



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

**NUEVA METODOLOGÍA BASADA EN LA OPERACIÓN EVOLUTIVA PARA  
INGENIERÍA DE PROTEÍNAS *IN SILICO***

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA  
MENCION INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

CARLOS HUMBERTO GÓMEZ RODRIGUEZ

PROFESOR GUÍA:  
JUAN ASENJO DE LEUZE DE LANCIZOLLE

PROFESOR CO-GUÍA:  
ÁLVARO OLIVERA NAPPA

MIEMBROS DE LA COMISION  
BARBARA ANNE ANDREWS FARROW  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
OCTAVIO HERNAN MONASTERIO OPAZO

Este trabajo ha sido financiado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y  
Tecnológica (CONICYT) y el CeBiB

SANTIAGO DE CHILE  
2018

**RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL**

**TITULO DE:** Doctor en ciencias de la ingeniería mención ingeniería química y biotecnología.

**POR:** Carlos Humberto Gómez Rodríguez

**FECHA:** 30/11/2018

**PROFESOR GUIA:** Juan Asenjo De Leuze De Lancizolle

**PROFESOR CO-GUIA:** Álvaro Olivera Nappa

**NUEVA METODOLOGÍA BASADA EN LA OPERACIÓN EVOLUTIVA PARA  
INGENIERÍA DE PROTEÍNAS *IN SILICO***

Proponemos la adaptación de la metodología operación evolutiva (EVOP), técnica de optimización continua usada en procesos industriales, la cual permitió identificar sitios de mutación y tipo de aminoácidos en la estructura de proteínas. A partir de modelos estructurales se determinan los efectos de las mutaciones sobre parámetros estructurales como la entropía de vibración, área de acceso al solvente (ASA), volumen, y cambios de fluctuación de los carbonos  $\alpha$ , se evaluó la interacción con el sustrato mediante la aproximación de docking molecular. Con estas herramientas se identificaron ocho mutaciones en la xilanasa antártica Xyl-L (GH 10) que condujeron a un desplazamiento de la temperatura óptima de 30°C a 57°C, con respecto a la enzima nativa, las mutaciones propuestas modificaron el equilibrio configuracional y conformacional de la estructura enzimática generando una redistribución de las cargas provocando a su vez un cambio en el pH de la actividad máxima desplazándolo de pH 7 a pH 6 con respecto a la enzima nativa, mostrando que la estabilidad térmica es el producto de la acumulación de diferentes factores estructurales, provocados por las mutaciones identificadas, las cuales serían difíciles de encontrar por los métodos tradicionales de mutagénesis al azar o evolución dirigida.

## DEDICATORIA

**A Dios.** Por darme la fuerza de contuniar con mi formación profesional y haberme dado salud para cumplir mis objetivos, además de su infinita bondad, amor y permitirme conocer las nuevas amistades encontradas durante esta investigación, sin las cuales este trabajo no se habría podido concluir.

**A mi abuela Elida.** Por que todo esto es gracias a su sacrificio y apoyo en todo momento, por sus consejos, sus valores, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

### **A mis familiares.**

A mis tias Nelly, Celmira y Gilma a mis primas Francia Elena y Elizabet, a mi cuñada Ximena a mis Hermanos Alex e Ivan, a mi padre y Fabiola y a todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis. ¡Gracias a ustedes!

**A mis maestros.** Doctor Juan Asenjo, Maria Elena Linqueo, Alvaro Olivera y por su gran apoyo y motivación para la culminación de mis estudios y para la elaboración de esta tesis.

### **A mis amigos.**

Que además de apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, me aguantaron y que, a pesar de todo, seguimos siendo amigos: Paula Osorio, Allison Leyton, Cristina Ravanal, Diana Saucedo, Omar Guiterres, Cristian Yusti, Katerine Paredes, Diego Lagos, Franco Lopez, Francisca Marchant, Carlos Cortes, Juan Morgado, Javiera Soto Aguilar, Catalina Landeta, Jose Duguet, Vida Rodriguez, Jean Franco Castro, Dana Martinez y Cielo Erika.

Quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer esta tesis. A todos ellos se los agradezco desde el fondo de mi alma. Para todos ellos hago esta dedicatoria

Finalmente, a los maestros, aquellos que marcaron cada etapa de este camino universitario, y que me ayudaron en asesorías y dudas presentadas en el desarrollo de estainvestigacion y elaboración de la tesis.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al gobierno chileno, específicamente a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT), por darme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado, financiar mi investigación y conocer su hermoso país.

Al director del Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CeBiB) doctor Juan Asenjo, por aceptarme en su grupo de investigación y darme esta oportunidad.

A la doctora Paula Osorio que gracias a sus consejos llegue a Santiago de Chile.

A mis amigos en el CeBiB, que estuvieron presentes en los momentos más difíciles de esta investigación: Allison Leyton, Cristina Ravanal, Diana Saucedo, Franco Lopez, Francisca Marchant, Jose Duguet, Carlos Cortes, Juan Morgado, Javiera Soto Aguilar, Catalina Landeta, Vida Rodriguez, Diego Lagos, Jean Franco Castro, Dana Martinez y Cielo Erika.

Quienes sin su ayuda nunca hubiera podido hacer esta tesis. A todos ellos se los agradezco desde el fondo de mi alma. Para todos ellos hago esta dedicatoria.

## TABLA DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	INDUSTRIA QUÍMICA VS INDUSTRIA BIOTECNOLÓGICA.....	1
1.2.	INGENIERIA DE PROTEÍNAS <i>IN SILICO</i> .....	3
1.2.1.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE SECUENCIAS .....	3
1.2.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	4
1.2.3.	ANÁLISIS DE CONSENSO.....	4
1.2.4.	DISEÑO RACIONAL .....	5
1.2.5.	OPERACION EVOLUTIVA (EVOP) PARA LA INGENIEIRA DE PROTEÍNAS .....	6
1.1.1.	ANÁLISIS DE MODOS NORMALES (NMA).....	7
1.1.2.	ENTROPÍA DE VIBRACIÓN.....	8
2.	OBJETIVOS.....	10
2.1.	OBJETIVO GENERAL .....	10
2.1.1.	OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
3.	METODOLOGÍA .....	11
3.1.	METODOLOGÍA DE OPERACIÓN EVOLUTIVA (EVOP) EN LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS .....	11
3.1.1.	POSICIÓN DE LOS AMINOÁCIDOS EN LA SECUENCIA PRIMARIA.....	11
3.1.2.	GENERACIÓN DE MODELOS ESTRUCTURALES.....	11
3.1.3.	CÁLCULO DE LOS VALORES DE $pK_a$ PARA LOS AMINOÁCIDOS EN LA ESTRUCTURA. ....	11
3.1.4.	CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS ESTRUCTURALES. ....	12
3.1.5.	CÁLCULO DEL CAMBIO DE ENTROPÍA DE VIBRACIÓN.....	12
3.1.6.	EVALUACIÓN DE LA INTERACCIÓN ENZIMA SUSTRATO <i>IN SILICO</i> .....	14

3.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO USADO EN LA METODOLOGÍA DE OPERACIÓN EVOLUTIVA (EVOP) PARA LA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	16
3.2.1.	ETAPAS EN LA METODOLOGÍA EVOP- CICLO .....	18
3.2.2.	FASE EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	19
3.2.3.	DETERMINACIÓN DE LA CONDICIÓN PREFERIBLE PARA EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS .....	19
3.2.4.	DETERMINACIÓN DE LOS MODELOS DE REGRESIÓN PARA EVOP PARA INGENIERÍA DE PROTEÍNAS .....	20
3.2.5.	CÁLCULO DE LAS CONDICIONES PREFERIBLES DE LOS MODELOS DE REGRESIÓN PREFERIBLE PARA EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS .....	21
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	22
4.1.	VALIDACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA METODOLOGÍA EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	22
4.1.1.	VALIDACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA METODOLOGÍA A EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS PARA LA LIPASA LIP A.....	23
4.1.2.	MUTACIONES PROPUESTAS PARA LA LIPASA LIP-A EN EL CICLO EVOP.....	24
4.1.3.	ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES PROPUESTAS EN LA LIPASA LIPA (FASE EVOP).....	32
4.1.4.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS SOBRE EL ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LA LIPASA LIPA PARA LA VALIDACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA METODOLOGÍA EVOP.....	34
4.1.5.	CONCLUSIONES DE LA VALIDACIÓN <i>IN SILICO</i> DE LA METODOLOGÍA A EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.....	46
4.2.	VALIDACIÓN EXPERIMENTAL DE LA METODOLOGÍA EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS.	46
4.3.	VALIDACION EXPERIMENTAL DE LA METODOLGIA EVOP EN INGENIERÍA DE PROTEÍNAS PARA LA XILANASA ANTÁRTICA (XYL-L) COMO ENZIMA MODELO.....	47
4.3.1.	CICLO EVOP PARA LA XILANASA XYL-L MUTACIONES PROPUESTAS.....	47
4.3.2.	ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES PROPUESTAS EN LA XILANASA XYL-L, (FASE EVOP) .....	55
4.3.3.	RESULTADOS EXPERIMENTALES PARA LA XILANASA (XYL-L) Y LA VARIANTE R13 .....	57

5. CONCLUSIONES.....	77
6. BIBLIOGRAFIA.....	78
7. ANEXOS.....	89
ANEXO A SECUENCIA PRIMARIA LIPASA LIP A.....	89

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto de la ingeniería molecular sobre las propiedades de diferentes enzimas industriales <sup>11</sup> .....	1
Tabla 2. Lista de aplicaciones para análisis de modos normal (URL verificado junio 2018 ordenadas alfabéticamente) .....	13
Tabla 3. Energías de deformación entregadas por el servidor WEBnm@ para los 20 primeros modos normales. ....	13
Tabla 4. Energías de deformación para la estructura de la lipasa LipA de Bacillus subtilis 168 <sup>197</sup> .....	24
Tabla 5. Variantes con las sustituciones propuestas para el primer ciclo para la lipasa LipA. ....	27
Tabla 6. Valores de la energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ) y el cambio en la entropía de vibración ( $\Delta S_{\text{vib}}$ ) para las variantes propuestas. ....	28
Tabla 7. Posiciones de aminoácidos seleccionadas para ajustar los modelos de regresión lineal, para la lipasa LipA. ....	29
Tabla 8. Soluciones seleccionadas para la Ecuación 10 y Ecuación 11. ....	30
Tabla 9. Valores de $pK_a$ que satisfacen las condiciones preferibles. ....	30
Tabla 10. Valores estimados de $pK_a$ para aminoácidos en función de su polaridad. <sup>203</sup> .....	31
Tabla 11. Posibles aminoácidos que cumplen con la condición preferible para la lipasa LipA. ....	32
Tabla 12. Variantes propuestas para el segundo ciclo EVOP .....	32
Tabla 13. Variantes analizadas en los tres ciclos evaluados. ....	33
Tabla 14. Variantes finales del trabajo de Reetz et al., (2006) <sup>20</sup> y del ciclo número 3 EVOP para la lipasa Lip A .....	34
Tabla 15. Parámetros estructurales para las variantes. ....	43
Tabla 16. Energías de deformación para la estructura de la xilanasas (Xyl-L) de Bacillus subtilis 168. <sup>197</sup> .....	48
Tabla 17. Variantes con las sustituciones propuestas para el primer ciclo para la xilanasas (Xyl-L). ....	49
Tabla 18. Variables seleccionadas para ajustar los modelos de regresión lineal, para la xilanasas Xil- L. ....	51
Tabla 19. Soluciones seleccionadas para las Ecuación 13 y Ecuación 14. ....	52
Tabla 20. Valores de $pK_a$ que satisfacen las condiciones preferibles. ....	53
Tabla 21. Posibles aminoácidos que cumplen con la condición preferible para la xilanasas Xyl-L. ....	54
Tabla 22. Variantes propuestas para el segundo ciclo EVOP .....	55
Tabla 23. Variantes analizadas en los 9 ciclos evaluados. ....	56
Tabla 24. Tiempos de vida media para enzima nativa y la mutante a 40 °C y 50 °C .....	61
Tabla 25. Valores de entropía de vibración (Sección 3.1.5) para la enzima nativa(Xyl-L) y mutada (Xil-R13).....	62
Tabla 26. Área de acceso al solvente (ASA) y volumen de la enzimas nativa y mutada <sup>140</sup> .....	62
Tabla 27. Zonas en la estructura con cambios en las Fluctuaciones de los Carbonos alfa.....	76

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Industria química vs industria biotecnológica

El uso de enzimas en las transformaciones químicas es una alternativa muy atractiva dado que representan una tecnología limpia y son procesos altamente selectivos. Una gran parte de la industria química (papel, textiles, detergentes y comida) hace uso de biocatalizadores para desarrollar sus productos comerciales. En ese contexto, a menudo se requiere que las enzimas funcionen en ambientes muy específicos y en ocasiones a condiciones alejadas de las fisiológicas, es así que muchos procesos industriales se ven beneficiados haciendo uso de enzimas con características funcionales que se ajusten al pH y la temperatura del proceso industrial<sup>1</sup>. Recientemente se ha incrementado el desarrollo de enzimas, haciendo uso de la ingeniería de proteínas, con características específicas para su potencial aplicación, como es el caso de diagnósticos en la industria farmacéutica<sup>2 3 4</sup>, de procesamiento de alimentos<sup>5 6 7</sup> y síntesis de productos químicos<sup>8 9 10 11</sup> (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto de la ingeniería molecular sobre las propiedades de diferentes enzimas industriales<sup>11</sup>

Aplicación industrial	Enzima industrial	Método de ingeniería molecular	Cambio en la propiedad de la enzima
Textil	Cutinasa	Mutagénesis sitio dirigida	Incremento en el tiempo de vida media en 2,7 veces después de la mutación
Cuero	Queratinasa	Mutagénesis sitio dirigida	Incremento en el tiempo de vida media en 5,6 veces después de cuatro mutaciones
Papelera	Xilanas	Mutagénesis sitio dirigida	Desplazamiento del pH óptimo en 1,5 unidades
Alimentos	Lipasa	Mutagénesis por saturación iterativa	Incremento en la enantio-selectividad de 1,1 S a 594 S
Detergentes	$\alpha$ -amilasa alcalina	Fusión	Incremento en la constante catalítica ( $K_{cat}$ ) de 3,5 veces
Farmacéutica	Esterasa	Mutagénesis por saturación	Incremento en la constante catalítica ( $K_{cat}$ ) de 7,8 veces

Uno de los parámetros que determina la viabilidad económica de la aplicación de una enzima en un proceso industrial, es su estabilidad térmica. Una alta estabilidad térmica en general se considera una ventaja económica debido a la reducción de regeneración de la enzima. Adicionalmente, las enzimas termoestables permiten trabajar a altas temperaturas de proceso que favorecen la velocidad de reacción, solubilidad, reactividad y disminuyen el riesgo de contaminación microbiana, como por ejemplo, en la industria de alimentos, donde deben soportar tratamientos térmicos de higiene y procesos como la extrusión durante los cuales la fricción y la presión incrementan la temperatura del material<sup>12</sup>.

Dada las ventajas de trabajar con este tipo de enzimas, existe un gran interés en el desarrollo de métodos teóricos y experimentales, que permitan identificar los cambios que se deben realizar en



la enzima (dependientes de pH y la temperatura) con los cuales se puedan obtener las características deseadas que permitan a la enzima ser usada a nivel industrial y que no comprometan su eficiencia catalítica<sup>13 14</sup>. En la búsqueda de este objetivo, se han logrado avances en los campos de la ingeniería de proteínas, a través de la evolución dirigida, consiguiendo así optimizar de manera sistemática su desempeño para una serie de condiciones deseadas<sup>15</sup>. En la evolución dirigida se introducen mutaciones aleatorias en la proteína bajo estudio y se seleccionan solo aquellas variantes que presentan las propiedades deseadas. Desafortunadamente no todas las características de las enzimas son igualmente fáciles de optimizar y a pesar de décadas de estudios, son pocos los casos exitosos desarrollados con ingeniería de proteínas para modificar perfiles de actividad enzimática en función del pH y su relación con la estructura<sup>16 17 18 19 20 21 22</sup>. Hay ejemplos experimentales en donde se han cambiado aminoácidos en sitios específicos de la secuencia primaria de la enzima, alterando así los perfiles de pK<sub>a</sub> y modificando de esta manera el perfil de actividad en función del pH, con la obtención de una enzima mutante eficiente<sup>23 24</sup>.

Hace varias décadas se demostró que muchos de los aspectos del comportamiento de la proteína son dominados por efectos electrostáticos<sup>25 26</sup>, por lo que uno de los elementos más importantes en la correlación estructura vs función está asociado a las interacciones electrostáticas de sus aminoácidos<sup>27</sup>. Estas observaciones demostraron que ciertas mutaciones en la enzima generan cambios en las cargas de su superficie, que alteran el comportamiento de su actividad catalítica en función del pH, y/o de los contra iones de los alrededores en el solvente. Adicionalmente, se pueden generar expansiones de la proteína causada por la repulsión electrostática de residuos de la superficie, que conducen a cambios estructurales y de reorientaciones de las interacciones electrostáticas en la enzima, afectando así los valores de pK<sub>a</sub> del sitio activo<sup>28</sup>. Por consiguiente, para evaluar la dependencia de la actividad enzimática con el pH se debe estimar el valor del pK<sub>a</sub> de los aminoácidos presentes en zonas cercanas al sitio activo y su variación con las mutaciones realizadas. Esto muestra que la predicción de los efectos electrostáticos sobre la actividad catalítica es un componente esencial para el diseño de proteínas<sup>29 30 31</sup>.

Loewenthal et al.,<sup>32</sup> y Loladze et al.,<sup>33</sup> plantearon una estrategia viable para la modificación del pH óptimo y la estabilidad térmica de las enzimas. Los autores propusieron que la estabilidad térmica puede ser incrementada mediante la modificación de las interacciones electrostáticas entre los grupos cargados en la superficie de la enzima, ya que al alterar los valores de las cargas de aminoácidos superficiales se estarían rediseñando las interacciones carga-carga de su superficie<sup>34 35</sup>. Tal rediseño puede conllevar a varios efectos potencialmente perjudiciales sobre la actividad: (i) perturbar el potencial electrostático en el centro activo, llegando a reducir o incluso suprimir la actividad enzimática; (ii) afectar la transición sustrato/producto y por consiguiente reducir o suprimir la actividad enzimática; o (iii) tener efectos sobre la cinética de la unión del sustrato y, por lo tanto, disminuir su actividad<sup>36</sup>. Pero hasta ahora, los cambios de pK<sub>a</sub> propuestos han sido modestos, y a menudo los sitios de mutación se han encontrado utilizando estrategias de ingeniería de proteínas comparativa, es decir, las mutaciones se introducen basándose en comparaciones con una enzima homóloga que posee el perfil de actividad de pH/temperatura deseado (análisis de consenso). Así, se consiguen mutaciones muy específicas en los aminoácidos cercanos a los sitios activos que pueden cambiar la dependencia de la actividad enzimática con el pH y la temperatura, pero con la desventaja de que es necesario conocer dichas zonas o sitios específicos para lograr las mutaciones. Por otra parte, no hay certeza que con los métodos de ingeniería racional actuales se logre un cambio de actividad/pH o actividad/temperatura significativos, debido a que las mutaciones que generan grandes cambios en el perfil de actividad/pH normalmente se encuentran en las cercanías del sitio activo y por lo tanto la probabilidad de obtener enzimas mutantes inactivas o con una reducción drástica de su actividad es muy alta. Por otro lado, las mutaciones

puntuales pero distales del sitio activo, producen enzimas con actividad semejante a la nativa, pero sus desplazamientos del perfil de actividad/temperatura son muy pequeños<sup>37 24 38</sup>.

Dada la necesidad de tener enzimas homólogas para llevar a cabo éste método, en algunas ocasiones se hace complejo su uso. Se plantea entonces en este trabajo el desarrollo de un método de análisis estadístico multivariante, que permita evaluar *in silico* el efecto de mutaciones sobre la estructura terciaria de la enzima, lo cual solo es evaluado en el análisis de consenso, hasta que la enzima es producida en el laboratorio.

## 1.2. Ingeniería de proteínas *in silico*

La ingeniería de proteínas es una herramienta comúnmente utilizada en la biotecnología moderna para modificar diversas características de las proteínas. El objetivo general a menudo es desarrollar proteínas que sean más adecuadas para ser usadas en condiciones específicas y así expandir sus posibilidades de uso. Para alterar de manera eficiente las propiedades fisicoquímicas específicas de las enzimas a través de la ingeniería, primero es imperativo definir las condiciones óptimas para la actividad de la enzima, así como comprender las formas y mecanismos mediante los cuales las proteínas se pliegan y mantienen su estabilidad. Existen diversas herramientas *in silico* para seleccionar los aminoácidos a sustituir, y así alterar la estabilidad térmica de las enzimas, así como su eficiencia catalítica. Estas herramientas incluyen los siguientes enfoques: bioinformático, análisis de consenso y diseño racional.<sup>6 14 39 40 41</sup>

### 1.2.1. Análisis bioinformático de secuencias

Los enfoques de la bioinformática de secuencias se han utilizado con éxito para lograr modificar la estabilidad térmica de enzimas debido a que permite usar datos de baja resolución, gracias a que la información evolutiva es suficiente para la identificación de mutaciones estabilizadoras, pero es menos adecuada para la predicción de mutaciones que determinan la especificidad o la actividad de la enzima<sup>42 41</sup>. Olivera-Nappa et al. (2011)<sup>43</sup> propusieron un análisis estadístico sobre cada posición de los aminoácidos en un alineamiento múltiple de proteínas, con base en diferentes características fisicoquímicas de los aminoácidos, incluyendo la hidrofobicidad, el volumen de la cadena lateral, carga y los parámetros conformacionales de proteínas. Las varianzas de cada una de estas propiedades en cada posición se combinan para obtener un indicador estadístico global del grado de conservación de cada propiedad. Los diferentes tipos de conservación fisicoquímica se definen para caracterizar las posiciones relevantes e irrelevantes. Las diferencias entre las variaciones estadísticas se toman a la vez como la base de las pruebas de hipótesis en cada posición para buscar sitios mutables. En otro trabajo, Yang et al. (2012)<sup>44</sup>, realizaron una comparación estadística de los sitios catalíticos y alostéricos, que reveló que estos últimos sitios son evolutivamente más variables y comprenden más residuos hidrofóbicos que los sitios catalíticos. De esta manera, se diseñaron mutaciones en donde los aminoácidos con carga en las posiciones menos conservadas fueron sustituidos por aminoácidos hidrofóbicos o neutros con tamaños similares. Las proteínas así diseñadas disminuyeron con éxito la inhibición alostérica de fructosa-1,6-bisphosphatasa de *E. coli*, sin afectar su eficiencia catalítica<sup>44</sup>. Por otra parte, Suplatov et al. (2012)<sup>45</sup>, estudiaron las actividades catalíticas de una lipasa y una amilasa que se implementan en el mismo marco estructural de la superfamilia de alfa-beta hidrolasas, uno de los mayores grupos de enzimas estructuralmente relacionadas con diversas funciones catalíticas, logrando identificar mutaciones adaptativas que se conservan y las clasificaron dentro de subfamilias. Estas posiciones

específicas de las subfamilias conservadas dentro de las lipasas y amilasas, pero diferentes entre ellas, fueron identificadas como las responsables de la diferenciación funcional<sup>45</sup>. Posteriormente, efectuaron un análisis estadístico que evaluó la importancia de estas posiciones específicas<sup>46</sup>. Las mutaciones en posiciones específicas de la subfamilia se utilizaron para introducir la actividad amilasa en *Cándida antártica* lipasa B (CALB), mostrando una mejoría significativa en la actividad amilasa medida experimentalmente. Con base en estos resultados, se propuso que estas posiciones específicas en la subfamilia deberían analizarse más a fondo con el fin de desarrollar una herramienta sistemática para estudiar la relación estructura/función de las enzimas y utilizar esta información para la ingeniería racional de enzimas, de esta manera se desarrolló el servidor web ZEBRA<sup>47</sup> para analizar subfamilias funcionales de las enzimas,<sup>48</sup>. Por otro lado, Bendl et al. (2014)<sup>49</sup> combinaron herramientas predictivas diseñadas previamente y desarrollaron un clasificador de consenso PredictSNP para evaluar el efecto perjudicial o neutro de las sustituciones, basándose en varios parámetros como características evolutivas, físico-químicas o estructurales, combinándolas ofreciendo una predicción unificada y mejorada para la evaluación del efecto de las mutaciones<sup>49</sup>

### **1.2.2. Análisis estadístico**

Olivera-Nappa et al. (2011)<sup>43</sup> proponen un análisis estadístico sobre cada posición de los aminoácidos en un alineamiento múltiple de proteínas, con base en diferentes características físicoquímicas de los aminoácidos, incluyendo la hidrofobicidad, el volumen de la cadena lateral, carga y los parámetros conformacionales de proteínas. Las varianzas de cada una de estas propiedades en cada posición se combinan para obtener un indicador estadístico global del grado de conservación de cada propiedad. Los diferentes tipos de conservación físicoquímica se definen para caracterizar las posiciones relevantes e irrelevantes. Las diferencias entre las variaciones estadísticas se toman a la vez como la base de las pruebas de hipótesis en cada posición para buscar sitios mutables.

Por otra parte, Suplatov et al. (2012)<sup>45</sup>, estudiaron cómo las actividades catalíticas de una lipasa y una amilasa que se implementan en el mismo marco estructural de la superfamilia de alfa-beta hidrolasas, uno de los mayores grupos de enzimas estructuralmente relacionadas con diversas funciones catalíticas, así lograron identificar mutaciones adaptativas que se conservan y las clasificaron dentro de subfamilias. Estas posiciones específicas de las subfamilias conservadas dentro de lipasas y amilasas, pero diferentes entre ellas, fueron identificadas, lo que se supone son las responsables de la diferenciación funcional<sup>45</sup>. Posteriormente, se efectuó un análisis estadístico que evaluó la importancia de estas posiciones específicas<sup>46</sup>.

### **1.2.3. Análisis de consenso**

El análisis de consenso es una de las herramientas más usadas para identificar sitios de mutación que permitirán modificar propiedades de la enzima entre ellas su estabilidad térmica. El método de consenso se basa en la hipótesis de que, en una posición determinada, el aminoácido de consenso respectivo contribuye más que el promedio en la estabilidad de la proteína, este método fue propuesto inicialmente por Pantoliano et al. (1989)<sup>50</sup>. Usando un alineamiento múltiple de secuencias, los aminoácidos que no son parte del consenso son sustituidos por los que si hacen parte de este; sin tener en cuenta cualquier teoría preconcebida sobre las posiciones de los aminoácidos que determinan la estabilidad térmica. La suposición de este método, es que el

aminoácido consenso en cualquier posición ha pasado la prueba de la evolución, y posiblemente, podría ser optimizado para la tarea en cuestión. Posteriormente se ofreció una posible explicación de la viabilidad de este enfoque basándose en la termodinámica estadística <sup>51 52</sup>. A partir de entonces se ha usado esta metodología para el diseño de enzimas con cierto éxito. Anbar et al., (2012) mejoró 14 veces la vida media de una endoglucanasa de *Clostridium thermocellum*, endoglucanasa Cel8A, sin pérdida de la actividad catalítica con respecto a la enzima nativa <sup>53</sup>. Igualmente, Blum et al., (2012) diseñaron con éxito una enzima  $\alpha$ -amino ester hidrolasas (AEH, EC. 3.1.1.43) de *Xanthomonas campestris* con un valor de "T-50" de 34 °C (7 °C de mejora) y la actividad 1,3 veces con respecto a la nativa <sup>54</sup>, Sullivan et al., (2012) abordaron el método de consenso distinguiendo entre mutaciones estabilizadoras y desestabilizadoras, teniendo como modelo la enzima triosafosfato isomerasa (TIM) de *Saccharomyces cerevisiae*. La adición de aminoácidos que favorecían el consenso en las zonas más conservadas fueron más propensos a estabilizar la enzima TIM y la eliminación de los aminoácidos que no son del consenso en posiciones casi invariables y altamente correlacionadas, aumentaban la probabilidad de estabilización <sup>55</sup>.

El método de consenso es generalmente reconocido como un instrumento adicional de gran valor en la caja de herramientas para el diseño de las enzimas con una mayor estabilidad térmica para todo tipo de aplicaciones industriales. Así, la construcción de una proteína a partir de solo el análisis de consenso tiene el potencial de proporcionar un aumento similar en la estabilidad térmica, como se lograría con muchos meses o años de diseño racional o con maniobras de evolución dirigida que implican múltiples generaciones y análisis de miles de mutantes.<sup>56</sup> .

#### 1.2.4. Diseño racional

Dentro de este método se han propuesto muchos enfoques, por ejemplo, el rediseño de enlaces de hidrógeno, de interacciones de Van der Waals y de puentes salinos, los cuales son métodos que se usan para modificar la estabilidad térmica de enzimas en condiciones de laboratorio. En este enfoque, se ha usado principalmente el modelo Tanford-Kirkwood (TK) para el cálculo de los estados de protonación de los aminoácidos en las proteínas <sup>57</sup> y así evaluar el efecto de las mutaciones sobre la accesibilidad del solvente <sup>58 59 60</sup> y la identificación de los aminoácidos cargados en la superficie y de esta manera poder redistribuir y optimizar estas cargas en la enzima. Sin embargo, para lograr esto se hace necesario el uso de algoritmos computacionales <sup>61</sup>, los cuales presentan dificultades técnicas al escribir un programa computacional simple que se permita ser usado para el diseño racional a escala industrial <sup>62 63</sup>, y por lo tanto no han sido técnicas ampliamente utilizadas. Adicionalmente, este modelo no permite predecir cuantitativamente la estabilidad térmica de la enzima <sup>61</sup>.

Otro enfoque racional propuesto es el análisis propio de la estructura de la enzima y la identificación de segmentos flexibles, los cuales estarían asociadas con su estabilidad debido al aumento de las Fluctuaciones por cambios en la temperatura, esta idea surge a partir de las observaciones en enzimas termófilas que presentan una baja actividad catalítica bajo las condiciones en donde las enzimas homologas mesófitas son altamente activas <sup>64</sup>. Para explicar esta reducción en la actividad catalítica se asume que la actividad enzimática esta principalmente controlada por la flexibilidad conformacional en la estructura, así la enzimas termófilas adquieren la flexibilidad apropiada para realizar la catálisis solo a altas temperaturas, este concepto es conocido el modelo de los estados correspondientes <sup>65</sup>. El desafío en esta propuesta radica en crear segmentos flexibles, pero con la rigidez adecuada en la enzima para que no se altere su actividad

catalítica. La flexibilidad dentro del centro activo de las enzimas es esencial tanto para la unión durante la catálisis como para la colocación del sustrato <sup>66 67</sup>.

Para la identificación de estas zonas flexibles y rígidas se usa el factor B, el cual cuantifica el movimiento vibratorio de los átomos en la estructura de la enzima <sup>68 69 70 71 72</sup>. De manera similar un enfoque asociado a la flexibilidad conformacional, es cuantificar el efecto que tienen las mutaciones sobre la entropía de vibración en la estructura terciaria de la enzima. Esta entropía de vibración hace referencia a las vibraciones causadas, por los movimientos térmicos, sobre los enlaces y sus ángulos de torsión flexibles <sup>73</sup>. Se ha observado que proteínas termófilas presentan una entropía de vibración menor en comparación a la entropía de vibración promedio de sus homólogas mesófitas <sup>74</sup>, aunque hay varios factores que contribuyen a que las enzimas termófilas presenten una mayor estabilidad térmica, estas enzimas presentan estados de flexibilidad similar a sus homologas mesófilas, correspondientes a su temperatura óptima (modelo de los estados correspondientes)<sup>75</sup>. Teniendo en cuenta lo expuesto, con el objetivo de modificar la estabilidad térmica de la enzima antártica xilanasa (Xyl-L) de la familia 10 <sup>76</sup>, se propone en este trabajo una metodología basada en la evaluación del cambio de la entropía de vibración de la enzima modificada, con respecto a la nativa, como una alternativa al análisis del consenso dentro del diseño racional.

### **1.2.5. Operación evolutiva (EVOP) para la ingeniería de proteínas**

Lo expuesto anteriormente apoya claramente la idea de que la estabilidad térmica de muchas proteínas y enzimas no está totalmente optimizada, la evolución no busca crear enzimas perfectas y, por tanto, la eficiencia catalítica y la estabilidad térmica de las enzimas es susceptible de ser modificada a través de una mejora en la interacción entre las cargas superficiales o internas de sus aminoácidos <sup>36 62 77 78</sup>. Considerando que uno de los criterios más importantes de la ingeniería de proteínas al modificar su estabilidad térmica, es conservar su actividad enzimática, se propone el desarrollo una metodología *in silico* para la identificación de la posición de los aminoácidos susceptibles de ser modificados, que permitan alterar la estabilidad térmica de la enzima sin modificar significativamente su actividad catalítica.

Como alternativa se pueden realizar modificaciones a la estructura primaria, de tal forma que no se afecte su estructura terciaria, con la condición de no alterar los aminoácidos catalíticos, lo que permitiría evaluar los efectos de estas variaciones, tal como se hace a nivel de laboratorio con la mutagénesis al azar. Sin embargo, esta estrategia así planteada sería tediosa dada la cantidad de tiempo y recursos que implica las posibles variantes que se pueden generar y evaluar <sup>79 80</sup>. Buscando agilizar este proceso se planteó el uso de una rutina de investigación usada en ingeniería de procesos industriales, conocida como programa de operación evolutiva (EVOP), metodología propuesta por el estadístico George Box <sup>81</sup>. Esta es una técnica de análisis de multivariante para modificar y mejorar procesos a escala industrial, la cual consiste en realizar pequeños cambios en los niveles de las variables del sistema, sin que estos alteren considerablemente las características del producto final deseado, lo que permite de manera ágil la identificación y cuantificación de los factores que tienen una influencia estadísticamente significativa sobre el producto final <sup>82</sup>. De esta manera, se pueden reconocer las variables del sistema que tienen influencia estadística sobre el proceso y generar modelos de regresión (función objetivo) que permitan hacer predicciones sobre las mejores condiciones de operación para optimizar el proceso. Posteriormente, con estos pronósticos se hacen los ajustes propuestos y se evalúa el efecto de los valores sugeridos por la

regresión y se da comienzo a un proceso o ciclo de iteración en donde se hace la selección de las variables del proceso, ajuste y evaluación.

Esta metodología se basa en el proceso biológico de selección natural, en donde las nuevas condiciones de operación corresponden a mutaciones y en cada ciclo de iteración se estarían seleccionando las variables de operación más favorables para redefinir ajustes en la dirección que generen cambios beneficiosos al proceso<sup>83 84</sup>. En el contexto de una enzima, las variables del sistema corresponden a las posiciones de los aminoácidos en la secuencia primaria de la enzima y los niveles de estas variables serían los 19 tipos de aminoácidos disponibles (en función de su pK<sub>a</sub>) que podrían ser ubicados en esa posición y como variables de respuesta o producto final, se evaluara *in silico* el efecto de estas mutaciones sobre la interacción enzima sustrato (docking molecular)<sup>85 86 87</sup>, y sobre el efecto de cambios estructurales asociados a estabilidad térmica de la enzima (análisis de modos normales)<sup>74 88</sup>.

### 1.1.1. Análisis de modos normales (NMA).

El análisis de modos normales (NMA) es una técnica para investigar el movimiento de vibración de un sistema oscilador armónico en la inmediata vecindad de éste en el equilibrio. Los movimientos que se estudian son de pequeña amplitud en un pozo de potencial y no pueden cruzar las barreras de energía, estos sistemas están en equilibrio (fondo de un pozo de potencial) cuando las fuerzas generalizadas que actúan sobre el sistema son iguales a cero. Por otro lado, el NMA no ofrece valores absolutos de desplazamiento para cada partícula, debido a que los vectores que describen la dirección de los movimientos de cada partícula y cuan lejos está se mueve lo hacen con respecto a otras partículas en el sistema; así el NMA lo que determina es un conjunto base de los posibles movimientos, los que al combinarse con la elección adecuada de amplitudes pueden generar cualquier otra configuración del sistema para describir el movimiento real de la estructura enzimática. Al comparar el NMA con la dinámica molecular, el NMA entrega información sobre los posibles movimientos que podría tener el sistema, mientras que la dinámica molecular calcula los movimientos reales de la estructura. La estructura de una enzima se mueve a lo largo de todos los modos normales al mismo tiempo; la energía asociada a cada frecuencia de vibración de los modos normales o energías de deformación están inversamente relacionadas con la amplitud del movimiento descrito por su correspondiente modo. Aunque estas energías de deformación calculadas solo tienen un significado cualitativo, los valores obtenidos para diferentes proteínas se pueden usar para hacer comparaciones, por medio del cálculo de la entropía de vibración<sup>89 88 90 74</sup>. Investigaciones al respecto muestran que las enzimas termófilas presentan una rigidez estructural mayor que sus homólogas mesófilas, pero conservan la distribución de regiones flexibles funcionalmente importantes entre los homólogos mesófilas y termófilos a sus respectivas temperaturas donde presentan actividad<sup>91 92</sup>, es decir se mantiene un equilibrio entre la rigidez general que permite la estabilidad térmica y la flexibilidad local que es importante para la actividad catalítica<sup>72</sup>. Esta observación sugiere que las enzimas termófilas presentan un aumento en la rigidez estructural general, pero que la distribución de regiones flexibles funcionalmente importantes es conservada entre las enzimas homólogas termófilas y mesófilas, comportamiento que está de acuerdo a la hipótesis de los estados correspondientes.<sup>93 94</sup> Estos cambios en la rigidez entre mesófilas y termófilas pueden ser cuantificados evaluando la diferencia entre sus entropías de vibración (sección 1.1.2) (Ecuación 1)<sup>74 88</sup>. El nivel de precisión del NMA es suficiente para identificar diferencias en la entropía de vibración asociadas a eventos moleculares y en cambios conformacionales de estructuras de proteínas<sup>95</sup>. Además esta aproximación proporciona una mayor velocidad para los análisis sin comprometer seriamente la precisión<sup>96</sup>.

### 1.1.2. Entropía de vibración.

Una propiedad fundamental de las proteínas es que su estructura terciaria o plegamiento nativo está determinando solamente por su secuencia primaria <sup>97</sup>, esta observación tiene dos grandes consecuencias, primero es que permitiría hacer predicciones de las estructuras de proteínas a partir de su secuencia primaria (sección 3.1.2), y segundo que la estructura terciaria representa el estado de plegamiento más estable de la proteína, es decir la energía global mínima de plegamiento como se puede ver en la Figura 1 (Energía vs posibles conformaciones) para la proteína. Estos cambios a gran escala en las conformaciones en los estados desplegados son conformaciones metaestables lo que significa que dependiendo del tipo de perturbación la estructura puede alejarse o no del estado plegado nativo, cuando la estructura de la proteína se acerca al estado de plegamiento nativo esta puede adquirir una amplia variedad de conformaciones similares, la cuales pueden diferir por ejemplo en la conformación de las cadenas laterales o detalles en la estructura, pero con pequeñas barreras energéticas entre ellas, lo que implicaría que el cambio entre una conformación a otra es muy rápido. <sup>98 99</sup>.

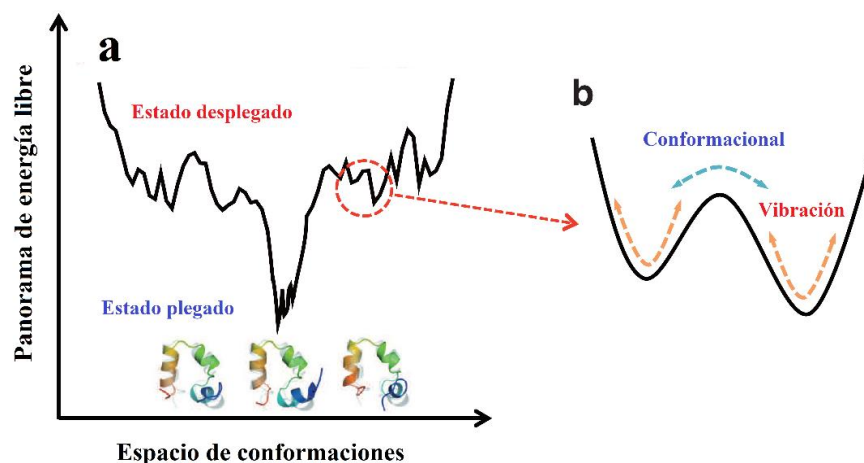


Figura 1. Diagrama de energía conformacional:(a) la proteína puede adoptar una amplia variedad de conformaciones. (b) la proteína adquiere varias conformaciones similares. (Adaptado de Chong y Sihyun 2015 <sup>99</sup>).

