712	0,0649	0,2290	0,2833	0,1505
Cantidad pNF producido [nmol]	8,5581	3,2462	11,4502	14,1651	7,5252
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0178	0,0030	0,0318	0,0262	0,0139

Tabla 6.14: Velocidades de reacción enzimática a 10 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	8	18	6	9	9
Tiempo ensayo [seg]	480	1080	360	540	540
Dilución enzima [-]	1	1	1	1	1
Cantidad enzima [nmol]	0,0827	0,0844	0,0793	0,0828	0,0748
Absorbancia medida [-]	0,274	0,1	0,337	0,309	0,272
pNF Producido [mM]	0,1617	0,0590	0,1989	0,1824	0,1605
Cantidad pNF producido [nmol]	8,0859	2,9511	9,9451	9,1188	8,0269
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0168	0,0027	0,0276	0,0169	0,0149

Tabla 6.15: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,741	0,719	0,912	0,993	0,788
pNF Producido [mM]	0,4373	0,4244	0,5383	0,5861	0,4651
Cantidad pNF producido [nmol]	21,8674	21,2182	26,9138	29,3041	23,2544
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0521	0,0354	0,0897	0,0698	0,0646

Tabla 6.16: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,701	0,649	0,801	0,997	0,756
pNF Producido [mM]	0,4137	0,3830	0,4728	0,5884	0,4462
Cantidad pNF producido [nmol]	20,6870	19,1525	23,6381	29,4222	22,3101
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0493	0,0319	0,0788	0,0701	0,0620

Tabla 6.17: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,763	0,538	0,831	0,964	0,722
pNF Producido [mM]	0,4503	0,3175	0,4905	0,5690	0,4261
Cantidad pNF producido [nmol]	22,5167	15,8768	24,5234	28,4483	21,3067
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0536	0,0265	0,0817	0,0677	0,0592

Tabla 6.18: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,681	0,395	0,736	0,947	0,621
pNF Producido [mM]	0,4019	0,2331	0,4344	0,5589	0,3665
Cantidad pNF producido [nmol]	20,0968	11,6567	21,7199	27,9466	18,3262
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0478	0,0194	0,0724	0,0665	0,0509

Tabla 6.19: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,707	0,301	0,632	0,876	0,552
pNF Producido [mM]	0,4173	0,1777	0,3730	0,5170	0,3258
Cantidad pNF producido [nmol]	20,8641	8,8827	18,6508	25,8514	16,2899
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0497	0,0148	0,0622	0,0616	0,0452

Tabla 6.20: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,6	0,139	0,461	0,684	0,332
pNF Producido [mM]	0,3541	0,0820	0,2721	0,4037	0,1960
Cantidad pNF producido [nmol]	17,7064	4,1020	13,6044	20,1853	9,7976
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0422	0,0068	0,0453	0,0481	0,0272

Tabla 6.21: Velocidades de reacción enzimática a 20 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	7	10	5	7	6
Tiempo ensayo [seg]	420	600	300	420	360
Dilución enzima [-]	2	1	2	2	2
Cantidad enzima [nmol]	0,0413	0,0844	0,0396	0,0414	0,0374
Absorbancia medida [-]	0,524	0,123	0,301	0,449	0,212
pNF Producido [mM]	0,3093	0,0726	0,1777	0,2650	0,1251
Cantidad pNF producido [nmol]	15,4636	3,6298	8,8827	13,2503	6,2563
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0368	0,0060	0,0296	0,0315	0,0174

Tabla 6.22: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,721	1,07	0,52	0,808	0,639
pNF Producido [mM]	0,4255	0,6315	0,3069	0,4769	0,3771
Cantidad pNF producido [nmol]	21,2772	31,5765	15,3456	23,8447	18,8573
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0887	0,0877	0,1096	0,1135	0,0898

Tabla 6.23: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,699	0,893	0,487	0,824	0,623
pNF Producido [mM]	0,4126	0,5271	0,2874	0,4863	0,3677
Cantidad pNF producido [nmol]	20,6280	26,3531	14,3717	24,3168	18,3852
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0859	0,0732	0,1027	0,1158	0,0875

Tabla 6.24: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,737	0,759	0,443	0,767	0,58
pNF Producido [mM]	0,4350	0,4480	0,2615	0,4527	0,3423
Cantidad pNF producido [nmol]	21,7494	22,3986	13,0732	22,6347	17,1162
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0906	0,0622	0,0934	0,1078	0,0815

Tabla 6.25: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,694	0,54	0,42	0,728	0,502
pNF Producido [mM]	0,4096	0,3187	0,2479	0,4297	0,2963
Cantidad pNF producido [nmol]	20,4804	15,9358	12,3945	21,4838	14,8144
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0853	0,0443	0,0885	0,1023	0,0705

Tabla 6.26: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,742	0,416	0,36	0,668	0,409
pNF Producido [mM]	0,4379	0,2455	0,2125	0,3943	0,2414
Cantidad pNF producido [nmol]	21,8969	12,2765	10,6239	19,7132	12,0699
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0912	0,0341	0,0759	0,0939	0,0575

Tabla 6.27: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,583	0,199	0,243	0,538	0,255
pNF Producido [mM]	0,3441	0,1175	0,1434	0,3175	0,1505
Cantidad pNF producido [nmol]	17,2047	5,8726	7,1711	15,8768	7,5252
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0717	0,0163	0,0512	0,0756	0,0358

