

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“EVOLUCIÓN DIRIGIDA MEDIANTE MUTAGÉNESIS
POR SATURACIÓN DE LA XILANASA L DE
ORIGEN MARINO ANTÁRTICO”***

Tesis presentada a la Universidad de Chile
para optar al grado académico de Magister en Bioquímica área de
especialización en Bioquímica de Proteínas Recombinantes y
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

Por:

MARÍA PATRICIA ROMERO NÚÑEZ

Directores de Tesis
Dr. Juan Asenjo
Dra. Barbara Andrews

SANTIAGO – CHILE
2012

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magister presentada por la candidata:

MARÍA PATRICIA ROMERO NÚÑEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica de Proteínas Recombinantes y al título de Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____ de 2012.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Asenjo De Leuze _____

Dra. Barbara Andrews Farrow _____

Comisión Informante de Tesis:

Dra. M. Antonieta Valenzuela P.
(Presidente) _____

Dr. Gino Corsini A. _____

Dr. Carlos Santiviago C. _____

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ENZIMAS PSICRÓFILAS.....	1
1.2. INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	2
1.3. XILANASA L DE ORIGEN MARINO ANTÁRTICO.....	4
1.4. ENZIMAS XILANOLÍTICAS	6
1.5. IMPORTANCIA DE LAS XILANASAS EN LA INDUSTRIA.....	9
1.6. PRODUCCIÓN DE XILANASAS.....	10
1.7. HIPOTESIS	11
1.8. OBJETIVOS.....	11
1.8.1. OBJETIVO GENERAL	11
1.8.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS	11
2. MATERIALES	12
2.1. CEPAS BACTERIANAS	12
2.2. REACTIVOS	12
2.3. MEDIOS DE CULTIVO.....	13
2.3.1. MEDIO SOB	13
2.3.2. MEDIO LURIA-BERTANI.....	13
2.3.3. MEDIO TB	13
2.4. PARTIDORES.....	14
2.5. VECTORES.....	15
2.5.1. pET-22B(+)......	15
3. MÉTODOS	16
3.1. OBTENER BIBLIOTECAS DE VARIANTES DE XILANASA L MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR SATURACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON MAYOR GRADO DE MOVILIDAD	16
3.1.1. ELECCIÓN DE AMINOÁCIDOS A MUTAR.....	16
3.1.2. MINI PREPARACIÓN PLASMIDIAL DE pET-22B(+) CON EL GEN DE XILANASA “310B” ¹⁹	
3.1.3. MUTAGÉNESIS POR SATURACIÓN.....	19
3.1.4. ELECTROFORESIS DE DNA	20
3.1.5. DIGESTIÓN DEL AMPLIFICADO.....	20
3.1.6. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES <i>E. COLI</i> BL21(DE3) PARA LA TRANSFORMACIÓN	21
3.1.7. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES.....	21
3.1.8. ORGANIZACIÓN DE LAS BIBLIOTECAS	22
3.2. SELECCIONAR LA MEJOR MUTANTE TERMOESTABLE MEDIANTE UNA BÚSQUEDA EN LAS BIBLIOTECAS A TRAVÉS DE ENSAYOS ENZIMÁTICOS	22
3.2.1. EXPRESIÓN DE LAS BIBLIOTECAS	22
3.2.2. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO	23
3.2.3. PREPARACIÓN DE DNS (ÁCIDO DINITROSALICÍLICO)	23
3.2.4. ENSAYO RÁPIDO DE TERMOESTABILIDAD.....	23
3.2.5. SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS	24
3.2.6. EVALUACIÓN MEDIANTE CURVA DE TERMOESTABILIDAD	25
3.3. CARACTERIZAR BIOQUÍMICAMENTE LA MEJOR VARIANTE DE XILANASA L LUEGO DE LA MUTAGÉNESIS DE SATURACIÓN Y COMPARARLA CON LA ENZIMA TEMPLADO.....	25

3.3.1.	OBTENCIÓN DE LAS FRACCIONES CELULARES.....	26
3.3.2.	ZIMOGRAMA DE XILANASAS	27
3.3.3.	SECUENCIACIÓN DE DNA Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS.....	27
3.3.4.	CURVAS DE PROGRESO.....	28
3.3.5.	TEMPERATURA ÓPTIMA	28
3.3.6.	PH ÓPTIMO	28
3.3.7.	DETERMINACIÓN DE VELOCIDADES INICIALES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO	29
3.3.8.	CÁLCULO DE CONSTANTES V_{MAX} Y K_M	29
3.3.9.	DETERMINACIÓN DE T_{50}^7	29
4.	RESULTADOS	31
4.1.	OBTENER BIBLIOTECAS DE VARIANTES DE XILANASA L MEDIANTE MUTAGÉNESIS POR SATURACIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS CON MAYOR GRADO DE MOVILIDAD	31
4.1.1.	MUTAGÉNESIS DE SATURACIÓN.....	31
4.2.	SELECCIONAR LA MEJOR MUTANTE MEDIANTE UNA BÚSQUEDA A TRAVÉS DE ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	33
4.2.1.	SELECCIÓN DE CLONES POSITIVOS	33
4.2.2.	CURVAS DE TERMOESTABILIDAD.....	34
4.3.	CARACTERIZAR BIOQUÍMICAMENTE LA MEJOR VARIANTE DE XILANASA L LUEGO DE LA MUTAGÉNESIS DE SATURACIÓN Y COMPARARLA CON LA ENZIMA TEMPLADO.....	37
4.3.1.	ZIMOGRAMA DE XILANASAS	37
4.3.2.	SECUENCIACIÓN DE LA NUEVA VARIANTE.....	39
4.3.3.	CURVAS DE PROGRESO.....	41
4.3.4.	TEMPERATURA ÓPTIMA	42
4.3.5.	DETERMINACIÓN DE VELOCIDADES INICIALES A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE SUSTRATO	44
4.3.6.	CALCULO DE PARÁMETROS CINÉTICOS V_{MAX} Y K_M	46
4.3.7.	PH ÓPTIMO	47
4.3.8.	DETERMINACIÓN DE T_{50}^7	48
5.	DISCUSIÓN.....	51
6.	CONCLUSIONES	57
7.	BIBLIOGRAFÍA	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Secuencia aminoacídica de la xilanasas de origen marino antártico (Xilanasas L)..	5
Figura 2. Diagrama estereoscópico del modelo por homología del dominio catalítico de la Xilanasas L.	5
Figura 3. Mecanismo de acción de las xilanasas.	8
Figura 4. Analisis electroforético en gel de agarosa 1% para los productos de PCR con partidores con degeneración NNK.	32
Figura 5. Actividad relativa y residual para placa de la biblioteca DM1.	34
Figura 6. Curva de termoestabilidad para la enzima 310B.	35
Figura 7. Curva de termoestabilidad para un clon positivo de la biblioteca DM1 (DM1 2 C1).	35
Figura 8. Zimograma de fracciones obtenidas a partir de un cultivo de Xilanasas L, Xilanasas 310B y clon DM1.	37
Figura 9. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la Xilanasas 310B y DM1.	39
Figura 10. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la Xilanasas 310B y DM1.	40
Figura 11. Curva de progreso para la enzima 310B.	41
Figura 12. Curva de progreso para la enzima DM1.	42
Figura 13. Temperatura óptima para la Xilanasas 310B y DM1.	43
Figura 14. Curva de progreso representativa para la enzima 310B con una concentración de sustrato de 3.945 mg/mL.	44
Figura 15. Gráfica de Lineweaver-Burk o dobles recíprocos para la Xilanasas 310B y Xilanasas DM1.	46
Figura 16. Curva de pH para la enzima 310B y DM1.	48
Figura 17. Curva de termoestabilidad de la xilanasas templado 310B.	50
Figura 18. Curva de termoestabilidad de la variante DM1.	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Codones para cada aminoácido obtenido con los partidores con degeneración NNK.	17
Tabla 2. T_{50}^7 de los clones positivos para termoestabilidad.	36
Tabla 3. Velocidades iniciales para la enzima 310B a distintas concentraciones de sustrato xilano soluble.	45
Tabla 4. Velocidades iniciales para la variante DM1 a distintas concentraciones de sustrato xilano soluble.	45
Tabla 5. Constantes K_m y V_{max} para enzima 310 y DM1.	47
Tabla 6. Diferencias en las T_{50}^7 al utilizar diferentes fracciones y distintos tiempos de reacción.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Deoxiribonucleótidos trifosfato
EDTA	Etilendiaminotetraacetato ácido
g	Fuerza de gravedad
g	Gramo
h	Hora
IPTG	Isopropil tio-β-D-galactósido
kb	Kilopares de bases
kDa	Kilodalton
k _{cat}	Constante catalítica
K _m	Constante de Michaelis-Menten
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
M	Molar
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Militros
mM	Milimolar
ms	Milisegundos
nm	Nanómetros
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
pH	Potencial hidrógeno
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
p/v	Razón peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo
SDS	Dodecil sulfato de sodio
σ	Desviación estándar
TAE	Amortiguador Tris-Acetato-EDTA
TB	Terrific Broth
T ₅₀ ⁷	Temperatura a la cual se pierde 50% de actividad catalítica luego de 7 min de incubación
T _m	Temperatura de apareamiento
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
μF	Microfaradios
μL	Microlitros
μM	Micromolar
V	Voltio

RESUMEN

Las proteínas psicrofílicas resultan muy útiles a nivel industrial pues permiten un ahorro de energía por presentar una alta actividad específica a bajas temperaturas en comparación con sus homólogas mesófilas (activas a temperaturas moderadas). En esta tesis se utilizó la enzima Xilanasas L, proveniente de bacterias psicrofílicas de origen marino antártico, la cual es activa a bajas temperaturas.

Las xilanasas son muy utilizadas en la industria, especialmente en el procesamiento del papel y degradación de fibras vegetales. La ventaja de las enzimas psicrofílicas es que poseen una eficiencia catalítica aumentada, producto de adaptaciones que han tenido que desarrollar para superar las bajas temperaturas, las cuales inhiben al común de las enzimas mesófilas. Todas las enzimas adaptadas al frío encontradas en la naturaleza tienen el inconveniente de tener su estructura molecular demasiado flexible, lo que provoca una pérdida de su conformación a moderadas y altas temperaturas, por ende pérdida de actividad.

A través de técnicas de ingeniería de proteínas es posible obtener una variante más termoestable al rediseñar la estructura para ganar rigidez, pero sin disminuir su actividad a bajas temperaturas. Para lograr esto, se usó el análisis de dinámica molecular y el diseño racional para la elección de los sitios a mutar dentro del dominio catalítico de acuerdo al movimiento de cada residuo y así obtener una enzima con las características deseadas. Mediante mutagénesis por saturación, se generaron mutantes simples, obteniéndose bibliotecas de 176 clones para cada aminoácido seleccionado. Se escogieron los clones más termoestables de cada biblioteca luego de una búsqueda (*screening*) rápida mediante ensayos enzimáticos. Se obtuvo una nueva xilanasas, llamada "DM1", la cual resultó ser una proteína truncada. Ésta nueva xilanasas se caracterizó bioquímicamente y se comparó con la enzima templado.

Se determinó que la enzima templado posee 752 residuos aminoacídicos, con una masa total de 83.15 kDa. Se alcanzó la temperatura óptima a los 41°C, y un pH óptimo de 9.2. Los parámetros cinéticos calculados por el método de Lineweaver-Burk fueron una constante de afinidad (K_m) de 2.003 mg/mL y una V_{max} de $0.100 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL min}} \right]$. La Xilanasa DM1 posee 638 residuos aminoacídicos con una masa de 70.42 kDa, una temperatura óptima de 41°C y un pH óptimo de 6.3. Esta enzima posee una K_m de 0.980 mg/mL y la V_{max} fue $0.063 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL min}} \right]$. La Xilanasa DM1 mejoró en 5°C su termoestabilidad frente a un shock térmico de 7 min.

Las razones del aumento de la termoestabilidad en esta nueva variante de Xilanasa L no están claras pero podemos especular sobre esto. Para entender el efecto de la delección del extremo C-terminal es necesario un modelamiento de la estructura completa de la enzima DM1. Esta nueva variante podría ser un primer paso para continuar la mejora de la xilanasa psicrófila.

Directed evolution of Antarctic sea water Xylanase L via saturation mutagenesis

The psychrophilic enzymes are very useful in the industry because they allow energy savings by its higher specific activity at low temperatures in comparison with their mesophilic homologues (active at moderate temperatures). In this thesis we used the Antarctic sea water Xylanase L which is active in low temperatures.

Xylanases are very important, especially in the paper industry and degradation process of vegetable fibers. The advantage of the psychrophilic enzymes is that they have an increasing catalytic efficiency because they have developed strategies to overcome the low temperatures which inhibit the reactions catalyzed by mesophilic enzymes. All cold-adapted enzymes found in nature have the disadvantage of their high structural flexibility which causes a loss of their structural conformation at moderate to high temperatures, losing their catalytic activity.

Through protein engineering we can redesign the enzyme structure in order to decrease the flexibility without a loss of low-temperature activity. We used molecular dynamics analysis and rational design to choose the residues for mutagenesis in the catalytic domain according to their movement. The chosen method was saturation mutagenesis through single mutant generation. We obtained 176 clones for each library. We choose the ones that show a higher thermostability in the enzymatic screening. We produced a new xylanase called “DM1”, which is a truncated protein. We did a biochemical characterization and compare it with the template enzyme. We determined that the template enzyme had 752 residues, with a theoretical mass of 83.15 kDa. Its optimal temperature and pH was 41°C and 9.2, respectively. The kinetic constants obtained using Lineweaver-Burk method were $K_m=2.003 \text{ mg/mL}$ and $V_{max}=0.100 \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL min}} \right]$.

The Xylanase DM1 had 638 residues with a theoretical mass of 70.42 kDa, an optimal temperature of 41°C and an optimal pH of 6.3. This enzyme have a $K_m=0.980$ mg/mL and a $V_{max}=0.063$ $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL min}}\right]$. The Xylanase DM1 increased their thermostability in 5°C in a 7 minutes thermal shock.

Although the cause of the increase of thermostability of this new Xylanase L are not very clear, we can speculate about that. In order to understand the effects of the deletion of the C-terminal, is necessary a modeling of the complete structure of the DM1 enzyme. This new variant could be the first step of the improvement of the psychrophilic xylanase.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Enzimas psicrófilas

En nuestro centro de investigación trabajamos con bacterias psicrófilas. Un psicrófilo se define como un organismo adaptado al frío que crece óptimamente a temperaturas menores a 15°C y máximo a 20°C^{1, 2}. Este tipo de organismos pueden ser encontrados no sólo en las zonas polares y alpinas sino también en aguas de alta profundidad. Los psicrófilos han colonizado exitosamente estos ambientes y son capaces de crecer eficientemente a temperaturas bajas. Esta adaptación requiere una amplia gama de ajustes estructurales y fisiológicos para superar la disminución de energía dada las bajas temperaturas del hábitat. Las bajas temperaturas inhiben fuertemente las reacciones químicas catalizadas por enzimas. Una forma de resistir los efectos adversos del frío en la actividad catalítica podría ser sintetizar más enzima, lo que es energéticamente costoso para el organismo. La estrategia comúnmente usada para compensar la baja tasa de reacción causada por el frío es producir enzimas de mayor actividad específica a estas temperaturas. Esto se logra ya sea aumentando parámetros como la constante catalítica (k_{cat}) y/o aumentando la afinidad por el sustrato (disminuyendo K_m).