Las conformaciones de las proteínas y los ácidos nucleicos, desempeñan un papel esencial en su función biológica, para comprender los factores implicados en la estabilidad de una conformación dada y en el cambio de una conformación a otra, es necesario poder evaluar las contribuciones energéticas y entrópicas a la energía libre de conformación. Dado que se espera que la entropía configuracional sea muy importante en muchas transformaciones (por ejemplo, desnaturalización de proteínas, transición hélice-espiral), se han invertido esfuerzos considerables para desarrollar métodos para su evaluación <sup>100 101 102 103 104</sup>. En un sistema macromolecular, la contribución de entropía configuracional se divide en dos partes<sup>105</sup>; la primera es introducida por la entropía de vibración relacionada con la dinámica de los movimientos térmicos en los ángulos de torsión y cambios en la longitud y ángulos de enlace de la estructura en cada pozo de energía libre, la segunda contribución a la entropía configuracional, es la entropía conformacional asociada a las diferentes conformaciones que puede adquirir la estructura para cada mínimo energético en cuanto a reordenamientos de la cadena principal y lateral (Figura 1-b) <sup>99</sup>, es decir la entropía

conformacional está asociada con el número de mínimos de energía libre, mientras que la entropía de vibración refleja el comportamiento estructural en el pozo de energía individual. Específicamente para las proteínas globulares la entropía de vibración representa la principal contribución a la entropía configuracional, esto es en gran parte debido al movimiento térmico de los ángulos de torsión flexibles <sup>73</sup>.

Con respecto a la relación de la entropía con la actividad enzimática, entre enzimas homólogas psicrófilas, mesófilas y termófilas se ha demostrado que la contribución entrópica en la estructura para enzimas psicrófilas es mayor que en las mesófilas y termófilas, esto se ha interpretado como una consecuencia de la mayor flexibilidad del sitio activo en las enzimas psicrófilas, las cuales presentarían una distribución más amplia de conformaciones en comparación de sus homologas mesófilas y termófilas <sup>106 107</sup>. Frappier y Najmanovich (2015) demostraron que existen diferencias en la entropía de vibración entre enzimas mesófilas y termófilas y cómo esta diferencia de entropía de vibración (Ecuación 1) puede ser usada para predecir el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad térmica, así, enzimas mesófilas presentan una entropía de vibración promedio mayor que la enzima homóloga termófila. La entropía de vibración se puede calcular a partir de la evaluación de las energías de deformación de la estructura de la enzimas por medio de análisis de modos normales (sección 1.1.1). <sup>74 88</sup>



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo General**

El objetivo general de esta investigación fue desarrollar una metodología de análisis estadístico que permita la identificación de zonas mutación en enzimas que afecten la estabilidad térmica, a través de la evaluación del cambio de la entropía de vibración en función de los cambios en el pK<sub>a</sub> de los aminoácidos en la estructura de la enzima, en este trabajo se usó como modelo la enzima xilanasa Xyl-L proveniente de *Psychrobacter sp.* strain 2-17.

#### **2.1.1. Objetivos específicos**

Para desarrollar este estudio se plantean los siguientes objetivos específicos:

Generar modelos estructurales con las mutaciones propuestas y realizar un análisis estadístico del efecto de estas mutaciones sobre las variables energía de acoplamiento con el sustrato y entropía de vibración, lo que permitirá identificar los aminoácidos con influencia estadística sobre estos parámetros.

Validar una metodología de selección de sitios de mutación a partir de los datos reportados en la literatura.

Evaluar el método para predecir los aminoácidos apropiados que debe tener la estructura de la enzima para lograr la propiedad deseada (estabilidad térmica y eficiencia catalítica).

Modificar la xilanasa Xyl-L con las mutaciones propuestas para evaluar los cambios en su estabilidad térmica y compararla bioquímicamente con respecto a la xilanasa Xyl-L nativa.

### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Metodología de operación evolutiva (EVOP) en la ingeniería de proteínas

La metodología propuesta para la identificación de las posiciones en la secuencia primaria de los aminoácidos a ser modificados que permitirá alterar el valor de la temperatura óptima de la actividad enzimática consistió en: (i) realizar una serie de ciclos iterativos de modificaciones en la secuencia primaria (mutaciones) (sección 3.1.1), (ii) la generación de modelos estructurales de dichas alteraciones en la secuencia (sección 3.1.2), (iii) el análisis de la entropía de vibración y fluctuación de carbonos  $\alpha$  (sección 1.1.1), (iv) la realización del análisis de acoplamiento enzima y sustrato (sección 3.1.6) y (v) la realización del análisis estadístico para evaluar las posiciones de los aminoácidos en la enzima que mostraron una influencia significativa sobre las propiedades calculadas y evaluadas. (sección 3.2).

##### 3.1.1. Posición de los aminoácidos en la secuencia primaria.

La metodología se inicia con el conocimiento de la secuencia primaria de la enzima, lo cual permite entender su función y la identificación de los aminoácidos involucrados en la catálisis. La posición de los aminoácidos en la secuencia primaria es la variable controlable más importante en esta metodología, ya que los cambios propuestos en estos, podrían afectar no solamente el ambiente químico de los aminoácidos vecinos en la secuencia, si no que pueden llegar a afectar a aminoácidos en posiciones distantes también <sup>108</sup>.

El efecto generado por la sustitución de aminoácidos cargados para determinada posición, será cuantificado por medio del valor en el  $pK_a$  para cada uno de los aminoácidos en la secuencia primaria. Debido a que los valores de  $pK_a$  en la enzima dependen de su geometría, se requiere del conocimiento de las coordenadas de cada átomo en la estructura, lo cual es fundamental para evaluar el entorno de cada aminoácido cargado, el grado de solvatación y sus interacciones electrostáticas <sup>109</sup>. Es así que a partir de esta secuencia primaria se genera un modelo estructural que permitirá realizar los posteriores análisis y cálculos *in silico* para las enzimas.

##### 3.1.2. Generación de modelos estructurales

Los modelos estructurales de las enzimas usadas para los diferentes análisis se generan por homología <sup>110 111</sup> usando el servidor RaptorX que predice las estructuras secundarias y terciarias así como la accesibilidad al solvente y regiones desordenadas. RaptorX también asigna puntajes de confianza para indicar la calidad de los resultados de la predicción <sup>112 113</sup>. Este servidor fue seleccionado ya que está clasificado en el primer lugar en la ronda de competición mundial de evaluación crítica de las técnicas para la predicción estructural proteica (CASP XII) y la predicción de contactos entre residuos de largo alcance, este tipo de predicciones tiene la ventaja de limitar el espacio conformacional en la predicción de estructuras de *novo* <sup>114</sup>.

##### 3.1.3. Cálculo de los valores de $pK_a$ para los aminoácidos en la estructura.

A partir de los modelos estructurales se pueden determinar los valores de las constantes de acidez ( $pK_a$ ) para cada aminoácido cargado, lo que permite asignarle a cada posición en la secuencia primaria valores que solo estarán en función del aminoácido asignado a esa posición, estos valores serán representados por la expresión  $pK_aAA_i$  la cual indica el valor de  $pK_a$  del aminoácido en la posición  $i$  de la secuencia primaria.

Los valores de  $pK_a$  a su vez también son función del pH del medio en el cual se pueda encontrar la enzima. La mayoría de los modelos teóricos propuestos para la predicción de estos valores de  $pK_a$  usan el enfoque de la ecuación Poisson- Boltzmann para evaluar los efectos electrostáticos en solución y para realizar los cálculos se requieren de las coordenadas atómicas de la enzima así como su entorno y la disponibilidad de solvatación; por eso la importancia de la disponibilidad de modelos estructurales para la enzima nativa y de las modificaciones que se propongan <sup>115 116 117</sup>. Estos resultados teóricos son usados para evaluar el comportamiento de los aminoácidos en la enzima y con el sustrato, y de esta manera se sugiere la hipótesis de trabajo <sup>118 119</sup>. El cálculo y evaluación de las constantes de acidez ( $pK_aAA_i$ ) de los aminoácidos en las enzimas se realizará con el servidor PDB2PQR <sup>120</sup>.

#### **3.1.4. Cálculo de los parámetros estructurales.**

Algunos estudios han mostrado que existen otros factores que son también responsables del mejoramiento en la estabilidad térmica de las enzimas, entre los cuales están el tamaño de la enzima y el número de puentes salinos <sup>121</sup>. Es así que muchas características estructurales que podrían conducir a incrementar la estabilidad térmica han sido examinadas y se han encontrado diversos factores estructurales para explicar la diferencia entre enzimas termófilas y mesófilas con variados grados de significancia. Factores estructurales que han sido estudiados incluyen cambios en el número de puentes de hidrógeno y pares iónicos <sup>77 122 123 124 125 126 127</sup>, también la diferencia en el área superficial expuesta al solvente ha sido evaluada <sup>122 128 129 130 131</sup>, el grado de empaquetamiento <sup>132 133 134 135</sup>, la entropía de vibración (análisis de modos normales) junto con la flexibilidad estructural <sup>136 137 138</sup> y la densidad <sup>139</sup>.

En el presente estudio se evaluó cómo las mutaciones propuestas alteran diversos factores estructurales. Para estimar los valores correspondientes del área de acceso al solvente y volumen se usará el servidor Vadar 1.8 <sup>140</sup>, para lo cual se usaron los parámetros de Sharke para estimar los valores del radio de Van der Waals y la definición de áreas de acceso al solvente para aminoácidos polares y no polares. Para el cálculo del volumen se usó el procedimiento de plano radical, y para estimar la energía libre de plegamiento y cargas de la enzima en función del pH se usa el servidor PDB2PQR.

#### **3.1.5. Cálculo del cambio de entropía de vibración**

El análisis de modos normales es particularmente útil para calcular diferencias de entropía de vibración, principalmente por el ahorro que se genera en el tiempo de cálculo computacional.<sup>90 95 96</sup>. Se ha demostrado que los cambios conformacionales de las proteínas pueden ser bien descritos por los modos normales de energía más baja, los que están íntimamente vinculados a la estructura

de la proteína, además, son también los modos más conservados evolutivamente debido a que estos son los que estarían asociados a la actividad funcional de la enzima <sup>141 142 143</sup>. Estos modos de baja frecuencia son los usados para los cálculos de entropía de vibración y son los responsables de los movimientos colectivos observados en las enzimas<sup>96</sup>, esto es porque mecánicamente se necesita de una menor cantidad de energía para lograr transiciones conformacionales (movimientos más grandes) a lo largo de los modos normales de baja frecuencia <sup>141</sup>.

En los últimos años han surgido numerosas aplicaciones web y bases de datos con un variado nivel de detalle atómico para el cálculo de los modos normales que están disponibles en internet (Tabla 2). En esta investigación se usó el servidor WEBnm@ para el cálculo de la energía de deformación para los modos normales, esta herramienta ofrece una amplia gama de análisis de los modos normales, así como las Fluctuaciones atómicas, y entrega información de las energías de deformación para los 20 primeros modos normales correspondientes a los modos de baja frecuencia (Tabla 3) <sup>144 145 146</sup>, los cuales son suficientes para evaluar la respuesta estructural de la topología de una enzima al cambiar su secuencia <sup>74 141</sup>.

Tabla 2. Lista de aplicaciones para análisis de modos normal (URL verificado junio 2018 ordenadas alfabéticamente)

<b>APLICACIÓN</b>	<b>DIRECCIÓN EN INTERNET (URL)</b>	<b>REFERENCIA</b>
AD-ENM	<a href="http://enm.lobos.nih.gov/start.html">http://enm.lobos.nih.gov/start.html</a>	147
DC-ENM	<a href="http://enm.lobos.nih.gov/start_dc.html">http://enm.lobos.nih.gov/start_dc.html</a>	148
DFProt	<a href="http://chaconlab.org/multiscale-simulations/dfprot/df-down">http://chaconlab.org/multiscale-simulations/dfprot/df-down</a>	149
DynOmics	<a href="http://enm.pitt.edu/">http://enm.pitt.edu/</a>	150
EINémo	<a href="http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/">http://www.sciences.univ-nantes.fr/elnemo/</a>	151
HingeProt	<a href="http://www.prc.boun.edu.tr/appserv/prc/hinge_prot/">http://www.prc.boun.edu.tr/appserv/prc/hinge_prot/</a>	152
iGNM	<a href="http://ignm.cccb.pitt.edu/">http://ignm.cccb.pitt.edu/</a>	153
iMODS	<a href="http://imods.chaconlab.org/">http://imods.chaconlab.org/</a>	154
MinActionPath	<a href="http://lorentz.dynstr.pasteur.fr/suny/index.php?id0=minactionpath#welcome">http://lorentz.dynstr.pasteur.fr/suny/index.php?id0=minactionpath#welcome</a>	155
MoViES database	<a href="http://ang.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prog/norm.pl">http://ang.cz3.nus.edu.sg/cgi-bin/prog/norm.pl</a>	156
NOMAD-Ref	<a href="http://lorentz.immstr.pasteur.fr/nomad-ref.php">http://lorentz.immstr.pasteur.fr/nomad-ref.php</a>	157
NORMA	<a href="http://www.igs.cnrs-mrs.fr/elnemo/NORMA/">http://www.igs.cnrs-mrs.fr/elnemo/NORMA/</a>	158
Path-ENM	<a href="https://enm.lobos.nih.gov/start_path.html">https://enm.lobos.nih.gov/start_path.html</a>	159
ProMode database	<a href="https://pdj.org/promode-elastic">https://pdj.org/promode-elastic</a>	160
TMM@	<a href="http://services.cbu.uib.no/tools/tmma">http://services.cbu.uib.no/tools/tmma</a>	161
WEBnm@	<a href="http://apps.cbu.uib.no/webnma/home">http://apps.cbu.uib.no/webnma/home</a>	162

Tabla 3. Energías de deformación entregadas por el servidor WEBnm@ para los 20 primeros modos normales.

Modo normal	Energía de deformación
7	1210,75
8	1605,57
9	2640,94
10	3602,51
11	3678,99
12	5294,33
13	5384,00
14	5955,26
15	6146,25
16	6753,18
17	8503,18
18	8239,24
19	8435,90
20	8232,64

A partir de los datos que entrega el servidor Webmn@<sup>162</sup>, para cada estructura enzimática, se puede realizar el cálculo del cambio de entropía de vibración utilizando el método propuesto por Karplus and Kushick (1981)<sup>100</sup> (ver Ecuación 1). Esta ecuación permitió evaluar el cambio en la entropía de vibración de la estructura mutada con respecto a la nativa<sup>74</sup>. El servidor también entrega una tabla con información sobre las Fluctuaciones medias cuadráticas normalizadas de los carbonos alfa (RMSFN) promediadas para 200 modos normales en la estructura de la enzima para cada aminoácido<sup>162</sup>.

$$\Delta S_{\text{vib mut} \rightarrow \text{natv}} = k_B * \ln \left( \frac{\prod_{n=7}^{n=20} \lambda_{n,\text{mut}}}{\prod_{n=7}^{n=20} \lambda_{n,\text{wt}}} \right)$$

Ecuación 1. Cálculo del cambio de entropía de vibración entre la enzima modificada y la nativa.

Donde,  $\Delta S_{\text{vib}}$  es el cambio en la entropía de vibración entre las estructura mutada y nativa, mut y wt representan a la enzima mutada y nativa respectivamente.  $\lambda_{n,\text{mut}/\text{nat}}$  es la energía de deformación (frecuencia de vibración) del modo normal n de las enzimas y  $k_B$  es la constante de Boltzmann.

Lo que se espera observar es que el efecto de mutaciones que favorezcan la generación de una enzima con una estabilidad térmica mayor, sea que la enzima mutada tenga un valor de entropía de vibración menor que la entropía de vibración de la enzima nativa, de tal manera que el cambio de entropía de vibración entre las dos estructuras sería menor que cero ( $\Delta S_{\text{vib mut} \rightarrow \text{natv}} < 0$ ).

### 3.1.6. Evaluación de la interacción enzima sustrato *in silico*

En los últimos años tratar de evaluar *in silico* la interacción de ligando (sustrato) con diferentes tipos de enzimas se ha vuelto una tarea interesante, como lo muestran varias investigaciones<sup>163 164 165 86 87 166</sup>. El proceso de análisis de acoplamiento se reduce básicamente a muestrear conformaciones energéticamente favorables de un ligando en una zona de una enzima, es decir mide la complementariedad enzima sustrato. Esta complementariedad o superposición de estas se evalúa en función de la energía más baja, y el análisis de las principales interacciones implicadas en la unión, asegurando una disposición estructural correspondiente. Las interacciones enzima sustrato que se evalúan en el análisis de acoplamiento *in silico* son la energía de Van der Waals, la energía de puentes de hidrógeno, la atracción electrostática, la energía de solvatación y un término correspondiente a la energía torsional<sup>85</sup>. Aunque el acoplamiento y la puntuación que se realiza para las conformaciones enzima-sustrato se basan en muchas aproximaciones, la aplicación de esta técnica se puede usar para identificar compuestos que serían sustratos para la enzima<sup>167</sup>. Por ejemplo, Hermann et al., (2016) predijeron correctamente estereoselectividades para el 90% de las combinaciones enzima-sustrato al ser comparadas con las posteriores validaciones experimentales<sup>168</sup>. El análisis de acoplamiento *in silico* permite también evaluar la interacción de carbohidratos en anticuerpos<sup>169</sup> o para el diseño de nuevos sustratos<sup>170</sup> y diseño de fármacos<sup>171</sup>. Sin embargo, las contribuciones de energía de la formación de enlaces covalentes en el análisis de acoplamiento *in silico* son generalmente descuidadas<sup>172</sup>. Para tratar de solventar este inconveniente la región de unión y el residuo reactivo al objetivo se deben conocer de antemano y además los residuos del receptor deben ser flexibles, lo que proporciona un enfoque más eficaz en la simulación de una interacción covalente enzima-sustrato permitiendo así modelar el espacio conformacional en la enzima y conseguir un esquema completo de los requerimientos estructurales del sustrato y los reconocimientos óptimos del mismo por parte de la enzima<sup>173 174</sup>.

De las principales ventajas del análisis de acoplamiento *in silico* es que reducen la carga de trabajo de laboratorio y permiten restringir el estudio de moléculas a un conjunto más pequeño y más representativo posible, haciendo la investigación más productiva<sup>166</sup>. Existen muchos programas disponibles para realizar cálculos de acoplamiento *in silico*<sup>165 86 87 166</sup>, en esta investigación se usó el servidor web Swissdock<sup>175</sup> desarrollado por el grupo de modelamiento molecular del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) que se basa en el programa de acoplamiento EADock DSS (Algoritmos Evolutivos para el muestreo espacial diédrico de acoplamiento)<sup>176</sup>, donde los parámetros de puntuación para las interacciones ligando-enzima están en función del campo de fuerza desarrollado para moléculas de interés biológico CHARMM22<sup>177</sup> y el modelo de cálculo para la energía libre de solvatación FACTS<sup>178 179</sup>, el cual se basa en la evaluación totalmente analítica del volumen y la simetría espacial del disolvente que es desplazado de alrededor de un átomo de soluto por sus átomos vecinos, además el servidor permite la flexibilidad de las cadenas laterales de los aminoácidos cercanos (3 Å a 5 Å) al ligando durante el acoplamiento, lo que permite un mejor ajuste de este.

La interfaz en línea de SwissDock es muy amigable y de fácil uso, el usuario puede ingresar las coordenadas y espacio de búsqueda en la enzima (15 Å alrededor de los aminoácidos catalíticos para esta investigación) para el análisis de acoplamiento, así como indicar la flexibilización de esta región en la enzima, Swissdock le permite al usuario no tener que preocuparse por la falta de recursos computacionales para el acoplamiento molecular debido a que se hace uso de los servidores de Swissdock. Los resultados de acoplamiento pueden ser vistos desde una URL proporcionada por el servidor o pueden ser descargados para su posterior análisis<sup>175</sup>.

En cuanto al estudio de los cambios en las interacciones enzima-sustrato entre las enzimas mutadas y la nativa el servidor Swissdock entrega información sobre la energía libre de unión ( $\Delta G_D$ ) entre la enzima y el ligando. La diferencia en la energía de unión  $\Delta G_D$  entre la enzima mutada y la nativa con el ligando se evaluó como fracción de cambio de energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ) de la

enzima mutada con respecto a la enzima nativa y el ligando, en donde los valores de  $\Delta D > 0$  indican que las mutaciones están favoreciendo el ajuste conformacional o electrostático entre la enzima y el ligando, ver Ecuación 2.

$$\Delta D = (\Delta GD, mut - \Delta GD, wt) / \Delta GD, wt$$

Ecuación 2.  $\Delta D$  fracción cambio en la energía de acoplamiento entre la estructura modificada y la nativa.

Donde  $\Delta D$  es la fracción de cambio de energía de unión entre las energías de unión de la enzima mutada y la nativa con el ligando,  $\Delta GD, wt$  es la energía de unión de la enzima nativa y el ligando, y  $\Delta GD, mut$  es la energía de unión de la enzima mutada y el ligando.

### **3.2. Análisis estadístico usado en la metodología de operación evolutiva (EVOP) para la ingeniería de proteínas**

La metodología de operación evolutiva (EVOP) en ocasiones se ha comparado con otras técnicas de optimización, pero la EVOP es una técnica de experimentación para la búsqueda de las condiciones preferibles del proceso, en contraste de los problemas de optimización matemática donde usualmente se establece la determinación de las condiciones que generan el máximo de alguna función  $g=f(x_1, \dots, x_n)$  dentro de alguna región  $R(x_1, \dots, x_n)$  del espacio de  $x$ , en donde generalmente se asume que:

- Las variables  $x_1, \dots, x_n$  son conocidas.
- La región  $R(x_1, \dots, x_n)$  es conocida.
- La naturaleza de la función  $g=f(x_1, \dots, x_n)$  es conocida.
- La función  $g=f(x_1, \dots, x_n)$  puede ser calculada sin error a partir de la selección de un conjunto de las variables  $x$ .

La metodología EVOP difiere de la configuración de optimización matemática en varios aspectos como son:

- La metodología EVOP no conoce las variables  $x_1, \dots, x_n$  que deberían ser incluidas en una función  $f$ .
- La metodología EVOP no conoce con exactitud la región  $R(x_1, \dots, x_n)$  dentro la cual se debe tratar de maximizar.
- La metodología EVOP no conoce la naturaleza o la forma de la función  $f$  que se desea maximizar.
- Las observaciones realizadas están generalmente sujetas a errores moderados o grandes.

Estas diferencias hacen que la metodología EVOP sea una técnica de experimentación en la que se busca las condiciones preferibles y rara vez, o nunca, las condiciones óptimas. Se puede entonces decir que la metodología EVOP permite encontrar las condiciones B en donde se observa mejoras en comparación a las condiciones previas A, lo que hace que las condiciones B sean preferibles y entonces la diferencia entre el proceso a las condiciones B y el proceso a las condiciones A es una media del progreso que se ha logrado.

En el contexto de esta investigación las condiciones preferibles serían las mutaciones que generen un aumento en la estabilidad térmica, pero sin que estas deterioren la actividad enzimática, teniendo como referencia la enzima nativa. El procedimiento iniciaría con la ejecución de experimentos simples, realizando mutaciones que mantengan a la enzima dentro del rango de operatividad, es decir evitando alterar la actividad enzimática realizando mutaciones en puntos distales del sitio catalítico, entonces las variables controlables en la enzima son las posiciones  $i$  de los aminoácidos (AA) en la secuencia primaria y el tipo de aminoácido en esa posición  $i$  ( $AA_i$ ). La forma de cuantificar los cambios de los aminoácidos cargados es a partir del valor de la constantes de acidez ( $pK_a$ ), así el efecto de realizar modificaciones en la secuencia primaria será representado por el valor de  $pK_a$  del amino ácido en la posición  $i$  ( $pK_{aAA_i}$ ).

El objetivo es recopilar datos sobre las variables de respuesta que son el cambio en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ ) y fracción de cambio de energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ), en los diversos puntos de los experimentos desarrollados y cuando se toma un conjunto de datos en todos los puntos del experimento, se dice que se completó un ciclo (Figura 2) (sección 3.2.1). Dado que un ciclo no es suficiente para detectar algún cambio en las variables de respuesta, es necesario realizar varios ciclos para interpretar los resultados de una manera eficiente y que permitan señalar el camino que permita la mejora que se quiere lograr, siguiendo el nuevo ciclo de experimentos *in silico* ahora incluyendo los datos de la “condición preferible”, se cerraría el ciclo, esto continua hasta que el efecto sobre las variables de respuesta ( $\Delta S_{vib}$  y  $\Delta D$ ) es significativo al compararse con la enzima nativa, lo cual hace que sea natural que se requiera de mucho trabajo de experimentación *in silico* que preceda a la etapa en que se detecte cambios significativos y entonces se dice que se ha completado una fase (Figura 2) y , es en este punto, generalmente donde se toma la decisión de cambiar los aminoácidos en la enzima nativa para la validación experimental (Figura 2 VIII).

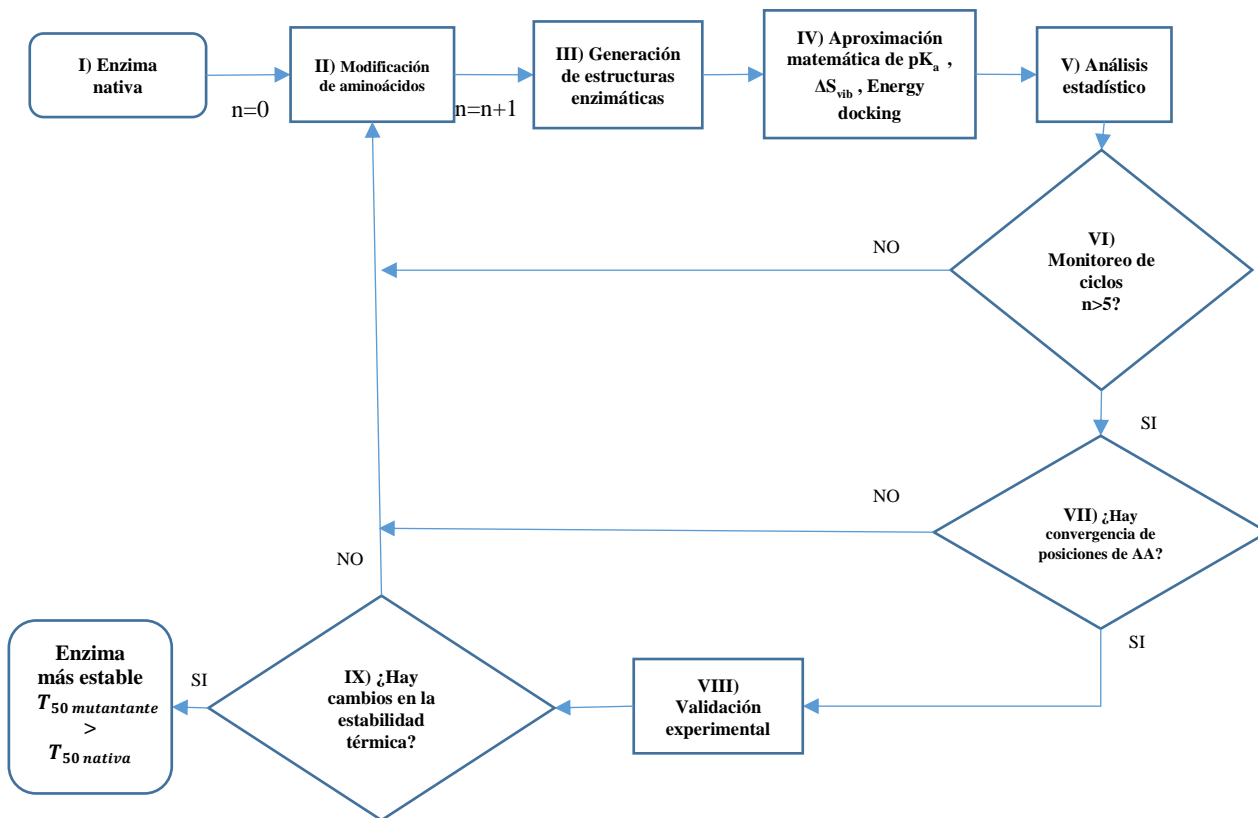


Figura 2. Bucle EVOP ciclo y fase.



### 3.2.1. Etapas en la metodología EVOP- Ciclo

La metodología EVOP para la ingeniería de proteínas se inicia con el conocimiento de la secuencia primaria de la enzima (Figura 2 I), a partir de la cual se genera un modelo de su estructura terciaria que permitirá realizar los posteriores análisis *in silico*. Estos análisis de la estructura terciaria facilitarán la selección de los sitios de mutación por medio del NMA, el cual entrega información sobre las Fluctuaciones de los carbonos  $\alpha$ , permitiendo identificar las posiciones  $i$  de los aminoácidos AA que presentan mayor movilidad en la estructura de la enzima <sup>146 145</sup> (sección 1.1.1), los cuales serían los principales candidatos a ser modificados en la secuencia (mutados, AA <sub>$i$</sub> ) (Figura 2 II). De esta manera se generan las nuevas secuencias primarias y a partir de ellas, nuevas estructuras (Figura 2 III) y así cuantificar el efecto de las mutaciones sobre variables de control  $\Delta S_{vib}$  y  $\Delta D$ , además de cuantificar el efecto de estas mutaciones sobre los valores de  $pK_a$  en los aminoácidos de la enzima ( $pK_{aAA_i}$ ) (Figura 2 IV).

El ciclo continua ahora con el análisis estadístico para la interpretación de una manera eficiente el efecto de las mutaciones, y así poder señalar el camino a seguir para lograr la mejora que se está buscando (Figura 2 V). Entonces con la suficiente información del efecto de las mutaciones propuestas se procede a identificar las posiciones  $i$  de los aminoácidos (AA <sub>$i$</sub> ) que muestren una mayor correlación con los cambios observados, para identificarlos se comparan los valores de  $pK_{aAA_i}$  de los residuos entre las estructuras modeladas y se identifican las posiciones de los residuos que presenten una desviación estándar mayor a 0,1 en los valores de  $pK_a$ , de estos se seleccionan los que presenten independencia estadística con respecto a las variables de respuesta  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$ . Para la identificación de los  $pK_{aAA_i}$  con independencia estadística se usó el software Statgraphics XVII <sup>180</sup>, a partir de estas variables se seleccionan las que mejor se ajusten en un modelo de regresión lineal para que correlacionen los cambios observados, usando el criterio de Spiess y Neumeyer (2010) para trabajos en bioquímica <sup>181</sup>, en esta investigación para los modelos de regresión se proponen modelos polinomiales de primer orden debido a que es la primera aproximación que se hace cuando no se conoce la relación entre las variables de respuestas <sup>182 183</sup> ( $\Delta S_{vib}$  y  $\Delta D$ ) y las variables controlables ( $pK_{aAA_i}$ ) (Ecuación 3, Ecuación 4). Estos modelos lineales (función objetivo), generados usando el software Statgraphics XVII <sup>180</sup>, indicarán la dirección en la cual dirigir los próximos experimentos que cumplan simultáneamente las condiciones de  $\Delta D > 0$  y  $\Delta S_{vib} < 0$  (condición preferible), es decir, los modelos de regresión entregan las predicciones de los valores de  $pK_a$  correspondientes a los aminoácidos en sus respectivas posiciones  $i$  ( $pK_{aAA_i}$ ) que cumplan con las restricciones impuestas, así el valor de  $pK_{aAA_i}$  para la posición  $i$  será un indicador para escoger el aminoácido más apropiado en dicho punto de la secuencia primaria, y estos aminoácidos serán modificados para el siguiente ciclo de iteración, de tal forma que cada ciclo corresponde a la repetición de los pasos II a V (Figura 2) hasta completar un mínimo de 5 ciclos ( $n \geq 5$ ), el número necesario de ciclos dependerá de la cantidad de cambio que se desee detectar y la variabilidad de las repuestas, pero a medida que se vayan acumulando más datos en cada ciclo, la variabilidad de los promedios disminuirá.

$$\text{Ecuación 3 } \Delta D = E^D + \sum_{j=1}^m a_j * pK_a AA_j$$

$$\text{Ecuación 4 } \Delta S_{vib} = E^S + \sum_{i=1}^m a_i * pK_a AA_i$$

Los modelos de regresión representados por la Ecuación 3 y la Ecuación 4, son las funciones objetivo que indicarán las mutaciones para los siguientes experimentos. Donde  $\Delta D$  es la fracción de cambio de energía de acoplamiento,  $\Delta S_{vib}$  es el cambio en la entropía de vibración,  $pK_{aAA_{i,j}}$  es el valor de  $pK_a$  para el aminoácido en la posición  $i$  o  $j$  de la secuencia primaria, ( $AA_i$  son las variables controlables),  $a_{i,j}$  son los coeficientes de regresión y  $E^D$  y  $E^S$  son los términos constantes para las funciones de  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$  respectivamente.

### 3.2.2. Fase EVOP en ingeniería de proteínas

Una vez se cumplan el número de ciclos propuestos, se procede a identificar las posiciones  $i$  en la secuencia primaria que conserven su independencia estadística y que además conforman los modelos de regresión durante las diferentes iteraciones, estas posiciones  $i$  de los aminoácidos que se conservaron son las que serán evaluadas a nivel de laboratorio para la validación experimental de las predicciones propuestas (mutaciones) por los modelos de regresión (Figura 2 VIII), lo que concluiría la fase y permitiría tomar la decisión si es necesario de evaluar nuevas posiciones  $i$  en la secuencia primaria para ser evaluadas, y así dar inicio a una nueva fase (Figura 2 IX)

### 3.2.3. Determinación de la condición preferible para EVOP en ingeniería de proteínas

Las condiciones preferibles, son las mutaciones que logren modificar la estructura terciaria y pueda satisfacer las siguientes restricciones para los modelos de regresión asociados a los cambios de entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ ) y energía de unión ( $\Delta D$ ):  $\Delta D > 0$  y  $\Delta S_{vib} < 0$  (Ecuación 3, Ecuación 4) en esta investigación. Posteriormente, las mutaciones predichas serán analizadas *in silico* y estos resultados serán evaluados estadísticamente, para lograr esto se disponen de varias alternativas para identificar los valores de las variables  $pK_{aAA_i}$  que logren satisfacer las restricciones propuestas. Algunas técnicas de optimización son:

- Superficie de respuesta: Este método se utiliza con frecuencia para refinar los modelos después de haber determinado cuales son las variables importantes del proceso y su rango de exploración, utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en el rango de las variables de respuesta<sup>184 185 186</sup>.
- Programación lineal: Método dedicado a optimizar una función lineal, (función objetivo), en donde la o las funciones objetivo y sus variables están sujetas a una serie de restricciones las cuales están expresadas mediante un sistema de ecuaciones o inecuaciones también lineales<sup>185 187 188 186</sup>.
- EVOP aleatoria: en este método se evalúan las variables de manera aleatoria durante la experimentación, con el objetivo de poder incluir el mayor número de ellas en la misma fase<sup>189 185 186</sup>.

- EVOP simplex: método usado donde lo que se busca es mejorar dos o más variables de respuesta simultáneamente<sup>185 186 187 190</sup>.

En esta investigación se propuso realizar una evaluación aleatoria con el fin de incluir el mayor número de posiciones  $i$  de aminoácidos ( $AA_i$ ) durante la fase, combinado junto con el método de optimización simplex para ajustar las variables de respuesta a las restricciones propuestas de  $\Delta D > 0$  y  $\Delta S_{vib} < 0$  (condiciones preferibles). El objetivo es ejecutar modificaciones simples en la secuencia primaria de la enzima en donde, estas mutaciones no incluyeren los aminoácidos catalíticos, y luego de las evaluaciones *in silico* del efecto de las mutaciones sobre la estructura de la enzima determinar por medio de regresión lineal múltiple, que posiciones ( $i$ ) y aminoácidos ( $AA$ ) se correlacionan con los cambios sobre  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$ . Para todos los propósitos prácticos, estas ecuaciones (Ecuación 3 y Ecuación 4) representan una superficie que se puede considerar como un plano, y es a partir de estas ecuaciones que se predice la dirección que se debería tomar en los próximos experimentos (mutaciones) para avanzar hacia las condiciones preferibles que se están buscando (máximo en la superficie que representan las ecuaciones de regresión)<sup>185 186</sup>, así las mutaciones que predicen los modelos de regresión (función objetivo) solo estarían indicando el camino en el cual debe realizarse los próximos experimentos *in silico*.

#### 3.2.4. Determinación de los modelos de regresión para EVOP para ingeniería de proteínas

El análisis de todos los aminoácidos y sus posiciones en la secuencia primaria de la enzima implica acudir al análisis estadístico de datos multivariante, con el fin de detectar que conjunto de estos aminoácidos tienen correlación con las variables de respuesta  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$ , y poder aventurar su predicción, es aquí donde la regresión lineal múltiple se usa como una herramienta para tratar de explicar la dependencia de las variables controlables ( $AA_i$ ), con las variables de respuesta o dependientes, además la regresión lineal también permite analizar la influencia de ciertas variables sobre las variables dependientes. Por esta razón, una etapa importante en el análisis estadístico multivariante es la comprobación de supuestos estadísticos latentes a las variables que intervienen en los modelos de regresión, en donde suele suponerse como hipótesis que sus variables en este caso  $pKaAA_i$  son linealmente independientes, es decir, que no existe alguna relación lineal exacta entre ellas (hipótesis de independencia)<sup>191 192</sup>. Para escoger las variables ( $pKaAA_i$ ) con independencia estadística, el programa Statgraphics XVII<sup>180</sup> permite identificar las variables que presenten dependencia lineal y ser descartadas, el programa realiza este análisis por defecto cuando se quiere generar el modelo de regresión lineal.

Una vez se han identificado las variables que presentan independencia estadística se procede ahora a seleccionar las que mejor explican los cambios en las variables de respuesta, este procedimiento considera todos los modelos de regresión posibles, lo que implica diferentes combinaciones de las variables independientes ( $pKaAA_i$ ). El programa Statgraphics XVII<sup>180</sup> tiene la opción de comparar y seleccionar entre todos los modelos con base los criterios propuestos por Spiess y Neumeyer (2010) para investigaciones bioquímicas:<sup>181</sup>: el criterio de información Akaike (AIC)<sup>193</sup>, el criterio Hannan Quinn (HQC)<sup>194</sup> y el criterio de información Schwarz-Bayesiano (SBIC)<sup>195</sup>, estos criterios tienen diferentes formas de penalizar los modelos de regresión en función del número de coeficientes, la cantidad de datos disponibles y el error cuadrático medio del modelo, y así de todas las combinaciones posibles de modelos de regresión, estos criterios ayudan a seleccionar el modelo más simple y que explique mejor los datos observados.

### 3.2.5. Cálculo de las condiciones preferibles de los modelos de regresión preferible para EVOP en ingeniería de proteínas

Finalmente, cuando se han determinado los modelos de regresión que mejor explican los cambios observados en  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$  y las variables involucradas  $pK_a AA_i$ , se debe determinar que valores de  $pK_a$  asociados a las variables  $AA_i$  ( $pK_a AA_i$ ) satisfacen las condiciones favorables (restricciones) para  $\Delta D > 0$  y  $\Delta S_{vib} < 0$  (Ecuación 5 y Ecuación 6)

$$\text{Ecuación 5 } \Delta D = E^D + \sum_{j=1}^m a_j * pK_a AA_j > 0$$

$$\text{Ecuación 6 } \Delta S_{vib} = E^S + \sum_{i=1}^m a_i * pK_a AA_i < 0$$

Para encontrar los valores de  $pK_a AA_i$  que cumplan las condiciones propuestas se usó el programa Solver de Microsoft Excel, que permite encontrar un valor óptimo (mínimo o máximo) para una fórmula en una celda, llamada celda objetivo en este caso serán dos celdas objetivo  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$ , que están sujetas a restricciones o limitaciones en los valores de otras celdas de fórmula de una hoja de cálculo. Solver trabaja con un grupo de celdas llamadas celdas de variables de decisión ( $pK_a AA_i$ ), celdas de variables que se usan para calcular fórmulas en las celdas objetivo y de restricción. Solver ajusta los valores de las celdas de variables de decisión para que cumplan con los límites de las celdas de restricción y así obtener el resultado deseado en la celda objetivo.

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1. Validación *in silico* de la metodología EVOP en ingeniería de proteínas

Una forma de validar la metodología propuesta consiste en tomar datos reportados en la literatura y tratar de replicar esos resultados a partir de la propuesta de investigación aquí planteada, para tal fin se tomarán los datos reportados por Reetz et al., (2006)<sup>20 16</sup>, donde se modificó una triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3, gen Lip A) de *Bacillus subtilis* 168<sup>20</sup>, logrando incrementar su estabilidad térmica, para lo cual los sitios de mutación se seleccionan con base a la diferencia estructural que existe entre enzimas mesófilas y termófilas, esta diferencia radica en que las estructuras de las enzimas termófilas presentan una mayor rigidez que las mesófilas, por lo que se asume que una mejora en la estabilidad térmica en las enzimas mesófilas debe ser posible al aumentar la rigidez en ciertas zonas en la estructura de la enzima (sustituciones de aminoácidos)<sup>72</sup>, las que son identificadas en función de los parámetros de desplazamiento atómico que se obtienen a partir de rayos X de la estructura enzimática, estos parámetros son los factores B (valores B), los cuales muestran el grado de corrimiento de las densidades electrónicas de los átomos con respecto a sus posiciones de equilibrio en el espacio, producto del movimiento térmico y, por tanto, es una muestra de la flexibilidad estructural<sup>71</sup>. Es a partir de estos valores que se seleccionaron 10 posiciones de aminoácidos para la mutagénesis por saturación, correspondiendo a aquellas que mostraron los valores B más altos en la enzima (G13, R33, D34, K35, K69, K112, M134, Y139, I157 y Q164)<sup>20</sup> (Figura 3), es a partir de estas posiciones que los autores generaron librerías de mutantes por mutagénesis de saturación y con una evaluación rápida para evidenciar estabilidad térmica  $T_{50}^{15}$  (temperatura a la cual pierde el 50% de su actividad enzimática inicial luego de 15 minutos de estrés térmico) de las mutantes, y a partir de la combinación de las variantes que mostraron un efecto estabilizador en la enzima encontrar la combinación de estas que generara un incremento en la estabilidad térmica (Figura 4).