Tabla 6.28: Velocidades de reacción enzimática a 30 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4	6	2,3333	3,5	3,5
Tiempo ensayo [seg]	240	360	140	210	210
Dilución enzima [-]	4	1	4	4	4
Cantidad enzima [nmol]	0,0207	0,0844	0,0198	0,0207	0,0187
Absorbancia medida [-]	0,508	0,119	0,147	0,336	0,143
pNF Producido [mM]	0,2998	0,0702	0,0868	0,1983	0,0844
Cantidad pNF producido [nmol]	14,9914	3,5118	4,3381	9,9156	4,2200
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0625	0,0098	0,0310	0,0472	0,0201

Tabla 6.29: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,613	1,165	0,457	0,733	0,51
pNF Producido [mM]	0,3618	0,6876	0,2697	0,4326	0,3010
Cantidad pNF producido [nmol]	18,0901	34,3800	13,4864	21,6314	15,0505
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0603	0,0716	0,0375	0,0601	0,0418

Tabla 6.30: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,584	1,012	0,397	0,703	0,458
pNF Producido [mM]	0,3447	0,5973	0,2343	0,4149	0,2703
Cantidad pNF producido [nmol]	17,2343	29,8648	11,7158	20,7460	13,5159
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0574	0,0622	0,0325	0,0576	0,0375

Tabla 6.31: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,627	0,86	0,375	0,672	0,418
pNF Producido [mM]	0,3701	0,5076	0,2213	0,3966	0,2467
Cantidad pNF producido [nmol]	18,5032	25,3792	11,0665	19,8312	12,3355
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0617	0,0529	0,0307	0,0551	0,0343

Tabla 6.32: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,561	0,615	0,314	0,619	0,347
pNF Producido [mM]	0,3311	0,3630	0,1853	0,3653	0,2048
Cantidad pNF producido [nmol]	16,5555	18,1491	9,2664	18,2671	10,2402
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0552	0,0378	0,0257	0,0507	0,0284

Tabla 6.33: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,56	0,452	0,258	0,557	0,27
pNF Producido [mM]	0,3305	0,2668	0,1523	0,3287	0,1594
Cantidad pNF producido [nmol]	16,5260	13,3388	7,6138	16,4375	7,9679
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0551	0,0278	0,0211	0,0457	0,0221

Tabla 6.34: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,452	0,198	0,145	0,402	0,147
pNF Producido [mM]	0,2668	0,1169	0,0856	0,2373	0,0868
Cantidad pNF producido [nmol]	13,3388	5,8431	4,2791	11,8633	4,3381
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0445	0,0122	0,0119	0,0330	0,0121

Tabla 6.35: Velocidades de reacción enzimática a 40 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	5	8	6	6	6
Tiempo ensayo [seg]	300	480	360	360	360
Dilución enzima [-]	16	2	16	16	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0052	0,0422	0,0050	0,0052	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,325	0,101	0,083	0,257	0,088
pNF Producido [mM]	0,1918	0,0596	0,0490	0,1517	0,0519
Cantidad pNF producido [nmol]	9,5910	2,9806	2,4494	7,5843	2,5969
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0320	0,0062	0,0068	0,0211	0,0072

Tabla 6.36: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 20 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,652	0,506	0,408	0,632	0,581
pNF Producido [mM]	0,3848	0,2986	0,2408	0,3730	0,3429
Cantidad pNF producido [nmol]	19,2410	14,9324	12,0404	18,6508	17,1457
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0713	0,0311	0,0334	0,0622	0,0572

Tabla 6.37: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 15 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,616	0,458	0,322	0,565	0,522
pNF Producido [mM]	0,3636	0,2703	0,1900	0,3335	0,3081
Cantidad pNF producido [nmol]	18,1786	13,5159	9,5024	16,6736	15,4046
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0673	0,0282	0,0264	0,0556	0,0513

Tabla 6.38: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 10 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,573	0,333	0,285	0,51	0,435
pNF Producido [mM]	0,3382	0,1965	0,1682	0,3010	0,2567
Cantidad pNF producido [nmol]	16,9096	9,8271	8,4106	15,0505	12,8372
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0626	0,0205	0,0234	0,0502	0,0428

Tabla 6.39: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 7,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,569	0,26	0,218	0,449	0,365
pNF Producido [mM]	0,3358	0,1535	0,1287	0,2650	0,2154
Cantidad pNF producido [nmol]	16,7916	7,6728	6,4333	13,2503	10,7714
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0622	0,0160	0,0179	0,0442	0,0359

Tabla 6.40: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,487	0,202	0,133	0,401	0,272
pNF Producido [mM]	0,2874	0,1192	0,0785	0,2367	0,1605
Cantidad pNF producido [nmol]	14,3717	5,9612	3,9249	11,8338	8,0269
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0532	0,0124	0,0109	0,0394	0,0268

Tabla 6.41: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 2,5 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,369	0,078	0,065	0,242	0,138
pNF Producido [mM]	0,2178	0,0460	0,0384	0,1428	0,0814
Cantidad pNF producido [nmol]	10,8895	2,3018	1,9182	7,1416	4,0725
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0403	0,0048	0,0053	0,0238	0,0136

Tabla 6.42: Velocidades de reacción enzimática a 50 °C y concentración de sustrato de 1,25 mM.

Enzima	Cel5A	A134Y	N138L	I99A	A134Y/I99A
Tiempo ensayo [min]	4,5	8	6	5	5
Tiempo ensayo [seg]	270	480	360	300	300
Dilución enzima [-]	32	4	16	32	16
Cantidad enzima [nmol]	0,0026	0,0211	0,0050	0,0026	0,0047
Absorbancia medida [-]	0,256	0,056	0,03	0,156	0,099
pNF Producido [mM]	0,1511	0,0331	0,0177	0,0921	0,0584
Cantidad pNF producido [nmol]	7,5547	1,6526	0,8853	4,6037	2,9216
Velocidad producción pNF [nmol/s]	0,0280	0,0034	0,0025	0,0153	0,0097