Dado el aumento en la eficiencia catalítica, estas enzimas permiten el ahorro de energía, lo que las hace ser muy interesantes para procesos biotecnológicos, tanto así que hay un creciente interés en estudiar este tipo de proteínas. Se han revelado, por ejemplo, qué tipo de modificaciones son necesarias para adaptar una enzima mesófila (activa a temperaturas intermedias) a bajas temperaturas. Los cambios aminoacídicos importantes

en la adaptación al frío se encuentran en sitios que mediante un análisis simple parecerían poco relevantes dentro de la enzima. Por otra parte, los residuos catalíticos están conservados en enzimas homólogas mesófilas y psicrófilas. Se ha descubierto también que generalmente en las enzimas psicrófilas el sustrato tiene un mejor acceso al sitio activo, lo que disminuiría la energía requerida para la acomodación del sustrato.

Otra característica importante de las enzimas psicrófilas es su baja estabilidad conformacional¹. Varias teorías han sido propuestas para explicar esta propiedad: bajo número de enlaces disulfuro y puentes de hidrógeno, baja cantidad de residuos de prolina, un aumento en los residuos de glicina y/o inserciones en sus “*loops*” en comparación a sus pares mesófilas y termófilas (activas a altas temperaturas), una baja en el número de pares iónicos, interacciones aromáticas o interacciones hidrofóbicas. Sea cual sea la explicación, todas apuntan al incremento de la flexibilidad con respecto a las mesófilas³⁻⁵. El aumento en la plasticidad produce una baja estabilidad estructural de la enzima. Este balance entre flexibilidad y estabilidad es un punto importante en la adaptación de enzimas a ambientes fríos. La baja estabilidad de las enzimas psicrófilas es una desventaja al momento de querer utilizarlas en procesos industriales ya que un aumento en la temperatura del proceso podría desnaturar la enzima, perdiendo su actividad.

1.2. Ingeniería de proteínas

La mayoría de las enzimas utilizadas en la industria son del tipo mesófilas, ya que presentan una buena actividad catalítica y termoestabilidad. Las enzimas psicrófilas, por otro lado, poseen una elevada eficiencia catalítica en comparación a las mesófilas pero el gran problema es su baja termoestabilidad. Mediante técnicas de ingeniería de

proteínas podemos rediseñar una enzima psicrófila para obtener una estructura más rígida, lo que supone un aumento en su termoestabilidad⁶⁻⁸. En el laboratorio es posible obtener este tipo de proteínas, donde se mantiene la actividad a bajas temperaturas gracias a la flexibilidad relativa, pero al mismo tiempo poseen una alta estabilidad¹. Hoy en día en el área ingeniería de proteínas, la nueva tendencia es la aplicación tanto de evolución dirigida, el cual tiene un componente aleatorio importante, y del análisis más racional de las estructuras y sitios de la proteína para identificar qué residuos deben ser mutados o recombinados. En este sentido, un análisis o estudio previo de las estructuras puede acotar u optimizar las zonas de la proteína que deben ser tratadas mediante los métodos de evolución dirigida o diseño racional. Esto permitiría lograr en menos tiempo y en forma más eficientemente los resultados esperados⁹. La optimización de una sola característica, como por ejemplo la termoestabilidad, mediante estos métodos podría dar tanto resultados exitosos como también resultados insignificantes debido que no hay una “regla racional general” aplicable a cualquier proteína.

En la evolución dirigida se busca manipular propiedades catalíticas de las enzimas, incluyendo termoestabilidad, solubilidad en solventes orgánicos y enantioselectividad. Este proceso requiere de mucho tiempo y generalmente es necesario el uso de robots para el *screening* de las grandes librerías de variantes de enzima (generalmente muchos miles de clones)¹⁰. El principal desafío de esta técnica es intentar abarcar mediante mutagénesis toda la secuencia de la proteína. Existen varias técnicas para realizar la mutagénesis, las más utilizada es la de PCR propenso a error (epPCR) junto con otros métodos como mutagénesis por saturación, DNA *shuffling* y variantes o combinaciones de éstas. Cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas. El método de mutagénesis por saturación restringe las mutaciones a un espacio predeterminado, creándose librerías focalizadas, pero requiere de información estructural para poder realizar la elección correcta de los sitios a mutar. Esta información se puede obtener

mediante cristalización de la proteína o por modelos por homología. Dependiendo de la característica a modificar será la forma de selección de los aminoácidos.

En el caso de la termoestabilidad se seleccionan los aminoácidos de acuerdo al “factor B” o al RMSD (Root Mean Square Deviation), esto refleja las densidades electrónicas con respecto a sus posiciones de equilibrio como resultado de movimientos térmicos y por lo tanto sitios de mayor flexibilidad en la cadena aminoacídica.

1.3. Xilanasa L de origen marino antártico

El año 2007 en el Centro de Ingeniería Bioquímica y Biotecnología de la Universidad de Chile fue aislado un fragmento de un gen de aproximadamente 200pb y con 45% de identidad con xilanasas de la familia GH10¹³. Se realizó un análisis del rDNA 16S de la bacteria de la cual fue aislado el fragmento, que identificó a la cepa como *Psychrobacter* sp. Este género ha sido encontrado tanto en muestras de agua de mar de la Antártica como del Ártico. Mediante una técnica mejorada de *genome walking* se logró obtener la secuencia completa de este gen. Esta nueva xilanasa fue nombrada “Xilanasa L”¹¹. Mediante bioinformática se identificó un péptido señal de exportación extracelular y dos dominios de unión a carbohidratos, uno en la región N-terminal y un segundo en la región C-terminal (Figura 1). El sitio activo presenta dos ácidos glutámicos catalíticos y las secuencias conservadas típicas de la familia GH10. Los estudios previos han revelado que las enzimas de la familia GH10 son mucho más conservadas estructuralmente que otras familias de glicosil hidrolasas.

Xilanase L			
MNKSIFRNTG LVTLVSLMA	CGGNKNDTPV PEPIPEVVAP DTPEPEAPIA AE	LTNGGFEE DTAGQTPVG NWVFRPTQES SATGTIEVIE BEEGVNTYQG	100
TKAVEVNVNT LGDNPWGIEI	AYEDLPITGG KNYEFSVWAK GEEGTSADFW	IQTAPDYGQ LSLVKETLTG EWQKITLTA	200
NKSIYLDEFS	GFILDDVPAQ EIPDVQYSEV TAA	SLKALAP NFNIGVAVPA GGFGNSVIDR PEIKTIEQH FNQLSAENIM	300
VNYAKDNSLT VHGHVFWHS	QIAPWMSFQ GOKAAWITMM ENHITQVATH	FEEEGNDTV VSWDVVN	400
PLAYKAARAA	DPDADLYND YNLIWADKL DAVIAMVDF	HNNGVPIDGI GFQSHISLNS PDISTIQAHL	500
QKVVDIRPKI KVKIT	LDV	MNEGGIPLT	600
YLTSERADEQ KQYYDIVKT	YLETVPEDQR GGTIIVGVID	EDSWLQWPE PKTEWPLFF	700
NDFTAKPALQ GFANA	KELI	EVVQPAPS	800
SE	LLTNGOFEAG		900
LDSWQARGSA	SITLSTQAH SGNNSALVQG	RTETWGLQK DVKGLFTADK	1000
TYNVSAWVKL	SDDTSTVSPD	IKLTLQIEHT	1100
STEYLELTPV	TTVAAGEWVQ		1200
LSGTYHSIT	TQESAALLYV	ESSELTADFY	1300
VDDVSVTLVE			1400

Figura 1. Secuencia aminoacídica de la xilanasa de origen marino antártico (Xilanasa L).

Los residuos marcados con amarillo corresponden por homología a los aminoácidos catalíticos, ácido glutámico (E) 368 y el E486. Se muestra en color azul el péptido señal y en rojo los dos dominios de unión a carbohidratos. En verde se muestra el dominio catalítico perteneciente a la familia 10 de las glicosil hidrolasas (GH10)¹³.

La estructura tridimensional de la Xilanasa L fue modelada por homología usando como templatado tres estructuras de xilanasas GH10 previamente resueltas: xilanasa A de *Streptomyces halstedii* (34% de identidad); xilanasa XYN10A de *Cellvibrio japonicus* (41% de identidad); xilanasa 10C de *Cellvibrio japonicus* (41% cristalizado con el sustrato xilopentaosa)¹³. Luego de la evaluación, se eligió el mejor modelo tri-dimensional de la Xilanasa L incluyendo el ligando xilotetraosa (Figura 2).

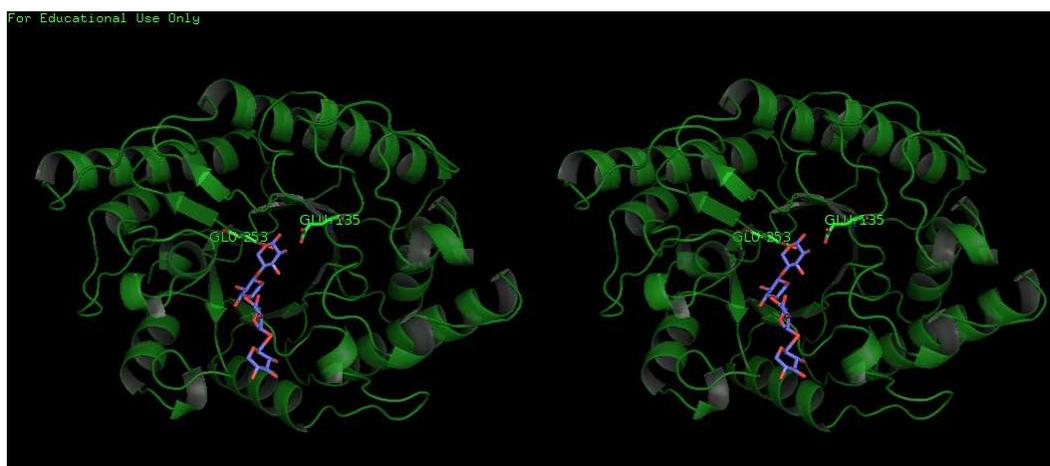


Figura 2. Diagrama estereoscópico del modelo por homología del dominio catalítico de la Xilanasa L.

En ramas se muestran los residuos catalíticos Glu253 y Glu135, y el ligando xilotetraosa unido al sitio activo¹³.

Se logró expresar el gen aislado de la xilanasa utilizando el sistema de expresión heterólogo *E. coli* BL21(DE3)/pET22b(+), el cual permitió la exportación de la proteína traducida (de 90 kDa) al espacio periplásmico y extracelular, fusionada a una cola de seis residuos de histidina en el extremo C-terminal¹³. Variando los parámetros de temperatura y tiempo de inducción se logró que el 100% de la expresión recombinante catalíticamente activa se obtuviera en el sobrenadante de cultivo. Luego de realizar ensayos enzimáticos, se determinó que esta xilanasa posee un pH óptimo en el rango de 6.0 y 8.0, y su temperatura óptima en un rango de 35°C y 40°C¹².

Se realizó un trabajo de evolución dirigida con el objetivo de mejorar la actividad de esta xilanasa. Mediante epPCR y DNA *shuffling* se logró obtener numerosas variantes y se eligió la más activa (clon 310B)¹³. Mediante la secuenciación del gen se determinó que poseía la mutación P35L que, a pesar de que no se encuentra en el dominio catalítico, ni en el de unión a carbohidratos, tiene un efecto significativo en el mejoramiento de la actividad pero no mejora la termoestabilidad.

1.4. Enzimas xilanolíticas

Para entender la función de las xilanasas en la naturaleza podemos decir que el xilano, su sustrato, es el componente principal de la hemicelulosa, el cual forma parte de la estructura de la pared celular vegetal (en angiospermas 15-30% del peso seco, en gimnospermas 7-12%)¹⁴. Es un heteropolímero complejo y altamente ramificado, con un esqueleto de xilosa β -1,4. Éste, junto con la celulosa y la lignina, son los componentes mayoritarios en las paredes de las células vegetales. Estos tres componentes interactúan vía enlaces covalentes y no covalentes. El xilano se encuentra en una interfase entre la lignina y la celulosa y se cree que cumple un importante papel

en la cohesión de las fibras y la integridad de la pared celular ¹⁵. La longitud del polímero varía entre 70-200 unidades de xilosa y, dependiendo de la fuente vegetal, puede estar sustituido con cadenas laterales de residuos de arabinosa, ácido glucorónico y ácido metilglucorónico, aunque también se ha logrado aislar xilano sin ramificaciones^{16,17}

La biodegradación del xilano es un proceso complejo que requiere de la acción coordinada de varias enzimas, entre las cuales están las xilanasas (endo-1,4- β -xilanasas, E.C. 3.2.1.8), las cuales rompen los enlaces internos del esqueleto de xilosa β -1,4, mientras las cadenas laterales son removidas por la acción de otras enzimas como las arabino-furanosidasas, glucoronidasas y acetil xilanoesterasas¹⁵. La hidrólisis del sustrato ocurre mediante un mecanismo de doble desplazamiento que involucra la formación e hidrólisis de un intermediario covalente enzima-sustrato (Figura 3). Durante la catálisis, un ácido carboxílico funciona como dador de protones (ácido/base), facilitando el desplazamiento del grupo con el extremo terminal reducido, y un segundo ácido carboxílico actúa como nucleófilo en la formación del intermediario enzima-sustrato. El sustrato es luego liberado mediante el ataque de una molécula de agua activada por el ahora desprotonado ácido carboxílico (ácido/base)¹³.

El xilano no es degradado al azar, ya que los enlaces seleccionados para la hidrólisis dependen de la naturaleza del sustrato (largo de la cadena, grado de ramificación y presencia de sustituyentes). Debido a que el xilano constituye aproximadamente un tercio del carbono orgánico renovable en la tierra, el rompimiento de éste es un paso crítico en el reciclaje del carbono en la naturaleza^{18,19}.

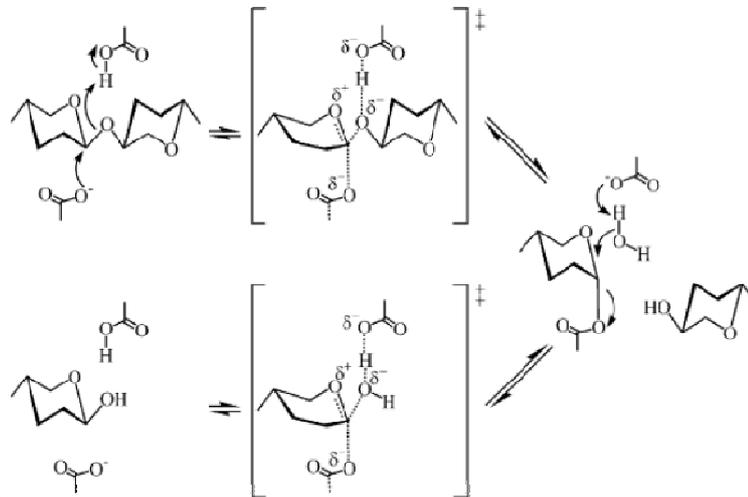


Figura 3. Mecanismo de acción de las xilanasas.