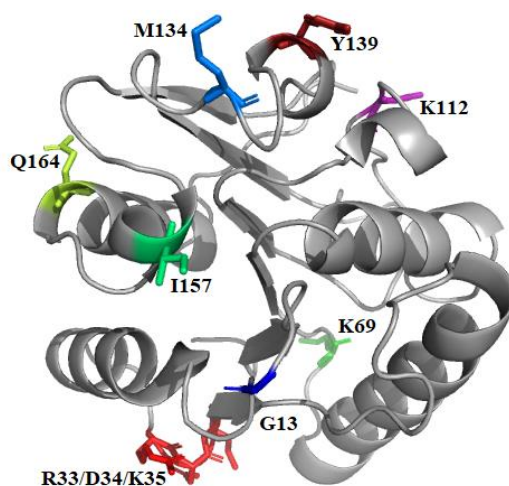


Figura 3. Sitios modificados por Reetz et al., (2006) en la lipasa Lip A

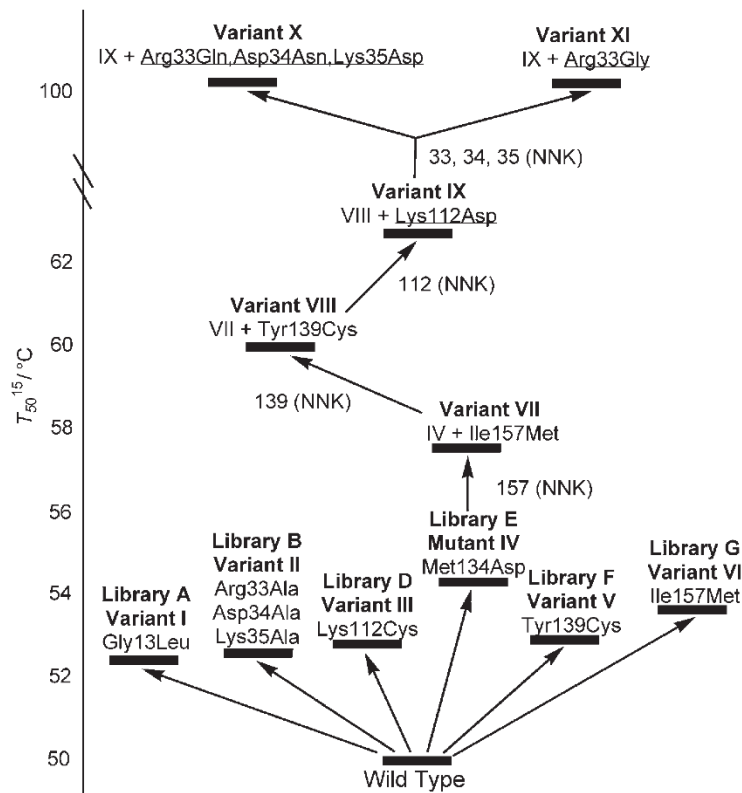


Figura 4. Estabilidad térmica ( $T_{50}^{15}$ ) de variantes de LipA en las diferentes etapas de la evolución (adaptado de Reetz et al., (2006)<sup>20</sup>)

#### 4.1.1. Validación *in silico* de la metodología a EVOP en ingeniería de proteínas para la lipasa Lip A

Secuencia primaria de la lipasa LipA de *Bacillus subtilis* 168<sup>20</sup> (Anexo A), a partir de esta secuencia se genera el modelo estructural usando el servidor Raptor X<sup>112</sup> (Sección 3.1.2) el cual usó como plantilla la estructura PDB 1I6W que corresponde a la estructura terciaria de la secuencia primaria de la lipasa LipA, a partir de esta estructura (Figura 5) se realizan análisis de modos normales, cálculo de las energías de deformación para los primeros 20 modos normales, cálculo de la entropía de vibración ( $S_{vib\ natv}$ , sección 3.1.5) y el cálculo de la energía de acoplamiento ( $\Delta GD, wt$  sección 3.1.6), los cuales serán los valores de referencia para evaluar el efecto de las mutaciones propuestas durante la validación de la metodología propuesta en esta investigación, también se identifica la posición de los aminoácidos catalíticos S77, D133 y H156<sup>20</sup> y el rango de pH donde esta enzima presenta su mayor actividad catalítica es entre pH 6 a pH 10<sup>196</sup>.

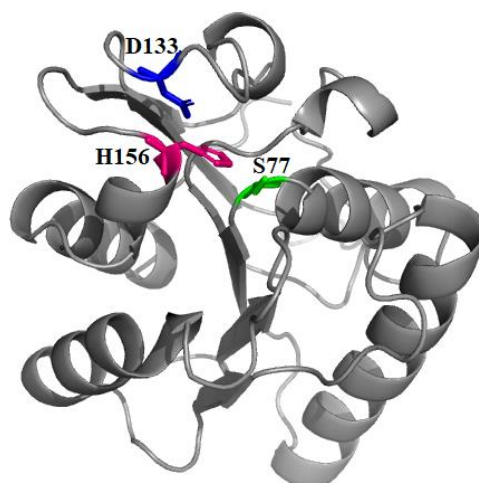


Figura 5. Estructura enzima nativa lipasa Lip-A, posición de los aminoácidos catalíticos S108, D164 y H187.

#### 4.1.2. Mutaciones propuestas para la lipasa Lip-A en el Ciclo EVOP.

A partir de la secuencia primaria y la generación de su respectiva estructura se realiza un análisis de modos normal y se calculan las energías de deformación, usando el el servidor WEBmn@ (Tabla 4), para ahora calcular la entropía de vibración, reemplazando los valores de las energías de deformación para la lipasa nativa en la Ecuación 7 la cual se deduce a partir de la Ecuación 1 (sección 3.1.5), así se tiene  $S_{vib\ natv} = 131.85 * k_B$ .

Tabla 4. Energías de deformación para la estructura de la lipasa LipA de Bacillus subtilis 168 <sup>197</sup>

Modo normal	Energía de deformación
7	5820,96
8	10602,05
9	8835,47
10	8362,89
11	9249,37
12	11641,55
13	13140,94
14	12784,59
15	13338,87
16	14577,16
17	15419,80
18	17715,54
19	21182,96
20	19724,61

$$\text{Ecuación 7 } S_{vib\ natv} = k_B * \ln(\prod_{n=7}^{n=20} \lambda_{n,wt})$$

Ahora con la estructura terciaria se determina la energía de acoplamiento entre la enzima y el sustrato para lipasa (Lip A) es p-Nitrofenil caprilato (Figura 6) según lo reportado por Reetz et al., (2006)<sup>20</sup>, usando el servidor Swissdock (sección 3.1.6), partir de los resultados entregados por el servidor se obtiene el valor  $\Delta GD, wt = -6,51789$  kcal/mol (resultado de promediar 10 energías de las conformaciones mas favorables).

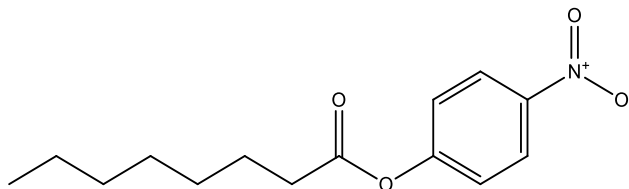


Figura 6. Representación de la estructura del sustrato usado para el análisis de acoplamiento para la lipasa LipA p-Nitrofenil caprilato.<sup>20</sup>

A partir del análisis de modos normal de la estructura se puede obtener información de la fluctuación de los carbonos  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) para cada modo normal, el servidor WEBmn@ entrega esta información de las Fluctuaciones promediada para los 200 primeros modos normales (Figura 7). Hacer un análisis sobre las Fluctuaciones de los  $C\alpha$  representa un ventaja sobre los valores B debido a que estos últimos ha mostrado experimentalmente una gran varianza de proteína a proteína (resolución de la estructura, contactos cristalinos), lo que refleja las diferencias entre los métodos y etapas de refinamiento estructural mas que una varianza natural<sup>68 198 199</sup>, es así que con la finalidad de evitar sesgos hacia las estructuras modelas y facilitar las comparaciones entre los diferentes modelos estructurales se propone normalizar las Fluctuaciones de los  $C\alpha$  según lo propuesto por Schlessinger, y Rost (2005)<sup>200 137</sup> (Ecuación 8).

$$\text{Ecuación 8} \quad F_{nc\alpha i} = \frac{(F_{c\alpha i} - \overline{F_{c\alpha}})}{\sigma_F}$$

Donde  $F_{nc\alpha i}$  fluctuación normalizada del  $C\alpha$  en la posición  $i$ ,  $F_{c\alpha i}$  es el valor de fluctuación del  $C\alpha$  en la posición  $i$ ,  $\sigma_F$  es la desviación estándar de las fluctuaciones en la estructura y  $\overline{F_{c\alpha}}$  es el promedio de las Fluctuaciones en la estructura, la Figura 7 muestra las fluctuaciones normalizadas para la estructura de la lipasa LipA y se indican las posiciones de los aminoácidos seleccionados por Reetz et al., (2006) para ser mutados, indicados con cuadros negros en la Figura 7.



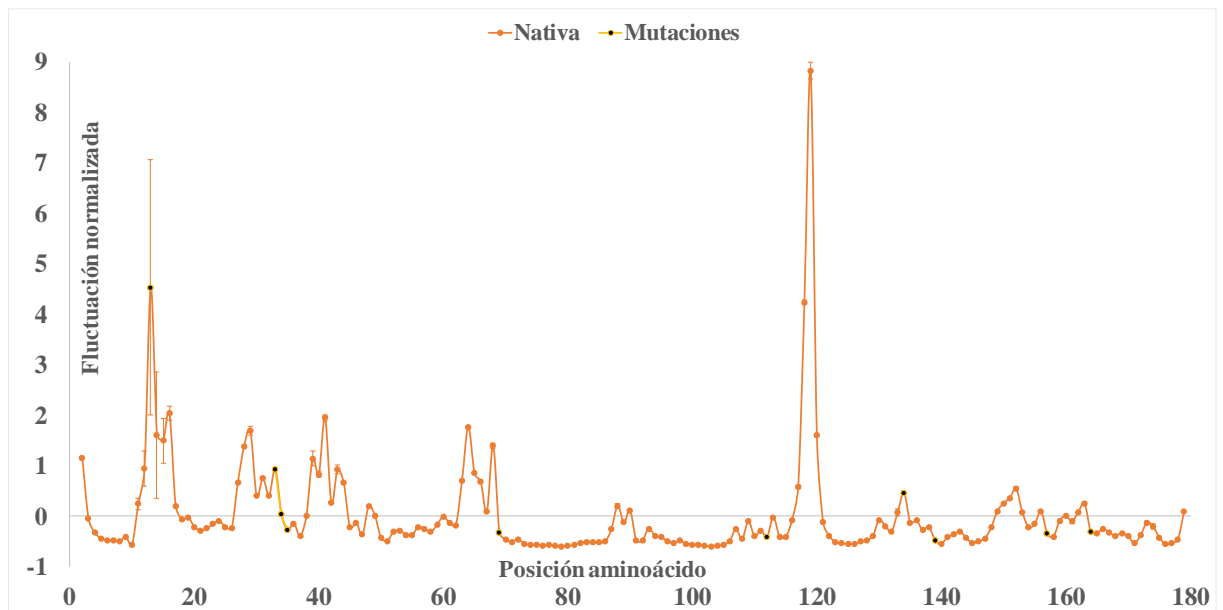


Figura 7. Fluctuaciones normalizadas de los carbonos  $\alpha$  en la estructura de la lipasa LipA, en cuadros naranja (■), las posiciones seleccionadas por Reetz et al., (2006) en cuadros negros (■).

De manera similar se utiliza un procedimiento de normalización de la variable  $pK_a AA_i$  (Ecuación 9) como una alternativa válida para la construcción de los modelos de regresión para representar el comportamiento del cambio en la energía de acoplamiento y el cambio en la entropía de vibración, permitiendo realizar una representación adecuada del problema y facilitar el análisis para la predicción de resultados, y al normalizar se simplifica la realización de los modelos de regresión y facilita la toma de decisiones para los próximos experimentos *in silico*.

$$\text{Ecuación 9} \quad npK_a AA_i = \frac{(pK_a AA_i - pH)}{pH}$$

Donde  $npK_a AA_i$  es el valor de  $pK_a$  del aminoácido en la posición  $i$  ( $AA_i$ ) normalizado,  $pK_a AA_i$  es el valor de la constante de acidez de  $AA_i$ ,  $pH$  es el valor de la acidez a la cual se calcularon los valores de  $pK_a AA_i$  en el servidor PDB2PQR<sup>120</sup>, para este análisis se realizan los cálculos a  $pH=8$ <sup>196</sup>.

Con respecto a la fluctuación de los sitios catalíticos se ha sugerido que estos, en general, son menos flexibles que los aminoácidos del resto de la estructura o sitios sin actividad catalítica<sup>201 202</sup>, por este motivo, para la validación *in silico* se seleccionan los aminoácidos en las posiciones que presenten una fluctuación de los  $C\alpha$  mayor a la fluctuación del aminoácido catalítico S77 (Figura 8 círculo rojo) que presenta la menor fluctuación, así se seleccionaron los siguientes aminoácidos G13, R33, D34, K35, K69, H76, D91, K112, M134, Y139, I157 y Q164 (Figura 8), indicados con triángulos azules, a partir de estas posiciones se proponen combinaciones, que serán las variantes estructurales de la enzima como se muestra en la Tabla 5, para estas variantes se generan sus respectivos modelos estructurales (sección 3.1.2) y con estos modelos se calcularon los cambios en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$  sección 3.1.5) y las energías de acoplamiento ( $\Delta D$ , sección 3.1.6) como se muestran en la Tabla 6.

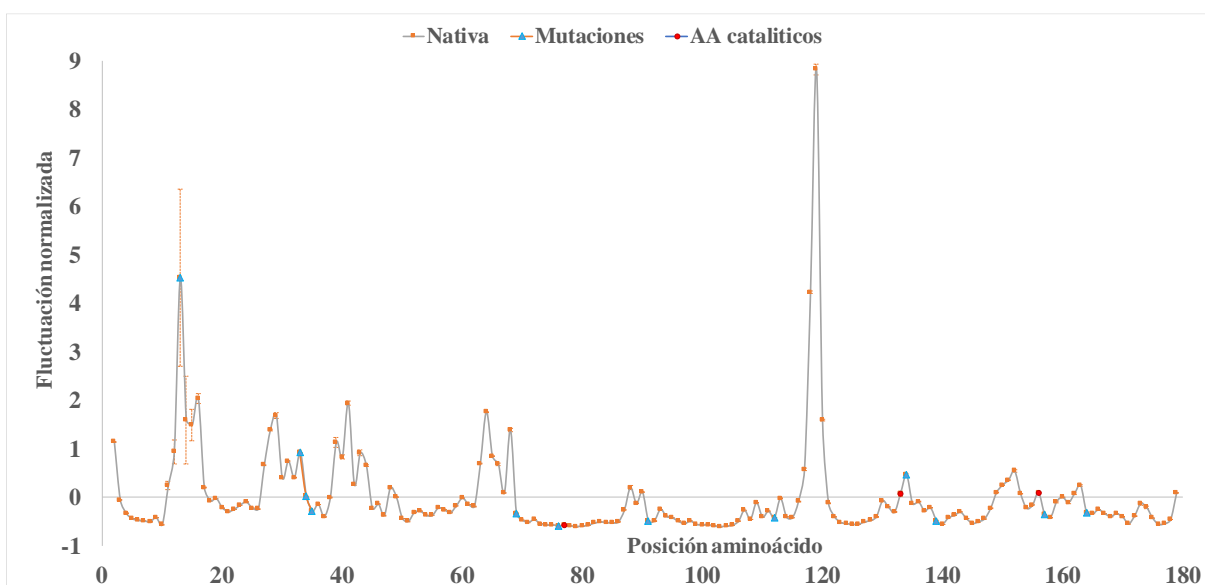


Figura 8. Posiciones de los aminoácidos en la estructura de la lipasa LipA en triángulos azules (▲), aminoácidos catalíticos indicados con círculo rojo (●).

Tabla 5. Variantes con las sustituciones propuestas para el primer ciclo para la lipasa LipA.

<b>VARIANTES</b>
G13L
R33A/D34A/K35A
R33D/D91L
R33E/D91L
R33K/D91L
R33D/D34C/K35M/H76D/D91L
R33D/D34H/K35Q/H76D/D91N
R33E/D34C/K35M/H76D/D91N
R33E/D34H/K35Q/H76D/D91G
R33E/D34H/K35Q/H76D/D91N
K112C
M134D
Y139C
I157M
M134D/I157M
M134D /Y139C/I157M
K112D/M134D /Y139C/I157M

Con esta información se procede ahora a realizar el análisis estadístico (sección 3.2.4) para identificar las mutaciones que explican los cambios observados en  $\Delta S_{vib}$  y en  $\Delta D$ , se seleccionan inicialmente las variables  $pK_a AA_i$  que muestran una desviación estándar mayor a 0,02 se seleccionaron para realizar el análisis estadístico, se identificaron 20 posiciones en la secuencia primaria (Tabla 7), de estas se identifican las presentan independencia estadística, 17 en total y así se procede a seleccionar la combinación de estas que mejor expliquen los cambios observados en el cambio en entropía de vibración las posiciones identificadas fueron 34, 69, 76, 91, 95, 107, 112,

133, 134 y 139 y para el cambio en la energía de acoplamiento, las posiciones identificadas son 10, 69, 91, 95, 107 y 134 los resultados se muestran resumidos en la Tabla 7.

Tabla 6. Valores de la energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ) y el cambio en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ ) para las variantes propuestas.

		$\Delta D$	$\Delta S_{vib}(k_B)$
	Lipasa nativa	0,0000	0,0000
	<b>VARIANTES</b>		
1	G13L	0,0315	0,0588
2	R33A/D34A/K35A	-0,0155	0,0590
3	R33D/D91L	-0,0056	-0,0004
4	R33E/D91L	0,0014	-0,0002
5	R33K/D91L	0,0049	0,0005
6	R33D/D34C/K35M/H76D/D91L	-0,0026	0,0006
7	R33D/D34H/K35Q/H76D/D91N	0,0171	-0,0592
8	R33E/D34C/K35M/H76D/D91N	0,0143	0,0593
9	R33E/D34H/K35Q/H76D/D91G	0,0159	0,0590
10	R33E/D34H/K35Q/H76D/D91N	-0,0031	0,0002
11	D91L	0,0026	0,0003
12	K112C	-0,0008	0,0587
13	M134D	0,0004	0,0583
14	Y139C	0,0084	0,0588
15	I157M	-0,0153	-0,1166
16	M134D/I157M	0,0013	0,0589
17	M134D /Y139C/I157M	0,0603	-0,0025
18	K112D/M134D /Y139C/I157M	0,0565	-0,0024

Con las variables identificadas (Tabla 7) para correlacionar los valores de  $npK_aAA_i$  se generan los modelos de regresión lineal usando el programa Statgraphics XVII, la Ecuación 10 correlaciona las variables para explicar el cambio en la energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ) debido al efecto de las mutaciones propuestas, de manera similar la Ecuación 11 correlaciona los cambios en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ ); los modelos de regresión así calculados logran correlacionar el 90 % de los cambios observados, ( $R^2 > 90 \%$ ).

$$\text{Ecuación 10 } \Delta D = 7,87959 - 8,18408*AA10 - 36,7733*AA69 + 0,056379*AA91 + 0,202529*AA95 + 0,609744*AA107 - 0,0210249*AA134 \quad R^2 = 93,6227$$

$$\text{Ecuación 11 } \Delta S_{vib} = -271,671 + 0,133029*AA34 - 149,906*AA69 - 2,02731*AA76 + 0,559097*AA91 + 2,18799*AA95 + 531,768*AA107 + 19,3016*AA112 + 48,688*AA133 - 1,01767*AA134 + 97,6134*AA139 \quad R^2 = 91,249$$

Tabla 7. Posiciones de aminoácidos seleccionadas para ajustar los modelos de regresión lineal, para la lipasa LipA.

<b>Posición del aminoácido</b>	<b>Variables con independencia estadística</b>	<b>Selección de variables para DOCKING</b>	<b>Selección de variables para ENTROPÍA</b>
AA10	AA10	AA10	
AA23			
AA25			
AA33	AA33		
AA34	AA34		AA34
AA35	AA35		
AA37	AA37		
AA40			
AA69	AA69	AA69	AA69
AA76	AA76		AA76
AA91	AA91	AA91	AA91
AA95	AA95	AA95	AA95
AA107	AA107	AA107	AA107
AA112	AA112		AA112
AA125	AA125		
AA129	AA129		
AA133	AA133		AA133
AA134	AA134	AA134	AA134
AA139	AA139		AA139
AA161	AA161		

Ahora con los modelos de regresión (función objetivo) ya definidos para  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$  se procede a calcular los valores de  $npK_a AA_i$  que satisfagan las condiciones preferibles:  $\Delta S_{vib} < 0$  y  $\Delta D > 0$ , (sección 3.2.5), usando el complemento Solver de Excel. En este caso el problema planteado admite infinitas soluciones dado que el número de variables supera al número de ecuaciones disponibles, pero las restricciones propuestas acotan el espacio las de soluciones posibles, la Tabla 8 muestra las soluciones seleccionadas; ahora a partir de los valores de  $npK_a AA_i$  se calculan los valores de  $pK_a$  (Ecuación 9) como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 8. Soluciones seleccionadas para la Ecuación 10 y Ecuación 11.

npKaAA10	-0,214	0,000	-0,013	0,016
npKaAA34	-0,707	0,000	0,000	0,004
npKaAA69	0,271	0,222	0,224	0,220
npKaAA76	1,000	0,000	0,001	0,018
npKaAA91	-0,973	0,000	0,000	-0,074
npKaAA95	1,000	0,000	-0,001	0,021
npKaAA107	0,296	0,573	0,525	0,566
npKaAA112	0,452	0,000	-1,000	-0,012
npKaAA133	1,000	0,000	0,986	0,037
npKaAA134	-0,022	0,000	0,000	-0,002
npKaAA139	1,000	0,000	-0,027	0,018

$\Delta D$	0,000	0,050	0,050	0,002
$\Delta S_{vib}$ (kB)	-0,200	-0,200	-0,200	-0,134

$pK_a AA_i$  es el valor de  $pK_a$  del aminoácido en la posición  $i$  ( $AA_i$ ) normalizado.  
 $\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}$ (kB) cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Tabla 9 Valores de  $pK_a$  que satisfacen las condiciones preferibles.

pKaAA10	6,3	8,0	7,9	8,1
pKaAA34	2,3	8,0	8,0	8,0
pKaAA69	10,2	9,8	9,8	9,8
pKaAA76	16,0	8,0	8,0	8,1
pKaAA91	0,2	8,0	8,0	7,4
pKaAA95	16,0	8,0	8,0	8,2
pKaAA107	10,4	12,6	12,2	12,5
pKaAA112	11,6	8,0	0,0	7,9
pKaAA133	16,0	8,0	15,9	8,3
pKaAA134	7,8	8,0	8,0	8,0
pKaAA139	16,0	8,0	7,8	8,1

$\Delta D$	0,000	0,050	0,050	0,002
$\Delta S_{vib}$ (kB)	-0,200	-0,200	-0,200	-0,134

$pK_a AA_i$  es el valor de  $pK_a$  del aminoácido en la posición  $i$  ( $AA_i$ ).  
 $\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}$ (kB) cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Para asignar el aminoácido asociado al valor de  $pK_a$  predicho por la Ecuación 10 y la Ecuación 11 se usan los valores propuestos por Kidera et al. (1985) que normalizan propiedades físicas características de los aminoácidos en la estructura de la enzima como la polaridad, entre otras<sup>203</sup>, estos valores normalizados para la polaridad (vnp), se correlacionaron a los valores de  $pK_a$ <sup>204</sup> (Tabla 10, Ecuación 12) para asociarlos a los valores de estimados por los modelos de regresión. A partir de los datos que se muestran en la Tabla 10 y la Tabla 9 se identifican los posibles

aminoácidos que deben ser modificados en la secuencia primaria (Tabla 11) para generar las variantes para el próximo ciclo como se muestra en la Tabla 12. Esto le permite a la metodología propuesta (sección 3.1) hacer que en cada ciclo las variables  $pK_{aAA_i}$  se muevan hacia al espacio de respuesta óptima. Para esta validación se realizaron 3 ciclos, al cumplirlos se pasó al siguiente punto de la metodología propuesta correspondiente a la Fase EVOP (sección 3.2.2).

Tabla 10. Valores estimados de  $pK_a$  para aminoácidos en función de su polaridad. <sup>203</sup>

Aminoácido	Valores normalizados de polaridad	$pK_a$ estimado
ASP	-1,74	3,1
GLU	-1,65	6,8
LYS	-1,62	7,9
ARG	-1,52	11
ASN	-0,60	15,5
GLN	-0,46	14,2
SER	-0,33	12,9
GLY	-0,19	11,6
HIS	-0,18	11,5
THR	0,01	9,9
ALA	0,11	9,3
PRO	0,21	8,7
CYS	0,63	8,2
MET	0,72	8,5
VAL	0,77	8,7
ILE	0,97	10,0
LEU	1,01	10,4
TYR	1,04	10,7
PHE	1,24	12,8
TRP	1,55	16,8

$$\text{Ecuación 12 } pK_a = -1,674917*(vnp)^4 + 4,039259*(vnp)^3 + 5,46492*(vnp)^2 - 7,548555*(vnp) + 10,009608 \quad R^2=72,3 \%$$

Tabla 11. Posibles aminoácidos que cumplen con la condición preferible para la lipasa LipA.

Posición	Aminoácidos			
10	E	K, C	K, C	K, C
34	D	K, C	K, C	K, C
69	I, L, A, Y, T	T, I,	T, I,	T, I,
76	W, N	K, C	K, C	K, C
91	D	K, C	K, C	E
95	N, W	K, C	K, C	C, K
107	L, I, A, Y, T	S, F	S, F	S, F
112	H,G	K, C	D	K, C
133	W, N	K, C	W, N	K, C
134	K, C	K, C	K, C	K, C
139	W, N	K, C	K, C	K, C
$\Delta D$	0,000	0,050	0,050	0,002
$\Delta S_{vib}(\text{kB})$	-0,200	-0,200	-0,200	-0,134

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}(\text{kB})$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Tabla 12. Variantes propuestas para el segundo ciclo EVOP

Posición	Variantes			
	pK <sub>a</sub> -1	pK <sub>a</sub> -2	pK <sub>a</sub> -3	pK <sub>a</sub> -4
10	E	K	C	K
34	D	K	C	C
69	I	T	I	T
76	W	K	C	K
91	D	K	C	E
95	N	K	C	K
107	L	S	S	F
112	H	K	D	K
133	W	K	W	C
134	K	K	C	K
139	W	K	C	C
$\Delta D$	0,000	0,050	0,050	0,002
$\Delta S_{vib}(\text{kB})$	-0,200	-0,200	-0,200	-0,134

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}(\text{kB})$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

#### 4.1.3. Análisis de las mutaciones propuestas en la lipasa LipA (Fase EVOP).

En este punto de la metodología se identifican las posiciones *i* de los aminoácidos que conservan su independencia estadística y que además hacen parte de los modelos de regresión en cada ciclo evaluado, estas posiciones conservadas o convergentes corresponden a las posiciones 34, 35, 76, 91, 107, 112 y 134, en la secuencia primaria, como se muestra en la Tabla 13.

Tabla 13. Variantes analizadas en los tres ciclos evaluados.

Posición amino ácidos	CICLO 1																		CICLO 2				CICLO 3					
	VARIANTES																		pKa-1	pKa-2	pKa-3	pKa-4	1_F6	2_F6	3_F6	4_F6	5_F6	pKa-5
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18										
10																		E	K	C	K							
13	L																					R	K	V	H	R	A	
33		A	D	E	K	D	D	E	E	E												T	H	T	H	Y	Y	
34		A				C	H	C	H	H								D	K	C	C					A	K	
35		A				M	Q	M	Q	Q																V	R	
69																		I	T	I	T							
76						D	D	D	D	D								W	K	C	K					E	C	
91			L	L	L	L	N	N	G	N	L							D	K	C	E	T	H	T	H		K	
94																											K	
95																		N	K	C	K							
107												C						L	S	S	F					T	T	
112																	D	H	K	D	K					T	Y	
118																						N	L	L	N		C	
133																		W	K	W	C							
134												D			D	D	D	K	K	C	K						R	
139													C				C	C	W	K	C	C						
157														M	M	M	M											
$\Delta D$	0,03	-0,02	-0,01	0,00	0,00	0,00	0,02	0,01	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01	-0,02	0,00	0,06	0,06	-0,02	0,00	-0,02	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,04	0,00	
$\Delta S_{vib}(kB)$	0,06	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,06	0,06	0,06	0,00	0,00	0,06	0,06	-0,12	0,06	0,00	0,00	0,09	0,01	0,09	0,11	-0,12	-0,09	-0,05	-0,12	-0,06	0,12	



Ahora se comparan estas posiciones conservadas con los resultados del trabajo de Reetz et al., (2006)<sup>20</sup>, se observa que las posiciones 33, 34, 112 y 134 son comunes en las dos metodologías, con la metodología EVOP logró una coincidencia del 57 % de las posiciones reportadas con solo dos ciclos ver Tabla 14, las posiciones 76, 91 y 107, son relevantes para la metodología EVOP y surgen del efecto de las mutaciones sobre el microambiente de los aminoácidos vecinos alterando así sus valores de pKa, y estas alteraciones en conjunto provocan los cambios observados en los valores de  $\Delta D$  y en  $\Delta S_{vib}$  ( $k_B$ ) (Tabla 13).

Tabla 14. Variantes finales del trabajo de Reetz et al., (2006)<sup>20</sup> y del ciclo número 3 EVOP para la lipasa Lip A

Posición aminoácidos	Variantes			
	Reetz (2006)		EVOP	
	X	XI	1_F6	5_F6
10				
13			R	R
33	Q	G	T	Y
34	N	N		A
35	D	D		V
69				
76				E
91			T	
94				
95				
107				T
112	D	D		T
118			N	
133				
134	D	D		
139	C	C		
157	M	M		
$\Delta D$	0,04	0,05	0,02	0,04
$\Delta S_{vib}(k_B)$	0,34	0,33	-0,12	-0,06

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}(k_B)$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

#### 4.1.4. Discusión de resultados sobre el análisis estructural de la lipasa LipA para la validación *in silico* de la metodología EVOP

Partiendo de la premisa planteada por el trabajo de Reetz et al., (2006)<sup>20</sup> sobre alterar la flexibilidad estructural de la lipasa Lip A a partir de mutar los aminoácidos con mayor movilidad, se procede ahora a analizar el efecto de dichas mutaciones y a su vez las mutaciones sugeridas por la metodología EVOP (Tabla 14). La Figura 9 muestra las Fluctuaciones normalizadas para la estructura de la enzima nativa junto con las estructura de las variantes finales.

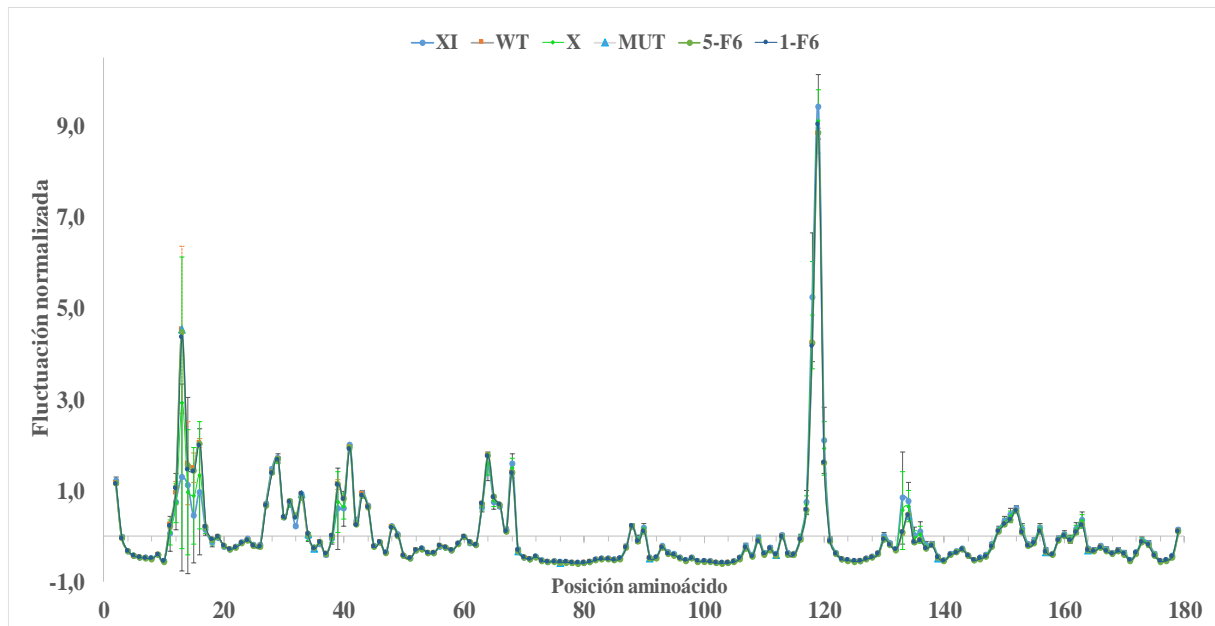


Figura 9. Fluctuaciones normalizadas para la estructura de la enzima nativa (wt) junto con las estructuras de las variantes finales (X, XI, 1-F6, 5-F6)

Apartir de los valores normalizados de las Fluctuaciones se identifican las posiciones en las variantes (X, XI, 1-F6, 5-F6) que presentaron cambios superiores de al menos un 5 % (valor absoluto) con respecto a la estructura de la enzima nativa (Figura 9), la Figura 10 a, se muestra como desde la posición 11 hasta la 20, el efecto de las mutaciones propuestas para las variantes X y XI generan una reducción en las Fluctuaciones en las estructuras, para las variantes X y XI la reducción observada esta en promedio en  $-34,7 \% \pm 18,0$  y  $-47,2 \% \pm 27,7$  respectivamente y para las variantes 1-F6 y 5-F6 la reducción en los valores de la fluctuación no presentan un cambio tan grande, siendo en promedio solo del  $-6,0 \% \pm 3,9$  y  $-4,0 \% \pm 4,3$  respectivamente, luego se observa la zona de la posición 21 a 26 (ver Figura 10) donde se presenta un incremento en los valores de la fluctuación en las variantes X y XI en promedio del  $10,0 \% \pm 7,0$  y de  $15,2 \% \pm 10,6$  respectivamente, y para las varianetes 1-F6 y 5-F6 sin embargo el incremento de en la fluctuación para la misma zona no supera el 2 % con respecto a la estructura nativa. La Figura 10 b, muestra la zona en la estructura que corresponde a las posiciones 11 a 27 (resaltada en color verde), esta zona correspondería a un lazo o loop y una porción de la estructura secundaria de un alfa hélice.

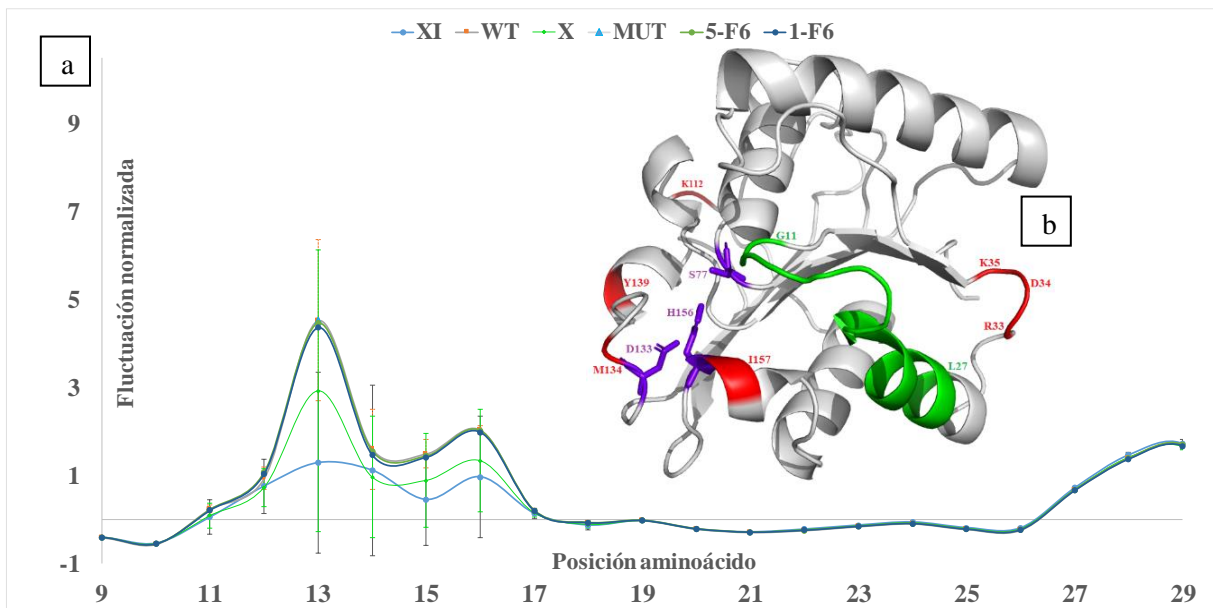


Figura 10. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 11 a 27. a) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. b) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en verde la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 11 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, específicamente en la zona correspondiente a las posiciones 32 a 40 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan una reducción en la fluctuación en promedio superior al -100 %, sin embargo para las variantes 1-F6 y 5-F6 la reducción en la fluctuación para esta misma zona no supera en promedio el -5 % con respecto a la estructura nativa, la Figura 11 c, muestra esta zona en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color azul), las posiciones 37 no está resaltada debido que en ninguna de las variantes evaluadas se observó algún cambio superior al 5 % con respecto a la estructura nativa, la zona donde se evidenciaron los cambios en la fluctuación corresponde a un lazo o loop.

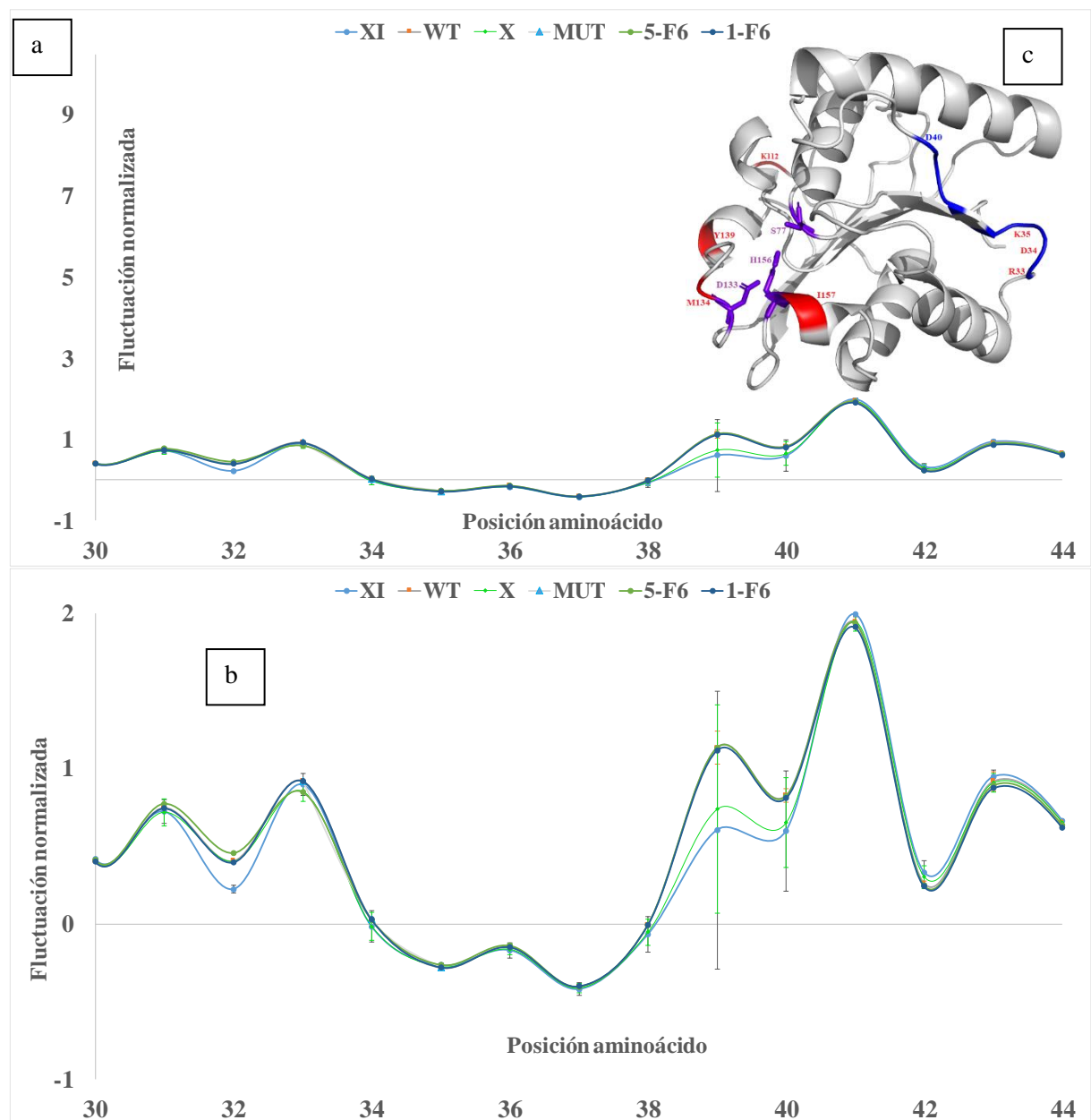


Figura 11. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 32 a 40. a) y b) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. c) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en azul la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 12 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, específicamente en la zona correspondiente a las posiciones 63 a 70 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan una reducción de la fluctuación en las posiciones 63 a 66 que en promedio son  $8,0 \% \pm 2,0$  y  $10,1 \% \pm 4,0$  respectivamente, sin embargo para estas variantes en la zona correspondiente a las posiciones 67 a 69 muestran un incremento en los valores de fluctuación siendo en promedio  $10,0 \% \pm 20,0$  y  $26,6 \% \pm 23,2$  respectivamente; sin embargo para las variantes 1-F6 y 5-F6 la reducción en la fluctuación para esta mismas zonas no superan en promedio el  $1 \% \pm 1,0$  el cambio en la fluctuación con respecto a la estructura nativa, la Figura 12 c, muestra esta zona (63 a 70) en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color amarillo).