Mecanismo general de catálisis de los enlaces glicosídicos β-1,4 del xilano¹⁵. Ocurre por un doble desplazamiento con formación e hidrólisis de un intermediario covalente enzima-sustrato. Un ácido carboxílico funciona como dador de protones (ácido/base) y un segundo ácido carboxílico actúa como nucleófilo.

Las xilanasas están presentes en hongos, bacterias, algas marinas, crustáceos, insectos, caracoles, semillas de plantas terrestres y generalmente son secretadas al medio extracelular para poder interactuar con sus blancos¹⁵. De acuerdo a la homología de secuencias aminoacídicas y el análisis de sus grupos hidrofóbicos las xilanasas generalmente se clasifican en dos familias, GH10 y GH11, aunque existen otras familias con actividad xilanolítica como la GH5, GH7, GH8, y GH43. A pesar de que las xilanasas muestran una gran diferencia en sus secuencias, se ha observado poca variabilidad en la actividad catalítica de distintas familias. Estas pequeñas diferencias se cree que son el resultado de cambios en su estructura tridimensional de su dominio catalítico, el cual presenta mayor flexibilidad conformacional en la familia 10 (GH10)²⁰. La compleja naturaleza química y heterogeneidad del xilano explica la multiplicidad de xilanasas producidas en microorganismos, donde varía la actividad hidrolítica, las propiedades fisicoquímicas y sus estructuras^{19, 21}.

1.5. Importancia de las xilanasas en la industria

Las xilanasas tienen aplicaciones biotecnológicas en muchos procesos industriales. La bioconversión del xilano depende de las propiedades de la xilanasas seleccionada. El blanqueamiento de la pulpa en la industria del papel es una de las aplicaciones más destacadas ya que reduce el uso de compuestos clorados y la eliminación de desechos tóxicos, disminuyendo el impacto ambiental de este proceso²². Las xilanasas empleadas para este fin no necesitan ser purificadas pero deben ser activas a altas temperaturas y a pH alcalino y no deben contener enzimas celulolíticas para poder mantener intactas las fibras de celulosa¹⁴.

Las xilanasas también son usadas para la recuperación de azúcares fermentables desde hemicelulosa, producción de biocombustible (etanol) y obtención de hidrolizados de desechos agroindustriales^{18, 19, 23}. También se utilizan como aditivos para mejorar la digestión de la comida, en la industria de las masas para aumentar la calidad del pan y productos horneados, para la extracción de café, aceites vegetales y almidón y para el procesamiento de jugo de fruta y vino en combinación con pectinasa y celulasa.

La industria de jugo de fruta es un gran consumidor de estas enzimas ya que la producción de jugos frutales y vegetales requiere métodos de extracción, limpieza y estabilización¹⁴. También se utilizan xilanasas para el procesamiento del vino y se han obtenido productos con un aroma más pronunciado que el convencional. En la industria de la cerveza se usa para disminuir la viscosidad producida por la presencia de largas cadenas de arabinoxilano.

Otro uso de las enzimas xilanolíticas es en la industria del textil para procesar fibras vegetales como la arpillera¹⁴. Para estos propósitos, la xilanasas debe actuar sola, libre de enzimas celulolíticas. Primero, se incubó la materia prima seca con la xilanasas para liberar las largas fibras de celulosa. Luego de usar este método no es necesario el blanqueamiento ya que la lignina (propensa a oxidación y oscurecimiento) ha sido eliminada. Se ha realizado poca investigación sobre la utilización de enzimas en la industria del textil, presentándose como un campo que demanda nuevas y mejores técnicas.

1.6. Producción de xilanasas

Las xilanasas comerciales son producidas industrialmente en países como Japón, Finlandia, Alemania, Irlanda, Dinamarca, Canadá y USA¹⁴. Los organismos usados para esto son tanto hongos como bacterias. Son usadas desde los años ochenta y actualmente representan, junto con las celulasas, el 20% del mercado mundial de enzimas.

El principal problema que presenta la Xilanasas L para ser utilizada en la industria es su termolabilidad debido a su flexibilidad estructural. Es por esto que el primer acercamiento a la estabilización de la enzima fue identificar las zonas con mayor movilidad dentro del dominio catalítico. Es así como en un trabajo previo, la Dra. Loreto Parra junto al Dr. Juan Pablo Acevedo obtuvieron un modelo homólogo del dominio catalítico de la proteína y realizaron un análisis de dinámica molecular para evaluar el movimiento de cada aminoácido dentro del sitio activo de la proteína. Como resultado de la simulación se obtuvo un valor RMSD (Root Mean Square Deviation) para cada aminoácido que da cuenta del movimiento de los átomos, por lo que un alto valor RMSD indica un alto movimiento en la estructura.

Teniendo la información sobre los sitios con mayor movimiento dentro del dominio catalítico, es posible diseñar una estrategia mediante ingeniería de proteínas para rigidizar esas zonas ganando termoestabilidad.

1.7. HIPOTESIS

Es posible aumentar la termoestabilidad de la Xilanasa L mediante la generación de mutantes simples con la técnica de mutagénesis por saturación.

1.8. OBJETIVOS

1.8.1. OBJETIVO GENERAL

Aumentar la termoestabilidad de la Xilanasa L mediante la generación de mutantes simples con la técnica de mutagénesis por saturación.

1.8.2. OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Obtener bibliotecas de variantes de Xilanasa L mediante mutagénesis por saturación de los aminoácidos con mayor grado de movilidad.
2. Seleccionar la mejor mutante termoestable mediante una búsqueda en las bibliotecas a través de ensayos enzimáticos.
3. Caracterizar desde el punto de vista bioquímico la mejor variante de Xilanasa L luego de la mutagénesis de saturación y compararla con la enzima templado.

2. MATERIALES

2.1. Cepas bacterianas

En este trabajo se utilizó *Escherichia coli* BL21(DE3), genotipo completo de la cepa: F⁻ *ompT hsdSB* (rB⁻ mB⁺) *gal dcm* (DE3), con el plasmidio pET-22b(+) portador del gen de una variante de Xilanasasa L (variante 310B) obtenida por el Dr. Juan Pablo Acevedo.

2.2. Reactivos

Ampicilina.	Calbiochem (USA)
Triptona, Extracto de levadura, medio Luria-Bertani,	Difco (DT- USA)
Estándar 1 kb, dNTPs, Carbenicilina, EDTA, <i>DpnI</i> .	Invitrogen (CA-USA)
Agarosa	Promega
QIAprep Spin Miniprep Kit.	Qiagen (USA)
D(+)-Xilosa, Bromuro de etidio, CaCl ₂ y otras sales.	Merk
KOD Hot Start DNA Polimerasa.	Novagen.
IPTG, Xilano soluble de Abedul (Birchwood Xylan).	Sigma (MO-USA)
Acilamida: Bisacrilamida 29:1, Fenol, Tris, SDS, glicerol,	Winkler (Chile)
Tritón X-100.	

2.3. Medios de cultivo

2.3.1. Medio SOB

El medio SOB contiene por cada 1 L: 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 0.5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 985 mL con agua destilada. Se mezcló y se agregó 10 mL de una solución de cloruro de potasio 250 mM y se ajustó el pH a 7.0. Se esterilizó. Antes de utilizar se agregó 5 mL de una solución estéril de cloruro de magnesio 2.0 M.

2.3.2. Medio Luria-Bertani

El medio LB contiene por cada 1 L de solución: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. El volumen se llevó a 1 L con agua destilada y el pH se ajustó a 7.0. Se esterilizó por autoclave. Para el medio Luria-Bertani-Agar se agregó agar al 1.5% p/v.

2.3.3. Medio TB

El medio TB contiene por cada 1 L de solución: 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura y 4 mL de glicerol. El volumen se llevó a 900 mL con agua destilada, se esterilizó por autoclave y se agregó 100 mL de fosfato de potasio estéril.

2.4. Partidores

Los partidores utilizados con degeneración NNK (N: Ade/Cyt/Gua/Thy; K: Gua/Thy), con su complementario MNN (N: Ade/Cyt/Gua/Thy; M: Ade/Cyt), son los siguientes (anotados de 5' a 3'):

DM1	DM1F	GTTCGTATGAACAAC <u>NNK</u> GGCGGCATTCCTCTC
	DM1R	GAGAGGAATGCCGCC <u>MNN</u> GTTGTTTCATACGAAC
DM2	DM2F	GTTCGTATGAACAACGA <u>ANNK</u> GGCATTCCTCTC
	DM2R	GAGAGGAATGCC <u>MNN</u> TTCGTTGTTTCATACGAAC
DM3	DM3F	GTTCGTATGAACAACGAAGGC <u>NNK</u> ATTCCTCTC
	DM3R	GAGAGGAAT <u>MNN</u> GCCTTCGTTGTTTCATACGAAC
DM4	DM4F	GTTCGTATGAACAACGAAGGC <u>NNK</u> CCTCTC
	DM4R	GAGAGG <u>MNN</u> GCCGCCTTCGTTGTTTCATACGAAC
DM5	DM5F	GGCATTCCTCTCACT <u>NNK</u> TAAACCAGTGAAAGAGCG
	DM5R	CGCTCTTTCACTGGTAA <u>MNN</u> AGTGAGAGGAATGCC
DM6	DM6F	GGTAAATACCGTGGTGA <u>ANNK</u> ACCACTGACGACAGC
	DM6R	GCTGTCGTCAGTGGT <u>MNN</u> TTCACCACGGTATTTACC
DM7	DM7F	CTGACGACAGCGCC <u>NNK</u> GAATCTGTATGGTTTG
	DM7R	CAAACCATACAGATTC <u>MNN</u> GGCGCTGTCGTCAG

DM8	DM8F	GACGACAGCGCCGAC <u>NNKT</u> CTGTATGGTTTG
	DM8R	CAAACCATACAGAM <u>MNNG</u> TCGGCGCTGTCGTC
DM9	DM9F	GTAAATACCGTGGTGAAAA <u>ANNK</u> ACTGACGACAGC
	DM9R	GCTGTCGTCAGT <u>MNNT</u> TTTTTCACCACGGTATTTAC

2.5. Vectores

2.5.1. pET-22b(+)

Se utilizó el vector de expresión pET-22b(+) que contiene el gen de la enzima xilanasa (Xilanasa L o su variante “Xilanasa 310B”). Ambas proteínas se expresan en forma recombinante unidas por su extremo C-terminal a un péptido de 6 histidinas que permite su purificación. Además, contiene una secuencia señal N-terminal PelB para la exportación periplasmática de la proteína y utiliza el sistema promotor T7.

3. MÉTODOS

3.1. Obtener bibliotecas de variantes de Xilanasa L mediante mutagénesis por saturación de los aminoácidos con mayor grado de movilidad

3.1.1. Elección de aminoácidos a mutar

Se utilizó el protocolo publicado por el profesor Manfred Reetz y el Dr. José Daniel Carballeira del Instituto Max Planck: “Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes”⁸. Los aminoácidos a mutar se escogieron en un trabajo previo realizado por el Dr. Juan Pablo Acevedo y la Dra. Loreto Parra. Para la mutagénesis por saturación se utilizó partidores con degeneración NNK (N: Ade/Cyt/Gua/Thy; K: Gua/Thy) para mutar nueve aminoácidos de alto valor RMSD (similar al factor B) en el dominio catalítico (numeración de los residuos con respecto al dominio catalítico):

DM1 Muta aminoácido Glu261

DM2 Muta aminoácido Gly262

DM3 Muta aminoácido Gly263

DM4 Muta aminoácido Ile264

DM5 Muta aminoácido Tyr268

DM6 Muta aminoácido Lys147

DM7 Muta aminoácido Asp154

DM8 Muta aminoácido Glu155

DM9 Muta aminoácido Thr148

Estos partidores permiten obtener bibliotecas de variantes con 32 codones distintos que codifican para los 20 aminoácidos proteínogénicos y un codón de término de la traducción en cada sitio escogido ¹³.

Tabla 1. Codones para cada aminoácido obtenido con los partidores con degeneración NNK.

Aminoácidos	Codones
Ala [A]	2
Arg [R]	3
Asn [N]	1
Asp [D]	1
Cys [C]	1
Gln [Q]	1
Glu [E]	1
Gly [G]	2
His [H]	1
Ile [I]	1
Leu [L]	3

Lys [K]	1
Met [M]	1
Phe [F]	1
Pro [P]	2
Ser [S]	3
Thr [T]	2
Trp [W]	1
Tyr [Y]	1
Val [V]	2
Stop	1
Codones	32

Para la generación de las bibliotecas se utilizó como templado el plasmidio pET-22b(+) con el gen de una variante de Xilasana L llamada “310B”, obtenida mediante epPCR por el Dr. Juan Pablo Acevedo en su tesis doctoral, la cual posee mayor actividad xilanólítica que la enzima nativa¹³.

3.1.2. Mini preparación plasmidial de pET-22b(+) con el gen de Xilanasa “310B”

El plasmidio se obtuvo a partir de bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plasmidio pET-22b(+) ligado al gen de la Xilanasa 310B. Se inoculó 4 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL, se incubó por 16 h a 37°C a 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga *Eppendorf* 5403) por 1 min para obtener un precipitado de bacterias. Luego se utilizó el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) según instrucciones del fabricante.

3.1.3. Mutagénesis por saturación

Los partidores antes mencionados permiten la amplificación total del plasmidio pET-22b(+) mediante PCR, introduciendo la degeneración NNK en el codón elegido.

Para la amplificación se usó DNA polimerasa KOD (KOD Hot Start DNA Polimerasa, Novagen) por su alta capacidad correctora. La reacción se realizó agregando 2 µL de templado (mini preparación plasmidial de pET-22b(+) con el gen 310B), 0.4µl de dNTPs 10 mM, 0.8 µL de cada partidador 10 mM, 0.8 µL de MgSO₄ 100 mM, 2 µL de amortiguador 10X recomendado por el fabricante, 0.5 µL de KOD y agua destilada hasta completar 20 µL. El programa utilizado en el termociclador para la amplificación fue el siguiente:

- 95°C por 2 min
 - 95°C por 45 s
 - $T_m - 5^\circ\text{C}$ (distinta para cada partidor) por 45 s
 - 72°C por 9 min
- } 30 ciclos
- 72°C por 10 min

3.1.4. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se realizó en una cámara horizontal. Las muestras se mezclaron con el amortiguador de carga (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0.25% p/v en agua destilada) y luego se cargaron en geles de agarosa 1%. La agarosa se preparó en amortiguador TAE: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM, pH 8.0) y bromuro de etidio 0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se incluyó un estándar de tamaño molecular de 1 kb (*1 kb DNA Ladder Invitrogen*). La electroforesis se realizó a voltaje constante de 100 V. Se utilizó como amortiguador de corrida TAE.

3.1.5. Digestión del amplificado

El producto de la reacción se digirió con 1 μL de la endonucleasa *DpnI* (Invitrogen) a 37°C por 3 h para eliminar el templado y así trabajar sólo con plasmidios que contengan variantes de la Xilanasas 310B.

3.1.6. Preparación de células electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3) para la transformación

Se inoculó 10 mL de medio SOB con una colonia de *E. coli* BL21(DE3) y se incubó con agitación a 37°C durante 16 h. Se inoculó 1 L de medio SOB estéril a una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) final de 0.05. Se incubó a la misma temperatura y agitación hasta alcanzar un valor entre 0.6 y 0.8. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 5.000 rpm a 4°C durante 10 min (centrífuga Sorvall® RC-28S, rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA). El sedimento se lavó 4 veces con glicerol 10% v/v estéril. Luego del último lavado, el sedimento se resuspendió en el glicerol residual, para finalmente ser alicuotado. Las células electrocompetentes se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.1.7. Transformación de células electrocompetentes

Se mezcló 0.2 µL del producto de PCR (digerido con *DpnI*) con 20 µL de células electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3). La electroporación se realizó en el equipo *Cell-Porator® Electroporation System* (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en las siguientes condiciones: 420V, 330 µF, baja impedancia, una tasa de carga rápida y un tiempo máximo de 2.5 ms. A las células transformadas se les agregó 1 mL de medio LB y se incubaron a 37°C durante 1 h, con agitación de 200 rpm. Luego, se concentraron las células mediante centrifugación durante 1 min y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en el sobrenadante remanente. Las bacterias se sembraron en placas de LB agar estériles con carbenicilina 100 µg/mL como medio de selección para la posterior recuperación de clones transformados. Las placas se incubaron a 37°C durante 16 h.

3.1.8. Organización de las bibliotecas

Se tomaron 176 colonias de bacterias transformadas con producto de mutagénesis para obtener las diferentes bibliotecas (conjunto de bacterias que contienen el gen mutado en un codón). Estas bibliotecas se cultivaron en placas Deep Well de 96 pocillos, con 300 µl de medio TB en cada pocillo, dejando una columna exclusivamente para el control (Xilanasas "310B"). Estas se almacenaron a -80°C como placas madres con glicerol 25%, para la posterior expresión y recuperación de los clones positivos.

3.2. Seleccionar la mejor mutante termoestable mediante una búsqueda en las bibliotecas a través de ensayos enzimáticos

3.2.1. Expresión de las bibliotecas

Se replicó cada placa madre en una nueva placa Deep Well con 300 µL de medio TB con ampicilina (100 µg/mL) en cada pocillo. Se incubó a 37°C y 400 rpm por 24 h. Con 20 µL de este cultivo se inoculó otra placa Deep Well que contiene 300 µL de medio TB y carbenicilina (100 µg/mL). Se incubó a 37°C y 400 rpm por 2.5 h. Se agregó IPTG hasta una concentración de 0.7 mM en cada pocillo y se incubó a 18°C y 400 rpm por 40 h.

3.2.2. Preparación del sustrato

Todos los ensayos enzimáticos se realizaron con sustrato xilano soluble de abedul (birchwood xylan, SIGMA). Se disolvió xilano de abedul a una concentración de 50 mg/mL en un amortiguador Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0, a temperatura ambiente con agitación durante 1 h, luego se centrifugó la solución a 10.000 *x g* por 30 min y el sobrenadante correspondió a la fracción soluble del xilano. Para medir la concentración de xilano soluble, las muestras fueron secadas en una estufa a 50°C por 48 h y se calculó en gramos los pesos secos de xilano en la solución.

3.2.3. Preparación de DNS (ácido dinitrosalicílico)

Para los ensayos de actividad xilanolítica se utilizó el método de DNS el cual se basa en la reacción de este con los azúcares reductores producidos en la reacción. Para 100 mL de reactivo DNS se agregó 1 g de ácido DNS, 20 mL de NaOH 2 N y 30 g de tartrato de sodio y potasio (sales de Rochelle).

3.2.4. Ensayo rápido de termoestabilidad

Se centrifugó las placas a 3.000 rpm por 45 min a 4°C y se utilizó el sobrenadante en una dilución adecuada para los ensayos.

La actividad xilanolítica se ensayó por 20 min a 20°C utilizando como sustrato xilano soluble de abedul en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0 (ensayo sin shock térmico). Por otro lado, se ensayó los mismos clones con una incubación previa

de 7 min a 40°C (shock térmico), la placa se enfrió rápidamente utilizando hielo y luego se ensayó de la misma forma que los anteriores.

Para ambos casos se ensayó 50 µL de sobrenadante diluido, mezclados con 50 µL de sustrato. Se detuvo la reacción con 100 µL de DNS, incubando a 100°C por 10 min. Luego, se midió la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 550 nm.

La temperatura de 40°C utilizada en el shock térmico se determinó en estudios previos en la Xilanasa L nativa realizados en el mismo centro de investigación.

3.2.5. Selección de clones positivos

Se determinó la actividad xilanolítica relativa utilizando la absorbancia de cada clon luego del ensayo sin shock térmico y se dividió por el promedio de la absorbancia del ensayo sin shock del control. Los clones con baja actividad relativa se descartaron por ser clones inactivos. Se obtuvo la actividad residual para cada clon calculando el cociente entre la absorbancia obtenida del ensayo con las muestras sometidas a shock térmico y la absorbancia del ensayo de las mismas muestras sin shock térmico multiplicado por 100. Se consideró significativo el aumento al obtener un valor mayor a 2 veces la desviación estándar por sobre el promedio de actividad residual del control (actividad residual control + 2σ). Se escogieron los mejores clones de cada biblioteca para realizar el mismo ensayo en cuadruplicado y así descartar falsos positivos.

Luego de eliminar los falsos positivos, se seleccionaron los clones que presentaron mayor actividad residual (2 clones por biblioteca) y se realizó un cultivo de mayor tamaño para evaluar la termoestabilidad de cada uno.

3.2.6. Evaluación mediante curva de termoestabilidad

Se inoculó 4 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Con este precultivo se inoculó 10 mL de medio TB con carbenicilina 100 µg/mL hasta llegar a una OD₆₀₀ inicial de 0.05. Se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6. Luego, se agregó IPTG hasta una concentración de 0.7 mM y se incubó a 18°C y 200 rpm por 40 h.

Se utilizó el sobrenadante para realizar una curva de termoestabilidad de las variantes y del control. Se determinó la T₅₀⁷ de cada una. La T₅₀⁷ se define como la temperatura a la cual, después de haber incubado por 7 min, pierde el 50% de actividad catalítica (actividad residual 50%). Se incubó las muestras en gradiente entre 30°C a 50°C por 7 min (shock térmico). Luego de enfriar las muestras, se ensayaron a 20°C por 20 min. Por otro lado, se midió la actividad de los clones sin shock térmico utilizando la misma temperatura y tiempo de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. Se calculó la actividad residual para cada temperatura y a partir de una regresión polinomial de tercer grado se determinó la temperatura a la cual se alcanzaba el 50% de actividad residual. Se seleccionó la variante que presentó mayor T₅₀⁷.

3.3. Caracterizar bioquímicamente la mejor variante de Xilanasa L luego de la mutagénesis de saturación y compararla con la enzima templado

Se realizó un cultivo bacteriano de mayor volumen de las cepas de *E. coli*, que contienen el plasmidio pET-22b(+) con las variantes de Xilanasa L, para expresar periplasmáticamente las enzimas Xilanasa L nativa, Xilanasa 310B y Xilanasa DM1 y

así determinar sus parámetros cinéticos. También se realizó un control negativo con el vector pET-22b(+) que no contiene el gen de xilanasas.

Para cada caso se inoculó 4 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. Luego, con este preinóculo se inoculó 250 mL de medio TB con carbenicilina (100 µg/mL) hasta llegar a una OD₆₀₀ inicial de 0.05. Se incubó a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.6. Luego, se agregó IPTG hasta una concentración de 0.7 mM y se incubó a 18°C y 200 rpm por 22 h.

3.3.1. Obtención de las fracciones celulares

Los cultivos se centrifugaron a 5.000 x g por 10 min a 4°C. El sobrenadante corresponde al medio extracelular. El precipitado obtenido se resuspendió en 0.1 volúmenes (con respecto al cultivo), de una solución Tris/HCl 30 mM, sacarosa 20% (p/v), pH 8.0. Luego, se agregó EDTA 0.5 M pH 8.0 a una concentración final de 1 mM y se agitó lentamente durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 10.000 x g por 15 min a 4°C. El sobrenadante corresponde al lavado de la fracción periplasmática. El precipitado se resuspendió en 0.1 volúmenes de MgCl₂ 5 mM. Finalmente, se centrifugó a 10.000 x g por 15 min a 4°C y se recuperó el sobrenadante, que corresponde a la fracción periplasmática.

Al no poder purificar la nueva xilanasas, se trabajó con el periplasma de todos los cultivos bacterianos (Xilanasas L, Xilanasas 310B y Xilanasas DM1). En esta fracción celular, a 24 h de inducción, está contenido el 100% de la actividad enzimática¹³.

Se realizó un zimograma de las fracciones periplasmáticas y el lavado de esta para observar la pérdida de material de interés en el proceso.

3.3.2. Zimograma de xilanasas

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12.5% de acuerdo a los procedimientos estándares, pero se reemplazó el agua de la mezcla por xilano soluble de abedul 0.0158 g/mL. Las muestras de proteína se mezclaron en una proporción 1:1 con el amortiguador de muestra 2X (Tris/HCl 125 mM, glicerol 20% (v/v), SDS 4% (p/v), azul de bromofenol 0.005% (p/v), pH 6.8). Luego de mezclar las muestras con el amortiguador, se cargaron en el gel. La electroforesis del gel se realizó igual que la electroforesis normal de proteínas, pero la cámara se introdujo en un contenedor con hielo para no desnaturar las proteínas por el calor. Luego de la electroforesis, el gel se incubó con Tritón X-100 1% (v/v) por 15 min en agitación lenta. Posteriormente, se dejó incubando toda la noche a 4°C en un amortiguador adecuado para la actividad xilanolítica (Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0). Finalmente, para visualizar las bandas, se realizó una tinción con Rojo Congo al 0.2% (p/v) y destinción con NaCl 1 M.

3.3.3. Secuenciación de DNA y análisis de secuencias

El DNA plasmidial se envió a secuenciar a MacroGen S.A. (Korea). Las secuencias se ensamblaron utilizando el programa Omega 2.0 (Rainbow Sentinel/LM, Rainbow Technologies, Inc.).

3.3.4. Curvas de progreso

Mediante una curva estándar de concentración de xilosa se calculó, a partir de la absorbancia, la concentración de producto liberado en cada reacción en $\mu\text{moles/mL}$.

Primero se realizó una curva de progreso para cada enzima utilizando sustrato xilano soluble de abedul y así, determinar las diluciones y el tiempo de reacción adecuado para las siguientes mediciones.

3.3.5. Temperatura óptima

Se determinó la temperatura óptima en un rango de 5°C a 65°C para ambas enzimas, midiendo azúcares generados durante 4 min de reacción utilizando como sustrato xilano soluble de abedul en una concentración final de 7.89 mg/mL en amortiguador Tris/HCl 50 mM , CaCl_2 2 mM , pH 8.0 . La temperatura óptima se define como la temperatura a la cual se consigue la mayor actividad xilanolítica bajo las condiciones de ensayo.

3.3.6. pH óptimo

El pH óptimo se determinó en un rango entre 4 y 11, con ensayos a 20°C , usando amortiguador Britton-Robinson 40 mM (ácido bórico 40 mM , ácido acético 40 mM y ácido fosfórico 40 mM) más CaCl_2 2 mM . El pH óptimo se define como el pH al cual se consigue la mayor actividad xilanolítica bajo las condiciones de ensayo.

3.3.7. Determinación de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato

Se construyeron curvas de progreso de la reacción en el rango lineal para 5 concentraciones distintas de sustrato xilano soluble de abedul. Se trabajó a una temperatura de 35°C. La pendiente de la curva corresponde a la velocidad inicial (V_i) en cada caso.

3.3.8. Cálculo de constantes V_{max} y K_m

Con las velocidades iniciales para cada concentración de sustrato xilano soluble de abedul es posible calcular la velocidad máxima (V_{max}) y constante de Michaelis–Menten (K_m). Se utilizó la gráfica de los dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) donde se representa $1/[Sustrato]$ vs $1/V_i$ y se realiza una regresión lineal. A partir de esta regresión, V_{max} corresponde al inverso del intercepto y K_m corresponde a la multiplicación de la pendiente por V_{max} .

3.3.9. Determinación de T_{50} ⁷

Para las curvas de termoestabilidad, a diferencia de la Sección 3.2.6, se utilizó la fracción periplasmática de cada cultivo bacteriano y la reacción enzimática fue a menores tiempos.

Se incubó las muestras en gradiente entre 30°C a 50°C por 7 min (shock térmico). Luego de enfriar las muestras, se ensayaron a 20°C por 4 min (rango lineal de la reacción). Por otro lado, se midió la actividad de los clones sin shock térmico utilizando la misma temperatura y tiempo de ensayo. Todos los ensayos se realizaron en duplicado. Se calculó la actividad residual para cada temperatura y, a partir de una regresión polinomial de tercer grado, se determinó la temperatura a la cual se alcanzaba el 50% de actividad residual (T_{50}^7).

4. RESULTADOS

Los residuos escogidos para la mutagénesis por saturación fueron los que presentaron mayor valor RMSD en el estudio de dinámica molecular a partir de un modelo por homología. Un alto valor RMSD refleja un sitio flexible que deberá ser rigidizado para aumentar la termoestabilidad. Se escogieron 9 residuos en el dominio catalítico y se utilizó partidores con la degeneración NNK para saturar cada posición.

4.1. Obtener bibliotecas de variantes de Xilanasas L mediante mutagénesis por saturación de los aminoácidos con mayor grado de movilidad

4.1.1. Mutagénesis de saturación

Con el fin de crear una familia de variantes se realizó una amplificación por PCR con partidores con degeneración NNK (detallados en sección 2.4) para la saturación de los sitios escogidos. Se obtuvo producto de amplificación en 8 de las 9 reacciones de PCR, los cuales se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (Figura 4).