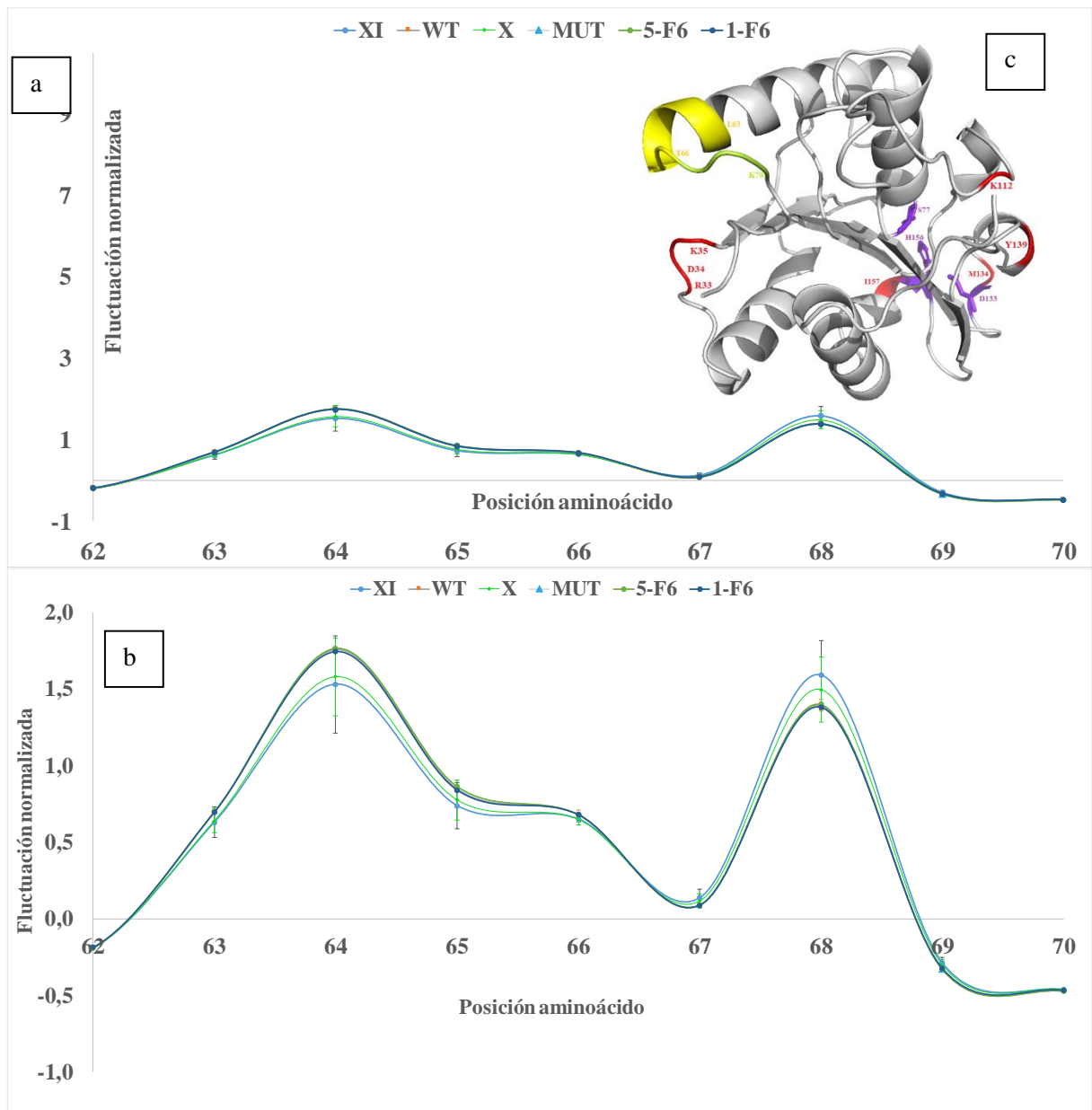


Figura 12. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 63 a 70. a) y b) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. c) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en amarillo la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 13 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, precisamente para la zona correspondiente a las posiciones 87 a 95 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan un aumento en la fluctuación en esta zona mostrando en promedio un incremento del  $12,2 \% \pm 14,0$  y  $17,6 \% \pm 21,5$  respectivamente, por otro lado, las variantes 1-F6 y 5-F6 presentan en promedio un incremento en la fluctuación de  $2,7 \% \pm 2,5$  y  $1,6 \% \pm 2,8$ , con respecto a la estructura nativa. la Figura 13 c, muestra esta zona en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color morado).

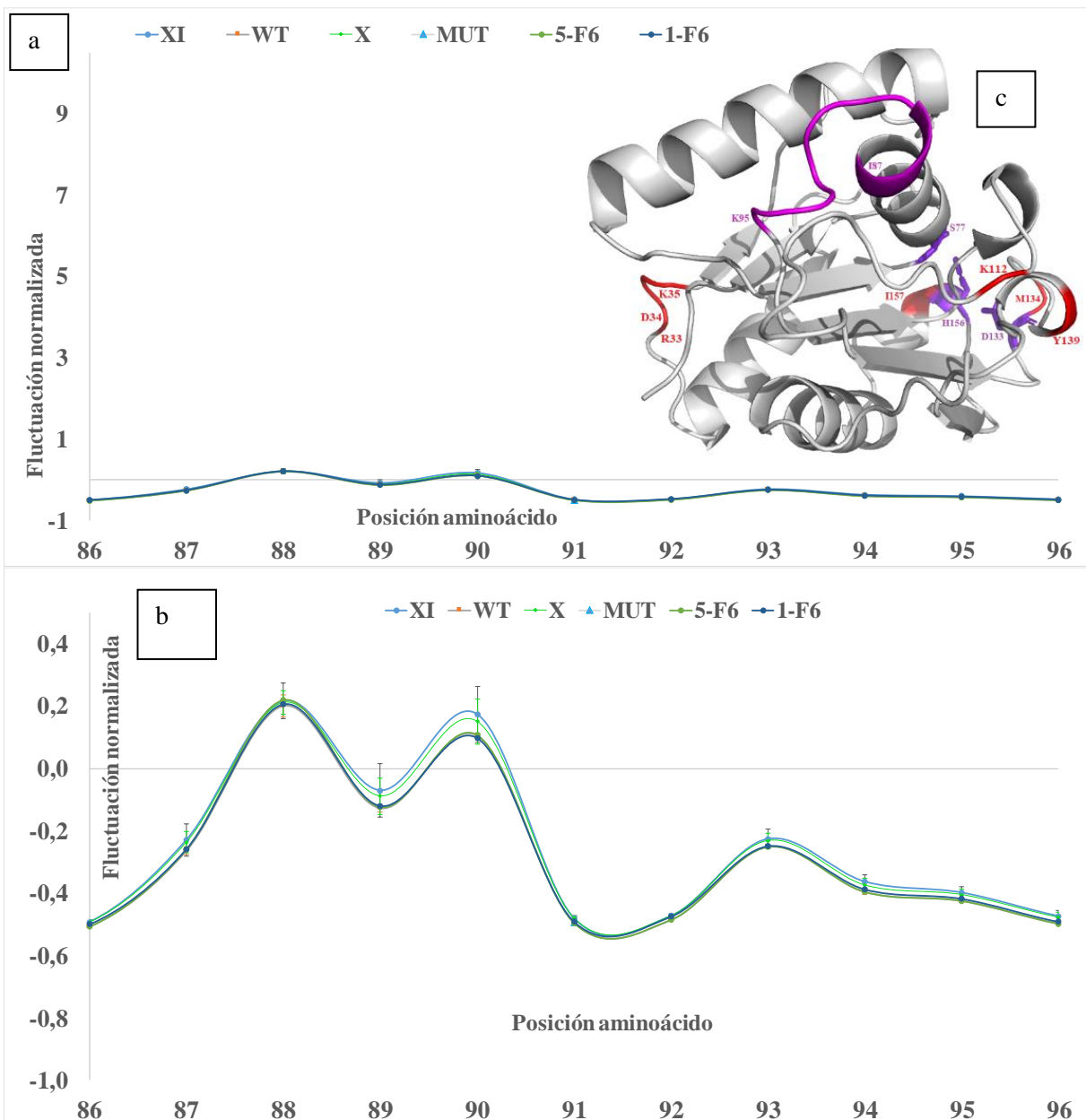


Figura 13. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 87 a 95. a) y b) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. c) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en morado la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 14 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, puntualmente para la zona correspondiente a las posiciones 107 a 122 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan un aumento en la fluctuación en esta zona mostrando en promedio un incremento del 20,5 %  $\pm$ 27,5 y 31,6 %  $\pm$ 44,9 respectivamente, por otro lado, las variantes 1-F6 y 5-F6 presentan en promedio cambios en la fluctuación en promedio de 1,6 %  $\pm$ 1,6 y 2,6 %  $\pm$ 4,5, con respecto a la estructura nativa. La Figura 14 c, muestra esta zona en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color cian).

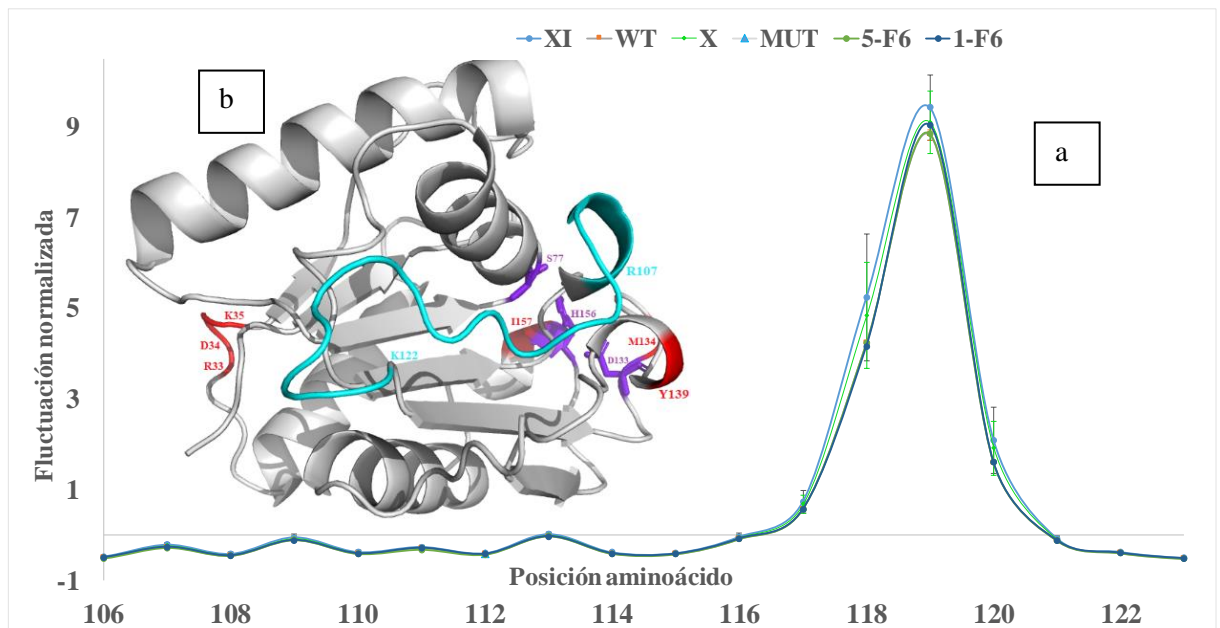


Figura 14. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 107 a 122. a) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. b) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en cian la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 15 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, puntualmente para la zona correspondiente a las posiciones 129 a 139 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan un aumento en la fluctuación en esta zona mostrando en promedio un incremento del  $91,4 \% \pm 184,6$  y  $141 \% \pm 290$  respectivamente, por otro lado, las variantes 1-F6 y 5-F6 presentan en promedio cambios en la fluctuación en promedio de  $1,9 \% \pm 1,4$  y  $1,3 \% \pm 1,5$ , con respecto a la estructura nativa. La Figura 15 c, muestra esta zona en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color naranja).

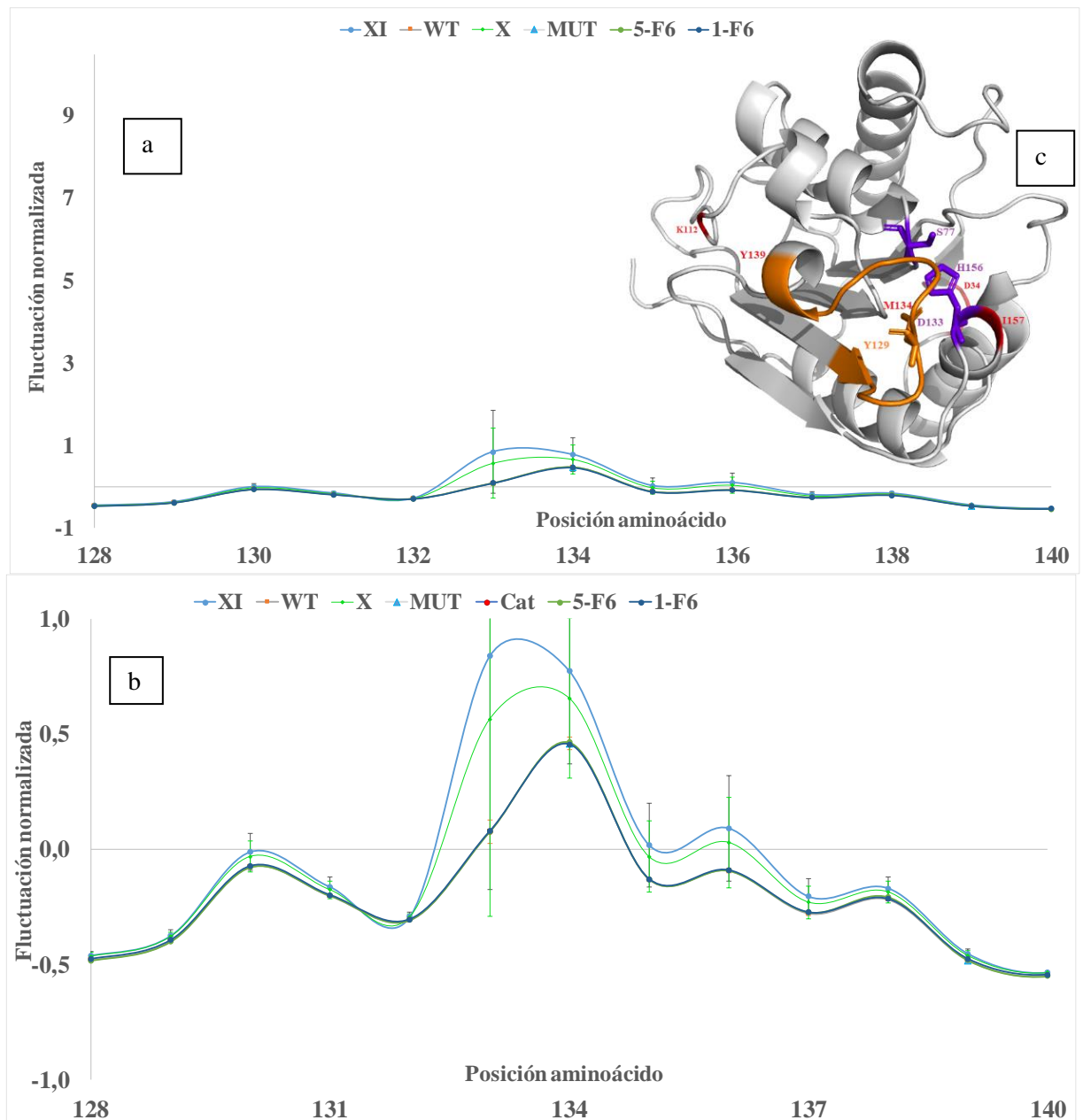


Figura 15. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 129 a 139. a) y b) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. c) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en naranja la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

La Figura 16 muestra el efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones en la estructura, puntualmente para la zona correspondiente a las posiciones 147 a 175 de la secuencia primaria, se observa que las variantes X y XI presentan un aumento en la fluctuación en esta zona mostrando en promedio un incremento del 20,2 %  $\pm$ 20,3 y 27,9 %  $\pm$ 29,4 respectivamente, por otro lado, las variantes 1-F6 y 5-F6 presentan en promedio cambios en la fluctuación en promedio de 1,0 %  $\pm$ 0,6 y 0,9 %  $\pm$ 1,3, con respecto a la estructura nativa. La Figura 16 c, muestra esta zona en la estructura terciaria de la enzima (resaltado en color verde).



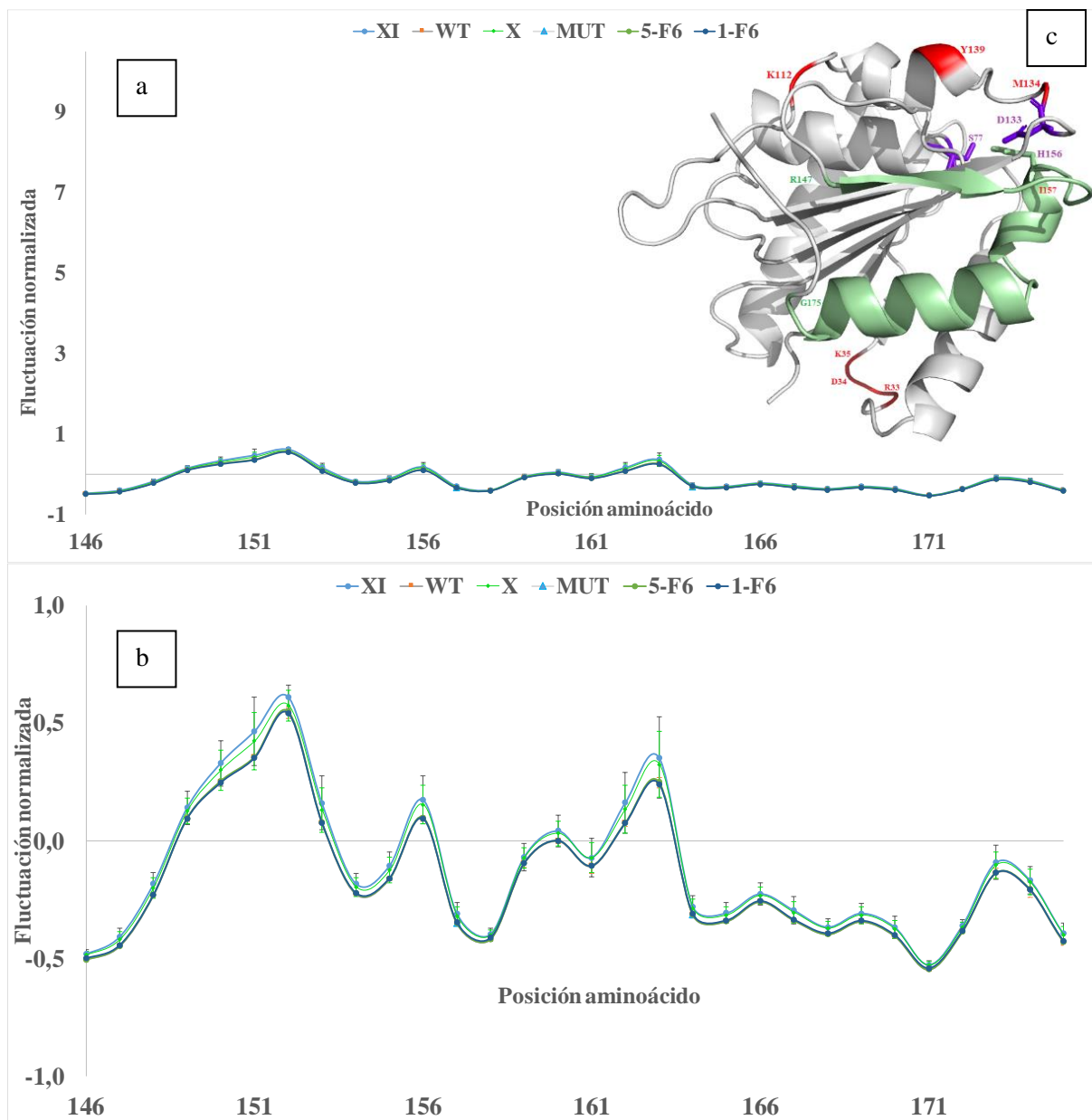


Figura 16. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 147 a 175. a) y b) variantes X, XI, 1-F6 y 5-F6. c) estructura terciaria de la Lipasa Lip A, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006), en púrpura aminoácidos catalíticos, en verde la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

De las siete zonas identificadas en la estructura terciaria donde las mutaciones generaron cambios en el valor de las Fluctuaciones superiores al 5% con respecto a las Fluctuaciones de la estructura nativa, en solo tres de estas zonas se evidencia una reducción en la fluctuación como se muestra en la Figura 10, Figura 11 y Figura 12, en forma general las mutaciones propuestas por Reetz et al., (2006) generan en promedio un incremento en la fluctuación del  $35\% \pm 401$  para la variante X y  $49\% \pm 537$  para la variante XI, las variantes 1-F6 y 5-F6 presentan un incremento promedio de  $0,89\% \pm 15$  y  $1,17\% \pm 14$  respectivamente.

las variantes X y XI las que presentan un aumento en su estabilidad térmica con respecto a la lipasa nativa, están mostrando un incremento en la fluctuación estructural, esto estaría implicando que la reducción en la fluctuación estructural y el incremento en la estabilidad térmica no estarían

mostrando necesariamente una correlación directa, como fue observado por Hernández et al. (1999)<sup>205</sup> y Grottesi et al. (2002),<sup>206</sup> para la proteína globular Rubredoxin (*Pyrococcus furiosus*), lo que parece sugerir es que el incremento en la movilidad de los aminoácidos en la estructura le permite a la enzima la capacidad de tolerar el estrés térmico, o que están ocurriendo simultáneamente otra clase de estrategias que la enzima estaría adoptando para la lograr la estabilidad térmica observada, estrategias que pueden involucrar otros cambios estructurales asociados a las mutaciones como el volumen, área de acceso al solvente, áreas no polares y con carga expuestas al solvente (Tabla 15); se observa como las estructuras de las variantes (X y XI) con mayor estabilidad térmica presentan una menor área de acceso al solvente junto con un menor volumen, con respecto a la estructura nativa (Figura 17), de las variantes propuestas por metodología EVOP solo la variante 5-F6 presenta una reducción en el volumen, de manera similar al evaluar el área de acceso al solvente de los aminoácidos no polares y con carga presentes en la superficie, en la Figura 18 y Figura 19 se observa de como las estructuras asociadas a una mayor estabilidad térmica tienden a presentar un área de acceso al solvente con aminoácidos no polares y con carga menor así como un volumen menor que en la estructura nativa, en el caso de las variantes 1-F6 y 5-f6, el área no polar se ha incrementado, y en el caso del área correspondiente a las cargas la variante 5-f6 fue la que mostró una reducción significativa (8%) con respecto a la estructura nativa, pero en el caso de el área de acceso a solvente para los aminoácidos polares se observa que las variantes con una estabilidad térmica mayor presentan un área mayor que la estructura nativa al mismo tiempo que el volumen de la estructura disminuye (Figura 20), para el caso de las variantes 1-F6 y 5-F6 las dos presentan un incremento el área polar de acceso al solvente, pero solo la variante 1-F5 presenta una reducción en el volumen.

Tabla 15. Parámetros estructurales para las variantes.

	$\Delta$ entropía	Área de acceso al solvente (ASA) (Å)	Área de acceso al solvente normalizada (ASAn)	Área de acceso al solvente no polar (ASANP) (Å)	Área no polar de acceso al solvente normalizada (ASANPn)	Área de acceso al solvente polar (ASAP) (Å)	Área polar de acceso al solvente normalizada (ASAPn)	Área de acceso al solvente carga (ASAP) (Å)	Área carga de acceso al solvente normalizada (ASACn)
<b>wt</b>	0,000	7993,83	1,00	4798,27	1,000	1975,13	1,000	1220,43	1,000
<b>Variantes</b>									
Reetz et al.,									
I	-0,174	8038,00	1,006	4872,80	1,016	1931,20	0,978	1234,00	1,011
II	-0,053	7926,90	0,992	4855,80	1,012	1965,10	0,995	1106,10	0,906
III	-0,112	7960,40	0,996	4801,70	1,001	1965,00	0,995	1193,70	0,978
IV	-0,108	7965,50	0,996	4729,00	0,986	1948,00	0,986	1288,50	1,056
V	-0,111	7967,40	0,997	4770,40	0,994	1964,10	0,994	1232,80	1,010
VI	-0,110	8009,60	1,002	4807,30	1,002	1968,10	0,996	1234,30	1,011
VII	-0,107	8003,00	1,001	4741,70	0,988	1972,70	0,999	1288,60	1,056
VIII	0,231	7699,60	0,963	4557,90	0,950	2022,70	1,024	1119,00	0,917
IX	0,230	7683,50	0,961	4513,20	0,941	2009,60	1,017	1160,70	0,951
<b>X</b>	0,136	7841,88	0,981	4556,55	0,950	2184,05	1,106	1101,30	0,902
<b>XI</b>	0,113	7723,30	0,966	4586,83	0,956	2027,47	1,026	1108,97	0,909
<b>EVOP</b>									
1-F6	-0,114	8161,03	1,021	4891,27	1,019	2009,87	1,018	1259,90	1,032
5-F6	-0,074	8077,60	1,010	4911,33	1,024	2040,97	1,033	1125,30	0,922

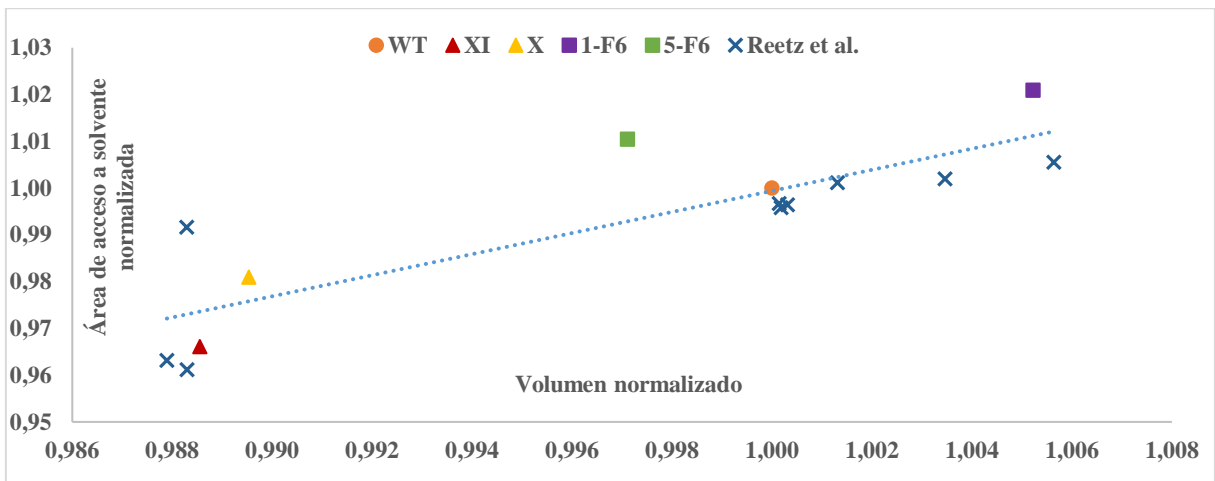


Figura 17. Área de acceso al solvente vs volumen para las estructuras de las variantes propuestas por Reetz et al. (2006) y la metodología EVOP.

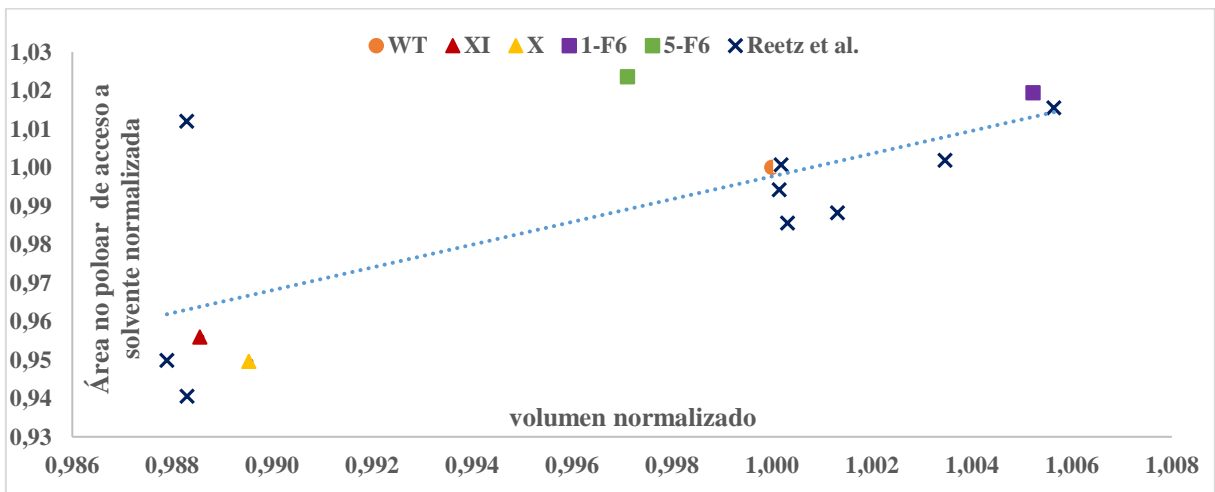


Figura 18. Área no polar de acceso al solvente vs volumen para las estructuras de las variantes propuestas por Reetz et al. (2006) y la metodología EVOP.

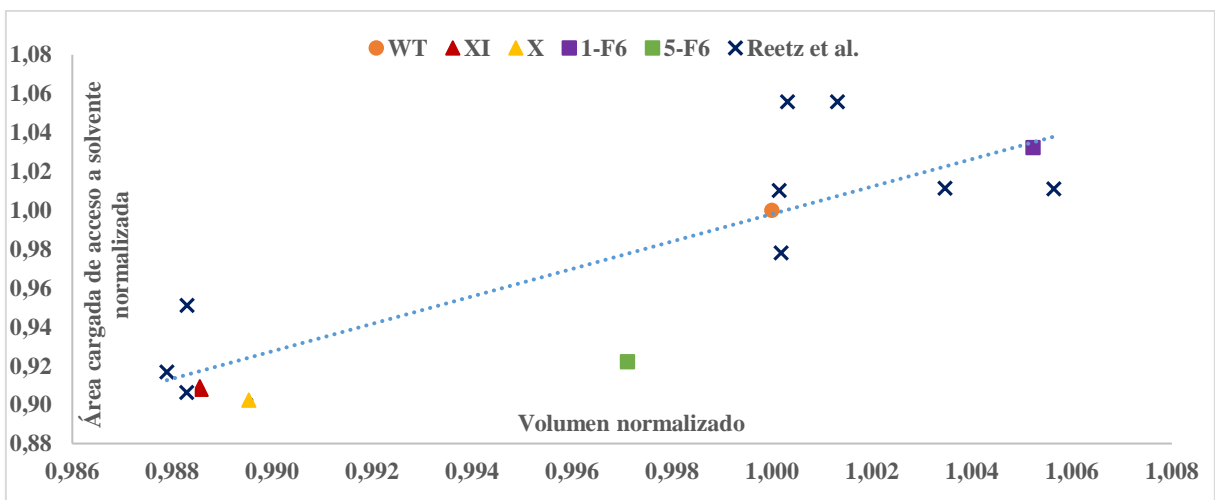


Figura 19. Área carga de acceso al solvente vs volumen para las estructuras de las variantes propuestas por Reetz et al. (2006) y la metodología EVOP.

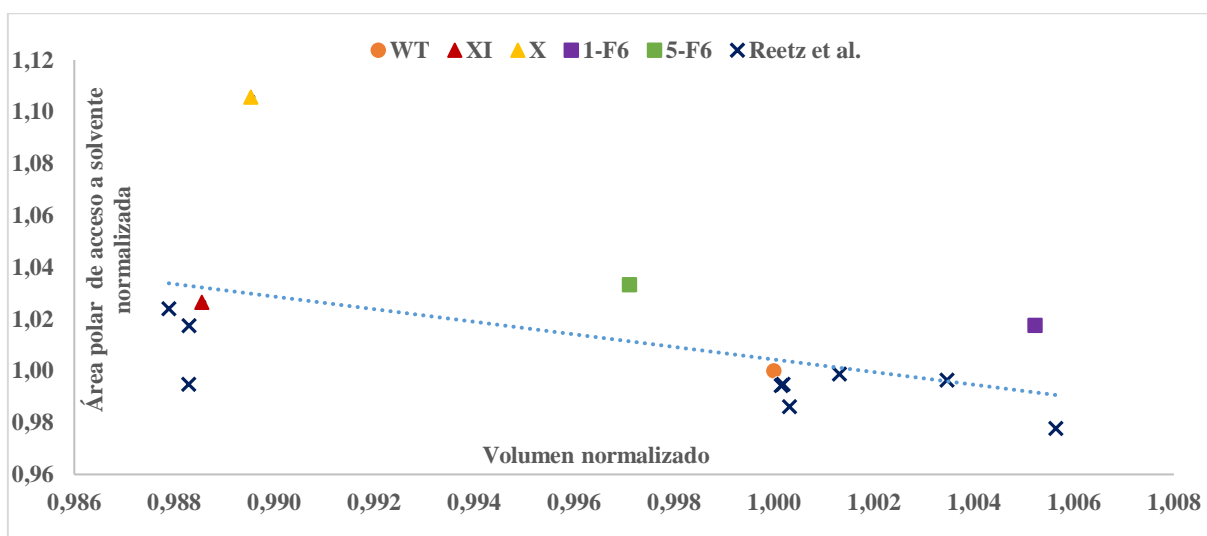


Figura 20. Área polar de acceso al solvente vs volumen para las estructuras de las variantes propuestas por Reetz et al. (2006) y la metodología EVOP.

El hecho que las variantes con mayor estabilidad térmica (X y XI) presenten un volumen menor y menor área de acceso al solvente sugieren que las estructuras están adquiriendo un mejor empaquetamiento (Figura 17), así como el enterramiento de los átomos explicarían la reducción en las áreas de acceso al solvente no polares y con carga (Figura 18 y Figura 19) lo que maximizaría las interacciones internas de los átomos en la enzima, este empaquetamiento mejorado está asociado al incremento en la estabilidad térmica, como lo observaron Russeell et al., (1997)<sup>207</sup> y Li et al., (2000)<sup>208</sup>, pero un empaquetamiento mejorado no parece ser una cualidad se pueda generalizar para explicar la estabilidad térmica como lo mostró el trabajo de Szilágyi y Závodszy (2000)<sup>209</sup>, Kumar et al., (2000)<sup>210</sup> así como Razvi y Scholtz (2006)<sup>211</sup>, lo que mejor se ajusta para explicar la estabilidad térmica es la acumulación de diferentes elementos estabilizadores estructurales, por un lado, la redistribución de la polaridad en la superficie vista como un incremento en el área polar de acceso al solvente esto en conjunto con una reducción en el volumen de la enzima (Figura 20), estaría evidenciando el efecto de la acumulación de factores estructurales asociados a la estabilidad térmica. El efecto de la optimización superficial de la polaridad sobre la estabilidad térmica en enzimas también fue analizado en el trabajo de Sánchez-Ruiz y Makhatadze (2001)<sup>212</sup>, Sánchez-Ruiz y Ibarra-Molero (2002)<sup>62</sup>, Makhatadze et al., (2004)<sup>213</sup> y Xia et al., (2018)<sup>214</sup>. Por otro lado el incremento en las Fluctuaciones ( $\Delta S_{vib} > 0$ ) de las variantes con mayor estabilidad térmica (X y XI) parece contradecir que estas estructuras presenten un menor volumen (Figura 21) según el trabajo de Dadarlat y Post (2003)<sup>125</sup> y Xia et al., (2018)<sup>214</sup> en el cual relacionan la estabilidad de las enzimas con una redistribución de cargas en el interior de la estructura y un incremento en la compresibilidad ( $\Delta \text{volumen} < 0$ ) concluyendo ellos que las interacciones electrostáticas (redes polares, puentes salinos y de hidrógeno) en el interior de la enzima estarían garantizando la estabilidad gracias al efecto coordinado de estas interacciones, por lo tanto, la responsabilidad de la estabilidad térmica no se le puede asignar a un único residuo, si no a la capacidad de interacción de los aminoácidos con sus vecinos y alrededores.

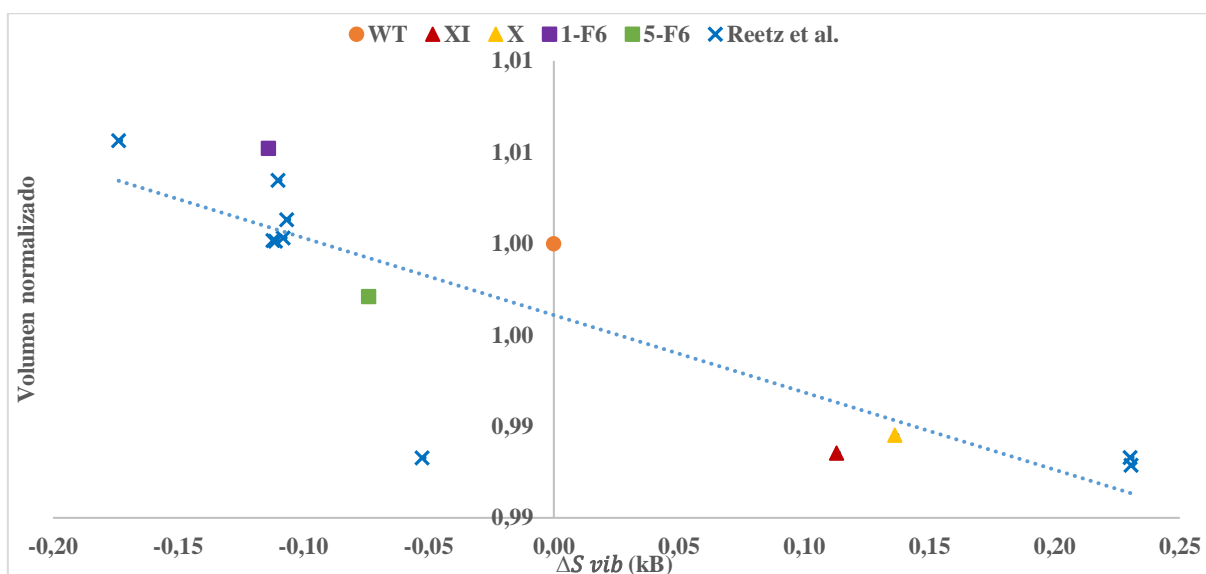


Figura 21. Volumen vs  $\Delta S_{vib}$ (kB) para las estructuras de las variantes propuestas por Reetz et al., (2006) y la metodología EVOP.

#### 4.1.5. Conclusiones de la Validación in silico de la metodología a EVOP en ingeniería de proteínas

La metodología EVOP para ingeniería de proteínas es usada para identificar sitios de mutación, permitió reconocer el 57% de las posiciones propuestas por Reetz et al. (2006) <sup>20</sup>, al evaluar dos ciclos.

La metodología EVOP propuesta permite evaluar las sustituciones aminoácidas (variables controlables,  $pK_aAA_i$ ) y su efecto sobre las variables de respuesta, la energía de acoplamiento con el sustrato ( $\Delta D$ ) y la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ (kB)).

Para la lipasa Lip A el efecto de las mutaciones en las variantes X y XI evidencian una mayor fluctuación y menor volumen estructural lo que estaría facilitando su capacidad de tolerar un estrés térmico mayor que la estructura nativa, este incremento en las Fluctuaciones y reducción en el volumen le estaría facilitando la capacidad de recuperar el plegamiento que le permita a la enzima así conservar su actividad catalítica.