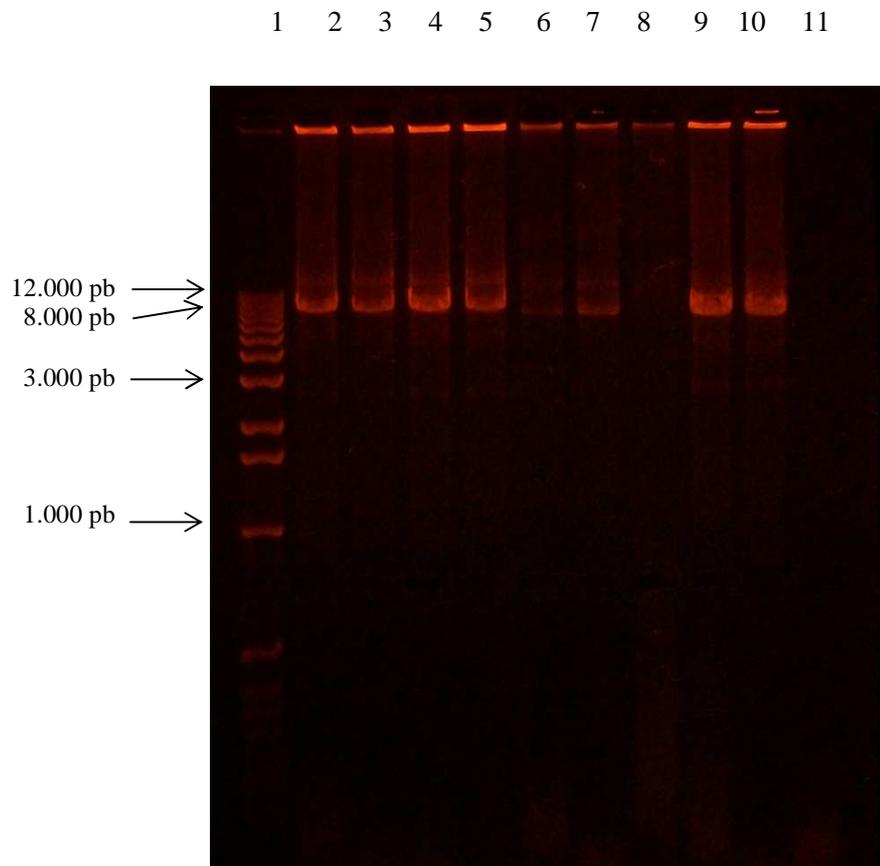


Figura 4. Análisis electroforético en gel de agarosa 1% para los productos de PCR con partidores con degeneración NNK.

DNA Ladder 1 kb (1). Producto de PCR utilizando los partidores DM1 (2), DM2 (3), DM3 (4), DM4 (5), DM5 (6), DM6 (7), DM7 (8), DM8 (9), DM9 (10), y un control negativo (11).

Se observó bandas de aproximadamente 8.000 pb que coinciden con la masa del vector pET-22b(+) sumado al gen de xilanasa. Se logró producto de amplificación para 8 pares de partidores.

Se digirió cada producto de PCR con la endonucleasa *DpnI* (Invitrogen) por 3 h para eliminar el templado. Luego, se transformó *E. coli* BL21 (DE3) con los productos de PCR mediante electroporación. Se organizó cada biblioteca en 2 placas Deep Well de 96 pocillos con medio de cultivo TB. Se reservó una columna exclusivamente para el

control de *E. coli* BL21 (DE3) que porta el vector templado, pET-22b(+) con el gen de Xilanasa 310B.

4.2. Seleccionar la mejor mutante mediante una búsqueda a través de ensayos enzimáticos

Se cultivaron las bibliotecas y se indujo por 40 h la expresión de las variantes de xilanasa. Se utilizó el sobrenadante de cada cultivo para la búsqueda de termoestabilidad mediante ensayos enzimáticos con sustrato xilano soluble de abedul.

4.2.1. Selección de clones positivos

Luego de realizar los ensayos enzimáticos se calculó los valores de actividad relativa con respecto al control y actividad residual para cada clon a partir de las absorbancias obtenidas a 550 nm. Se ordenaron de menor a mayor actividad relativa, los resultados de una de las placas representativa (DM1) se presenta en la Figura 5.

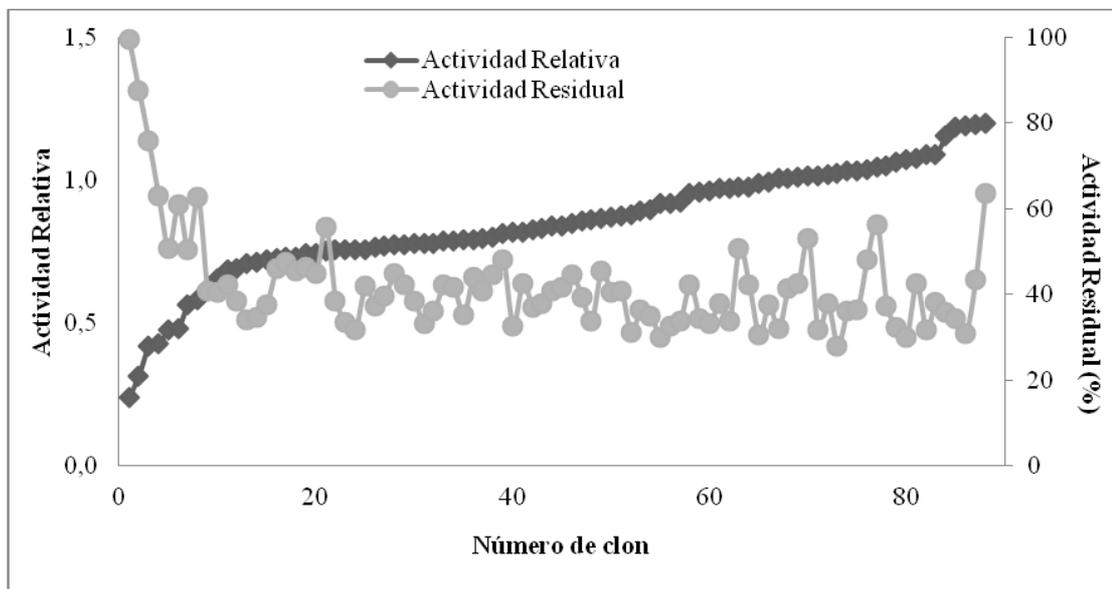


Figura 5. Actividad relativa y residual para placa de la biblioteca DM1.

Se calculó la actividad relativa utilizando la absorbancia de cada clon luego del ensayo sin shock térmico y se dividió por el promedio de la absorbancia del ensayo sin shock del control.

Se seleccionaron los clones que presentaron una actividad residual significativamente mayor que la actividad residual del control. Como ya se mencionó en la sección “Métodos”, se consideró que un aumento de 2 veces la desviación estándar (actividad residual del control + 2σ) era suficiente para considerar que el aumento se debe a un cambio real del comportamiento de la enzima frente al shock térmico. Ya que se obtuvo gran cantidad de clones que cumplían este requisito, se seleccionaron los que presentaron los valores más altos.

4.2.2. Curvas de termoestabilidad

Luego de realizados los cuadruplicados para eliminar falsos positivos y haber elegido los 2 mejores clones para cada biblioteca, se realizó cultivos de mayor volumen y se evaluó la termoestabilidad de la enzima templado y las variantes en la fracción

extracelular, determinando la actividad residual para cada temperatura. Las Figuras 6 y 7 muestran la de dos casos.

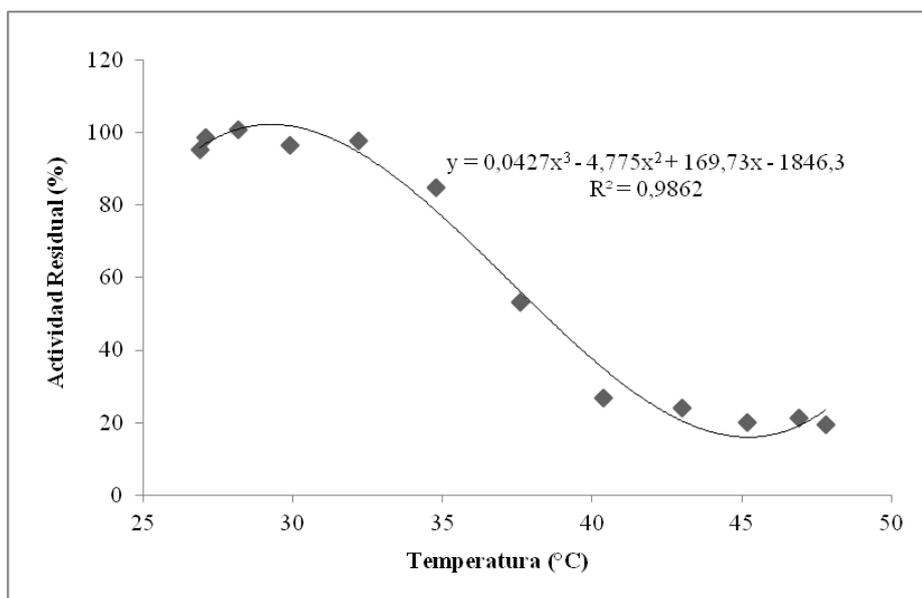


Figura 6. Curva de termoestabilidad para la enzima 310B.
Preincubación de 7 min a distintas temperaturas y reacción por 20 min a 20°C y pH 8.0.

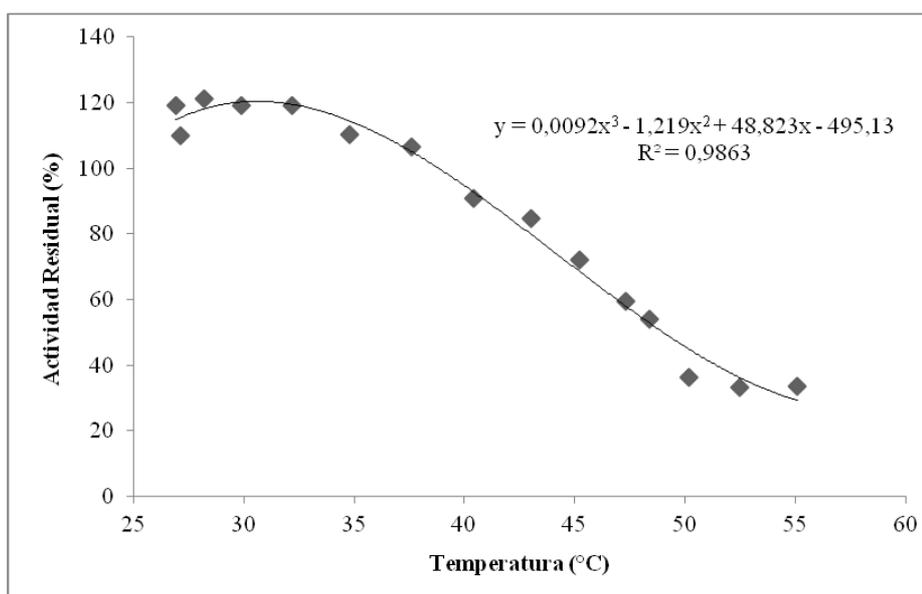


Figura 7. Curva de termoestabilidad para un clon positivo de la biblioteca DM1 (DM1 2 C1).
Preincubación de 7 min a distintas temperaturas y reacción por 20 min a 20°C y pH 8.0.

A partir de estas curvas es posible determinar la T_{50}^7 de cada variante, que es la temperatura a la cual se alcanza el 50% de actividad residual luego de un shock térmico de 7 min. Se determinó que la T_{50}^7 para 310B y un clon positivo de la biblioteca DM1 (DM1 2 C1) es 38°C y 50°C, respectivamente. Se encontró aumentos menores en la T_{50}^7 de otros clones (Tabla 2). El mejor clon obtenido fue DM1 2 C1 (el cual llamaremos **DM1**).

Tabla 2. T_{50}^7 de los clones positivos para termoestabilidad.

T_{50}^7 para los mejores clones de cada biblioteca, la biblioteca DM5 no presentó clones positivos.

Clon	T_{50}^7 (°C)
310B	38
DM1 2 C1	50
DM1 2 F3	43
DM2 1 G2	40
DM2 2 G5	40
DM3 1 E4	38
DM3 2 E1	39
DM4 1 E12	38
DM4 1 H10	39
DM4 1 C12	38
DM6 1 A8	40
DM6 1 B3	38
DM6 1 H10	40
DM8 2 C10	42
DM8 2 D1	41
DM9 1 A1	40
DM9 1 A11	39
DM9 1 A12	39

4.3. Caracterizar bioquímicamente la mejor variante de Xilanasa L luego de la mutagénesis de saturación y compararla con la enzima templado

4.3.1. Zimograma de xilanasas

Se realizó un zimograma del periplasma de los cultivos finales del control negativo (vector pET-22b(+)) sin el gen de xilanasa), Xilanasa L nativa (*Wild type*), Xilanasa 310B y clon DM1. Se incluyó el lavado del periplasma para observar la pérdida de xilanasa en el proceso de separación de fracciones (Figura 8).

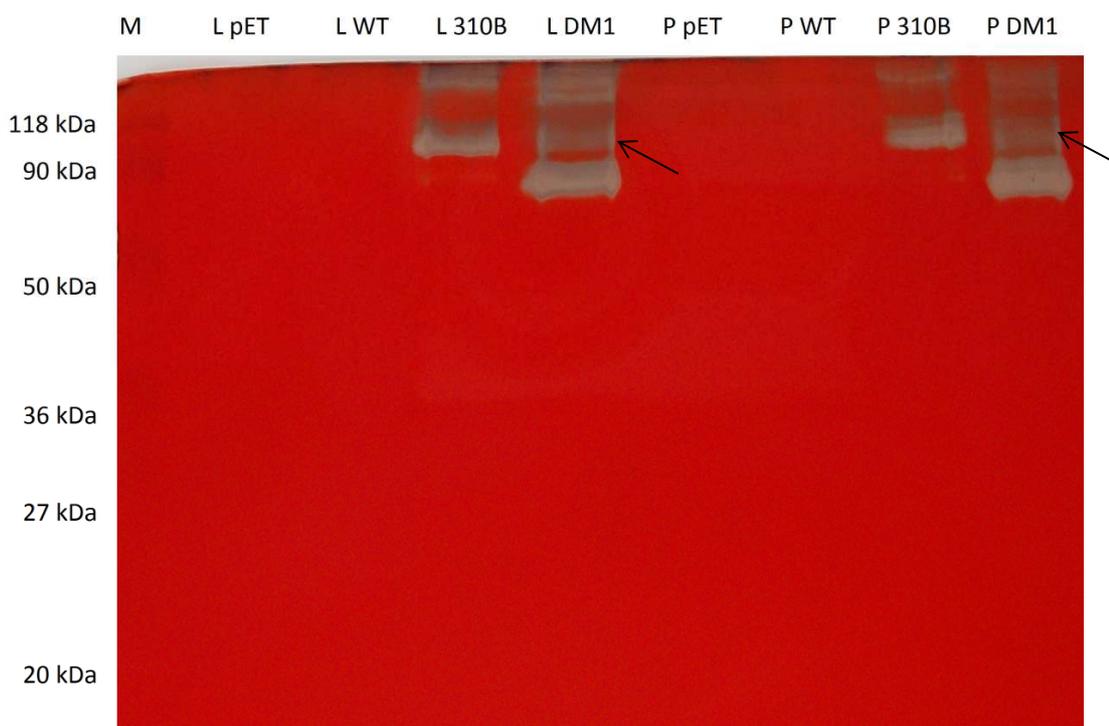


Figura 8. Zimograma de fracciones obtenidas a partir de un cultivo de Xilanasa L, Xilanasa 310B y clon DM1.