La estabilidad térmica en la enzima es el producto de la acumulación de diferentes factores estructurales generado por las alteraciones provocadas por las mutaciones específicas propuestas.

#### 4.2. Validación experimental de la metodología EVOP en ingeniería de proteínas.

Ahora como modelo de estudio se usa la enzima xilanasa proveniente de una bacteria antártica *Psychrobacter sp.* strain 2-17, la xilanasa Xyl-L, la secuencia genética que codifica a esta enzima ha sido depositada con el número de acceso HH759472.1 en GenBank <sup>215 216</sup>; la xilanasa Xyl-L es una glicosil hidrolasa de la familia 10 (GH10 EC 3.2.1.8) ya caracterizada por Acevedo et al., <sup>76</sup>

<sup>216</sup>. En esta investigación es de especial interés las enzimas xilanasas debido a su gran potencial para su uso en diferentes procesos industriales como por ejemplo la industria del papel y la producción de etanol a partir de materiales lignocelulosicos <sup>217 218</sup>, por eso la validación experimental de la metodología propuesta se realiza usando la enzima antártica xilanasas Xyl-L con el objetivo de incrementar su estabilidad térmica y así permitir su uso a nivel industrial.

### 4.3. Validación experimental de la metodología EVOP en ingeniería de proteínas para la xilanasas antártica (Xyl-L) como enzima modelo.

La xilanasas Xyl-L presenta dos dominios de unión a carbohidrato cercanando el dominio catalítico, es a partir de la secuencia primaria correspondiente al dominio catalítico de la xilanasas Xyl-L de *Psychrobacter sp. strain 2-17* <sup>76</sup> (Anexo C), que se genera el modelo estructural usando el servidor Raptor X <sup>112</sup> (Sección 3.1.2) el cual usó como plantilla las estructuras PDB 1US3 y 1W32 xilanasas de *Cellvibrio japonicus*, a partir de esta estructura modelada (Figura 22) se realizan análisis de modos normales, cálculo de las energías de deformación para los primeros 20 modos normales, cálculo de la entropía de vibración ( $S_{vib\ natv}$  sección 3.1.5) y el cálculo de la energía de acoplamiento ( $\Delta GD, wt$  sección 3.1.6), los cuales serán los valores de referencia para evaluar el efecto de las mutaciones propuestas durante la validación de la metodología propuesta en esta investigación, también se tienen identificados la posición de los aminoácidos acatalíticos E135 y E253 <sup>76</sup> y se ha reportado que el pH donde esta enzima presenta su mayor actividad catalítica a pH 8 <sup>76</sup>.

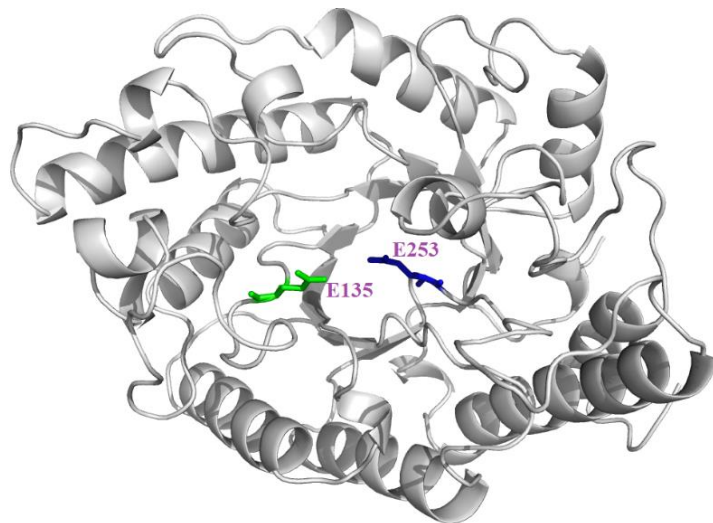


Figura 22. Estructura de la enzima nativa xilanasas Xyl-L, posición de los aminoácidos catalíticos E135 Y E253.

#### 4.3.1. Ciclo EVOP para la xilanasas Xyl-L mutaciones propuestas.

A partir de la secuencia primaria y la generación de su respectiva estructura se realiza un análisis de modos normal y se calculan las energías de deformación, usando el servidor WEBmn@, para calcular la entropía de vibración, reemplazando los valores de las energías de deformación para la lipasa nativa en la Ecuación 7, la cual se deduce a partir de la Ecuación 1 (sección 3.1.5), así se tiene  $S_{vib\ natv} = 118,83 * k_B$ .

Tabla 16. Energías de deformación para la estructura de la xilanasa (Xyl-L) de *Bacillus subtilis* 168.<sup>197</sup>

Modo normal	Energía de deformación
7	1274,31
8	1588,99
9	2788,45
10	3592,98
11	3771,30
12	5518,51
13	5579,30
14	6491,94
15	6177,05
16	7284,30
17	7920,63
18	9503,43
19	9182,33
20	8543,89

A partir de la estructura terciaria se determina la energía de acoplamiento entre la enzima y el sustrato usado para la xilanasa Xyl-L que es xilopentosa (Figura 23) , usando el servidor Swissdock (sección 3.1.6), partir de los resultados entregados por el servidor se obtiene el valor  $\Delta GD, wt = -9,86664 \text{ kcal/mol}$  (resultado de promediar 10 energías de las conformaciones mas favorables).

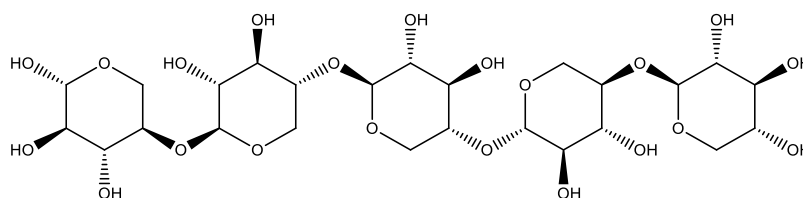


Figura 23. Representación de la estructura de xilopentosa como sustrato usado para el análisis de acoplamiento para la xilanasa (Xyl-L).

Con la estructura de la enzima ahora se puede realizar el análisis de modos normal y obtener información de la fluctuación de los carbonos  $\alpha$  ( $C\alpha$ ) para cada modo normal, el servidor WEBmn@ entrega un promedio de estas Fluctuaciones para los primeros 200 modos normales (Figura 24), con la finalidad de evitar sesgos hacia los otros modelos estructurales y facilitar las comparaciones entre las diferentes estructuras se normalizan las Fluctuaciones de los  $C\alpha$  según lo propuesto por Schlessinger, y Rost (2005)<sup>137</sup> y Carugo y Argos (1997)<sup>200</sup> ver Ecuación 8, de manera similar se calculan los valores de  $pK_a AA_i$  usando el servidor PDB2PQR<sup>120</sup> calculados a  $pH=8$ , y posteriormente son normalizados (Ecuación 9).

Para la validación experimental se seleccionan aminoácidos en posiciones que presenten una fluctuación de los  $C\alpha$  mayor que la fluctuación de los aminoácidos catalíticos (E135 y E253), de manera aleatoria, así se seleccionaron los siguientes posiciones de aminoácidos E58, Y70, H110,

H117, E121, E139, Y143, E165, K172, R175, D195, R244, R273, D275, E345 (Figura 24 indicados en círculos amarillos), a partir de estas posiciones se proponen combinaciones de mutaciones, que serán las variantes estructurales de la enzima, (Tabla 17), para estas variantes se generan sus respectivos modelos estructurales (34 modelos) (sección 3.1.2) y con estos modelos se calcularon los cambios en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$  sección 3.1.5) y las energías de acoplamiento ( $\Delta D$ , sección 3.1.6) como se observa en la Tabla 17.

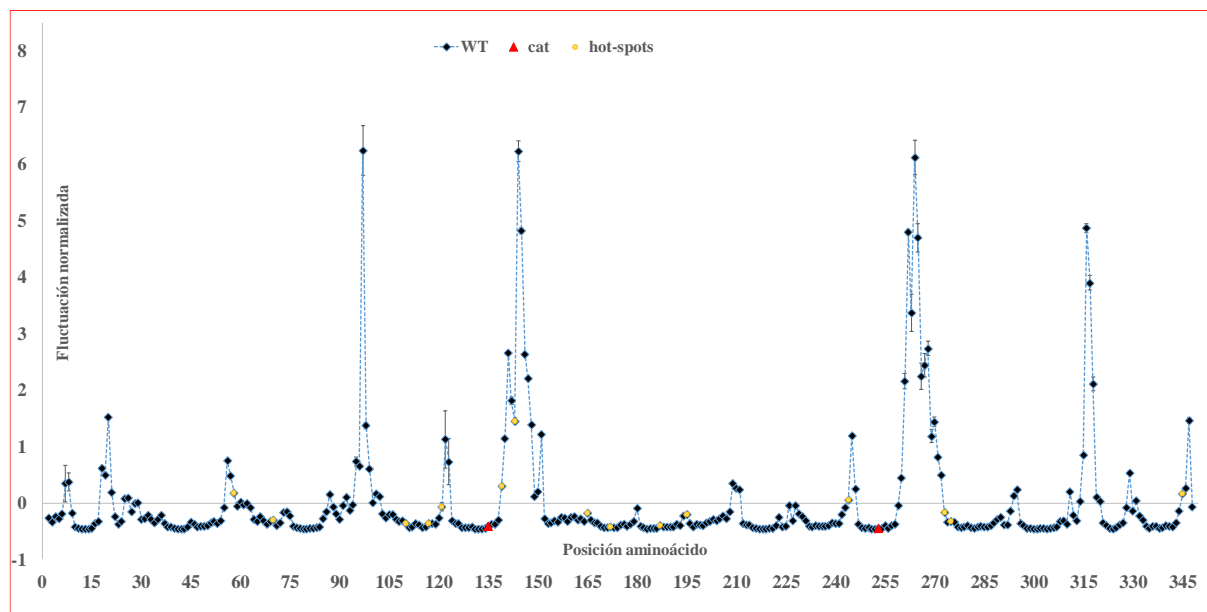


Figura 24. Fluctuaciones normalizadas de los carbonos  $\alpha$  en la estructura de la xilanasa (Xyl-L), en rombos negros ( $\blacklozenge$ ), las posiciones catalíticas en triángulos rojo ( $\blacktriangle$ ), hot-spots en círculos amarillos ( $\bullet$ ).

Tabla 17. Variantes con las sustituciones propuestas para el primer ciclo para la xilanasa (Xyl-L).

VARIANTES	$\Delta S_{vib}(k_B)$	$\Delta D$	VARIANTES	$\Delta S_{vib}(k_B)$	$\Delta D$
E58I/E139L/Y143C/D275Y/E345L	0,01059709	-0,0063483	E139Y	0,0091577	0,072426
E58I/E139L/Y143R/D275F/E345L	0,01092307	-0,0198163	E139R/K172H	0,0041283	-0,022171
E58I/E139M/Y143C/D275F/E345V	0,01062972	0,06802035	E139F/E165I	0,0091782	0,0504422
Y70R_E139A_K172C	-0,002699	-0,0155808	E139A/K172C	0,0127908	0,0220022
Y70R_E139A_K172H	0,01252697	-0,0072704	Y143R	0,0116637	-0,068661
Y70R_E139R_K172C	0,00301563	-0,0890361	R175I	0,0100345	-0,033082
H110L	0,01150314	-0,0383943	R175L	0,0112704	-0,021336
H110L/H117F	0,0094919	-0,0024514	D195M	0,0132441	0,029925
H110E/H117D	0,01091267	0,0100699	E121K	0,0108563	-0,056575
H110L/H117L	0,00943435	-0,0004183	R175L	0,0082688	-0,08662
H110L/H117M	0,00875486	-0,0264285	R175I	0,010647	-0,070653
H110D/H117K/E44H	0,01138755	-0,0345107	R175S/R244H	0,0100744	0,0326752
H110D/H117K	0,00885483	-0,0437066	R244H	0,0110621	-0,07208
H117R/R273K	0,01148276	-0,0065469	R273K	0,0115899	-0,023178
H117D/R273K	0,01080189	-0,0303156	D275E	0,0101645	0,0850881
E121F	0,01055355	-0,0299174	E345M	0,0107656	-0,020765
E121K	0,01108827	-0,0106022	E345D	0,0126266	0,0172077



Ahora a partir de esta información se realiza un análisis estadístico (sección 3.2.4) para identificar las mutaciones que explican los cambios observados en  $\Delta S_{vib}$  y en  $\Delta D$ , se seleccionan inicialmente las variables  $pK_a AA_i$  que muestran una desviación estándar mayor a 0,10 se seleccionaron para realizar el análisis estadístico, donde se logran identificar 42 posiciones en la secuencia primaria (Tabla 18), de estas se eligen las que presentan independencia estadística, en total son 20 variables independiente y así se procede a seleccionar la combinación de estas que mejor expliquen los cambios observados, en la entropía de vibración las posiciones identificadas que fueron la 79, 81, 117, 121, 135, 143, 147, 150, 154, 222, 250, 253, 255, 309, 348 y para el cambio en la energía de acoplamiento, las posiciones identificadas son 81, 110, 117, 121, 135, 143, 147, 150, 154, 188, 222, 244, 250, 255, 348 los resultados se muestran resumidos en la Tabla 18.

Con las posiciones identificadas (Tabla 18) para correlacionar los valores de  $npK_a AA_i$  se generan los modelos de regresión lineal usando el programa Statgraphics XVII, la Ecuación 13 correlaciona las variables para explicar el cambio en la energía de acoplamiento ( $\Delta D$ ) debido al efecto de las mutaciones propuestas, de manera similar Ecuación 14 correlaciona los cambios en la entropía de vibración ( $\Delta S_{vib}$ ); los modelos de regresión así calculados logran correlacionar más del 60 % de los cambios observados, ( $R^2 > 60\%$ ).

Con los modelos de regresión (función objetivo) ya definidos para  $\Delta D$  y  $\Delta S_{vib}$  se procede a calcular los valores de  $npK_a AA_i$  que satisfagan las condiciones preferibles:  $\Delta S_{vib} < 0$  y  $\Delta D > 0$ , (sección 3.2.5), usando el complemento Solver de Excel. En este caso el problema planteado admite infinitas soluciones, dado que el número de variables supera al número de ecuaciones disponibles, pero las restricciones propuestas acotan el espacio de soluciones posibles, la Tabla 19 muestra las soluciones seleccionadas, ahora a partir de los valores de  $npK_a AA_i$  se calculan los valores de  $pK_a$  (Ecuación 9) como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 18. Variables seleccionadas para ajustar los modelos de regresión lineal, para la xilanasa Xil- L.

<b>Variables seleccionadas</b>	<b>Variables con independencia estadística</b>	<b>Selección de variables para DOCKING</b>	<b>Selección de variables para ENTROPIA</b>
AA31			
AA44			
AA58			
AA65			
AA79	AA79		AA79
AA81	AA81	AA81	AA81
AA86	AA86		
AA110	AA110	AA110	
AA117	AA117	AA117	AA117
AA119			
AA121	AA121	AA121	AA121
AA131			
AA135	AA135	AA135	AA135
AA139			
AA143	AA143	AA143	AA143
AA147	AA147	AA147	AA147
AA150	AA150	AA150	AA150
AA151			
AA154	AA154	AA154	AA154
AA172			
AA175			
AA178	AA178		
AA182			
AA185			
AA187			
AA188	AA188	AA188	
AA206			
AA215			
AA222	AA222	AA222	AA222
AA229			
AA244	AA244	AA244	
AA250	AA250	AA250	AA250
AA253	AA253		AA253
AA255	AA255	AA255	AA255
AA273			
AA275			
AA280			
AA283			
AA309	AA309		AA309
AA321			
AA345			
AA348	AA348	AA348	AA348

Ecuación 13  $\Delta D = -0,154175 + 0,107863*AA81 - 0,117891*AA110 - 0,016339*AA117 + 0,0434067*AA121 + 0,12504*AA135 - 0,174195*AA143 + 0,124265*AA147 - 0,158999*AA150 + 0,0915275*AA154 + 0,100296*AA188 - 0,0815345*AA222 + 0,117865*AA244 + 0,312899*AA250 - 0,0813007*AA255 + 0,0386609*AA348$

$R^2 = 60,3433 \%$

Ecuación 14  $\Delta S_{vib} = 0,0149302 + 0,0304333*AA79 - 0,00971616*AA81 - 0,00315045*AA117 - 0,00420304*AA121 - 0,00718676*AA135 + 0,00851812*AA143 + 0,00405094*AA147 - 0,00125452*AA150 + 0,00317056*AA154 + 0,01669*AA222 + 0,0322817*AA250 + 0,0277663*AA253 + 0,00305276*AA255 + 0,0066281*AA309 + 0,00338108*AA348$

$R^2 = 81,1721 \%$

Tabla 19. Soluciones seleccionadas para las Ecuación 13 y Ecuación 14.

npKaAA79	-0,197	-0,338	-0,531	-0,490	-0,277
npKaAA81	-0,044	0,269	0,104	0,075	-0,053
npKaAA86					
npKaAA110	-0,271	-0,084	-0,212	-0,273	-0,272
npKaAA117	-0,031	-0,269	-0,254	0,051	0,098
npKaAA121	0,149	0,316	-0,242	0,271	0,160
npKaAA135	0,039	0,598	0,929	0,422	0,041
npKaAA143	-0,720	-0,282	-0,367	-0,611	-0,603
npKaAA147	-0,002	0,042	-0,536	-0,212	-0,013
npKaAA150	-0,110	-0,067	0,029	-0,144	-0,070
npKaAA154	-0,240	0,343	0,433	0,136	0,256
npKaAA178					
npKaAA188	0,086	0,229	0,275	-0,119	-0,098
npKaAA222	-0,318	0,048	0,419	0,081	-0,325
npKaAA244	0,059	0,148	0,297	0,158	-0,247
npKaAA250	0,229	-0,134	0,146	0,084	0,112
npKaAA253	-0,696	-0,508	-0,592	-0,414	-0,187
npKaAA255	0,153	-0,367	-0,369	-0,315	-0,184
npKaAA309	0,953	-0,105	0,176	-0,139	-0,005
npKaAA348	0,013	0,492	0,174	0,038	0,323
$\Delta D$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,1
$\Delta S_{vib}$ (kB)	-0,009	-0,022	-0,015	-0,02	-0,005

$npK_a AA_i$  es el valor de  $pK_a$  del aminoácido en la posición  $i$  ( $AA_i$ ).

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.

$\Delta S_{vib}$ (kB) cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Tabla 20. Valores de pK<sub>a</sub> que satisfacen las condiciones preferibles.

pKaAA79	5,6	4,6	3,3	3,6	5,1
pKaAA81	6,7	8,9	7,7	7,5	6,6
pKaAA86					
pKaAA110	5,1	6,4	5,5	5,1	5,1
pKaAA117	6,8	5,1	5,2	7,4	7,7
pKaAA121	8,0	9,2	5,3	8,9	8,1
pKaAA135	7,3	11,2	13,5	10,0	7,3
pKaAA143	2,0	5,0	4,4	2,7	2,8
pKaAA147	7,0	7,3	3,3	5,5	6,9
pKaAA150	6,2	6,5	7,2	6,0	6,5
pKaAA154	5,3	9,4	10,0	8,0	8,8
pKaAA178					
pKaAA188	7,6	8,6	8,9	6,2	6,3
pKaAA222	4,8	7,3	9,9	7,6	4,7
pKaAA244	7,4	8,0	9,1	8,1	5,3
pKaAA250	8,6	6,1	8,0	7,6	7,8
pKaAA253	2,1	3,4	2,9	4,1	5,7
pKaAA255	8,1	4,4	4,4	4,8	5,7
pKaAA309	13,7	6,3	8,2	6,0	7,0
pKaAA348	7,1	10,4	8,2	7,3	9,3
$\Delta D$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,1
$\Delta S_{vib}(\text{kB})$	-0,009	-0,022	-0,015	-0,02	-0,005

$pK_{aAA_i}$  es el valor de pK<sub>a</sub> del aminoácido en la posición i (AA<sub>i</sub>).

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.

$\Delta S_{vib}(\text{kB})$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Para asignar el aminoácido asociado al valor de pK<sub>a</sub> predicho por la Ecuación 13 y la Ecuación 14 se usan los valores propuestos por Kidera et al., (1985) para normalizar propiedades físicas características de los aminoácidos en la estructura de la enzima como la polaridad, entre otras<sup>203</sup>, estos valores normalizados para la polaridad (vnp), se correlacionaron a los valores de pK<sub>a</sub><sup>204</sup> (Tabla 10, Ecuación 12) para asociarlos a los valores de estimados por los modelos de regresión.

A partir de los datos de la Tabla 10 y Tabla 9 se identifican los posibles aminoácidos que deben ser modificados en la secuencia primaria ver Tabla 21 para generar las variantes como se observa en la Tabla 22, para el próximo ciclo. Usando este procedimiento para la metodología propuesta (sección 3.1) permite que, en cada ciclo las variables pK<sub>aAA<sub>i</sub></sub> se muevan al espacio de respuesta óptima. Para esta validación se evaluaron 8 ciclos, al cumplirlos se pasa al siguiente punto de la metodología propuesta correspondiente a la Fase EVOP (sección 3.2.2).

Tabla 21. Posibles aminoácidos que cumplen con la condición preferible para la xilanasas Xyl-L.

<b>Posición aminoácido</b>	<b>Aminoácido propuesto</b>				
79	E	D	D	D	E
81	E	A	C	C	E
86					
110	E	E	E	E	E
117	E	E	E	C	C
121	C	A	E	A	C
135	E	H	F-W	I-Y	E
143	D	D	D	D	D
147	E	E	D	D	E
150	E	E	E	D	E
154	D	A	I-L	C	P
178					
188	K	P	A-P	E	E
222	D	K	T	K	D
244	E	C	A-P	C	D
250	M	E	K	K	K
253	D	D	D	D	D
255	C	D	D	D	D
309	F-W	E	C	D	E
348	E	L	C	E	A
$\Delta D$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,1
$\Delta S_{vib}(k_B)$	-0,009	-0,022	-0,015	-0,02	-0,005

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.  
 $\Delta S_{vib}(k_B)$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

Tabla 22. Variantes propuestas para el segundo ciclo EVOP

Posición	Variantes				
	C2a	C2b	C2c	C2d	C2e
79	E	D	D	D	E
81	E	A	C	C	E
86					
110	E	E	E	E	E
117	E	E	E	C	C
121	C	A	E	A	C
135	E	H	W	I	E
143	D	D	D	D	D
147	E	E	D	D	E
150	E	E	E	D	E
154	D	A	I	C	P
178					
188	K	P	A	E	E
222	D	K	T	K	D
244	E	C	P	C	D
250	M	E	K	K	K
253	D	D	D	D	D
255	C	D	D	D	D
309	F	E	C	D	E
348	E	L	C	E	A
$\Delta D$	0,10	0,10	0,10	0,10	0,1
$\Delta S_{vib}(kB)$	-0,01	-0,02	-0,02	-0,020	-0,01

C2 ciclo dos, a, b, c, d, y e son las variantes.

$\Delta D$  cambio en la energía de acoplamiento con respecto a la estructura nativa.

$\Delta S_{vib}(kB)$  cambio en la entropía de vibración con respecto a la estructura nativa.

#### 4.3.2. Análisis de las mutaciones propuestas en la xilanasa Xyl-L, (Fase EVOP)

En la Fase EVOP se identifican las posiciones *i* de los aminoácidos que conservan su independencia estadística y que además hacen parte de los modelos de regresión en cada ciclo evaluado, estas posiciones conservadas o convergentes, en esta investigación se espera que presenten una frecuencia de aparición superior al 70 %, estas posiciones convergentes (al evaluar 8 ciclos) son: 58, 70, 121, 139, 143, 165, 172, 187, 195, 250, 273, 275 y 345; a partir de las cuales se generaron variantes como la C9a y C9b de ellas es la estructura C9a la que satisface las condiciones preferibles al ser evaluada *in silico*, las mutaciones E58C, Y70W, Y143W, E165K, D187W, D195F, R273C y D275W como se muestra en la Tabla 23. Esta variante será la considerada para la evaluación experimental y generar la xilanasa modificada Xil-R13.

Tabla 23. Variantes analizadas en los 9 ciclos evaluados.

Posición AA	Ciclos														% frecuencia de aparición	C9a	C9b	
	C2a	C2b	C3a	C3b	C4a	C4b	C5a	C5b	C6a	C6b	C7a	C7b	C8a	C8b				
58				E	T	R	T		T	A	R		W			86	C	
70				E	E				K	P	C		T			71	W	
79	E		D			S				G						57		
81	E	A														14		
86			Y				D	N		G						43		
110	E	E														14		
117	E	E														14		
121	C	A		E	T						F	W	F	Y		71	E	Q
131			Y				D		D							43		
135	E	H														14		
139				M	H	I	Y	Y		H	F	E	W	H		86	E	H
143	D	D		L	L	P	S	I	Q	N	L	L	K	I		100	W	L
146			R							N						29		
147	E	E	R						A							43		
150	E	E														14		
151																		
154	D	A							S							29		
165				T	T		P			Y	L	A	P	T		86	K	H
171			R													14		
172						A						H		R		43		M
175								A	T							23		
178			R													14		
184			K													14		
187			H			Y		T		H	W	H	D	Y		86	W	P
188	K	P														14		
195			Y	L	L			V	Q		W	T	D	F		86	F	H
222	K	P														14		
242			E													14		
244	E	C								E						29		
250	M	E		E	E	C		G				S		Y		86		C
253	D	D														14		
255	C	D														14		
273				L	P			A			C		R			71	C	
275			R	P	L		P		T		C	H	W	T		86	W	T
280			R													14		
309	F	E							R							29		
345			R	P	L	H	P	G				H		V		71		V
348	E	L														14		
$\Delta D$	0,10	0,10	-0,08	-0,01	0,01	-0,02	-0,02	0,03	-0,09	0,07	0,02	-0,02	-0,12	-0,04			0,01	-0,001
$\Delta S_{\text{pH}}(\text{kB})$	-0,01	-0,02	-0,02	0,004	-0,002	0,277	-0,12	-0,16	0,08	0,27	-0,14	-0,09	-0,01	-0,71			-0,08	-0,05

C<sub>n</sub> ciclos, a, b, c...etc. Son las variantes.

### 4.3.3. Resultados experimentales para la xilanasa (Xyl-L) y la variante R13

Para la expresión recombinante de los genes Xyl-L y Xil-R13 (1047 pares de bases cada uno) cada gen se sintetizó y se insertó en un vector de clonación y expresión pET 22b, ligados entre los sitios de restricción NcoI y XhoI correspondiente a los extremos 5' y 3' (General Biosystems Inc.)<sup>219</sup>, los codones fueron optimizados para *E-coli*<sup>220</sup> y así facilitar su expresión recombinante.

Experimentalmente la expresión recombinante de las enzimas Xyl-L y R13 en *E-coli* BL21 permitió obtener las enzimas en el sobrenadante del medio de cultivo, las enzimas fueron concentradas por precipitación con sulfato de amonio y dializadas con buffer Tris HCl a pH 8, logrando una concentración de proteína total de 2,12 µg/µL para la enzima Xyl-L y 2,97 µg/µL para la enzima Xil-R13.

Para caracterizar la Xilanasa Xyl-L nativa y la modificada (Xil-R13) se usó xilano de Beechwood (Haya) (Megazyme). La temperatura óptima se cuantificó por la generación de azúcares reductores con el método DNS a temperaturas entre 25°C y 60°C, siguiendo la metodología propuesta por Bailey et al., (1992)<sup>221</sup>. El efecto del pH y la temperatura sobre la actividad, se realizaron en un rango de pH entre 5,0 a 8,0 usando buffer McIlvaine<sup>222</sup> y la evaluación de la estabilidad térmica de la enzima nativa y la mutante (Xil-R13) se determinó midiendo sus actividades residuales después de incubar cada enzima en intervalos 10 minutos hasta completar 120 minutos a la temperatura de 40°C y 50°C a pH 6.

Al evaluar el efecto de la temperatura y el pH sobre la actividad de la xilanasa nativa y mutada Xil-R13 (Figura 25 a Figura 29), se observó que, el comportamiento de la xilanasa nativa en los intervalos de pH evaluados presenta un comportamiento similar al reportado por Acevedo et al.,<sup>76</sup> para xilanasa Xyl-L, mostrando una actividad superior al 50 % a temperaturas inferiores a 30°C la cual decae rápidamente a temperaturas por sobre 40°C<sup>76</sup>, sin embargo la enzima modificada Xil-R13, es capaz mantener su actividad relativa sobre el 50% a temperaturas superiores a 50°C en el rango de pH de 5 a 7 (Figura 28), es de especial interés el comportamiento de la enzima Xil-R13 a pH 6 en donde presenta la mayor actividad con respecto a las otras condiciones de pH para la misma enzima Xil-R13 y la Xyl-L a temperaturas por encima de 40°C (Figura 30).



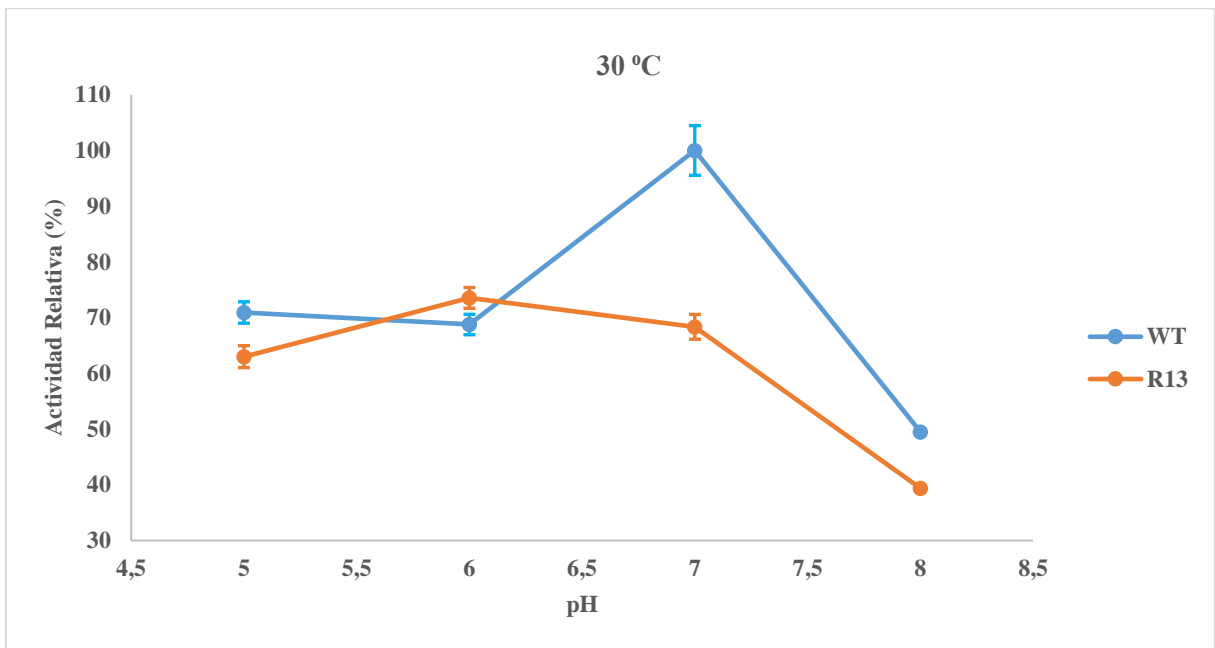


Figura 25. Efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a 30°C.

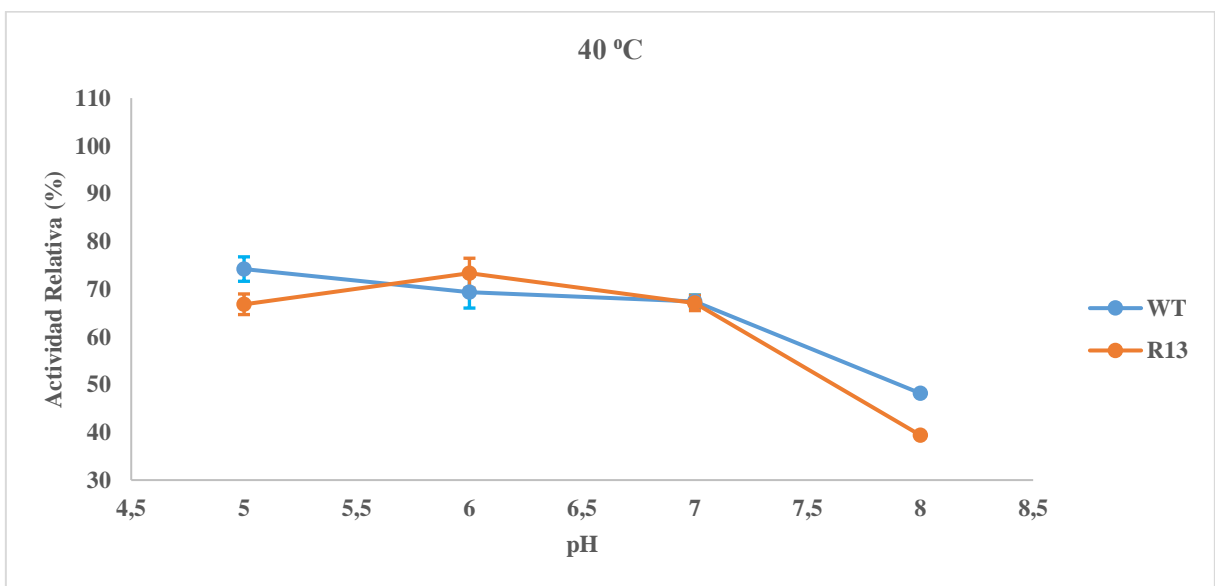


Figura 26. Efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a 40°C.

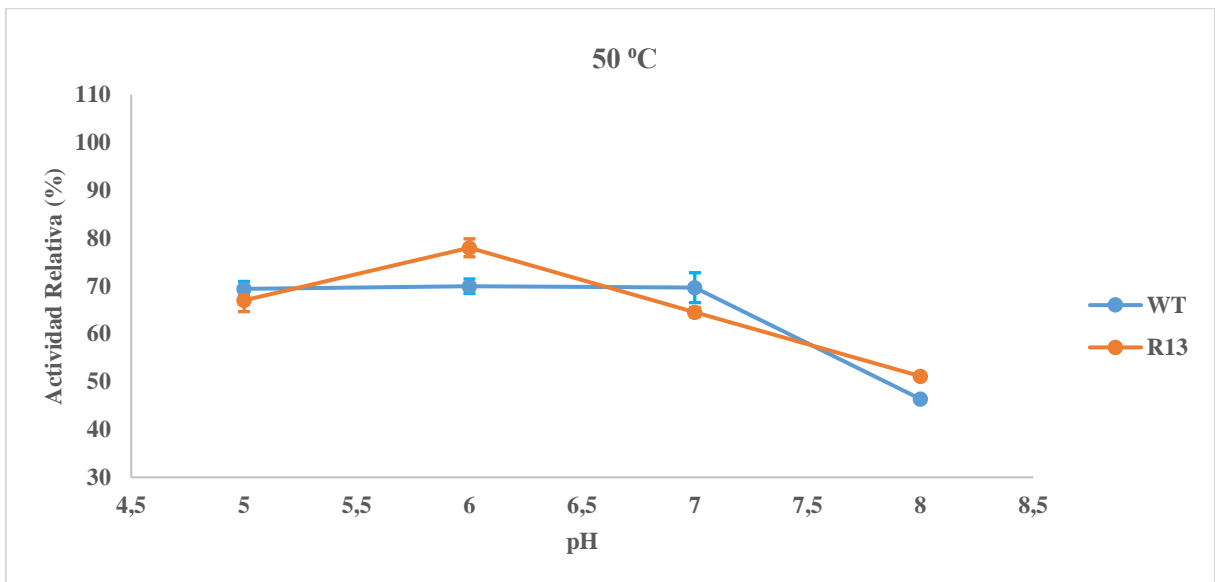


Figura 27. Efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a 50°C.

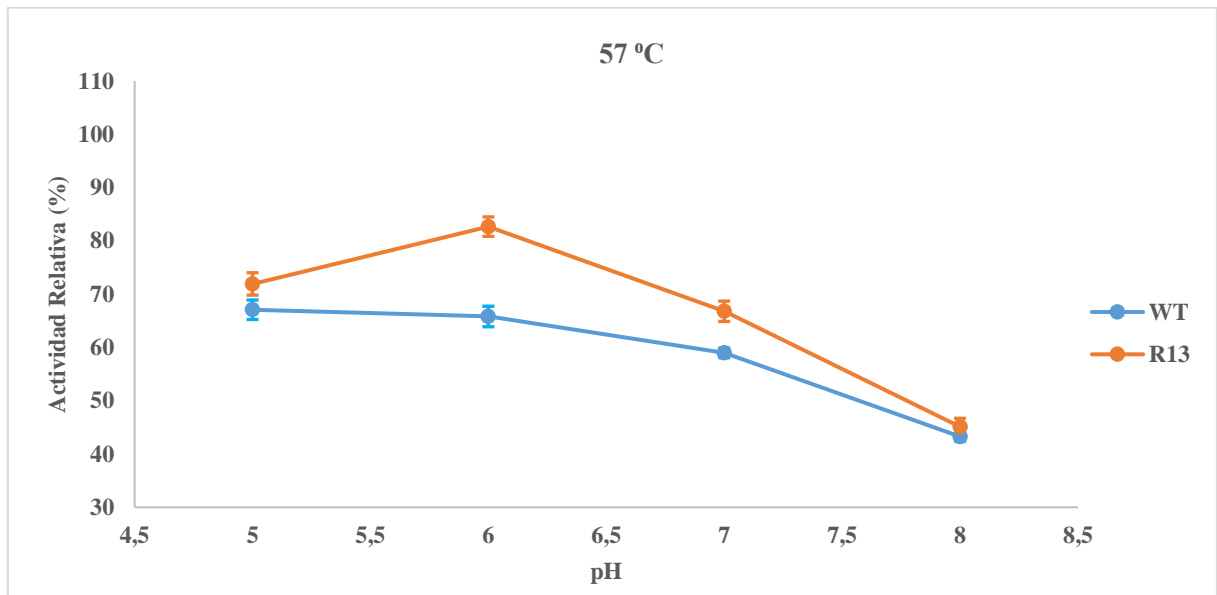


Figura 28. Efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a 57°C.

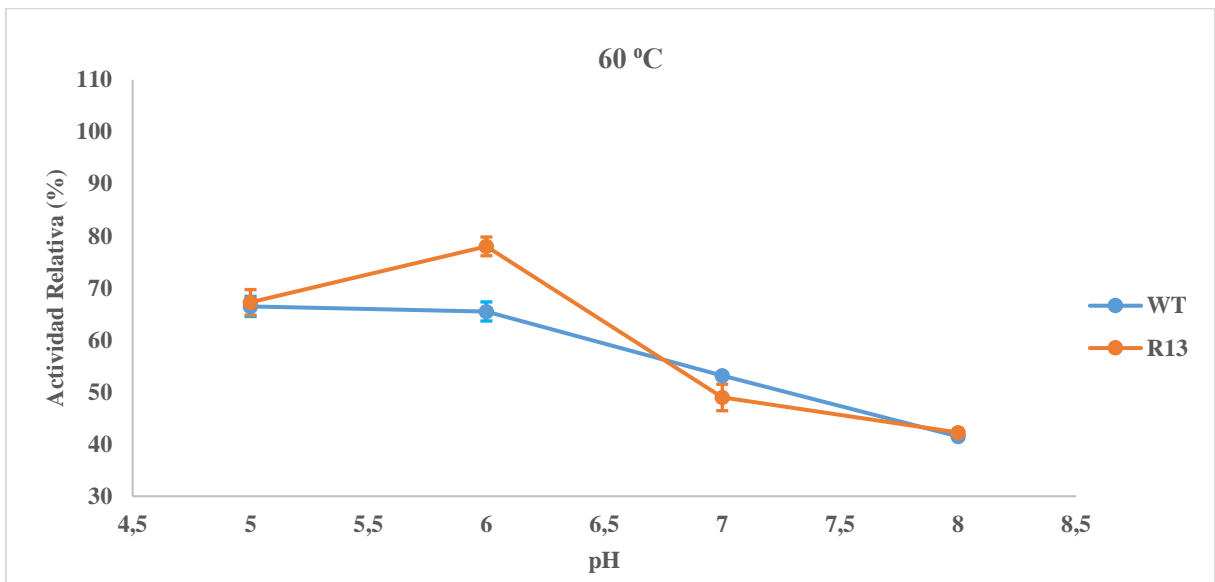


Figura 29. Efecto de la temperatura y el pH sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a 60°C.