Fracciones lavado (L) y periplasma (P) de un cultivo de *E. coli* BL21(DE3) que contiene vector pET-22b(+) sin el gen de la xilanasa (pET), Xilanasa L nativa (WT), Xilanasa 310B y el clon positivo DM1. Las flechas indican bandas de mayor masa molecular que la banda principal.

En la zimografía se observa que la Xilanasas DM1 posee menor masa molecular que su templado, sugiriendo que durante la mutagénesis el gen pudo haber sufrido alguna modificación que produce una proteína más pequeña que la no mutada (310B). Además, se observan una banda de menor intensidad que corresponde al peso de la enzima 310B, lo que sugería (en un principio) que la variante DM1 estaba siendo proteolizada, formándose una banda principal (variante luego de la proteólisis) y una banda secundaria (variante sin sufrir proteólisis).

En la secuenciación se observó la formación de un codón de término en el gen de la enzima DM1, lo que produce la pérdida de su extremo C-terminal, es por esta razón que la banda principal se observa a menor masa molecular. Con esto queda descartada la idea de proteólisis de la variante. Es posible que la banda secundaria sea producto de una contaminación con un clon distinto en la muestra DM1 o una mala manipulación al cargar las muestras.

Se observa una gran pérdida de xilanasas en la fracción de lavado de periplasma, lo que puede deberse a la agitación brusca en presencia de EDTA en ésta etapa.

La Xilanasas L nativa no mostró actividad, por lo que es probable que no se expresara en cantidades adecuadas para observar un halo de degradación de xilano. Por esta razón sólo se caracterizó la enzima templado 310B y el clon DM1. Los cultivos que contenían el vector pET-22b(+) sin el gen de xilanasas no mostraron actividad frente a xilano soluble de abedul en ninguna de sus fracciones.

4.3.2. Secuenciación de la nueva variante

El gen que codifica la variante DM1, identificada en el proceso de *screening* como una variante termoestable, se secuenció para conocer los cambios introducidos en la mutagénesis. Se realizó un alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la Xilanasa 310B y DM1 en el servidor EMBL-EBI (Figura 9). A partir de este alineamiento, se observó que la nueva variante DM1 posee la mutación G1917A. Luego, se obtuvo la secuencia aminoacídica derivada de la secuencia de DNA de la Xilanasa 310B y la variante DM1, y se realizó un nuevo alineamiento (Figura 10).

```
Gen_Xilanasa310B      TTTGAAGCCGGACTTGATTCCITGGCAAGCGCGTGGCAGTGCAAGCATAACCTTAGAGTCA 1860
Gen_XilanasaDM1      TTTGAAGCCGGACTTGATTCCITGGCAAGCGCGTGGCAGTGCAAGCATAACCTTAGAGTCA 1860
*****

Gen_Xilanasa310B      ACCCAAGCTCATAGCGGTAATAATAGCGCTTTAGTACAAGGGCGAACTGAAACGTGGPAT 1920
Gen_XilanasaDM1      ACCCAAGCTCATAGCGGTAATAATAGCGCTTTAGTACAAGGGCGAACTGAAACGTGAPAT 1920
*****

Gen_Xilanasa310B      GGGTTACAAAAGGATGTAAAAGGCTTATTTACAGCAGATAAAACCTATAACGTATCTGCA 1980
Gen_XilanasaDM1      GGGTTACAAAAGGATGTAAAAGGCTTATTTACAGCAGATAAAACCTATAACGTATCTGCA 1980
*****
```

Figura 9. Alineamiento de secuencias nucleotídicas de la Xilanasa 310B y DM1.

Se muestra el alineamiento de la región donde se produce la mutación.

```

Xilanasa310B      MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTFVPEPILEVVAPDTPEPEAPIAAEITNG 60
XilanasaDM1      MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTFVPEPILEVVAPDTPEPEAPIAAEITNG 60
*****

Xilanasa310B      GFEEDTAGQTFVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW 120
XilanasaDM1      GFEEDTAGQTFVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW 120
*****

Xilanasa310B      GIEIAYEDLPITGGKNYEFSVWAKGEEGTSADFWIQT PAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT 180
XilanasaDM1      GIEIAYEDLPITGGKNYEFSVWAKGEEGTSADFWIQT PAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT 180
*****

Xilanasa310B      LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK 240
XilanasaDM1      LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK 240
*****

Xilanasa310B      ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTII EQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD 300
XilanasaDM1      ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTII EQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD 300
*****

Xilanasa310B      SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD 360
XilanasaDM1      SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD 360
*****

Xilanasa310B      NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTDDSADESVWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL 420
XilanasaDM1      NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTDDSADESVWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL 420
*****

Xilanasa310B      YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNGVPIIDGIGFQSHISLNSPDISTIQAHLQKVVDI 480
XilanasaDM1      YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNGVPIIDGIGFQSHISLNSPDISTIQAHLQKVVDI 480
*****

Xilanasa310B      RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLTSERADEQKQYYDVKTYLETVPEDQRGGITIW 540
XilanasaDM1      RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLTSERADEQKQYYDVKTYLETVPEDQRGGITIW 540
*****

Xilanasa310B      GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLFNDFTAKPALQGFANALKELIEVVQPAPSSSELLTNGD 600
XilanasaDM1      GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLFNDFTAKPALQGFANALKELIEVVQPAPSSSELLTNGD 600
*****

Xilanasa310B      FEAGLDSWQARGASASITLSTQAHSGNNSALVQGRTEIWNGLQKDVKGLFTADKTYNWSA 660
XilanasaDM1      FEAGLDSWQARGASASITLSTQAHSGNNSALVQGRTEI----- 638
*****

Xilanasa310B      WVKLSDDISTVSPDIKLTILQIEHTSTEYLELIPVITVAAGEWVQLSGTYTHSITTQESAA 720
XilanasaDM1      -----

Xilanasa310B      LLYVESSELTADFVYDDVSVTLVLEHHHHHH 752
XilanasaDM1      -----

```

Figura 10. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de la Xilanasa 310B y DM1.

Se observa la formación de un codón de término de la traducción TGA (Trp639Stop) por lo que la proteína obtenida a partir del clon DM1 posee 638 residuos aminoacídicos, 114 residuos menos que la enzima templado. Se perdió aproximadamente dos tercios de uno de los dominios de unión a carbohidratos y la cola de histidinas que permitía su

purificación por lo que se debió trabajar con la enzima sin purificar en la fracción periplasmática.

A partir de la secuencias es posible calcular la masa molecular teórica de la enzima 310B y DM1 resultando 83.15 kDa y 70.42 kDa respectivamente.

4.3.3. Curvas de progreso

Se construyeron curvas de progreso de la reacción catalizada por las xilanasas 310B y DM1. Los resultados se presentan en las Figuras 11 y 12. A raíz de estos resultados se utilizó un tiempo total de 4min para las siguientes mediciones ya que la liberación de xilosa se encuentra en una relación lineal con el tiempo de reacción (rango lineal). Luego de este tiempo se pierde la linealidad.

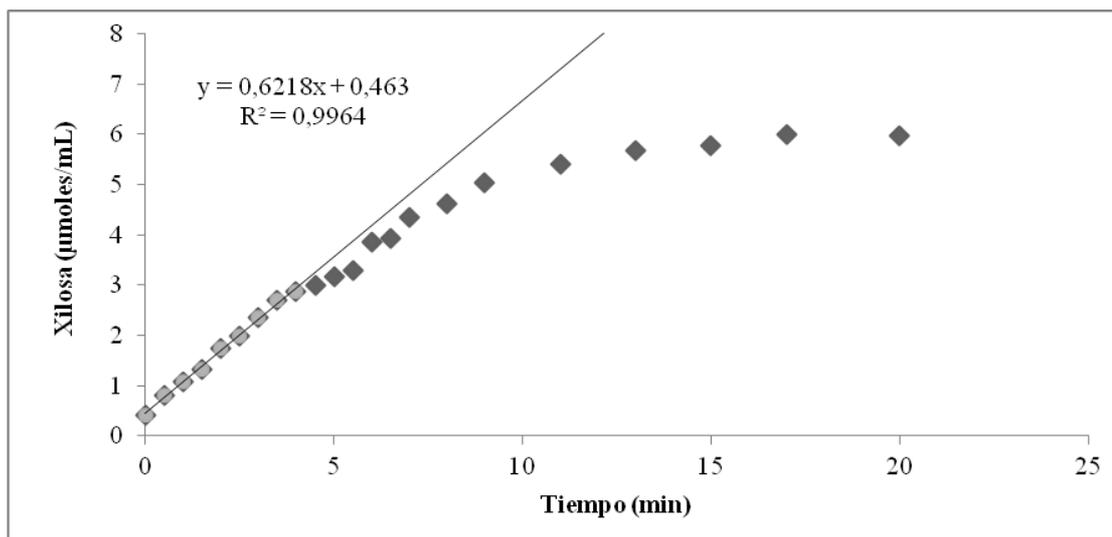


Figura 11. Curva de progreso para la enzima 310B.

Reacción con xilano soluble (7.89 mg/mL) a 35°C, en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

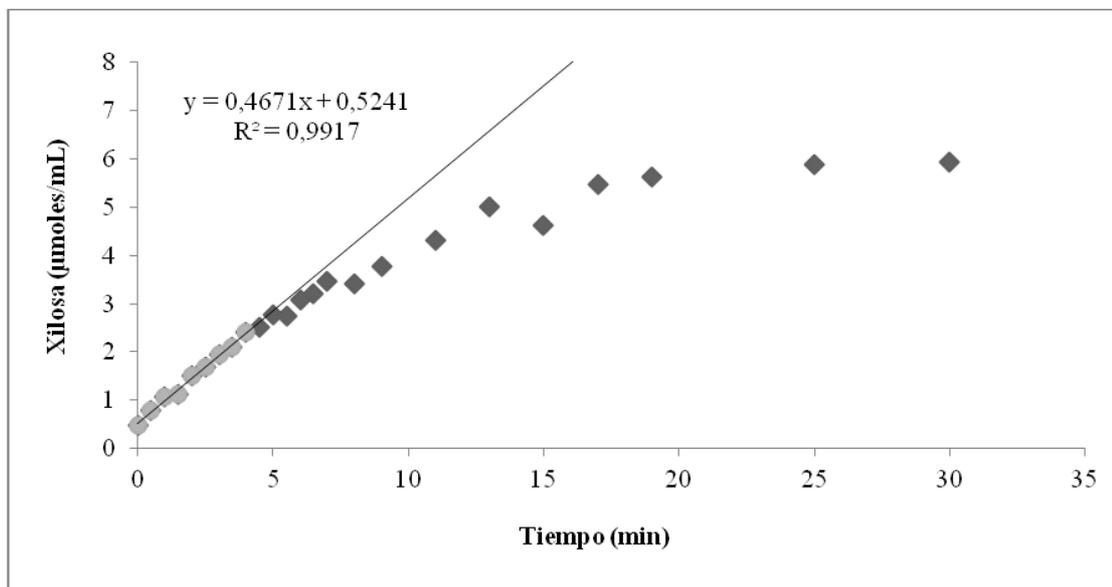


Figura 12. Curva de progreso para la enzima DM1.
 Reacción con xilano soluble (7.89 mg/mL) a 35°C, en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

4.3.4. Temperatura óptima

Se determinó la temperatura óptima en un rango de 5°C a 65°C para ambas enzimas. La reacción se realizó incubando la enzima durante 4 min con sustrato xilano soluble de abedul (7.89 mg/mL), en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0 (Figura 13). Es muy importante considerar las condiciones de ensayo ya que la temperatura óptima no es una característica intrínseca de la enzima, sino que varía al cambiar los parámetros utilizados en la reacción.

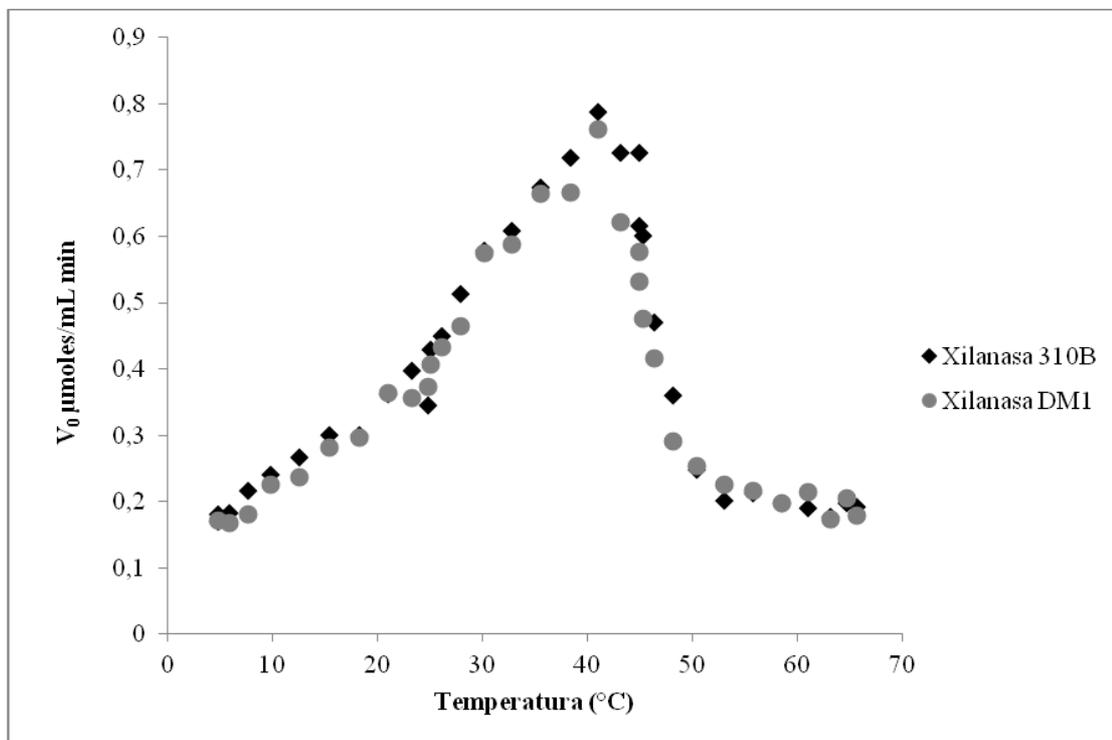


Figura 13. Temperatura óptima para la Xilanasas 310B y DM1.

Reacción de 4 min con sustrato xilano soluble (7.89 mg/mL), en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

En base a estos resultados se determinó que la temperatura óptima para ambas enzimas es 41°C. Se siguió trabajando a una temperatura de 35°C ya que a 41°C una fracción de ambas enzimas se desnatura por lo que los resultados de velocidades de reacción se verían afectadas con el efecto de termolabilidad.

4.3.5. Determinación de velocidades iniciales a diferentes concentraciones de sustrato

Se construyeron curvas de progreso en el rango lineal para distintas concentraciones de sustrato, mostrándose en la Figura 14 los resultados para la enzima 310B. Esto permitió determinar las velocidades iniciales (V_i) para cada concentración a partir de la pendiente de la curva. Se calculó la V_i para 5 concentraciones distintas de sustrato y se construyó un gráfico de Lineweaver-Burk para determinar los parámetros K_m y V_{max} .