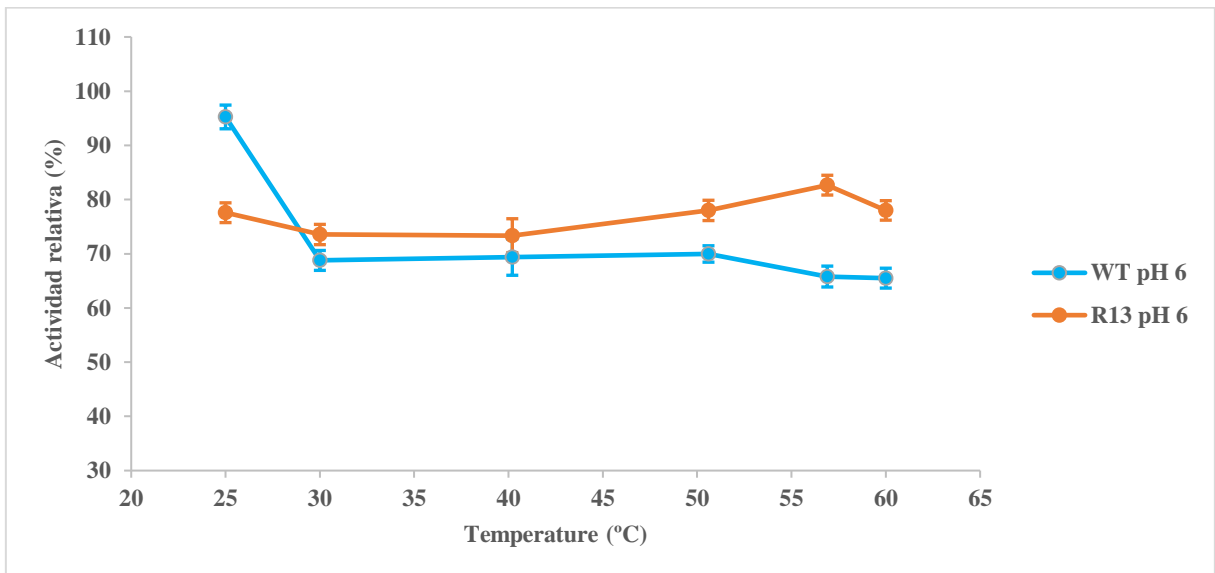


Figura 30. Efecto de la temperatura y sobre la estabilidad de la enzima Xyl-L y Xil-R13 a pH6

La estabilidad térmica de la enzima nativa y mutada fueron determinadas al medir su actividad residual en intervalos de 10 minutos de incubación a 40°C y 50°C a un pH de 6 (Figura 31) el cual fue el pH en donde la mutante Xil-R13 presentó su mayor actividad, (Figura 30), en la Figura 31 se estima para la enzima nativa que tiene un tiempo de vida media de 79.6 min para la temperatura de 40°C y 53.2 min para la temperatura de 50°C, el  $T_{50}^{30}$  para la enzima Xil-R13, se estima su tiempo de vida media en 404.0 min y a 50°C se estima en 104.2 min (Tabla 24).

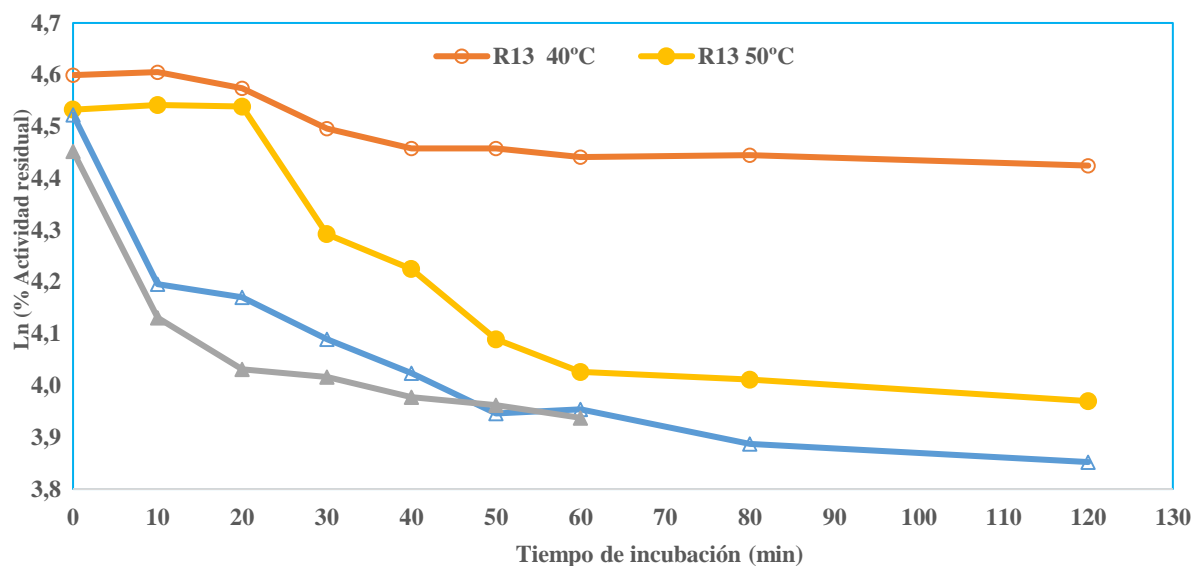


Figura 31. Tiempos de vida media de inactivación térmica para las enzimas Xyl-L y Xil-R13 a pH 6.

Tabla 24 Tiempos de vida media para enzima nativa y la mutante a 40 °C y 50 °C

Enzima	Tempertura de incubación (°C)	t <sub>1/2</sub> (min)*
WT	40	79.6
WT	50	53.2
R13	40	404.0
R13	50	104.2

\* t<sub>1/2</sub> tiempo de vida media, en minutos

Los cambios observados de estabilidad térmica y actividad a diferentes valores de pH en la enzima Xil-R13 con respecto a la enzima Xyl-L se podrían explicar a partir de la propuesta de Lee y Goodey (2011)<sup>108</sup> quienes plantean tres mecanismos para justificar el porqué las mutaciones distales con respecto a los aminoácidos catalíticos tienen efecto sobre parámetros funcionales; lo primero que plantean es que dichas mutaciones generan un nuevo equilibrio en la configuración de la estructura, en segundo lugar es que se presentan cambios en las interacciones entre los aminoácidos y el solvente debido a un cambio en la distribución de cargas y por último hay cambios en el movimiento conformacional de la estructura.<sup>108</sup>

Es así que los cambios en la entropía de vibración debido al efecto de las mutaciones estarían asociados a nuevos equilibrios en la configuración estructural, dichos cambios estructurales podrían explicar las alteraciones en los parámetros funcionales observados, como los cambios de la actividad a diferentes temperaturas. Se observa en la estructura de la xilanaso mutada (Xil-R13) una reducción de  $-0,174 \pm 0,012$  unidades de entropía de vibración (Ecuación 1) esta disminución en el valor de la entropía de vibración está evidenciando que las mutaciones han acotado el número de configuraciones posibles que puede tener la estructura de la xilanaso Xil-R13 con respecto a la enzima Xyl-L (Tabla 25). Aunque el número de posibles configuraciones estructurales disminuyen en la enzima mutada, las enzimas son capaces de ajustar las mutaciones en la estructura

impidiendo una deformación global de la enzima como lo comprobó Sauer y Lim (1992)<sup>223</sup>. Por otro lado, alteraciones en los valores de entropía de vibración de la estructura implican a su vez cambios en el valor de la entalpía de enlace, siempre en una dirección compensatoria, como lo mostro inicialmente Cooper et al., (2001)<sup>224</sup> y luego Starikov y Norden (2007)<sup>225</sup> demostraron que este tipo de equilibrios compensatorios entre los cambios de entropía y entalpía son característicos de sistemas complejos, igualmente Vega et al., (2016) observaron también que el equilibrio conformacional es la principal contribución a los cambios en la entalpía de enlace durante la interacción enzima sustrato<sup>226</sup>, por lo tanto una reducción en el valor de la entropía de vibración implicaría un incremento en el valor de la entalpía para mantener el equilibrio del sistema, repercutiendo esto en que la enzima mutada requerirá de una mayor temperatura para lograr una conformación adecuada para manter su actividad catalítica como se observó experimentalmete (Figura 25 a Figura 29).

Tabla 25. Valores de entropía de vibración (Sección 3.1.5) para la enzima nativa(Xyl-L) y mutada (Xil-R13)

	$S_{vib}/k_B$ <sup>a</sup>	$\sigma$ <sup>b</sup>
<b>R13</b>	118,802	0,028
<b>WT</b>	118,976	0,016

<sup>a</sup>  $S_{vib}$  cambio en la entropía de vibración.

$k_B$  constante de Boltzmann

<sup>b</sup>  $\sigma$  desviación estándar.

Por otra parte, Schuler et al., (2002)<sup>227</sup> sugieren que el incremento en la estabilidad térmica de las enzimas se puede explicar también debido a una reducción en la superficie de las cadenas laterales flexibles de los aminoácidos o a la reducción del volumen estructural de la enzima, lo que implica una reducción en los grados de libertad accesibles a la proteína (reducción de  $\Delta S_{vib}/k_B$ )<sup>228</sup>, así al comparar los volúmenes de la xilanasa Xil-R13 y la Xyl-L se observó que la enzima mutante tiene un área de acceso al solvente y volumen molecular (Sección 3.1.4) menor que la nativa mostrando una reducción en el área de  $-179,4 \pm 417.64 \text{ \AA}^2$ , y una reducción en el volumen de  $-655.03 \pm 980.92 \text{ \AA}^3$  como se observa en la Tabla 26; estos cambios configuracionales sugieren que también se han generado alteraciones electrostáticas o una redistribución de cargas en la estructura, las cuales estarían ejerciendo un efecto importante sobre la actividad catalítica<sup>214 229</sup> a diferentes temperaturas, como se observa en la Figura 32 para la enzima Xil-R13 y en la Figura 33 para la enzima nativa Xyl-L.

Tabla 26. Área de acceso al solvente (ASA) y volumen de la enzimas nativa y mutada<sup>140</sup>

	ASA ( $\text{\AA}^2$ ) <sup>*</sup>	$\sigma$ <sup>b</sup>	Volumen ( $\text{\AA}^3$ )	$\sigma$ <sup>b</sup>
<b>R13</b>	14567,60	22,45	47497,23	137,36
<b>WT</b>	14747,00	440,09	48152,25	1118,28

<sup>\*</sup>Área de acceso al solvente (ASA). <sup>b</sup>,  $\sigma$  desviación estándar.

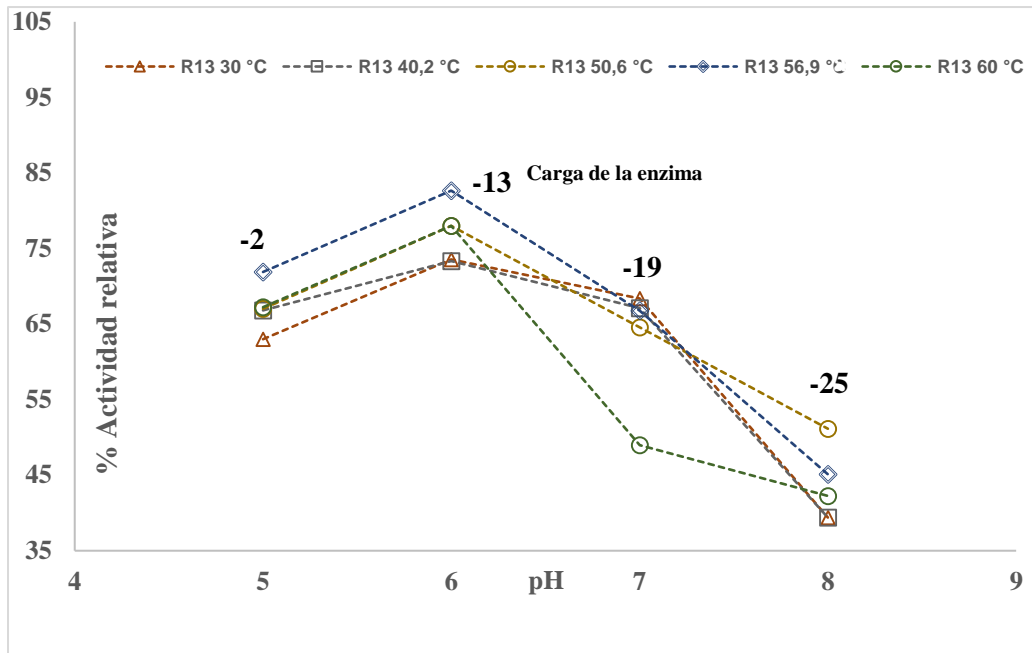


Figura 32. Actividad relativa en función de los cambios en la carga de la enzima Xil-R13 en función de pH y con respecto a la temperatura.

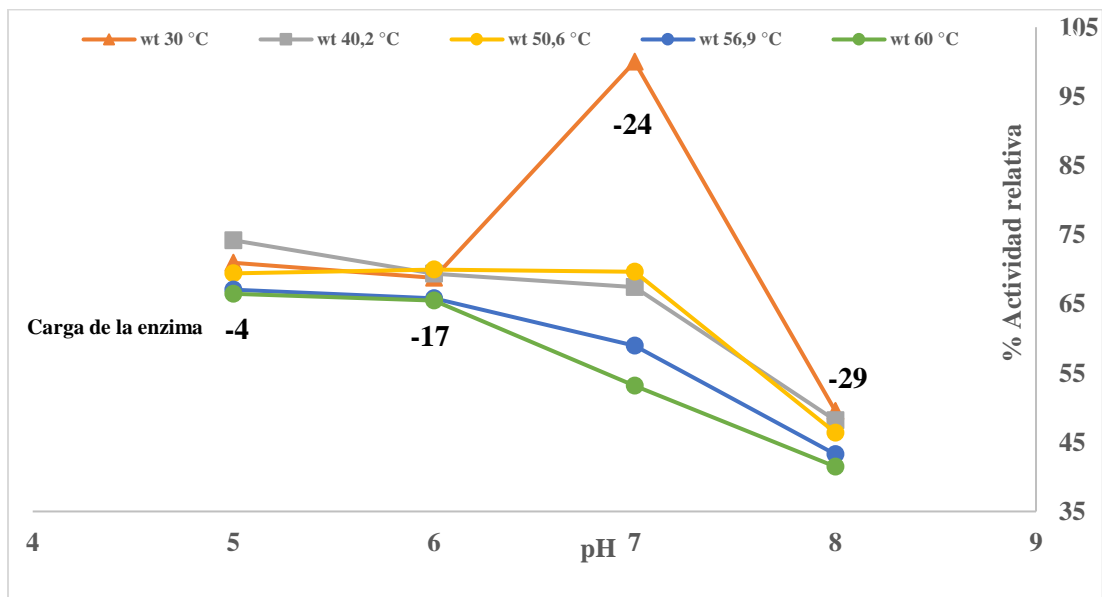


Figura 33. Actividad relativa en función de los cambios en la carga de la enzima Xyl-L en función de pH y la temperatura.

Ahora se analiza como las mutaciones alteraron los valores en las Fluctuaciones de los  $C\alpha$  en las estructura de la enzima Xyl-L y Xil-R13, con respecto a la enzima Xyl-L por medio del análisis de modos normales que permite evaluar los valores de fluctuación de los  $C\alpha$ , la Figura 34 muestra las Fluctuaciones normalizadas (Ecuación 8) para las estructuras de las enzimas Xyl-L y Xil-R13, con estos valores normalizados se identifican las posiciones en la estructura de la enzima Xil-R13 que presente cambios superiores a un 5 % (valor absoluto) con respecto a la estructura de la enzima Xyl-L (Anexo D), en la Figura 35 se observa como desde la posición 25 hasta la 29 se evidencia una reducción de las Fluctuaciones de  $-32 \% \pm 27$ , la Figura 35 b muestra esta misma región ubicada en la estructura (indicado en color verde), en la Figura 36 ahora las posiciones desde la

48 hasta 52 muestran un incremento en la fluctuación de un  $5 \% \pm 2$ , la zona en la estructura correspondiente a esta posiciones esta indicada en la Figura 36 b (indicada con color azul), en la Figura 37 ahora las posiciones desde la 59 hasta 63 muestran una reducción en la fluctuación de un  $-1779 \% \pm 3859$ , la zona en la estructura correspondiente a esta posiciones esta indicada en la

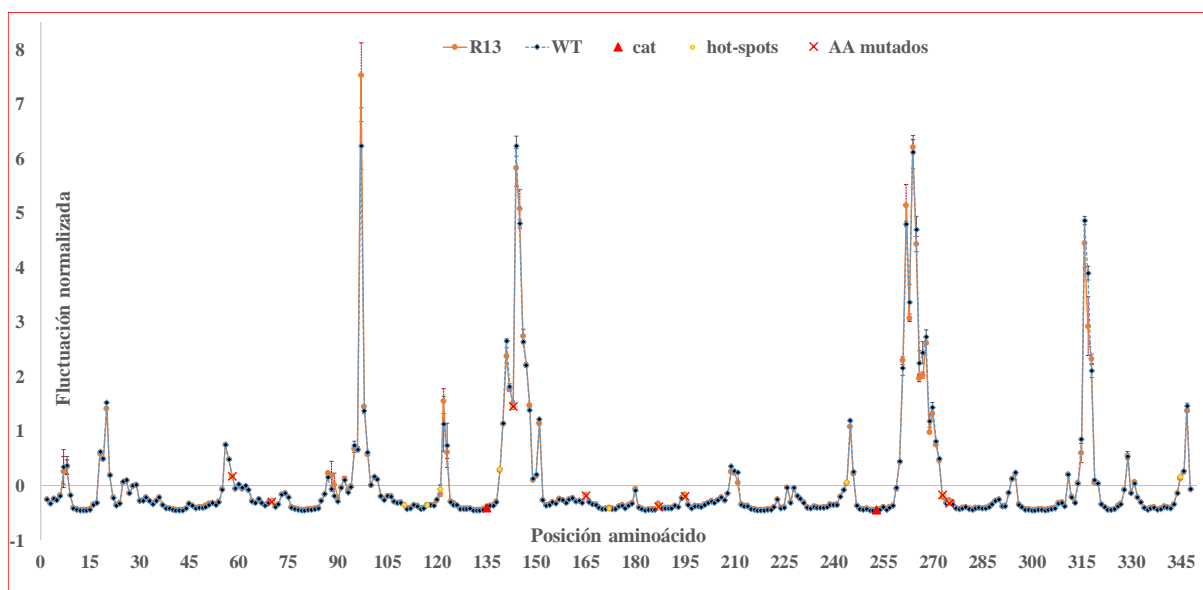


Figura 34. Fluctuaciones normalizadas para la estructura de la enzima nativa, Xyl-L (rombos negros) y la variante Xil-R13(círculos naranjas), mutaciones indicadas con una X roja.

Figura 37 b (indicada con color amarillo), en la zona correspondiente a las posiciones 69 hasta 74 se observa un incremento en la fluctuación de  $5 \% \pm 2$  Figura 38, de manera similar en la zona correspondiente a las posiciones 86 a 103 se evidencia un incremento en la fluctuación en esta zona de un  $33 \% \pm 95$  en promedio Figura 39, la siguiente zona en que se evidencio cambios en las Fluctuaciones corresponde a la zona comprendida entre las posiciones 120 a 125 Figura 40, se presenta aquí una reducción promedio de la fluctuación de un  $-25 \% \pm 77$ , en la Figura 41 la zona correspondiente a las posiciones 144 a 151 presenta una reducción promedio en su fluctuación de un  $-4 \% \pm 10$ , igualmente en la zona correspondiente a las posiciones 208 a 211 Figura 42 se observa una reducción promedio en las Fluctuaciones de un  $-31 \% \pm 33$ , también se presenta una reducción promedio de un  $-18 \% \pm 12$  en las posiciones 243 a 246 Figura 43, en la zona correspondiente a las posiciones 259 a 276. En la Figura 44 se presenta también una reducción promedio de las Fluctuaciones de un  $-8 \% \pm 20$ , de manera similar las posiciones 314 a 320 presenta una reducción en las Fluctuaciones en promedio de  $-5 \% \pm 32$  Figura 45 y las posiciones 345 a 347 también presenta una reducción en las Fluctuaciones de  $-13 \% \pm 9$  Figura 46. Finalmente se observa como las Fluctuaciones de los aminoácidos catalíticos (E135 y E253) no se ven afectadas por las mutaciones. La Tabla 27 resume las observaciones sobre los cambios en las Fluctuaciones en la estructura de Xil-R13.

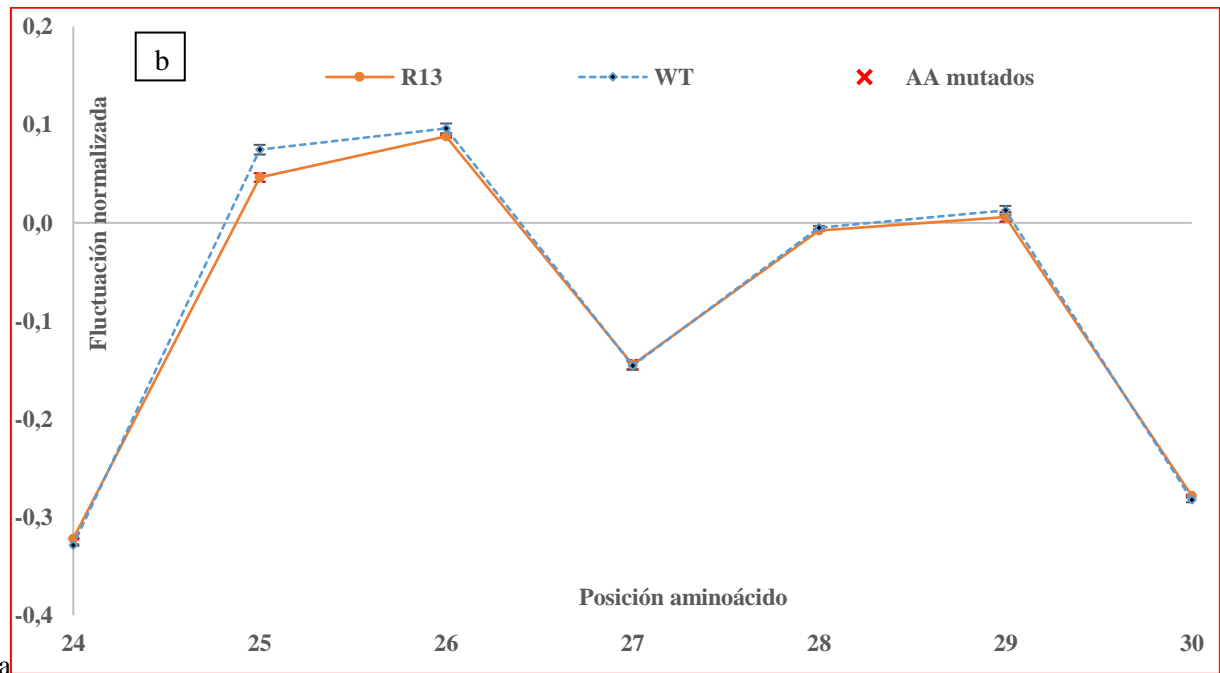
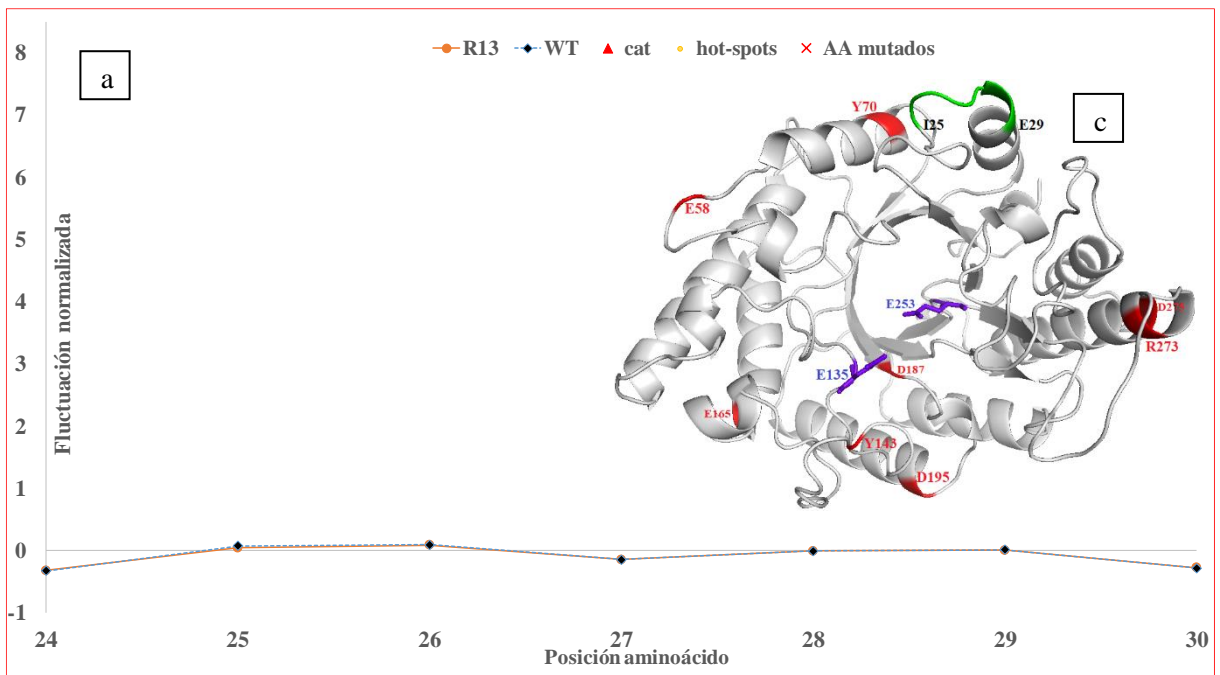


Figura 35. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 25 a 29. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color verde la zona donde se observan cambios en la fluctuación.



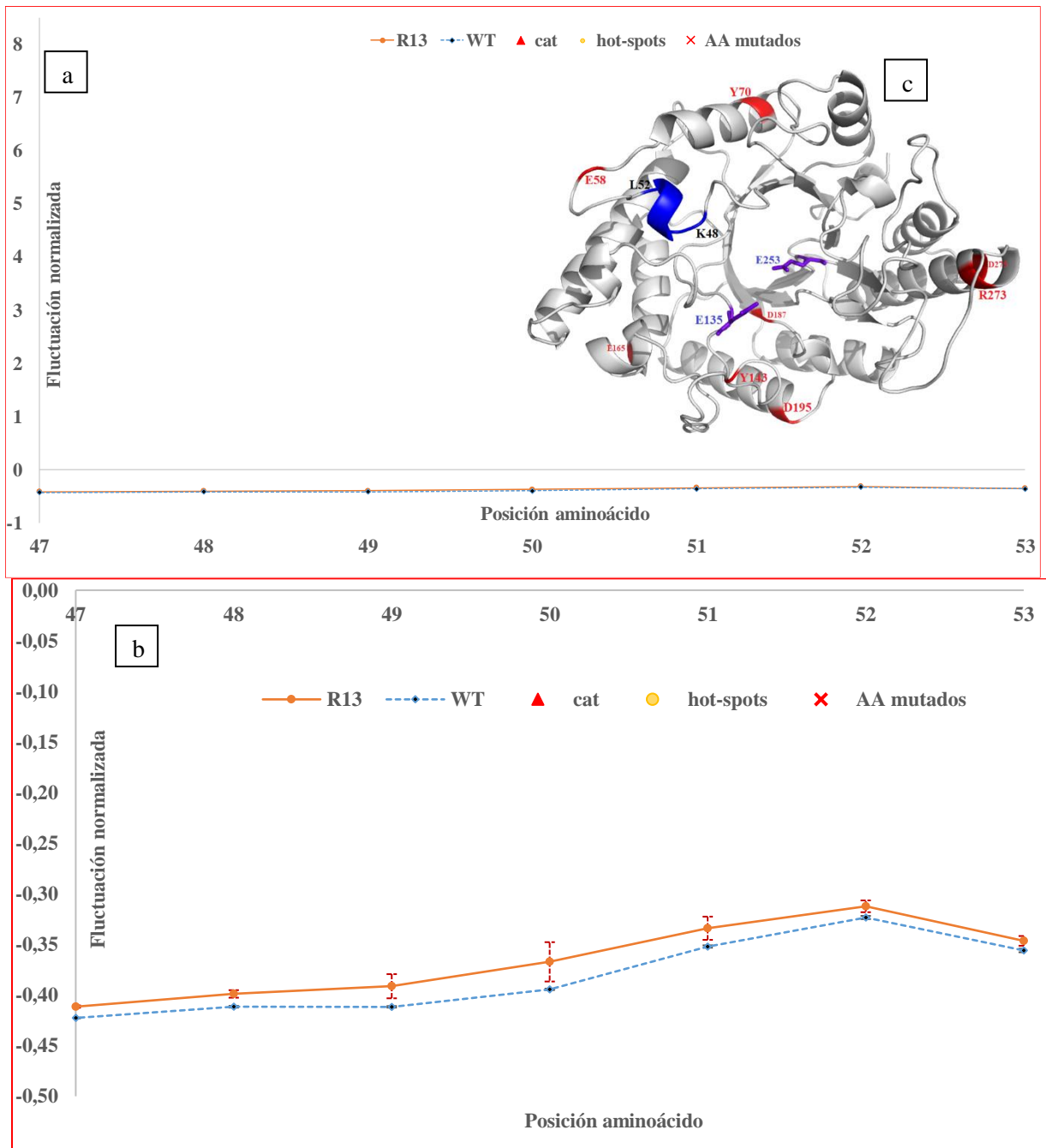


Figura 36. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 48 a 52. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color azul la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

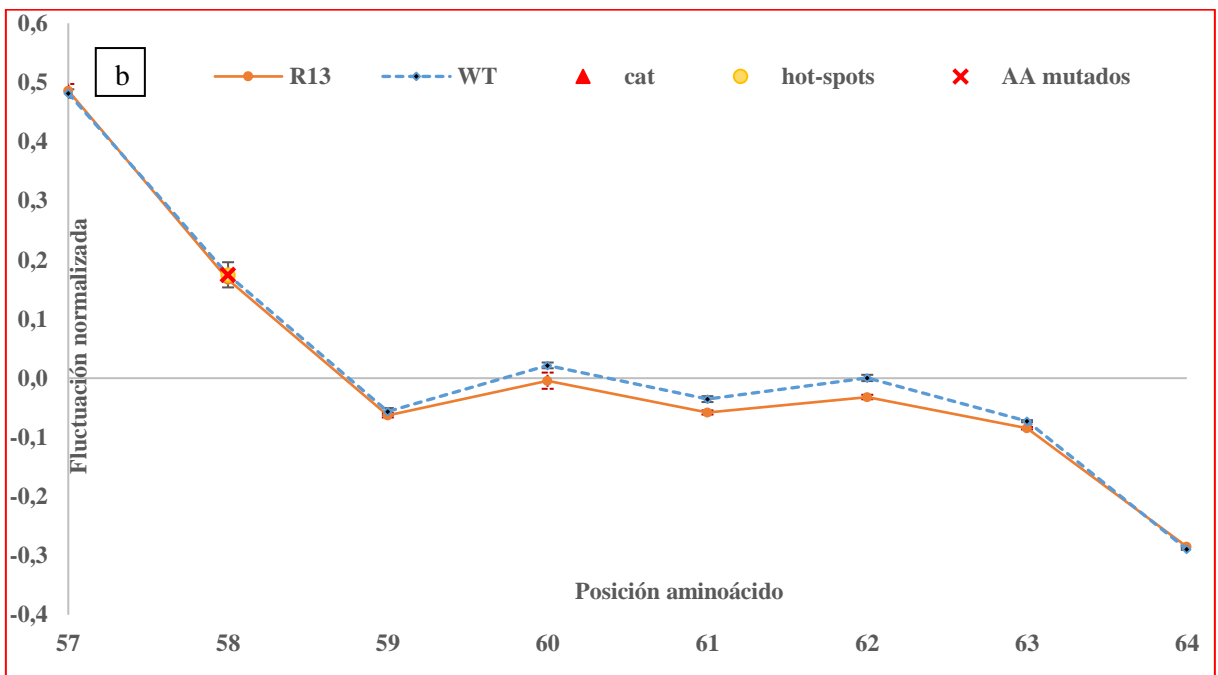
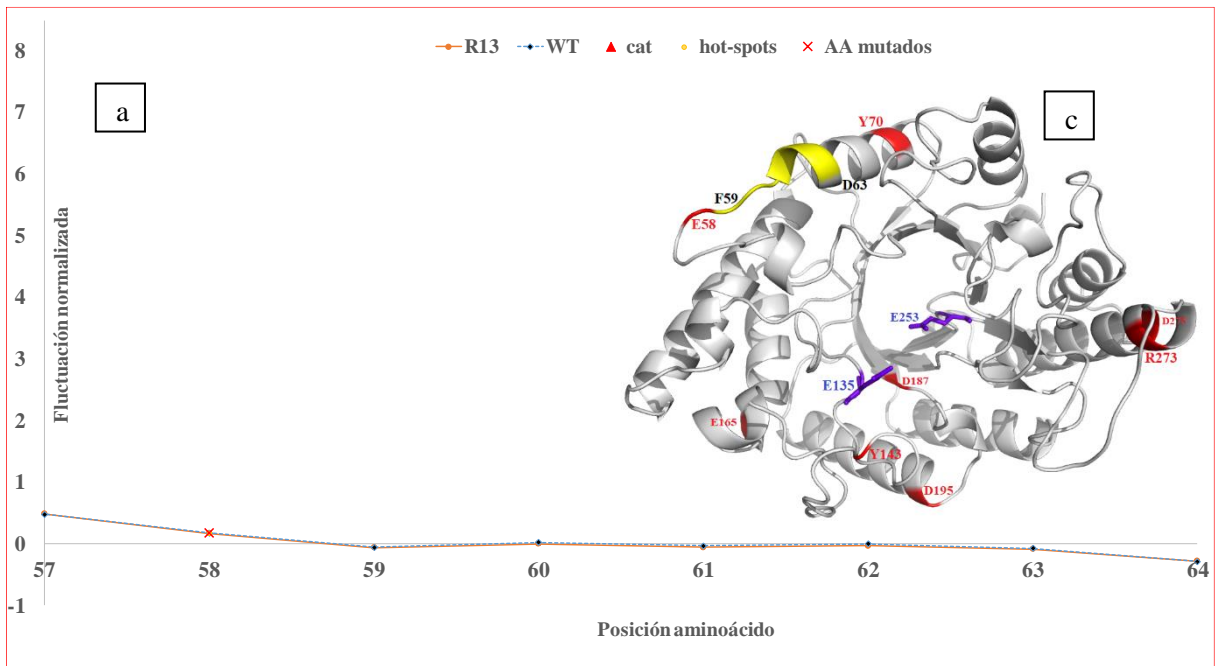


Figura 37. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 59 a 63. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color amarillo la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

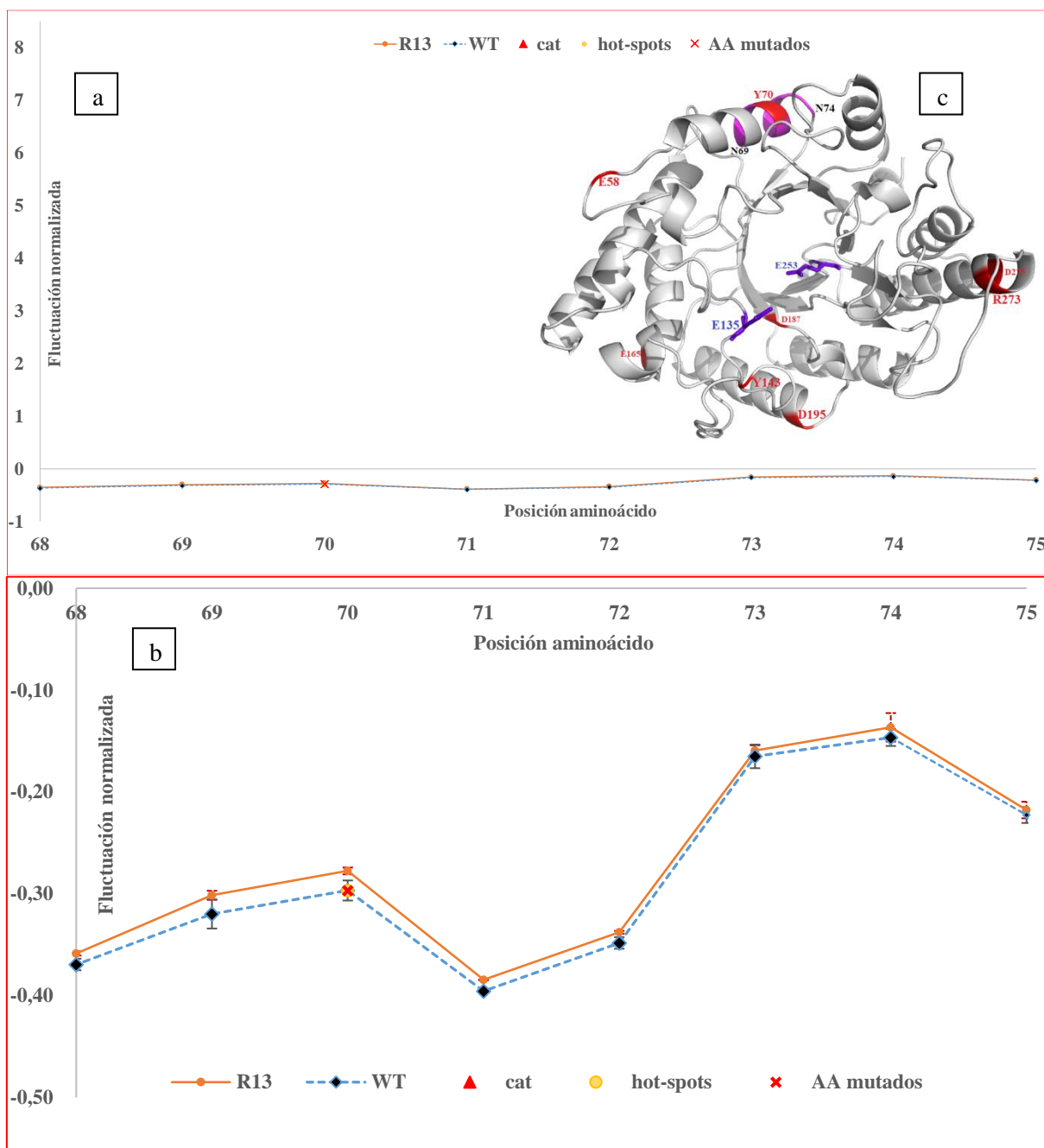


Figura 38. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 69 a 74. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color magenta la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

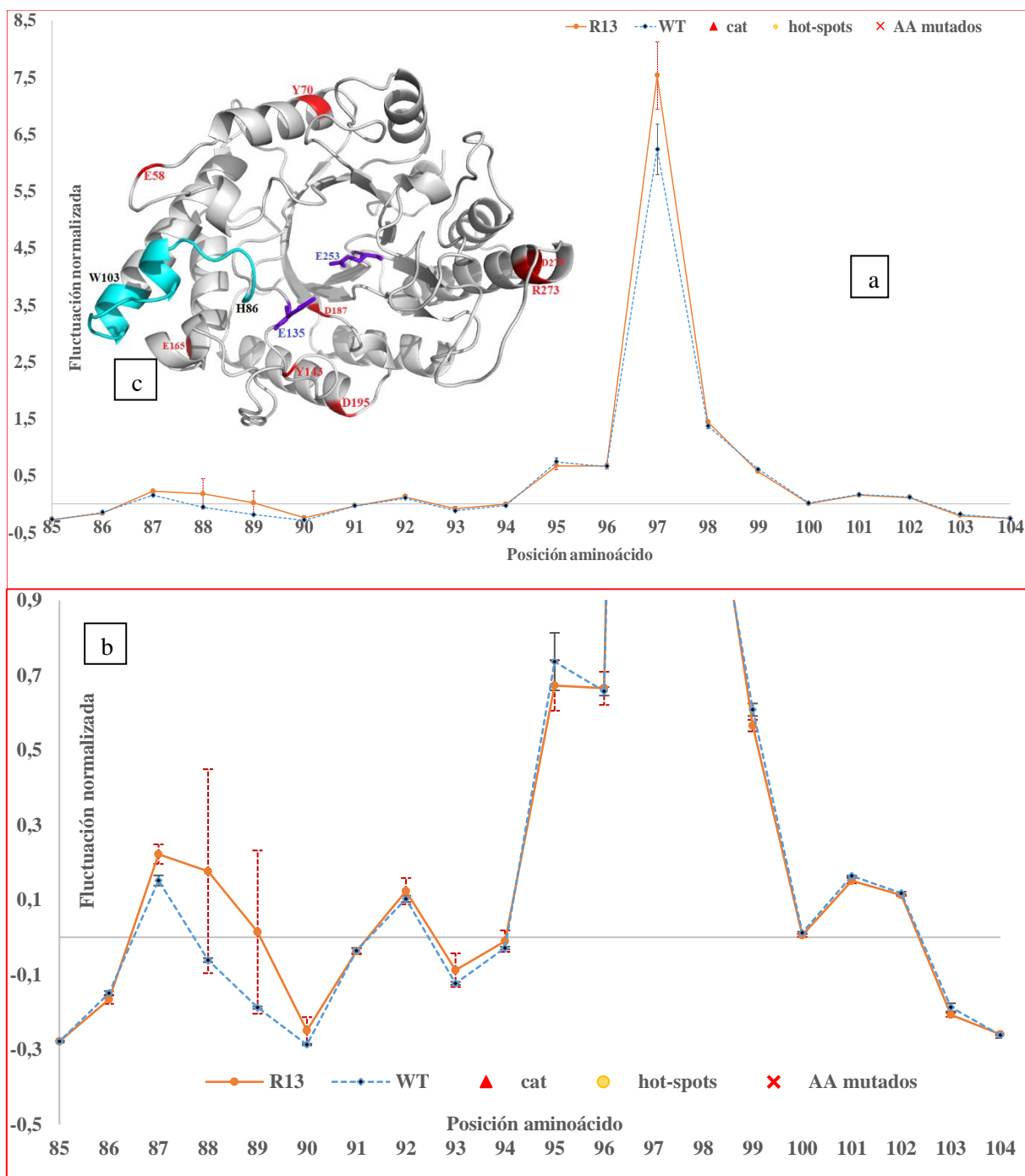


Figura 39. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 86 a 103. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color cian la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