A partir de este tipo de gráfico, se determinó la velocidad inicial de reacción (V_i) para las enzimas 310B y DM1 que corresponde a la pendiente de la curva en las curvas de progreso para cada concentración de sustrato. Los resultados se presentan en las Tablas 3 y 4.

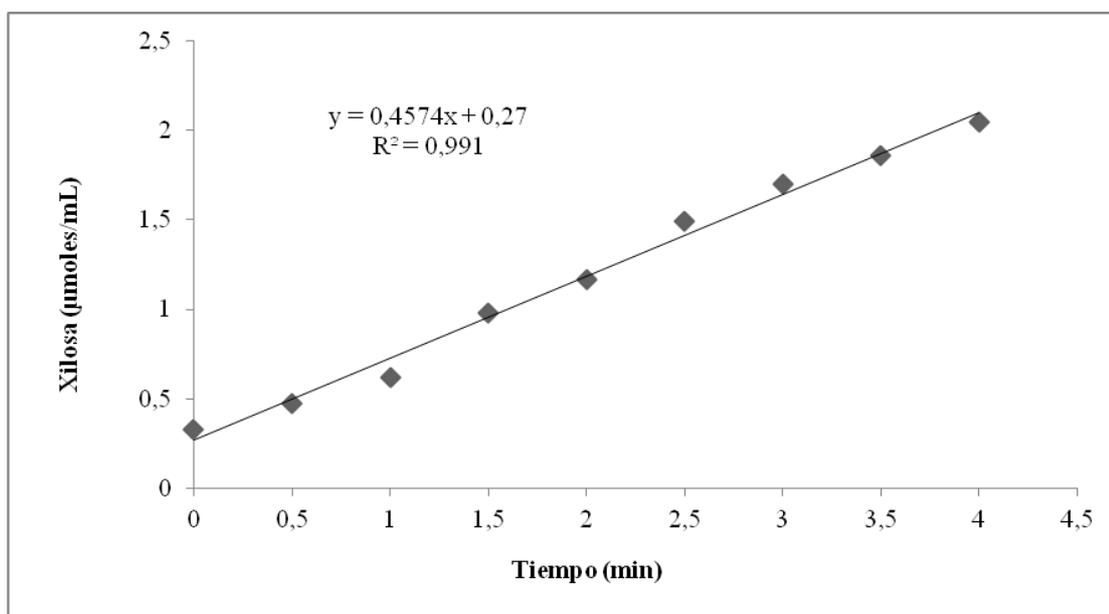


Figura 14. Curva de progreso representativa para la enzima 310B con una concentración de sustrato de 3.945 mg/mL. Reacción a 35°C y amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

Tabla 3. Velocidades iniciales para la enzima 310B a distintas concentraciones de sustrato xilano soluble.

Reacciones a 35°C en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

Xilano mg/mL	$V_i \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]$
7.89	0.079
5.26	0.073
3.94	0.068
2.63	0.056
1.97	0.05

Tabla 4. Velocidades iniciales para la variante DM1 a distintas concentraciones de sustrato xilano soluble.

Reacciones a 35°C en amortiguador Tris/HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 8.0.

Xilano mg/mL	$V_i \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL} \cdot \text{min}} \right]$
7.89	0.059
5.26	0.052
3.94	0.047
2.63	0.046
1.97	0.042

4.3.6. Cálculo de parámetros cinéticos V_{max} y K_m

Se construyó una gráfica de dobles recíprocos (Lineweaver-Burk) para las enzimas Xilanasas 310B y DM1, donde se representa $1/[Sustrato]$ vs $1/V_i$ y su regresión lineal (Figura 15). A partir de estas gráficas de dobles recíprocos, es posible obtener los parámetros cinéticos de las xilanasas 310B y DM1. V_{max} corresponde al inverso del intercepto, y K_m corresponde a la pendiente multiplicada por V_{max} . Los parámetros se encuentran detallados en la Tabla 5.

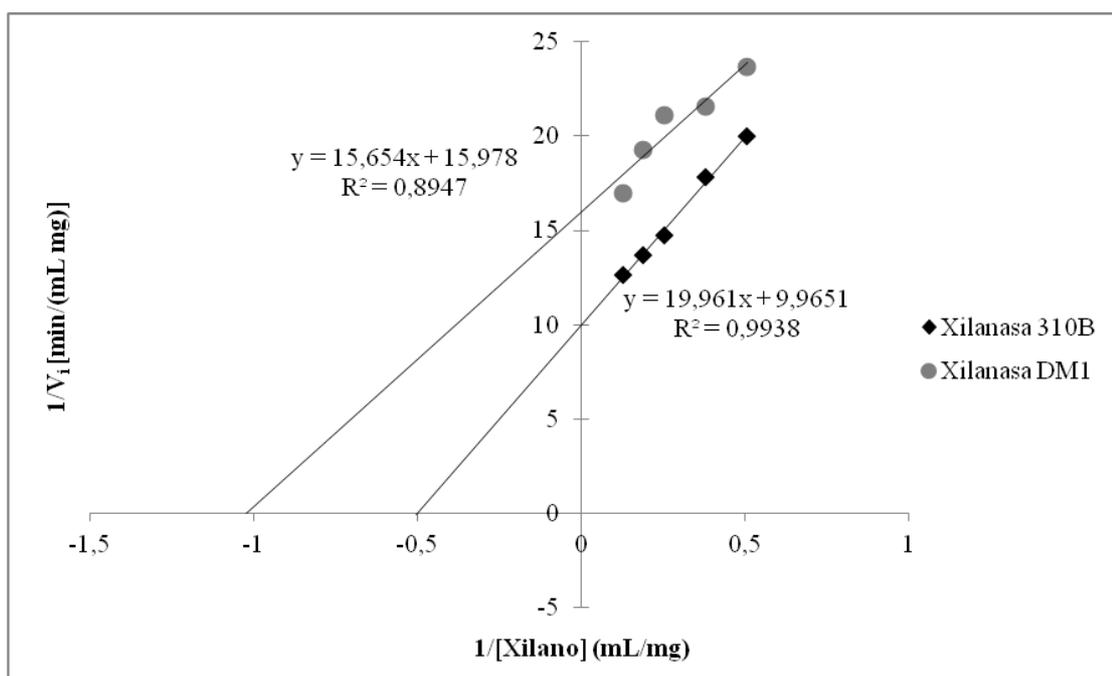


Figura 15. Gráfica de Lineweaver-Burk o dobles recíprocos para la Xilanasas 310B y Xilanasas DM1.

Tabla 5. Constantes K_m y V_{max} para enzima 310 y DM1.

Los valores se obtuvieron a partir de la gráfica de Lineweaver-Burk.

	310B	DM1
K_m (mg/mL)	2.003	0.980
V_{max} $\left[\frac{\text{mg}}{\text{mL min}} \right]$	0.100	0.063

4.3.7. pH óptimo

Se determinó el pH óptimo para la Xilanasas 310B y la variante DM1 en un rango de entre 4 y 11, usando amortiguador Britton-Robinson 40 mM más CaCl_2 2 mM. La concentración de producto obtenido luego de una reacción de 4 min a los diferentes pH se presenta en la Figura 16, donde se muestra que el pH óptimo para la enzima templado 310B es 9.2 y para la variante DM1 es 6.3.

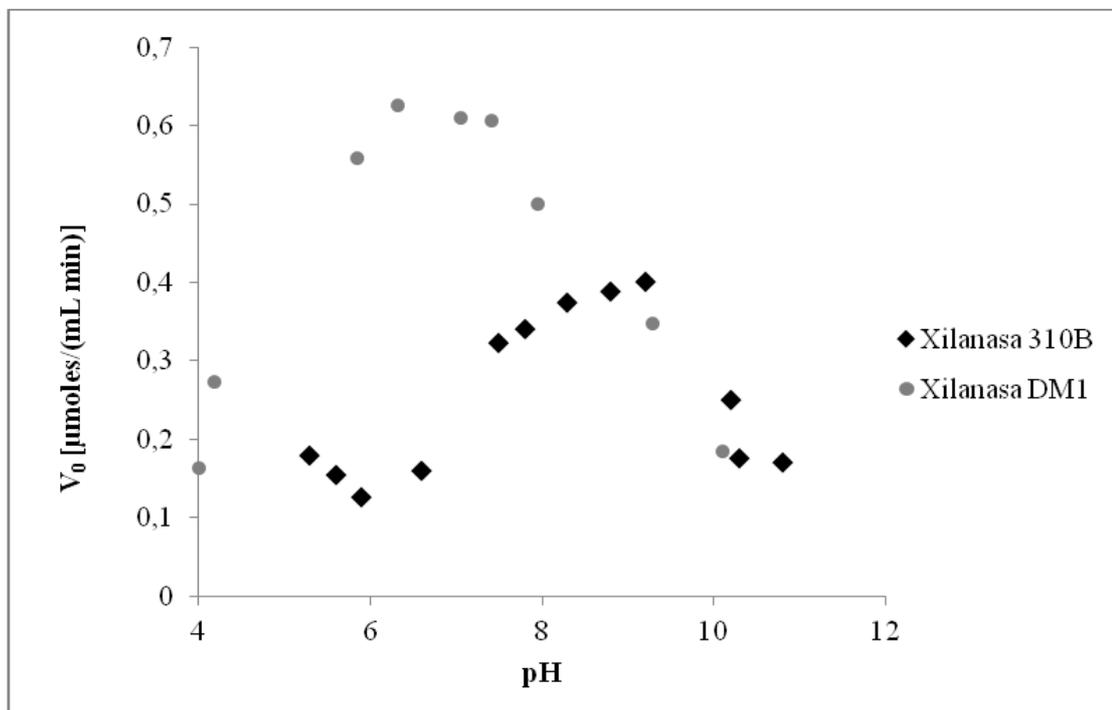


Figura 16. Curva de pH para la enzima 310B y DM1.

4.3.8. Determinación de T_{50}^7

Se construyeron curvas de termoestabilidad de la Xilanasa 310B y la variante DM1 con el fin de determinar la T_{50}^7 . A diferencia de la Sección 4.2.2, esta vez se utilizó la fracción periplasmática donde, reduciendo las horas de inducción, la enzima se obtiene más concentrada y con menos contaminantes. Además el ensayo se realizó a menor tiempo para que la liberación de xilosa se relacionara linealmente con el tiempo (diferencias en los resultados se muestran en la Tabla 6).

Se incubó las fracciones periplasmáticas de ambas enzimas por 7 min a diferentes temperaturas (shock térmico) y luego, se ensayó la actividad xilanólítica por 4 min (rango lineal de la reacción). Se calculó la actividad residual para cada temperatura que

corresponde al cociente entre la actividad luego del shock térmico y la actividad de la muestra sin shock térmico (Figuras 17 y 18).

Se determinó que la xilanasas templado 310B tiene una T_{50}^7 de 38°C, el clon DM1 tiene una T_{50}^7 de 43°C. La nueva variante DM1 aumentó su T_{50}^7 en 5°C en comparación a la enzima utilizada como templado para la mutagénesis.

Tabla 6. Diferencias en las T_{50}^7 al utilizar diferentes fracciones y distintos tiempos de reacción.

	Sobrenadante 20 min reacción (Sección 4.2.2)	Periplasma 4 min de reacción (Sección 4.3.8)
310B	38°C	38°C
DM1	50°C	43°C

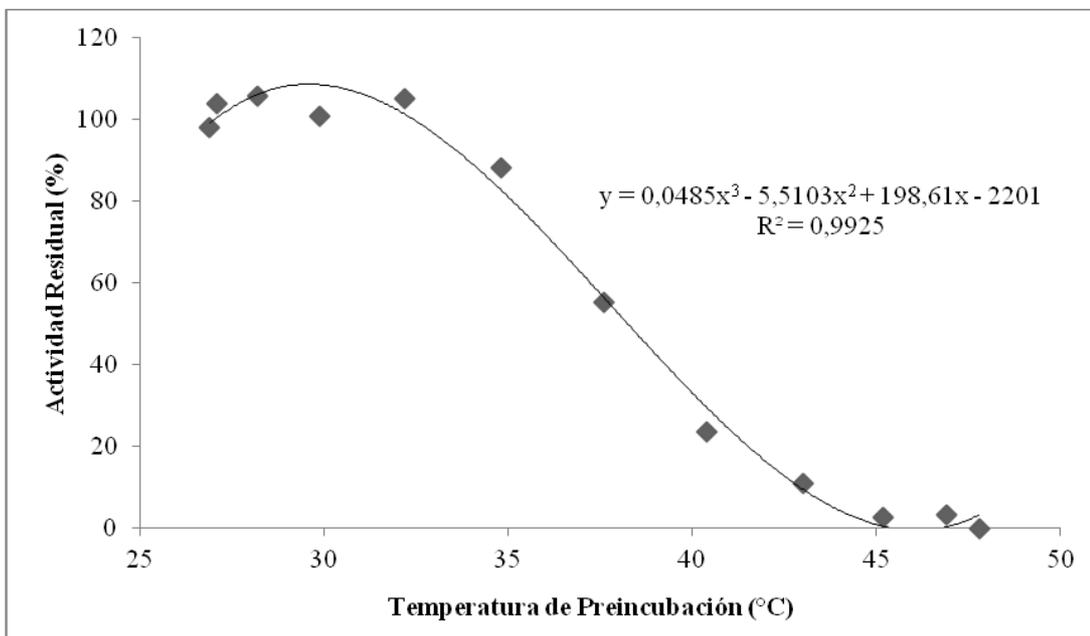


Figura 17. Curva de termoestabilidad de la xilanasa templado 310B.
 La preincubación o shock térmico se realizó por 7 min.

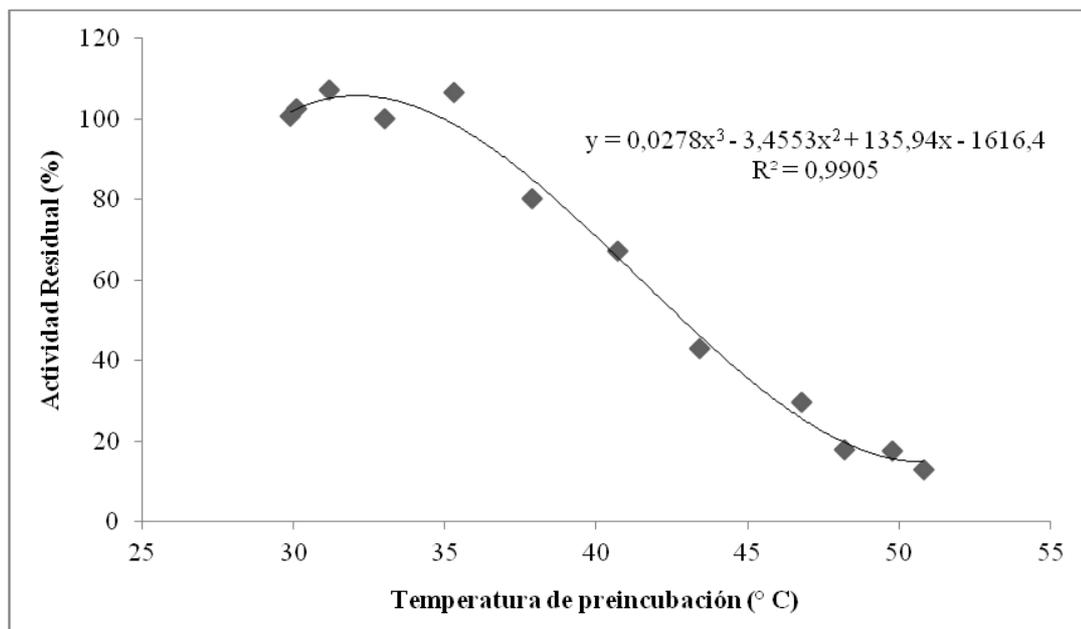


Figura 18. Curva de termoestabilidad de la variante DM1.
 La preincubación o shock térmico se realizó por 7 min.

5. DISCUSIÓN

Se eligió el método de mutagénesis por saturación para la generación de las bibliotecas por sobre otras técnicas ya que ésta presenta ventajas tanto en el tiempo de trabajo requerido para el análisis de los clones como en el tipo de resultados obtenidos. Al producir bibliotecas focalizadas se reduce el número de clones a analizar^{7,10}. El éxito de este tipo de acercamiento depende principalmente de la forma en que fueron escogidos los sitios a mutar. Es por esto que la etapa de modelamiento de la enzima a mejorar y el análisis de dinámica molecular es esencial.

En el proceso de mutagénesis se logró obtener producto en ocho de las nueve reacciones. La reacción de PCR con los partidores DM7 no generó amplificado a pesar de haberse intentado en repetidas ocasiones, lo que puede deberse a problemas en el diseño de los partidores. Ya que se contaba con un gran número de reacciones realizadas con éxito, no se le prestó mayor atención a los problemas presentados con los partidores DM7.

La utilización de una DNA polimerasa de alta fidelidad supone una baja probabilidad de que se produzcan mutaciones no deseadas (tasa de mutación de 0.1%). A pesar de esto, se generó un codón de término en un lugar distinto a los seleccionados, lo que significó la expresión de una proteína con 114 aminoácidos menos que el templado.

Luego de la búsqueda, se seleccionaron más de 100 clones positivos de todas las bibliotecas (10 o más clones positivos dependiendo de cada biblioteca). Al realizar los

cuadruplicados de los ensayos de termoestabilidad se obtuvo resultados positivos para una gran cantidad de variantes. Para realizar los cultivos de mayor volumen se seleccionaron máximo 3 clones (los que presentaron mayor actividad residual) por biblioteca, debido a la dificultad de controlar la densidad óptica de cada cultivo antes de la inducción y así lograr expresar las proteínas en igualdad de condiciones.

Como se trabajó con un gran número de clones (16 clones más los controles Xilanasas 310B) se utilizó el sobrenadante de los cultivos para la construcción de curvas de termoestabilidad, ya que la obtención de esta fracción es rápida y sencilla. Se observó una gran diferencia en los valores de T_{50} ⁷ obtenidos al realizar el mismo análisis en la fracción periplasmática y a menores tiempos de reacción (rango lineal).

Se encontró otros clones que presentan mayor termoestabilidad que la Xilanasas 310B, con diferencias de hasta 5°C en esta etapa preliminar. Estos clones podrían ser utilizados para evaluar la efectividad del método de selección de residuos termolábiles y para continuar la mejora de la Xilanasas L sin la pérdida del dominio de unión a carbohidratos.

Al realizar el zimograma de xilanasas se observó actividad en la Xilanasas 310B y la variante DM1. No se detectó actividad en la Xilanasas L nativa probablemente por estar en menor concentración y/o ser 3 veces menos activa que la Xilanasas 310B.

En el gel se observó una gran disminución de peso entre la Xilanasas 310B y la variante DM1. A pesar de que un zimograma no es un método apropiado para calcular el peso molecular de una proteína es posible llegar a una buena estimación²⁵. Es posible distinguir algunas bandas discretas de mayor peso en las muestras Xilanasas DM1 lavado y periplasma, La aparición de estas bandas podría deberse a contaminación con un clon

distinto en la muestra DM1 o a problemas en la manipulación al cargar las muestras en el gel, ya que se comprobó la aparición de un codón de término de la traducción.

Al obtener la secuencia aminoacídica del clon DM1 se observó la mutación Trp639Stop, lo que significó la pérdida de dos tercios de uno de los dominios de unión a carbohidratos y la totalidad de la cola de 6 residuos de histidina que permitían la purificación de la enzima. La Xilanasa DM1 no posee la mutación en el codón que se intentó mutar (Glu499, Glu261 con respecto al dominio catalítico). La delección del fragmento de 114 residuos provocó un efecto mayor en la termoestabilidad que el provocado por cualquier mutación en los residuos seleccionados.

El fragmento eliminado, según la predicción del servidor I-TASSER, es un sitio rico en estructura secundaria tipo sábana β lo que podría explicar, en parte, el efecto estabilizador frente al calor. La estructura tipo sábana β se forma por la interacción de aminoácidos lejanos (en comparación con las hélices α), unidos por “*loops*”, lo que pudieran otorgar cierta flexibilidad a la estructura y por lo tanto inestabilidad frente al calor. Al perder este sitio termolábil pudo haberse logrado una estructura más rígida y por lo tanto más estable.

Se determinó que la temperatura óptima para ambas enzimas es 41°C lo que no era esperable. Al estabilizar y rigidizar una estructura, la curva de temperatura debiera desplazarse hacia la derecha, ya que pierde la flexibilidad necesaria para su actividad a bajas temperaturas. Esto es una buena señal ya que una buena termoestabilización de una enzima psicrófila no debiera interferir en su actividad.

A pesar de haber determinado que la temperatura óptima en ambos casos era de 41°C no se trabajó a tal temperatura ya que se tenía información que a 40°C una fracción significativa de la enzima se desnatura. Al utilizar una temperatura menor es posible minimizar el efecto de desnaturación en el tiempo que podría llevar a errores en la determinación de velocidades iniciales. Es importante recordar que la temperatura óptima es altamente dependiente de las condiciones de ensayo por lo que no es una característica propia de la enzima. Los valores de temperatura óptima pueden variar de un ensayo a otro dependiendo de parámetros como el pH y tiempo de ensayo.

Al determinar los parámetros cinéticos del clon DM1 se observó una mayor afinidad con el sustrato, alcanzándose la semisaturación con la mitad de concentración de sustrato (0.980 mg/mL) en comparación con el templado 310B (2.003 mg/mL). La K_m resultó ser bastante baja tanto en la enzima templado como en el clon DM1 ya que otras xilanasas presentan valores sobre los 10 mg/mL^{9,16}. La mejora en este parámetro es confusa ya que, al perder un dominio de unión a carbohidratos se esperaría que la afinidad por estos disminuya pero, también se postula que estructuras más rígidas pueden unir mejor a su sustrato¹.

A pesar de que existen datos publicados por otros centros de investigación relativos a la constante de afinidad, no es pertinente compararlo con los resultados del presente trabajo, ya que el sustrato usado (xilano de abedul) es de una naturaleza distinta a los usados en los reportes encontrados (avena de trigo, madera de haya, arabinóxilano de centeno, etc).

La V_{\max} de la Xilanasa DM1 disminuyó en un 37% en comparación al templado. En la literatura no se reportan valores de V_{\max} para otras xilanasas utilizando el mismo sustrato.

Se determinó que el pH óptimo para la Xilanasa 310B fue 9.2 y para DM1 fue 6.3. La diferencia en los puntos de inflexión en la curva de pH denota un cambio importante en el ambiente de los residuos catalíticos.

Al realizar las curvas de termoestabilidad en las fracciones periplasmáticas, se observó un aumento en 5°C en la T_{50} ⁷ de la enzima DM1 con respecto a la Xilanasa 310B. En la etapa preliminar de selección de clones positivos se determinó que esta diferencia pudiera ser de 12°C, pero al repetir el análisis utilizando una fracción distinta y a menores tiempos se determinó que la diferencia era de 5°C. No se encontró publicaciones que reportaran casos similares. Es necesario repetir el análisis con la enzima purificada ya que es la forma en la que se usaría en la industria.

El aumento en la termoestabilidad al perder parte de su estructura primaria podría relacionarse con una menor cantidad de estructuras secundarias y terciarias que mantener frente a las alzas de temperatura. A pesar de que es sabido que cada dominio posee una cierta independencia estructural y que la pérdida de un dominio no debería influir en la estabilidad de los otros, puede ser posible que una estructura más pequeña pudiera ser más fácil de estabilizar.

Se ha descrito que las xilanasas con mayor termoestabilidad poseen mutaciones en sus extremos, mostrando que estos parecieran ser más susceptible a desnaturalización frente al calor^{26,27}.

Todas estas especulaciones debieran ser resueltas con un estudio acabado de la estructura completa de la proteína ya que sólo se posee el modelo del dominio catalítico.

El aumento de 5°C en la termoestabilidad pudiera ser un primer paso para continuar la evolución dirigida comenzando con una enzima con mayor termoestabilidad y afinidad por el sustrato.

6. CONCLUSIONES

Se logró la generación de mutantes simples mediante la técnica de mutagenesis por saturación. Dentro de las cuáles se pudo identificar mutantes termoestables mediante la búsqueda rápida a través de ensayos enzimáticos. La mutante más termoestable que resultó ser una proteína truncada (Xilanasa DM1).

Con la obtención de la Xilanasa DM1, fue posible aumentar la termoestabilidad de la xilanasa templado 310B en 5°C, a pesar de no haberse logrado la mutación en el sitio elegido. La enzima DM1 mantuvo su actividad a bajas temperaturas.

No obstante la Xilanasa DM1 posee una mayor afinidad por el sustrato, presenta una disminución en su velocidad máxima.

Se comprobó la hipótesis planteada de que es posible aumentar la termoestabilidad de la Xilanasa L, puesto que además de la Xilanasa DM1 se obtuvieron 12 clones con una mejora en su termoestabilidad.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. D'Amico S., Claverie P., Collins T., Georlette D., Gratia E., Hoyoux A., Meuwis MA., Feller G. y Gerday C. (2002) Molecular basis of cold adaptation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, 357:917–925
2. Feller G. (2002) Molecular adaptations to cold in psychrophilic enzymes. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 60:648–662
3. Chiuri R., Maiorano G., Rizzello A., Del Mercato LL., Cingolani R., Rinaldi R, Maffia M. y Pompa PP. (2009) Exploring Local Flexibility/Rigidity in Psychrophilic and Mesophilic Carbonic Anhydrases. *Biophys. J.*, 96:1586–1596.
4. Van Petegem F., Collins T., Meuwis MA., Gerday C., Feller G. y Van Beeumen J. (2003) The Structure of a Cold-adapted Family 8 Xylanase at 1.3 Å Resolution: Structural adaptations to cold and investigation of the active site. *J. Biol. Chem.*, 9:7531–7539.
5. Sonan G., Receveur-Brechot V., Duez C., Aghajar N., Czjzek M., Haser R. y Gerday C. (2007) The linker region plays a key role in the adaptation to cold of the cellulose from an Antarctic bacterium. *Biochem. J.*, 407:293–302.
6. Bae E., Bannen R. y Phillips G. (2008) Bioinformatic method for protein thermal stabilization by structural entropy optimization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 28:9594–9597.

7. Reetz M. y Carballeira JD. (2007). Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.*, 4:891-903.
8. Reetz M., Soni P. y Fernandez L. (2009) Knowledge-Guided Laboratory Evolution of Protein Thermolability. *Biotechnol. Bioeng.*, 6:1712-1717.
9. Joo JC., Pohkrel S., Pack SP. y Yoo YJ. (2010) Thermostabilization of *Bacillus circulans* xylanase via computational design of a flexible surface cavity. *J. Biotechnol.*, 146:31–39.
10. Reetz M., Kahakeaw D. y Lohmer R. (2008) Addressing the Numbers Problem in Directed Evolution. *ChemBioChem.*, 9:1797–1804.
11. Acevedo JP., Reyes F., Parra L., Salazar O., Andrews B., Asenjo JA. (2008) Cloning of complete genes for novel hydrolytic enzymes from Antarctic sea water bacteria by use of an improved genome walking technique. *J. Biotechnol.*, 133:277–286.
12. Parra L., Acevedo JP., Andrews B., Asenjo J. y Burzio LO. (2009) Protein and DNA Sequence Encoding a Cold Adapted Xylanase. U.S Patent Application No. 61/150,545.
13. Acevedo, JP. (2007) Tesis doctoral: Aislamiento y producción recombinante de nuevas proteasas bacterianas adaptadas a bajas temperaturas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas.

14. Polizeli M., Rizzatti A., Monti R., Terenzi H., Jorge J. y Amorim D. (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67:577–591.
15. Collins T., Gerday C. y Feller G. (2005) Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.*, 29: 3–23
16. Collins T., Meuwis MA., Stals I., Claeysens M., Feller G. y Gerday C. (2002) A Novel Family 8 Xylanase, Functional and Physicochemical Characterization. *J. Biol. Chem.*, 38:35133–35139.
17. Gilkes N., Henrissat B., Kilburn D., Miller R. y Warren R. (1991) Domains in Microbial beta-1,4-Glycanases: Sequence Conservation, Function, and Enzyme Families. *Microbiol. Rev.*, 2:303-315.
18. Ghaffar A., Khan S., Mukhtar Z., Rajoka M. y Latif F. (2010) Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115. *Mol. Biol. Rep.* 38:3227-33
19. Valenzuela S., Diaz P., y Pastor IJ. (2010) Recombinant Expression of an Alkali Stable GH10 Xylanase from *Paenibacillus barcinonensis*. *J. Agric. Food Chem.*, 58:4814-8

20. Gallardo O., Diaz P. y Pastor IJ. (2003) Characterization of a *Paenibacillus* cell-associated xylanase with high activity on aryl-xylosides: a new subclass of family 10 xylanases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61:226–233.
21. Henrissat B. y Bairoch A. (1996) Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. *Biochem. J.*, 316:695-696.
22. Shin YO., Wannon D., Weber M. y Vera J. (2004) Selective Precipitation and Recovery of Xylanase Using Surfactant and Organic Solvent. *Biotechnol. Bioeng.*, 86:698-705.
23. Lama L., Calandrelli V., Gambacorta A. y Nicolaus B. (2004) Purification and characterization of thermostable xylanase and β -xylosidase by the thermophilic bacterium *Bacillus thermantarcticus*. *Res. Microbiol.*, 155:283–289.
24. Miller G. (1959) Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal. Chem.*, 31:426-428.
25. Kaberdin V., McDowall K. (2003) Expanding the use of zymography by the chemical linkage of small, defined substrates to the gel matrix. *Genome Res.* 13:1961-1965.
26. Liu L., Zhang G., Zhang Z., Wang S. y Chen H. (2011) Terminal Amino Acids Disturb Xylanase Thermostability and Activity. *J. Biol. Chem.*, 52:44710–44715.

27. Feller G. y Gerday C. (1997) Psychrophilic enzymes: molecular basis of cold adaptation. *Cell Mol Life Sci.* 53:830-41.