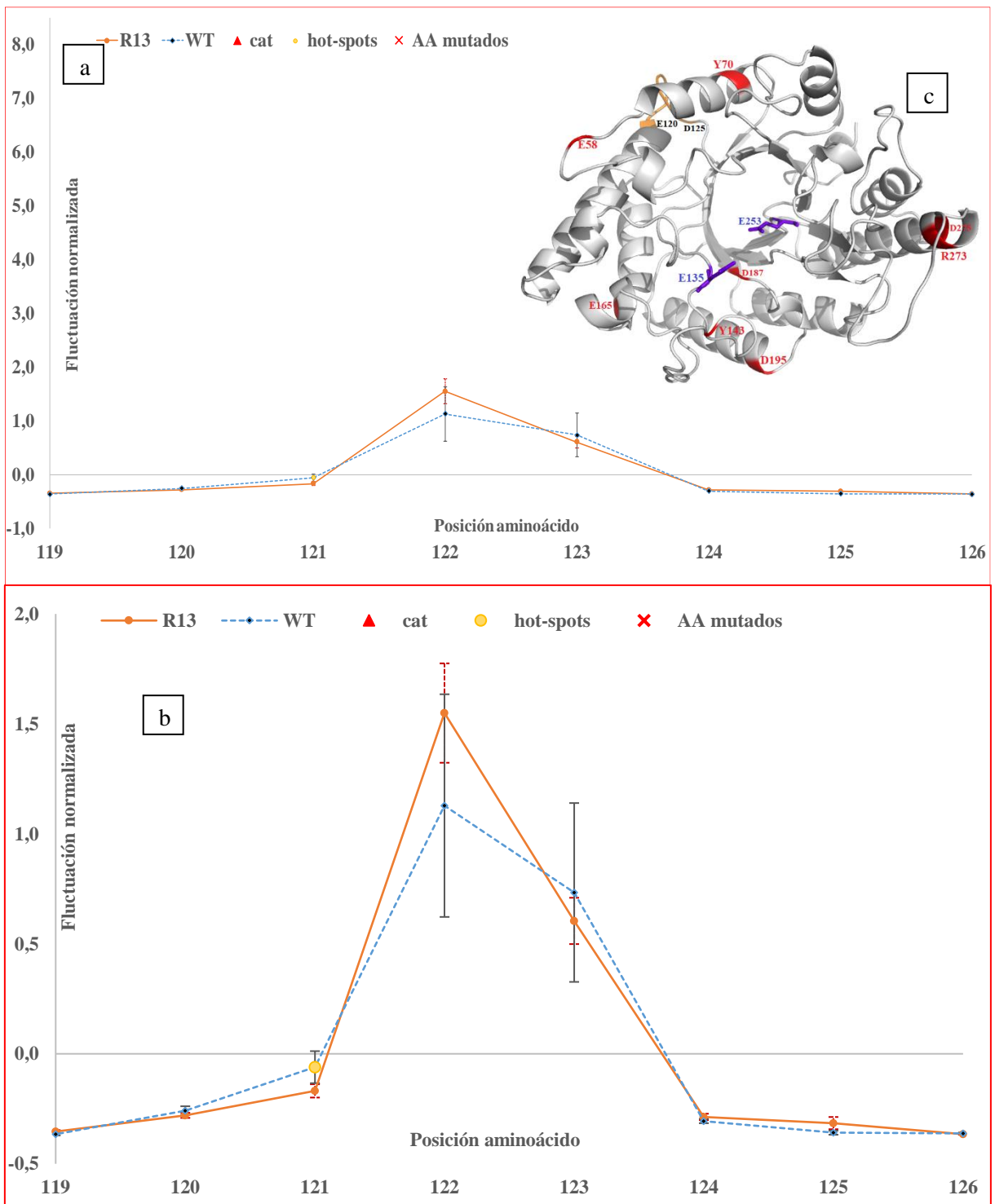


Figura 40. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 120 a 125. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color naranja la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

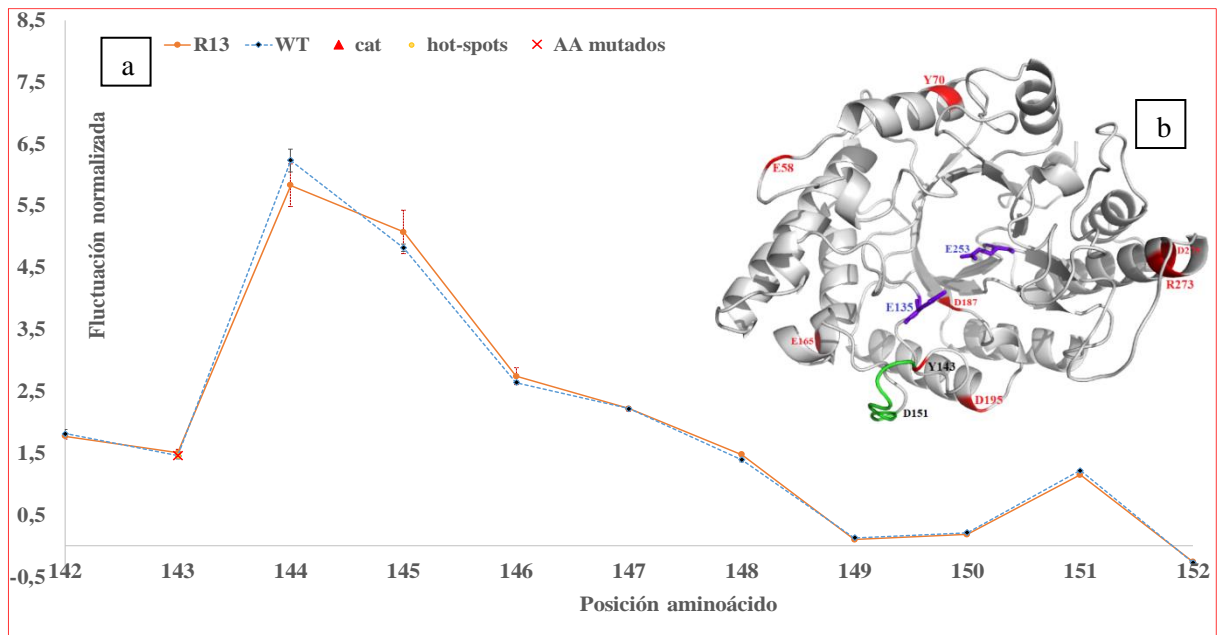


Figura 41. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 144 a 151. a) variantes Xyl-L y Xil-R13, b) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color verde la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

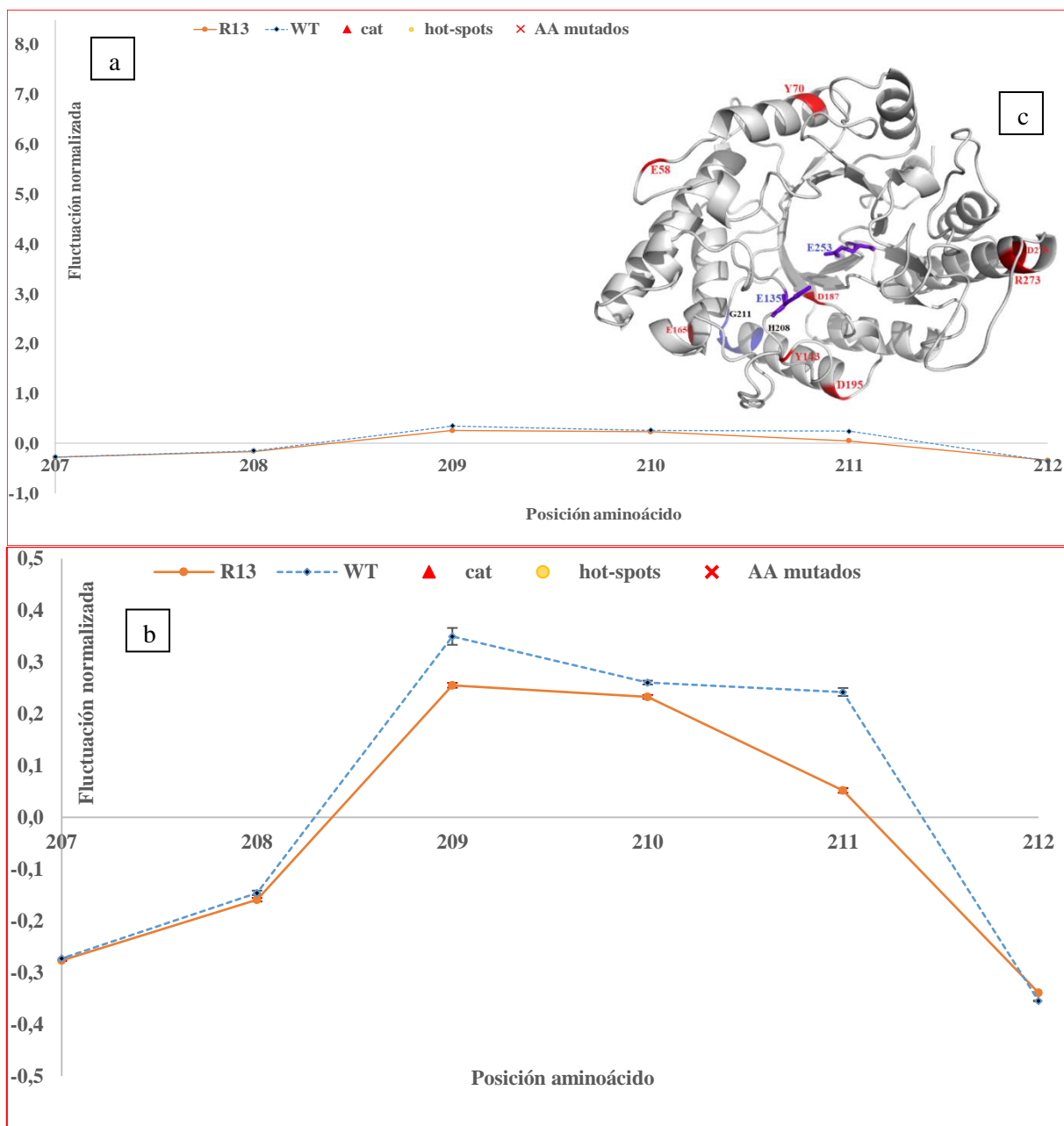


Figura 42. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 208 a 211. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color azul la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

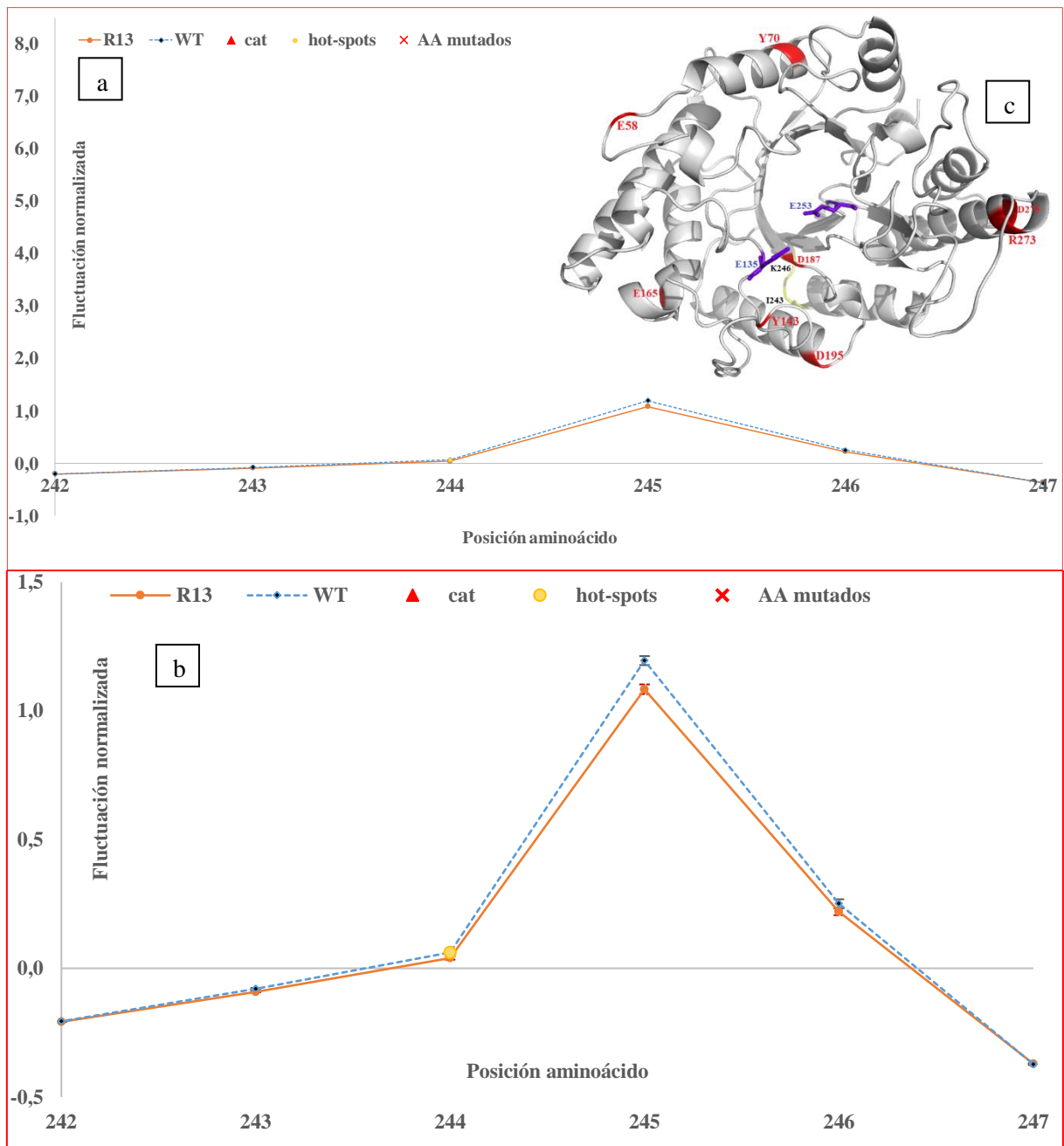


Figura 43. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 243 a 246. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color amarillo la zona donde se observan cambios en la fluctuación.



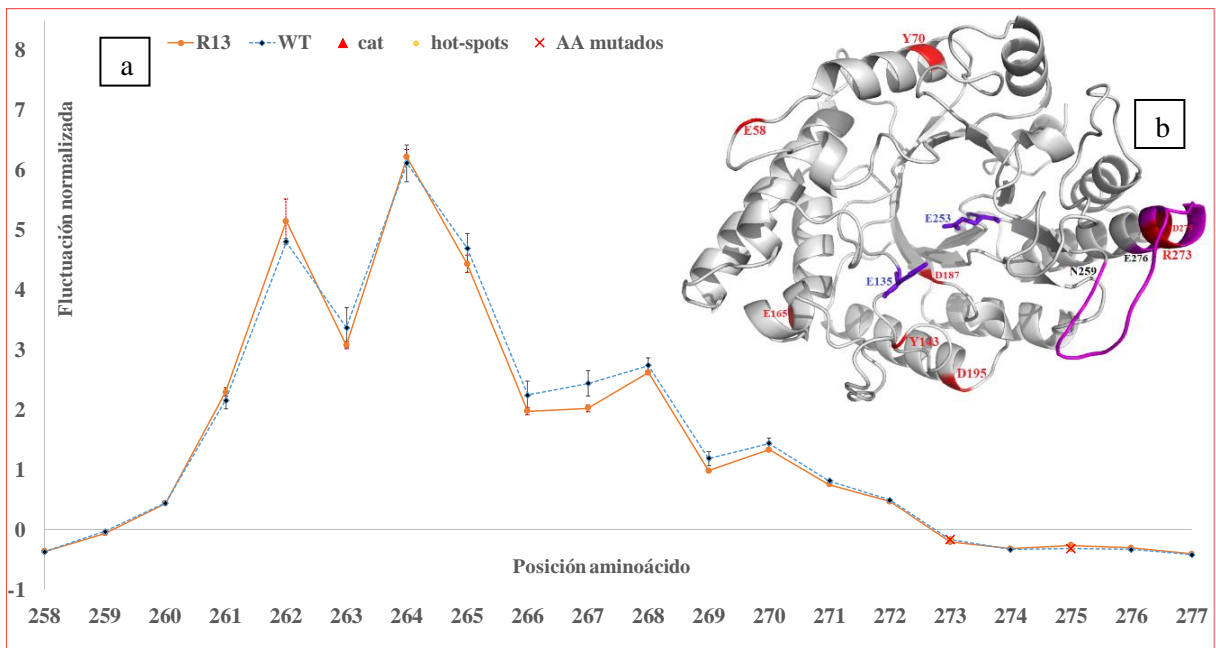


Figura 44. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 259 a 276. a) variantes Xyl-L y Xil-R13, b) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color magenta la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

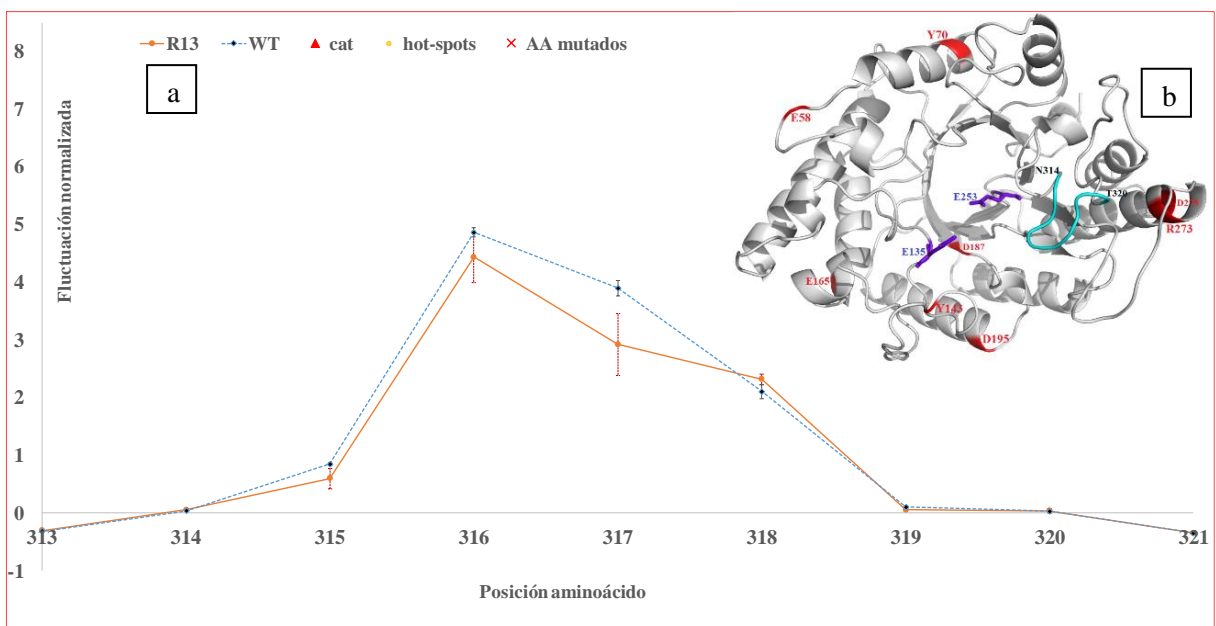


Figura 45. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 314 a 320. a) variantes Xyl-L y Xil-R13, b) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color cian la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

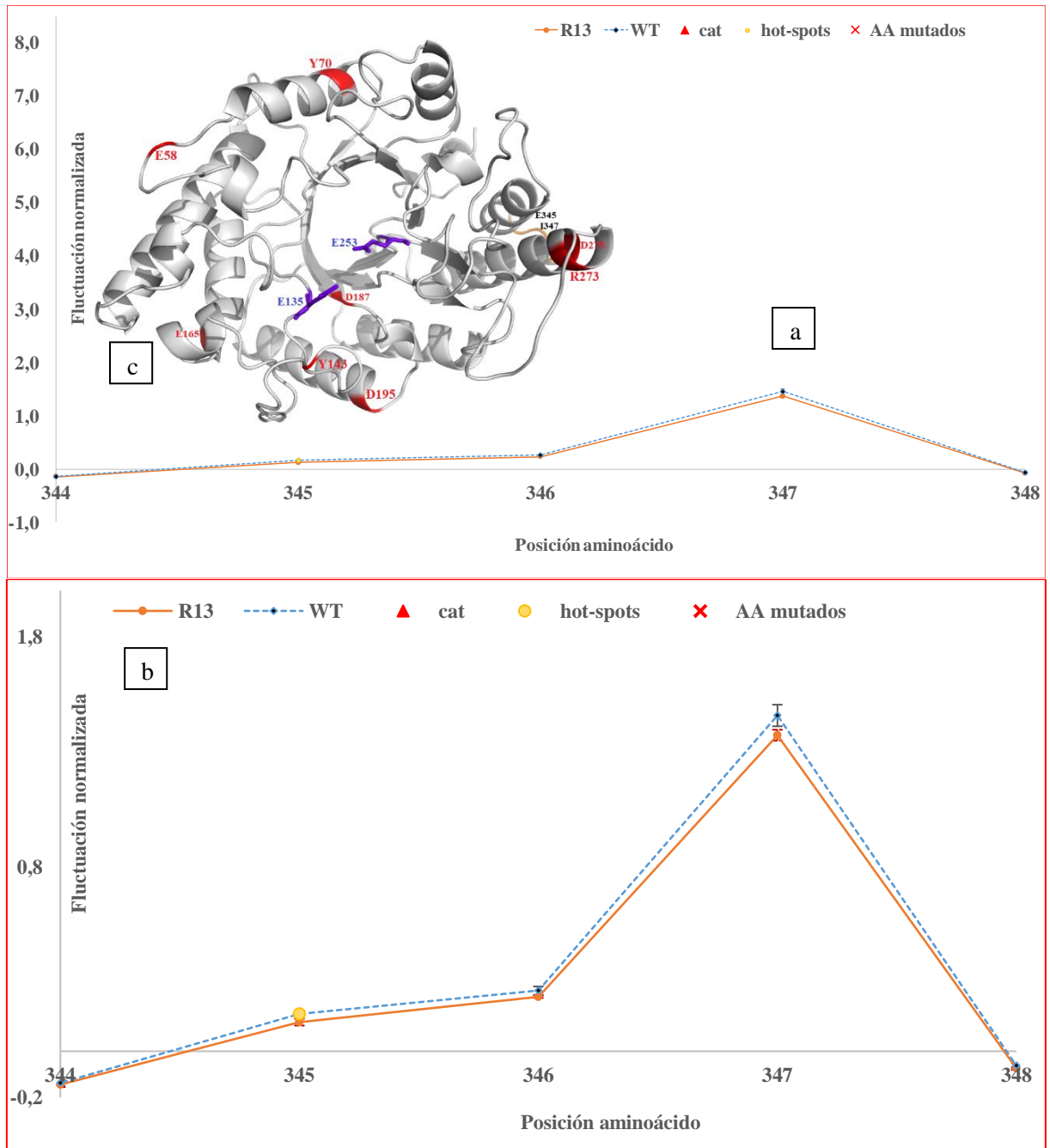


Figura 46. Efecto de las mutaciones sobre las Fluctuaciones normalizadas en las posiciones 11 a 27. a) y b) variantes Xyl-L y Xil-R13, c) estructura terciaria de la xilanasa Xyl-L, en rojo las posiciones de las mutaciones propuestas por la metodología EVOP, en púrpura aminoácidos catalíticos, en color naranja la zona donde se observan cambios en la fluctuación.

Tabla 27 Zonas en la estructura con cambios en las Fluctuaciones de los Carbonos alfa.

posiciones AA	% de cambio*	desviación	Figura	Estructura secundaria predominante
25-29	-32	27	41	Loop
48-52	5	2	42	Helice
59-63	-1779	3859	43	Loop
69-74	5	2	44	Helice
86-103	33	95	45	Helice
120-125	-25	77	46	Loop
144-151	-4	10	47	Loop
208-211	-31	33	48	Loop
243-246	-18	12	49	Loop
259-276	-8	20	50	Loop
314-320	-5	32	51	Loop
345-347	-13	9	52	Loop
1-349	-24,8	467		

\* El signo negativo indica la reducción en la fluctuación.

Al comparar los valores de los cambios en los valores de la fluctuación de manera global entre la estructura de la enzima Xyl-L y Xil-R13 se observa una reducción promedio de un -24.8 % (Tabla 27), esto estaría evidenciando cambios configuracionales en la estructura<sup>230</sup>, en la enzima Xil-R13 se evidencia la reducción en la fluctuación principalmente en posiciones que involucran estructuras secundarias tipo loop (Tabla 27) y en las hélices, predominan los incrementos en la fluctuación (Tabla 27). Se cree que estos cambios están correlacionados entre sí con el objetivo de mantener un balance entre la estabilidad y flexibilidad estructural, estos factores son complementarios para el funcionamiento óptimo de la enzima, por un lado, estabilidad asegura la geometría apropiada para el enlace con el sustrato y evitar la desnaturalización por efecto de la temperatura, al mismo tiempo se requiere de cierta flexibilidad necesaria para llevar a cabo la catálisis a un ritmo metabólico efectivo.<sup>136 231</sup>. Investigaciones han confirmado que el impacto observado en los cambios de la actividad enzimática producto de las mutaciones distales no se deben a cambios en la estructura de la enzima, sino a cambios en la fluctuación de los aminoácidos en la estructura de la enzima, es decir movimientos conformacionales, mostrando que las contribuciones de la flexibilidad están estrechamente relacionadas con el mecanismo de la enzima<sup>226 232 233 234</sup>; igualmente Karshikoff et al., (2015), mostraron que la tolerancia térmica de una enzima no está correlacionada necesariamente con la supresión de las Fluctuaciones y la reducción de la movilidad interna, es así como la separación de la estructura de la enzima entre partes rígidas y flexibles no describen la realidad de sus características en forma apropiada<sup>235</sup>. Estos cambios en las Fluctuaciones en la estructura de Xil-R13 pueden ser necesarios para el reconocimiento eficiente del sustrato y la optimización de las interacciones intermoleculares. Por lo tanto, el efecto conjunto de las 8 mutaciones en la xilanas Xil-R13 generaron cambios en su configuración, geometría, carga y conformaciones, que le permitieron mantener su actividad catalítica por sobre 40°C y a pH 6.

## 5. Conclusiones

En esta investigación se usó la metodología EVOP para conseguir una metodología de optimización sistemática del desempeño de enzimas para mantener su actividad catalítica en nuevas condiciones de operación, mediante el análisis estadístico del efecto de mutaciones en la estructura de la enzima, de lo cual se puede concluir:

- Se ajustó la metodología EVOP al contexto de la ingeniería de proteínas, para lograr modificar las condiciones de operación de la enzima.
- La metodología propuesta permite evaluar mediante modelos de regresión lineal, las sustituciones aminoácidas (variables controlables) y su efecto sobre la energía libre de acoplamiento entre la enzima y su sustrato y los cambios en la entropía de vibración (variables de respuesta).
- Esta metodología se basa en el análisis estructural que identifica los sitios y tipo de mutación, los cuales serían difíciles de encontrar por métodos tradicionales como lo son la mutagénesis al azar o la evolución dirigida.
- El efecto de las mutaciones propuestas alteró el equilibrio configuracional y conformacional de la estructura enzimática lo que condujo a la redistribución de las cargas provocando a su vez un cambio en el pH de actividad máxima, pH 6.
- También las mutaciones propuestas generaron una reducción en los valores de entropía de vibración, indicador de la reducción en el número de configuraciones de la estructura lo que implica un incremento compensatorio en la entalpía de enlace lo cual explica el desplazamiento de la actividad catalítica máxima a 57 °C para la enzima Xil-R13, una mayor temperatura que la enzima Xyl-L (30 °C).
- En la enzima Xil-R13, se observaron incrementos en la fluctuación de los aminoácidos en algunos loops con respecto a la enzima nativa, pero los aminoácidos catalíticos presentan el mismo patrón de fluctuación en las dos estructuras enzimáticas.
- Se recomienda que se deben considerar otros factores estructurales (cambio de volumen, cambios en el área de acceso al solvente) en esta metodología para analizar el efecto de las mutaciones sobre la estabilidad térmica, factores estructurales que dependerán del tipo de enzima.

## 6. Bibliografia

1. Li, Y. & Cirino, P. C. Recent advances in engineering proteins for biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 1273-1287 (2014).
2. Huisman, G. W. & Collier, S. J. On the development of new biocatalytic processes for practical pharmaceutical synthesis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 284-292 (2013).
3. Bommarius, A. S., Blum, J. K. & Abrahamson, M. J. Status of protein engineering for biocatalysts: how to design an industrially useful biocatalyst. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **15**, 194-200 (2011).
4. Fisher, M. a & Tullman-Ereck, D. Change, exchange, and rearrange: protein engineering for the biotechnological production of fuels, pharmaceuticals, and other chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **24**, 1010-1016 (2013).
5. Fushinobu, S., Ito, K., Konno, M., Wakagi, T. & Matsuzawa, H. Crystallographic and mutational analyses of an extremely acidophilic and acid-stable xylanase: biased distribution of acidic residues and importance of Asp37 for catalysis at low pH. *Protein Eng.* **11**, 1121-1128 (1998).
6. Kumar, V., Dangi, A. K. & Shukla, P. Engineering Thermostable Microbial Xylanases Toward its Industrial Applications. *Mol. Biotechnol.* 1-10 (2018). doi:10.1007/s12033-018-0059-6
7. Izadpanah, F., Homaei, A., Fernandes, P. & Javadpour, S. Marine microbial L-asparaginase: Biochemistry, molecular approaches and applications in tumor therapy and in food industry. *Microbiol. Res.* **208**, 99-112 (2018).
8. Turner, N. J. & Truppo, M. D. Biocatalysis enters a new era. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 212-214 (2013).
9. Marcheschi, R. J., Gronenberg, L. S. & Liao, J. C. Protein engineering for metabolic engineering: current and next-generation tools. *Biotechnol. J.* **8**, 545-55 (2013).
10. Woodley, J. M. Protein engineering of enzymes for process applications. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 310-316 (2013).
11. Yang, H. *et al.* Molecular engineering of industrial enzymes: recent advances and future prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 23-9 (2014).
12. Eijssink, V. G. H. *et al.* Rational engineering of enzyme stability. *J. Biotechnol.* **113**, 105-120 (2004).
13. Zheng, H. *et al.* Improvement of alkali stability and thermostability of *Paenibacillus campinasensis* Family-11 xylanase by directed evolution and site-directed mutagenesis. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **41**, 153-62 (2014).
14. Modarres, H. P., Mofrad, M. R. & Sanati-Nezhad, A. Protein thermostability engineering. *RSC Adv.* **6**, 115252-115270 (2016).
15. Lane, M. D. & Seelig, B. Advances in the directed evolution of proteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **22**, 129-136 (2014).
16. Reetz, M. T. & Carballeira, J. D. Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. *Nat. Protoc.* **2**, 891-903 (2007).
17. Kuchner, O. & Arnold, F. H. Directed evolution of enzyme catalysts. *Trends in Biotechnology* **15**, 523-530 (1997).
18. Cherry, J. R. *et al.* Directed evolution of a fungal peroxidase. 379-384 (1999).
19. Farinas, E. T., Bulter, T. & Arnold, F. H. Directed enzyme evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 545-551 (2001).
20. Reetz, M. T., Carballeira, J. D. & Vogel, A. Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 7745-51 (2006).
21. Dalby, P. a. Strategy and success for the directed evolution of enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**, 473-80 (2011).

22. Li, G., Maria-Solano, M. A., Romero-Rivera, A., Osuna, S. & Reetz, M. T. Inducing high activity of a thermophilic enzyme at ambient temperatures by directed evolution. *Chem. Commun.* **53**, 9454-9457 (2017).
23. Thomas, P., Russell, A. & Fersht, A. Tailoring the pH dependence of enzyme catalysis using protein engineering. *Nature* **318**, 375-376 (1985).
24. Russlell, A. j. & Fersht, A. R. Rational modification of enzyme catalysis by engineering surface charge. *Nature* **328**, 496-500 (1987).
25. Perutz, M. F. Electrostatic Effects in Proteins. *Science (80- )*. **201**, 1187-1191 (1978).
26. Warshel, A. Electrostatic Basis of Structure-Function Correlation in Proteins. *Acc. Chem. Res.* **14**, 284-290 (1981).
27. Sippel, K. H. & Quioco, F. A. Ion-dipole interactions and their functions in proteins. *Protein Sci.* **24**, 1040-1046 (2015).
28. Russell, A. J., Thomas, P. G. & Fersht, A. R. Electrostatic effects on modification of charged groups in the active site cleft of subtilisin by protein engineering. *J. Mol. Biol.* **193**, 803-813 (1987).
29. Sternberg, M. J. E., Hayes, F. R. F., Russell, A. J., Thomas, P. G. & Fersht, A. R. Prediction of electrostatic effects of engineering of protein charges. *Nature* **330**, 86-88 (1987).
30. Hirata, A., Adachi, M., Utsumi, S. & Mikami, B. Engineering of the pH optimum of *Bacillus cereus* ??-amylase: Conversion of the pH optimum from a bacterial type to a higher-plant type. *Biochemistry* **43**, 12523-12531 (2004).
31. Zhang, F. *et al.* Modulating the pH Activity Profiles of Phenylalanine Ammonia Lyase from *Anabaena variabilis* by Modification of Center-Near Surface Residues. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **183**, 699-711 (2017).
32. Loewenthal, R., Sancho, J., Reinikainen, T. & Fersht, A. R. Long-Range Surface Charge-Charge Interactions in Proteins Comparison of Experimental Results with Calculations from a Theoretical Method. *J. Mol. Biol.* **232**, 574-583 (1993).
33. Loladze, V. V., Ibarra-Molero, B., Sanchez-Ruiz, J. M. & Makhadze, G. I. Engineering a thermostable protein via optimization of charge-charge interactions on the protein surface. *Biochemistry* **38**, 16419-16423 (1999).
34. Strickler, S. S. *et al.* Protein stability and surface electrostatics: A charged relationship. *Biochemistry* **45**, 2761-2766 (2006).
35. Pace, C. N., Grimsley, G. R. & Scholtz, J. M. Protein ionizable groups: pK values and their contribution to protein stability and solubility. *J. Biol. Chem.* **284**, 13285-13289 (2009).
36. Gribenko, A. V. *et al.* Rational stabilization of enzymes by computational redesign of surface charge-charge interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 2601-2606 (2009).
37. Thomas, P. G., Russell, A. J. & Fersht, A. R. Tailoring the pH dependence of enzyme catalysis using protein engineering. *Nature* **318**, 375-376 (1985).
38. Tynan-Connolly, B. M. & Nielsen, J. E. Redesigning protein pKa values. *Protein Sci.* **16**, 239-249 (2007).
39. Park, S. & Cochran, J. *Protein engineering and design*. CRC Press (2010).
40. Sen, S. & Nilsson, L. *Thermostable proteins: structural stability and design*. (Taylor & Francis, 2012).
41. Suplatov, D., Voevodin, V. & Švedas, V. Robust enzyme design: Bioinformatic tools for improved protein stability. *Biotechnol. J.* **10**, 344-355 (2015).
42. Damborsky, J. & Brezovsky, J. Computational tools for designing and engineering enzymes. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 8-16 (2014).
43. Olivera-Nappa, A., Andrews, B. a & Asenjo, J. a. Mutagenesis Objective Search and Selection Tool (MOSST): an algorithm to predict structure-function related mutations in proteins. *BMC Bioinformatics* **12**, 122 (2011).
44. Yang, J.-S., Seo, S. W., Jang, S., Jung, G. Y. & Kim, S. Rational engineering of enzyme

- allosteric regulation through sequence evolution analysis. *PLoS Comput. Biol.* **8**, e1002612 (2012).
45. Suplatov, D. A., Besenmatter, W., Švedas, V. K. & Svendsen, A. Bioinformatic analysis of alpha/beta-hydrolase fold enzymes reveals subfamily-specific positions responsible for discrimination of amidase and lipase activities. *Protein Eng. Des. Sel.* **25**, 689-697 (2012).
  46. Suplatov, D., Shalaeva, D., Kirilin, E., Arzhanik, V. & Švedas, V. Bioinformatic analysis of protein families for identification of variable amino acid residues responsible for functional diversity. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32**, 75-87 (2013).
  47. Suplatov, D. Zebra web server. *Zebra bioinformatic analysis in the wet-laboratory practice* (2013). Disponible en: <http://biokinet.belozersky.msu.ru/zebra#q1>.
  48. Suplatov, D., Kirilin, E., Takhaviev, V. & Svedas, V. Zebra: a web server for bioinformatic analysis of diverse protein families. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **32**, 1752-8 (2013).
  49. Bendl, J. *et al.* PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Comput. Biol.* **10**, 1-12 (2014).
  50. Pantoliano, M. W. *et al.* Large Increases in General Stability for Subtilisin BPN' through Incremental Changes in the Free Energy of Unfolding. *Biochemistry* **28**, 7205-7213 (1989).
  51. Steipe, B., Schiller, B., Pluckthun, A. & Steinbacher, S. Sequence statistics reliably predict stabilizing mutations in a protein domain. *J. Mol. Biol.* **240**, 188-192 (1994).
  52. Steipe, B. Consensus-based engineering of protein stability: From intrabodies to thermostable enzymes. *Methods Enzymol.* **388**, 176-186 (2004).
  53. Anbar, M., Gul, O., Lamed, R., Sezerman, U. O. & Bayer, E. a. Improved thermostability of *Clostridium thermocellum* endoglucanase Cel8A by using consensus-guided mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 3458-64 (2012).
  54. Blum, J. K., Ricketts, M. D. & Bommarius, A. S. Improved thermostability of AEH by combining B-FIT analysis and structure-guided consensus method. *J. Biotechnol.* **160**, 214-21 (2012).
  55. Sullivan, B. J. *et al.* Stabilizing proteins from sequence statistics: The interplay of conservation and correlation in triosephosphate isomerase stability. *J. Mol. Biol.* **420**, 384-399 (2012).
  56. Lehmann, M. & Wyss, M. Engineering proteins for thermostability: The use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 371-375 (2001).
  57. Tanford, C., Kirkwood, J. G. & Tanford, C. Theory of Protein Titration Curves. I. General Equations for Impenetrable Spheres. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 5333-5339 (1957).
  58. Matthew, J. B. *et al.* pH-dependent processes in proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **18**, 91-197 (1985).
  59. Matthew, J. B. & Gurd, F. R. N. [17] Calculation of electrostatic interactions in proteins. *Methods Enzymol.* **130**, 413-436 (1986).
  60. Matthew, J. B. Stabilization and Destabilization of Protein Structure by Charge Interactions. *Methods Enzymol.* **130**, 437-453 (1986).
  61. Zhang, L. *et al.* A method to rationally increase protein stability based on the charge-charge interaction, with application to lipase LipK107. *Protein Sci.* **23**, 110-116 (2014).
  62. Ibarra-Molero, B. & Sanchez-Ruiz, J. M. Genetic Algorithm to Design Stabilizing Surface-Charge Distributions in Proteins. *J. Phys. Chem. B* **106**, 6609-6613 (2002).
  63. Schweiker, K. Protein stabilization by the rational design of surface charge-charge interaction. *Methods Mol. Biol.* **490**, 261-283 (2009).
  64. Wrba, A., Schweiger, A., Schultes, V., Jaenicke, R. & Závodszy, P. Extremely Thermostable D-Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from the Eubacterium *Thermotoga maritima*. *Biochemistry* **29**, 7584-7592 (1990).
  65. Somero, G. N. Temperature adaptation of enzymes: Biological Optimization Through

- Structure-Function Compromises. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **9**, 1-29 (1978).
66. Rader, A. J. Thermostability in rubredoxin and its relationship to mechanical rigidity. *Phys. Biol.* **7**, (2010).
  67. Zhang, X. F. *et al.* A general and efficient strategy for generating the stable enzymes. *Sci. Rep.* **6**, 1-12 (2016).
  68. Karplus, P. A. & Schulz, G. E. Prediction of chain flexibility in proteins. *Naturwissenschaften* **72**, 212-213 (1985).
  69. Ragone, R., Facchiano, F., Facchiano, A., Facchiano, A. M. & Colonna, G. Flexibility plot of proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* **2**, 497-504 (1989).
  70. Vihinen, M., Torkkila, E. & Riihonen, P. Accuracy of protein flexibility predictions. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **19**, 141-149 (1994).
  71. Parthasarathy, S. & Murthy, M. R. N. Protein thermal stability: insights from atomic displacement parameters (B values). *Protein Eng. Des. Sel.* **13**, 9-13 (2000).
  72. Yu, H. & Huang, H. Engineering proteins for thermostability through rigidifying flexible sites. *Biotechnol. Adv.* **32**, 308-315 (2014).
  73. Goethe, M., Fita, I. & Rubi, J. M. Vibrational entropy of a protein: Large differences between distinct conformations. *J. Chem. Theory Comput.* **11**, 351-359 (2015).
  74. Frappier, V. & Najmanovich, R. Vibrational entropy differences between mesophile and thermophile proteins and their use in protein engineering. *Protein Sci.* **24**, 474-483 (2015).
  75. Radestock, S. & Gohlke, H. Exploiting the link between protein rigidity and thermostability for data-driven protein engineering. *Eng. Life Sci.* **8**, 507-522 (2008).
  76. Acevedo, J. P., Reetz, M. T., Asenjo, J. A. & Parra, L. P. One-step combined focused epPCR and saturation mutagenesis for thermostability evolution of a new cold-active xylanase. *Enzyme Microb. Technol.* **100**, 60-70 (2017).
  77. Chan, C.-H., Wilbanks, C. C., Makhatadze, G. I. & Wong, K.-B. Electrostatic contribution of surface charge residues to the stability of a thermophilic protein: benchmarking experimental and predicted pKa values. *PLoS One* **7**, e30296 (2012).
  78. Newton, M. S., Arcus, V. L., Gerth, M. L. & Patrick, W. M. Enzyme evolution: innovation is easy, optimization is complicated. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **48**, 110-116 (2018).
  79. Taguchi, S., Ozaki, A. & Momose, H. Engineering of a cold-adapted protease by sequential random mutagenesis and a screening system. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 492-495 (1998).
  80. Jones, B. J., Lim, H.-Y., Huang, J. & Kazlauskas, R. J. Comparison of five protein engineering strategies to stabilize an  $\alpha/\beta$ -hydrolase. *Biochemistry* **acs.biochem.7b00571** (2017). doi:10.1021/acs.biochem.7b00571
  81. Box, G. E. P. Some Theorems on Quadratic Forms Applied in the Study of Analysis of Variance Problems, I. Effect of Inequality of Variance in the One-Way Classification. *Ann. Math. Stat.* **25**, 290-302 (1954).
  82. Box, G. E. P. Evolutionary Operation: A method for increasing industrial productivity. *J. R. Stat. Soc.* **6**, 81-101 (1957).
  83. Theodore, K. & Panda, T. Self-directing optimization of B-1 , 3-glucanase production by *Trichoderma harzianum* in batch culture. *Bioprocess Eng.* **14**, 111-112 (1996).
  84. Felse, P. A. & Panda, T. Self-directing optimization of parameters for extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in batch mode. *Process Biochem.* **34**, 563-566 (1999).
  85. Hill, A. D. & Reilly, P. J. A Gibbs free energy correlation for automated docking of carbohydrates. *J. Comput. Chem.* **29**, 1131-1141 (2008).
  86. Yuriev, E. & Ramsland, P. a. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J. Mol. Recognit.* **26**, 215-39 (2013).
  87. Yuriev, E., Holien, J. & Ramsland, P. A. Improvements, trends, and new ideas in



- molecular docking: 2012-2013 in review. *J. Mol. Recognit.* **28**, 581-604 (2015).
88. Frappier, V., Chartier, M. & Najmanovich, R. en *Computational Protein Design* (ed. Samish, I.) **1529**, 203-212 (Springer protocols, 2017).
  89. Kaledin, M., Kaledin, A. L., Brown, A. & Bowman, J. M. en *Normal Mode Analysis: Theory and Applications to Biological and Chemical Systems* (eds. Cui, Q. & Bahar, I.) 281-300 (Chapman & Hall/CRC, 2005).
  90. Skjaerven, L., Hollup, S. M. & Reuter, N. Normal mode analysis for proteins. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **898**, 42-48 (2009).
  91. Hermans, S. M. A., Pflieger, C., Nutschel, C., Hanke, C. A. & Gohlke, H. Rigidity theory for biomolecules: concepts, software, and applications. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* **7**, (2017).
  92. Mandell, D. J. & Kortemme, T. Backbone flexibility in computational protein design. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 420-428 (2009).
  93. Somero, G. N. Temperature adaptation of enzymes: Biological Optimization Through Structure-Function Compromises. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **9**, 1-29 (1978).
  94. Radestock, S. & Gohlke, H. Protein rigidity and thermophilic adaptation. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 1089-1108 (2011).
  95. Hinsen, K. Analysis of Domain Motions by Approximate Normal Mode Calculations. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **33**, 417-429 (1998).
  96. Carrington, B. J. & Mancera, R. L. Comparative estimation of vibrational entropy changes in proteins through normal modes analysis. *J. Mol. Graph. Model.* **23**, 167-174 (2004).
  97. Anfinsen. Principles that Govern the Folding of Protein Chains. *Science (80-. )*. **181**, 223-230 (1973).
  98. Tunnicliffe, R. B., Waby, J. L., Williams, R. J. & Williamson, M. P. An experimental investigation of conformational fluctuations in proteins G and L. *Structure* **13**, 1677-1684 (2005).
  99. Chong, S. H. & Ham, S. Dissecting Protein Configurational Entropy into Conformational and Vibrational Contributions. *J. Phys. Chem. B* **119**, 12623-12631 (2015).
  100. Karplus, M. & Kushick, J. N. Method for estimating the configurational entropy of macromolecules. *Macromolecules* **14**, 325-332 (1981).
  101. King, B. M., Silver, N. W. & Tidor, B. Efficient calculation of molecular configurational entropies using an information theoretic approximation. *J. Phys. Chem. B* **116**, 2891-2904 (2012).
  102. Fenley, A. T. *et al.* Correlation as a determinant of configurational entropy in supramolecular and protein systems. *J. Phys. Chem. B* **118**, 6447-6455 (2014).
  103. Gyimesi, G., Závodszy, P. & Szilágyi, A. Calculation of configurational entropy differences from conformational ensembles using Gaussian mixtures. *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 29-41 (2017).
  104. Goethe, M., Gleixner, J., Fita, I. & Rubi, J. M. Prediction of Protein Configurational Entropy (Popcoen). *J. Chem. Theory Comput.* **14**, 1811-1819 (2018).
  105. Karplus, M., Ichiye, T. & Pettitt, B. M. Configurational entropy of native proteins. *Biophys. J.* **52**, 1083-1085 (1987).
  106. Feller, G. Psychrophilic enzymes: from folding to function and biotechnology. *Scientifica (Cairo)*. **2013**, 1-28 (2013).
  107. Åqvist, J., Kazemi, M., Isaksen, G. V. & Brandsdal, B. O. Entropy and Enzyme Catalysis. *Acc. Chem. Res.* **50**, 199-207 (2017).
  108. Lee, J. & Goodey, N. M. Catalytic contributions from remote regions of enzyme structure. *Chem. Rev.* **111**, 7595-7624 (2011).
  109. Ishikita, H. & Saito, K. Proton transfer reactions and hydrogen-bond networks in protein environments. *J. R. Soc. Interface* **11**, 20130518-20130518 (2013).
  110. Marti-Renom, M., Yerkovich, B. & Sali, A. Comparative protein structure prediction.

- Curr. Protoc. Protein Sci.* **28**, 1-22 (2002).
111. Fiser, A. & Šali, A. MODELLER: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods Enzymol.* **374**, 461-491 (2003).
  112. Källberg, M. *et al.* Template-based protein structure modeling using the RaptorX web server. *Nat. Protoc.* **7**, 1511-1522 (2012).
  113. Torchala, M. & Bates, P. A. en *Protein Structure Prediction* (ed. Kihara, D.) **1137**, 17-27 (Springer protocols, 2014).
  114. Schaarschmidt, J., Monastyrskyy, B., Kryshchak, A. & Bonvin, A. M. J. J. Assessment of contact predictions in CASP12: Co-evolution and deep learning coming of age. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **86**, 51-66 (2018).
  115. Bashford, D. & Karplus, M. pKa's of Ionizable Groups in Proteins: Atomic Detail from a Continuum Electrostatic Model. *Biochemistry* **29**, 10219-10225 (1990).
  116. Lee, A. C. & Crippen, G. M. Predicting pKa. *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 2013-2033 (2009).
  117. Alexov, E. *et al.* Progress in the prediction of pKa values in proteins. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* **79**, 3260-3275 (2011).
  118. Warshel, A. Electrostatic origin of the catalytic power of enzymes and the role of preorganized active sites. *J. Biol. Chem.* **273**, 27035-27038 (1998).
  119. Fogolari, F., Brigo, A. & Molinari, H. The Poisson-Boltzmann equation for biomolecular electrostatics: A tool for structural biology. *J. Mol. Recognit.* **15**, 377-392 (2002).
  120. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A. & Baker, N. a. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Nucleic Acids Res.* **32**, W665-W667 (2004).
  121. Chakravarty, S. & Varadarajan, R. Elucidation of determinants of protein stability through genome sequence analysis. *FEBS Lett.* **470**, 65-69 (2000).
  122. Vogt, G., Woell, S. & Argos, P. Protein thermal stability, hydrogen bonds, and ion pairs1. *J. Mol. Biol.* **269**, 631-643 (1997).
  123. Xiao, L. & Honing, B. Electrostatic contributions to the stability of hyperthermophilic proteins. *J. Mol. Biol.* **289**, 1435-1444 (1999).
  124. Sterner, R. & Liebl, W. Thermophilic adaptation of proteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**, 39-106 (2001).
  125. Dadarlat, V. M. & Post, C. B. Adhesive-cohesive model for protein compressibility: An alternative perspective on stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14778-14783 (2003).
  126. Robinson-Rechavi, M., Alibés, A. & Godzik, A. Contribution of electrostatic interactions, compactness and quaternary structure to protein thermostability: Lessons from structural genomics of *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* **356**, 547-557 (2006).
  127. Sadeghi, M., Naderi-Manesh, H., Zarrabi, M. & Ranjbar, B. Effective factors in thermostability of thermophilic proteins. *Biophys. Chem.* **119**, 256-270 (2006).
  128. Fukuchi, S. & Nishikawa, K. Protein surface amino acid compositions distinctively differ between thermophilic and mesophilic bacteria. *J. Mol. Biol.* **309**, 835-43 (2001).
  129. Yano, J. K. & Poulos, T. L. New understandings of thermostable and peizostable enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 360-365 (2003).
  130. Greaves, R. B. & Warwicker, J. Mechanisms for stabilisation and the maintenance of solubility in proteins from thermophiles. *BMC Struct. Biol.* **7**, 1-23 (2007).
  131. Pechkova, E., Sivozhelezov, V. & Nicolini, C. Protein thermal stability: The role of protein structure and aqueous environment. *Arch. Biochem. Biophys.* **466**, 40-48 (2007).
  132. Karshikoff, a & Ladenstein, R. Proteins from thermophilic and mesophilic organisms essentially do not differ in packing. *Protein Eng.* **11**, 867-72 (1998).
  133. Kawamura, S. *et al.* Investigation of the Structural Basis for Thermostability of DNA-binding Protein HU from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **273**, 19982-19987 (1998).
  134. Vieille, C. & Zeikus, G. J. Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular

- Mechanisms for Thermostability. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**, 1-43 (2001).
135. Glyakina, A. V., Garbuzynskiy, S. O., Lobanov, M. Y. & Galzitskaya, O. V. Different packing of external residues can explain differences in the thermostability of proteins from thermophilic and mesophilic organisms. *Bioinformatics* **23**, 2231-2238 (2007).
  136. Fields, P. A. Review: Protein function at thermal extremes: Balancing stability and flexibility. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 417-431 (2001).
  137. Schlessinger, A. & Rost, B. Protein flexibility and rigidity predicted from sequence. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **61**, 115-126 (2005).
  138. Siddiqui, K. S. & Cavicchioli, R. Cold-Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 403-433 (2006).
  139. Fischer, H., Polikarpov, I. & Craievich, A. F. Average protein density is a molecular-weight-dependent function. *Protein Sci.* **13**, 2825-2828 (2015).
  140. Willard, L. *et al.* VADAR: A web server for quantitative evaluation of protein structure quality. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3316-3319 (2003).
  141. Ma, J. Usefulness and limitations of normal mode analysis in modeling dynamics of biomolecular complexes. *Structure* **13**, 373-380 (2005).
  142. Echave, J. Why are the low-energy protein normal modes evolutionarily conserved? *Pure Appl. Chem.* **84**, 1931-1937 (2012).
  143. Fuglebakk, E., Tiwari, S. P. & Reuter, N. Comparing the intrinsic dynamics of multiple protein structures using elastic network models. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 911-922 (2015).
  144. Hollup, S. M., Salensminde, G. & Reuter, N. WEBnm@: A web application for normal mode analyses of proteins. *BMC Bioinformatics* **6**, 52 (2005).
  145. Tiwari, S. P. *et al.* WEBnm @ v2 . 0 : Web server and services for comparing protein flexibility. *BMC Bioinformatics* **15**, 1-12 (2014).
  146. Fuglebakk, E. *et al.* Comparing Normal Modes of Protein Structures using Webnm@ 2.0. *Biophys. J.* **104**, 228a (2013).
  147. Zheng, W. & Brooks, B. R. Probing the local dynamics of nucleotide-binding pocket coupled to the global dynamics: Myosin versus kinesin. *Biophys. J.* **89**, 167-178 (2005).
  148. Zheng, W. & Brooks, B. R. Normal-modes-based prediction of protein conformational changes guided by distance constraints. *Biophys. J.* **88**, 3109-3117 (2005).
  149. Garzón, J. I., Kovacs, J., Abagyan, R. & Chacón, P. DFprot: A webtool for predicting local chain deformability. *Bioinformatics* **23**, 901-902 (2007).
  150. Li, H., Chang, Y. Y., Lee, J. Y., Bahar, I. & Yang, L. W. DynOmics: Dynamics of structural proteome and beyond. *Nucleic Acids Res.* **45**, W374-W380 (2017).
  151. Suhre, K. & Sanejouand, Y. H. Elnémo: A normal mode web server for protein movement analysis and the generation of templates for molecular replacement. *Nucleic Acids Res.* **32**, 610-614 (2004).
  152. Emekli, U., Schneidman-Duhovny, D., Wolfson, H. J., Nussinov, R. & Haliloglu, T. HingeProt: Automated prediction of hinges in protein structures. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **70**, 1219-1227 (2008).
  153. Li, H., Chang, Y. Y., Yang, L. W. & Bahar, I. iGNM 2.0: The Gaussian network model database for biomolecular structural dynamics. *Nucleic Acids Res.* **44**, D415-D422 (2016).
  154. López-Blanco, J. R., Aliaga, J. I., Quintana-Ortí, E. S. & Chacón, P. IMODS: Internal coordinates normal mode analysis server. *Nucleic Acids Res.* **42**, 271-276 (2014).
  155. Franklin, J., Koehl, P., Doniach, S. & Delarue, M. MinActionPath: Maximum likelihood trajectory for large-scale structural transitions in a coarse-grained locally harmonic energy landscape. *Nucleic Acids Res.* **35**, 477-482 (2007).
  156. Cao, Z. W. *et al.* MoViES: Molecular vibrations evaluation server for analysis of fluctuational dynamics of proteins and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* **32**, (2004).
  157. Lindahl, E., Azuara, C., Koehl, P. & Delarue, M. NOMAD-Ref: Visualization, deformation and refinement of macromolecular structures based on all-atom normal mode

- analysis. *Nucleic Acids Res.* **34**, 52-56 (2006).
158. Suhre, K., Navaza, J. & Sanejouand, Y.-H. NORMA: a tool for flexible fitting of high resolution protein structures into low resolution electron microscopy derived density maps. *Act. Cryst. D* **62**, 1098-1100 (2006).
  159. Zheng, W., Brooks, B. R. & Hummer, G. Protein conformational transitions explored by mixed elastic network models. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **69**, 43-57 (2007).
  160. Wako, H. & Endo, S. Normal mode analysis as a method to derive protein dynamics information from the Protein Data Bank. *Biophys. Rev.* **9**, 877-893 (2017).
  161. Skjaerven, L., Jonassen, I. & Reuter, N. TMM@: A web application for the analysis of transmembrane helix mobility. *BMC Bioinformatics* **8**, 1-8 (2007).
  162. Tiwari, S. P. *et al.* WEBnmat v2.0: Web server and services for comparing protein flexibility. *BMC Bioinformatics* **15**, 1-12 (2014).
  163. Lyne, P. D. Structure-based virtual screening: An overview. *Drug Discov. Today* **7**, 1047-1055 (2002).
  164. Kellenberger, E., Rodrigo, J., Muller, P. & Rognan, D. Comparative evaluation of eight docking tools for docking and virtual screening accuracy. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **57**, 225-242 (2004).
  165. Vaqué, M. *et al.* Protein-ligand Docking: A Review of Recent Advances and Future Perspectives. *Curr. Pharm. Anal.* **4**, 1-19 (2008).
  166. Kanwar, G., Anish, K. & Anshika, M. Open source software tools for computer aided drug design. *Int. J. Res. Pharm.* **9**, 86-95 (2018).
  167. Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 935-949 (2004).
  168. Hermann, J. C. *et al.* Predicting substrates by docking high-energy intermediates to enzyme structures. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15882-15891 (2006).
  169. Agostillo, M., Jene, C., Boyle, T., Ramsland, P. A. & Yuriev, E. Molecular docking of carbohydrate ligands to antibodies: Structural validation against crystal structures. *J. Chem. Inf. Model.* **49**, 2749-2760 (2009).
  170. Matsui, M., Kono, H. & Ogata, M. Molecular design and synthesis of a novel substrate for assaying lysozyme activity. *J. Appl. Glycosci.* 1-21 (2018). doi:10.5458/jag.jag.JAG-2018\_003
  171. Kamel, M. M., Ali, H. I., Anwar, M. M., Mohamed, N. A. & Soliman, A. M. Synthesis, antitumor activity and molecular docking study of novel Sulfonamide-Schiff's bases, thiazolidinones, benzothiazinones and their C-nucleoside derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **45**, 572-580 (2010).
  172. Sotriffer, C. Docking of Covalent Ligands: Challenges and Approaches. *Mol. Inform.* **1800062**, (2018).
  173. Lill, M. A. Efficient incorporation of protein flexibility and dynamics into molecular docking simulations. *Biochemistry* **50**, 6157-6169 (2011).
  174. Bianco, G., Forli, S., Goodsell, D. S. & Olson, A. J. Covalent docking using autodock: Two-point attractor and flexible side chain methods. *Protein Sci.* **25**, 295-301 (2016).
  175. Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS. *Nucleic Acids Res.* **39**, 270-277 (2011).
  176. Grosdidier, A., Zoete, V. & Michielin, O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS. *J. Comput. Chem.* **32**, 2149-2159 (2011).
  177. MacKerell, A. D. *et al.* All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins <sup>†</sup>. *J. Phys. Chem. B* **102**, 3586-3616 (1998).
  178. Haberthur, U. & Caflisch, A. FACTS: Fast Analytical Continuum Treatment of Solvation. *J. Comput. Chem.* **29**, 701-715 (2008).
  179. Zoeteay, V., Grosdidieray, A., Cuendeta, M. & Michielin, O. Use of the FACTS solvation model for protein-ligand docking calculations. Application to EADock. *J. Mol. Recognit.*

- 23**, 457-461 (2010).
180. Polhemus, N. STATGRAPHICS Centurion XVII. (2014).
  181. Spiess, A.-N. & Neumeyer, N. An evaluation of R<sup>2</sup> as an inadequate measure for nonlinear models in pharmacological and biochemical research: a Monte Carlo approach. *BMC Pharmacol.* **10**, 6 (2010).
  182. Khuri, A. I. & Cornell, J. A. en *Response surfaces designs and analyses* 149-202 (Marcel Dekker, 1987).
  183. Stamatis, D. H. en *Six sigma and Beyond Design of experiments* 259-278 (CRS Press Taylor & Francis Group, 2002).
  184. Khuri, A. & Cornell, J. *Response surfaces designs and analysis*. (Marcel Dekker, 1987).
  185. Box, G. & Draper, N. R. *Evolutionary operation a statistical method for process improvement*. (JOHN WILEY & SONS, 1969).
  186. Panda, T., Kumar, R. A. & Théodore, T. *Statistical optimization of biological systems*. (CRS Press Taylor & Francis Group, 2016).
  187. Spendley, W., Hext, G. R. & Himsforth, F. R. Sequential Application of Simplex Designs in Optimisation and Evolutionary Operation. *Technometrics* **4**, 441-461 (1962).
  188. Vanderbei, R. j. en *Linear Programming Foundations and Extensions* 11-19 (Springer Science, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-7630-6
  189. Satterthwaite, F. E. Random Balance Experimentation. *Technometrics* **1**, 111-137 (1959).
  190. Deming, S. N., Parker, L. R. & Bonner Denton, M. A Review of Simplex Optimization in Analytical Chemistry. *C R C Crit. Rev. Anal. Chem.* **7**, 187-202 (1978).
  191. Véliz Capuñay, C. en *Análisis multivariante: métodos estadísticos multivariantes para la investigación* 75-102 (CENGANE Learding, 2016).
  192. Pérez, C. en *Técnicas de análisis multivariante de datos* 21-68 (Pearson Education., 2004).
  193. Bozdogan, H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. *Psychometrika* **52**, 345-370 (1987).
  194. Hannan, E. J. & Quinn, B. G. The Determination of the Order of an Autoregression. *J. R. Stat. Soc.* **41**, 190-195 (1979).
  195. Schwarz, G. Estimating the Dimension of a Model. *Ann. Stat.* **6**, 461-464 (1978).
  196. Lesuisse, E., Schanck, K. & Colson, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. *Eur. J. Biochem.* **216**, 155-160 (1993).
  197. Web-server for Normal Mode Analysis of proteins. (2013). Disponible en: <http://apps.cbu.uib.no/webnma/jobs/2018-07-19-18-01-39-855081>.
  198. Tronrud, D. E. Knowledge-based B-factor restraints for the refinement of proteins. *J. Appl. Crystallogr.* **29**, 100-104 (1996).
  199. Sheriff, S., Hendrickson, W. a, Stenkamp, R. E., Sieker, L. C. & Jensen, L. H. Influence of solvent accessibility and intermolecular contacts on atomic mobilities in hemerythrins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 1104-1107 (1985).
  200. Carugo, O. & Argos, P. Correlation between side chain mobility and conformation in protein structures. *Protein Eng. Des. Sel.* **10**, 777-787 (1997).
  201. Yang, L. & Bahar, I. Coupling between Catalytic Site and Collective Dynamics : A Requirement for Mechanochemical Activity of Enzymes. **13**, 893-904 (2005).
  202. Yuan, Z., Zhao, J. & Wang, Z.-X. Flexibility analysis of enzyme active sites by crystallographic temperature factors. *Protein Eng. Des. Sel.* **16**, 109-114 (2003).
  203. Kidera, A. *et al.* Statistical analysis of the physical properties of the 20 naturally occurring amino acids. *J. Protein Chem.* **4**, 23-55 (1985).
  204. Haynes, W. M., Lide, D. R. & Bruno, T. J. *Handbook of chemistry and physics : a ready-reference book of chemical and physical data*. (taylor & Francis Group, 2017).
  205. Hernandez, G., Jenney, F. E., Adams, M. W. W. & LeMaster, D. M. Millisecond time scale conformational flexibility in a hyperthermophile protein at ambient temperature.

- Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 3166-3170 (2000).
206. Grottesi, A., Ceruso, M. A., Colosimo, A. & Di Nola, A. Molecular dynamics study of a hyperthermophilic and a mesophilic rubredoxin. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **46**, 287-294 (2002).
  207. Russell, R. J. M., Ferguson, J. M. C., Hough, D. W., Danson, M. J. & Taylor, G. L. The crystal structure of citrate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **36**, 9983-9994 (1997).
  208. Li, W.-T., Shriver, J. W. & Reeve, J. N. Mutational Analysis of Differences in Thermostability between Histones from. *J. Bacteriol.* **182**, 812 (2000).
  209. Szilágyi, A. & Závodszy, P. Structural differences between mesophilic , moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits : results of a comprehensive survey. *Structure* **8**, 493-504 (2000).
  210. Kumar, S., Tsai, C.-J. & Nussinov, R. Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng. Des. Sel.* **13**, 179-191 (2000).
  211. Razvi, A. & Scholtz, J. M. Lessons in stability from thermophilic proteins. *Protein Sci.* **15**, 1569-1578 (2006).
  212. Sanchez-Ruiz, J. M. & Makhatadze, G. I. To charge or not to charge? *Trends Biotechnol.* **19**, 132-135 (2001).
  213. Makhatadze, G. I., Loladze, V. V, Gribenko, A. V & Lopez, M. M. Mechanism of thermostabilization in a designed cold shock protein with optimized surface electrostatic interactions. *J. Mol. Biol.* **336**, 929-42 (2004).
  214. Xia, Y.-L. *et al.* Insights into the role of electrostatics in temperature adaptation: a comparative study of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic subtilisin-like serine proteases. *RSC Adv.* **8**, 29698-29713 (2018).
  215. Asenjo, J.A., Andrews, B.A., Acevedo, J.P., Parra, L. and Burzio, L. O. Sequence 1 from Patent WO2010089302. (2010). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/HH759472>. (Accedido: 1.<sup>a</sup> junio 2018)
  216. J.A. Asenjo, B.A. Andrews, J.P. Acevedo, L.P. Parra, L. O. B. Protein and DNA sequence encoding a cold adapted xylanase. **US8679814B**, (2014).
  217. Bajpai, P. Application of enzymes in the pulp and paper industry. *Biotechnol. Prog.* **15**, 147-157 (1999).
  218. Kenealy, W. R. & Jeffries, T. W. Enzyme processes for pulp and paper: A review of recent developments. *Wood Deterior. Preserv.* **845**, 210-239 (2003).
  219. General Biosystems Inc. Disponible en: [generalbiosystems.com](http://generalbiosystems.com).
  220. Integrated DNA Technologies, I. Codon Optimization Tool. Disponible en: [www.idtdna.com/CodonOpt](http://www.idtdna.com/CodonOpt).
  221. Bailey, M. J., Biely, P. & Poutanen, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *J. Biotechnol.* **23**, 257-270 (1992).
  222. McIlvaine, T. A buffer solution for colorimetric comparison. *J. Biol. Chem.* **49**, 183-186 (1921).
  223. Sauer, R. T. & Lim, W. A. Mutational analysis of protein stability. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 46-51 (1992).
  224. Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H. & Nollmann, M. Heat does not come in different colours : entropy . enthalpy compensation , free energy windows , quantum confinement , pressure perturbation calorimetry , solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys. Chem.* **93**, 215-230 (2001).
  225. Starikov, E. B. & Nordén, B. Enthalpy-entropy compensation: A phantom or something useful? *J. Phys. Chem. B* **111**, 14431-14435 (2007).
  226. Vega, S., Abian, O. & Velazquez-Campoy, A. On the link between conformational changes, ligand binding and heat capacity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1860**, 868-878 (2016).

227. Schuler, B., Kremer, W., Kalbitzer, H. R. & Jaenicke, R. Role of entropy in protein thermostability: Folding kinetics of a hyperthermophilic cold shock protein at high temperatures using F-19 NMR. *Biochemistry* **41**, 11670-11680 (2002).
228. Schuler, B., Kremer, W., Kalbitzer, H. R. & Jaenicke, R. Role of Entropy in Protein Thermostability : Folding Kinetics of a Hyperthermophilic Cold Shock Protein at High Temperatures Using 19 F NMR †. *Biochemistry* **41**, 11670-11680 (2002).
229. Liu, C. T. *et al.* Probing the electrostatics of active site microenvironments along the catalytic cycle for escherichia coli dihydrofolate reductase. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 10349-10360 (2014).
230. Mahajan, S. & Sanejouand, Y. H. Jumping between protein conformers using normal modes. *J. Comput. Chem.* **38**, 1622-1630 (2017).
231. Vemparala, S., Mehrotra, S. & Balaram, H. Role of loop dynamics in thermal stability of mesophilic and thermophilic adenylosuccinate synthetase : A molecular dynamics and normal mode analysis study. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1814**, 630-637 (2011).
232. Tousignant, A. & Pelletier, J. N. Protein Motions Promote Catalysis. *Chem. Biol.* **11**, 1037-1042 (2004).
233. Yang, L. W. & Bahar, I. Coupling between catalytic site and collective dynamics: A requirement for mechanochemical activity of enzymes. *Structure* **13**, 893-904 (2005).
234. Hammes-schiffer, S. & Benkovic, S. J. Relating Protein Motion to Catalysis. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 519-541 (2006).
235. Karshikoff, A., Nilsson, L. & Ladenstein, R. Rigidity versus flexibility: The dilemma of understanding protein thermal stability. *FEBS J.* **282**, 3899-3917 (2015).

## 7. Anexos

### Anexo A Secuencia primaria lipasa Lip A

>sp|P37957|ESTA\_BACSU Lipase EstA OS=Bacillus subtilis (strain 168) OX=224308  
GN=estA PE=1 SV=2

EHNPVVMVHGIGGASFNFAGIKSYLVSQGWSRDKLYAVDFWDKTGTNYNNGPVLSRF  
VQKVLDETGAKKVDIVAHSMGGANTLYYIKNLDGGNKVANVVTLGGANRLTTGKALP  
GTDPNQKILYTSIYSSADMIVMNYLSRLDGARNVQIHGVGHIGLLYSSQVNSLIKEGLNG  
GGQNTN



**Anexo B Fluctuaciones normalizadas Lipasa Lip A, navita y variantes X, XI, 1-F6, 5-F6. y porcentaje de cambio con respecto a la estructura de la lipasa Lip A**

AA	WT	$\sigma$ WT	X	$\sigma$ X	% de cambio	XI	$\sigma$ XI	% de cambio	1-F6	$\sigma$ 1-F6	% de cambio	5-F6	$\sigma$ 5-F6	% de cambio
1														
2	1,15	0,01	1,17	0,05	1,6	1,22	0,07	6,1	1,14	0,01	-1,1	1,16	1,02	0,7
3	-0,05	0,01	-0,03	0,03	-38,5	-0,03	0,04	-48,5	-0,05	0,02	1,0	-0,05	0,33	-10,1
4	-0,33	0,01	-0,33	0,02	1,0	-0,34	0,02	1,6	-0,33	0,01	-0,7	-0,33	0,17	-1,2
5	-0,44	0,00	-0,44	0,00	-1,8	-0,43	0,01	-2,0	-0,44	0,00	-1,0	-0,44	0,10	-0,5
6	-0,48	0,00	-0,47	0,00	-1,8	-0,47	0,00	-1,7	-0,47	0,00	-1,1	-0,48	0,08	0,0
7	-0,49	0,00	-0,48	0,01	-2,5	-0,48	0,00	-2,7	-0,49	0,00	-1,0	-0,49	0,07	0,2
8	-0,50	0,01	-0,50	0,01	-1,4	-0,50	0,01	-1,4	-0,50	0,01	-0,9	-0,50	0,07	0,2
9	-0,42	0,00	-0,42	0,01	-0,2	-0,42	0,02	0,5	-0,41	0,00	-0,9	-0,42	0,12	-0,1
10	-0,56	0,00	-0,55	0,01	-2,5	-0,55	0,01	-2,9	-0,56	0,00	-1,3	-0,56	0,03	-0,2
11	0,24	0,11	0,09	0,28	<b>-64,6</b>	0,05	0,39	<b>-78,3</b>	0,21	0,12	<b>-12,5</b>	0,22	0,49	-8,6
12	0,94	0,34	0,73	0,43	<b>-22,7</b>	0,75	0,61	<b>-19,8</b>	1,05	0,43	<b>11,1</b>	1,07	1,03	14,1
13	4,53	2,53	2,93	3,21	<b>-35,4</b>	1,29	2,06	<b>-71,6</b>	4,37	2,57	<b>-3,6</b>	4,47	3,45	-1,3
14	1,60	1,26	0,97	1,38	<b>-39,5</b>	1,11	1,94	<b>-30,4</b>	1,46	1,18	<b>-8,6</b>	1,55	1,55	-3,0
15	1,49	0,44	0,89	1,06	<b>-40,6</b>	0,45	1,04	<b>-70,1</b>	1,41	0,41	<b>-5,4</b>	1,44	1,22	-3,7
16	2,04	0,14	1,34	1,17	<b>-34,4</b>	0,96	1,38	<b>-52,6</b>	1,98	0,14	<b>-2,6</b>	2,02	1,52	-0,9
17	0,20	0,00	0,15	0,09	<b>-24,9</b>	0,13	0,11	<b>-34,6</b>	0,19	0,01	<b>-5,2</b>	0,20	0,47	-1,3
18	-0,07	0,01	-0,12	0,08	<b>58,2</b>	-0,14	0,10	<b>84,0</b>	-0,08	0,01	<b>2,7</b>	-0,08	0,31	2,1
19	-0,02	0,01	-0,03	0,02	<b>24,7</b>	-0,03	0,03	<b>25,3</b>	-0,03	0,00	<b>7,2</b>	-0,03	0,34	5,1
20	-0,22	0,01	-0,22	0,02	<b>1,9</b>	-0,23	0,02	<b>5,3</b>	-0,22	0,01	-0,8	-0,22	0,23	-0,2
21	-0,29	0,01	-0,29	0,01	<b>-1,9</b>	-0,29	0,00	<b>-1,0</b>	-0,29	0,01	-0,9	-0,29	0,19	0,2
22	-0,25	0,00	-0,23	0,02	<b>-6,3</b>	-0,23	0,02	<b>-9,0</b>	-0,25	0,00	-1,0	-0,25	0,21	-0,4
23	-0,16	0,00	-0,14	0,02	<b>-10,6</b>	-0,14	0,02	<b>-16,1</b>	-0,16	0,00	-1,8	-0,16	0,26	-0,3
24	-0,10	0,00	-0,08	0,03	<b>-22,7</b>	-0,07	0,03	<b>-32,8</b>	-0,10	0,00	-1,5	-0,10	0,30	-0,8
25	-0,23	0,00	-0,20	0,03	<b>-10,6</b>	-0,19	0,03	<b>-14,0</b>	-0,22	0,00	-1,3	-0,22	0,23	-0,7
26	-0,24	0,00	-0,21	0,03	<b>-11,6</b>	-0,20	0,04	<b>-18,2</b>	-0,24	0,00	-2,5	-0,24	0,22	-0,9
27	0,66	0,02	0,68	0,03	2,4	0,71	0,03	7,6	0,66	0,02	-0,7	0,67	0,74	0,8
28	1,39	0,02	1,41	0,07	2,0	1,46	0,06	5,7	1,37	0,02	-0,7	1,39	1,16	0,6
29	1,69	0,09	1,65	0,07	-1,9	1,71	0,10	1,7	1,67	0,08	-0,8	1,70	1,34	0,8
30	0,40	0,01	0,41	0,01	1,5	0,42	0,01	3,8	0,40	0,01	0,0	0,41	0,59	2,3
31	0,75	0,01	0,72	0,09	-3,8	0,72	0,07	-3,3	0,75	0,01	-0,3	0,77	0,80	3,5
32	0,41	0,00	0,40	0,01	-0,5	0,22	0,02	-44,6	0,40	0,01	-1,8	0,46	0,62	12,6
33	0,92	0,01	0,85	0,06	-7,3	0,90	0,07	-2,6	0,92	0,01	0,0	0,85	0,85	-7,8
34	0,03	0,00	-0,02	0,09	-149,8	-0,02	0,10	-149,2	0,03	0,00	0,1	0,03	0,37	-13,1
35	-0,28	0,00	-0,27	0,01	-2,7	-0,26	0,01	-6,0	-0,28	0,00	-1,6	-0,26	0,20	-6,5
36	-0,15	0,01	-0,16	0,04	10,9	-0,17	0,05	14,8	-0,15	0,01	0,6	-0,14	0,28	-5,2
37	-0,40	0,01	-0,41	0,03	2,2	-0,42	0,04	3,9	-0,40	0,01	-1,2	-0,40	0,12	-0,2
38	0,00	0,02	-0,05	0,08	932,3	-0,07	0,11	1268,9	-0,01	0,02	6,5	0,00	0,35	1,4
39	1,14	0,15	0,74	0,67	-34,9	0,61	0,90	-46,7	1,12	0,14	-1,5	1,13	1,02	-0,1
40	0,83	0,06	0,65	0,29	-21,1	0,60	0,39	-27,5	0,81	0,06	-2,0	0,82	0,83	-0,6
41	1,94	0,06	1,95	0,06	0,1	2,00	0,02	2,6	1,91	0,05	-1,7	1,94	1,47	-0,4
42	0,26	0,02	0,30	0,07	14,9	0,33	0,07	26,6	0,24	0,02	-7,6	0,25	0,50	-5,5

AA	WT	$\sigma$ WT	X	$\sigma$ X	% de cambio	XI	$\sigma$ XI	% de cambio	1-F6	$\sigma$ 1-F6	% de cambio	5-F6	$\sigma$ 5-F6	% de cambio
43	0,92	0,09	0,91	0,06	-0,9	0,95	0,04	3,3	0,88	0,07	-4,6	0,89	0,87	-2,9
44	0,65	0,02	0,65	0,01	-0,6	0,67	0,01	1,7	0,62	0,00	-5,1	0,63	0,72	-3,1
45	-0,23	0,00	-0,22	0,01	-4,4	-0,22	0,01	-5,9	-0,24	0,01	2,7	-0,24	0,22	2,8
46	-0,14	0,01	-0,14	0,01	-1,9	-0,13	0,01	-4,5	-0,14	0,01	3,6	-0,14	0,27	3,6
47	-0,37	0,01	-0,36	0,01	-2,2	-0,36	0,00	-3,3	-0,37	0,01	-0,9	-0,37	0,14	0,1
48	0,19	0,01	0,20	0,03	7,1	0,21	0,03	10,6	0,18	0,01	-3,4	0,19	0,47	-0,3
49	0,01	0,00	0,02	0,03	244,0	0,04	0,03	392,8	0,00	0,00	-79,0	0,01	0,36	-22,2
50	-0,44	0,01	-0,43	0,01	-1,2	-0,43	0,01	-1,3	-0,43	0,01	-0,8	-0,44	0,10	0,3
51	-0,50	0,01	-0,49	0,01	-1,0	-0,49	0,01	-1,0	-0,49	0,00	-0,8	-0,50	0,07	0,3
52	-0,31	0,01	-0,32	0,02	1,3	-0,32	0,02	1,3	-0,31	0,01	-0,4	-0,32	0,17	0,6
53	-0,29	0,01	-0,28	0,00	-1,5	-0,28	0,01	-1,9	-0,28	0,01	-1,1	-0,29	0,19	0,4
54	-0,38	0,00	-0,37	0,00	-1,4	-0,37	0,01	-1,4	-0,37	0,00	-0,6	-0,38	0,14	0,2
55	-0,37	0,00	-0,37	0,00	-1,8	-0,37	0,00	-2,3	-0,37	0,00	-0,2	-0,38	0,14	0,4
56	-0,22	0,00	-0,22	0,02	2,2	-0,23	0,02	4,0	-0,22	0,00	-0,9	-0,22	0,23	0,5
57	-0,26	0,00	-0,26	0,01	1,0	-0,26	0,02	2,1	-0,26	0,00	-1,0	-0,26	0,21	-0,1
58	-0,32	0,00	-0,32	0,01	-0,2	-0,32	0,01	0,2	-0,32	0,00	-0,8	-0,32	0,17	0,2
59	-0,17	0,01	-0,17	0,00	-2,2	-0,17	0,00	-4,3	-0,17	0,01	-0,6	-0,18	0,26	0,6
60	-0,02	0,01	-0,02	0,01	9,8	-0,01	0,01	-29,9	-0,01	0,01	-7,8	-0,02	0,35	-4,5
61	-0,14	0,01	-0,16	0,03	9,0	-0,16	0,04	12,4	-0,14	0,01	-1,0	-0,14	0,27	-0,8
62	-0,19	0,01	-0,19	0,01	-0,6	-0,19	0,01	-1,1	-0,19	0,01	-1,0	-0,19	0,25	-0,3
63	0,70	0,00	0,64	0,08	-8,0	0,63	0,10	-9,7	0,70	0,01	0,0	0,70	0,76	0,3
64	1,76	0,01	1,58	0,25	-10,2	1,53	0,32	-13,0	1,75	0,01	-0,8	1,77	1,38	0,4
65	0,85	0,01	0,78	0,13	-8,7	0,74	0,15	-13,1	0,84	0,02	-1,0	0,87	0,86	1,9
66	0,68	0,04	0,65	0,04	-4,9	0,65	0,01	-4,5	0,68	0,04	-0,3	0,68	0,75	0,0
67	0,09	0,00	0,12	0,05	31,2	0,14	0,06	53,3	0,09	0,00	-0,1	0,09	0,41	2,1
68	1,39	0,05	1,50	0,21	7,4	1,59	0,22	14,2	1,38	0,05	-0,8	1,40	1,17	0,5
69	-0,33	0,01	-0,30	0,03	-7,7	-0,29	0,03	-12,1	-0,32	0,01	-1,3	-0,33	0,17	0,1
70	-0,47	0,00	-0,46	0,00	-1,9	-0,46	0,00	-1,6	-0,47	0,00	-1,0	-0,47	0,08	-0,1
71	-0,52	0,00	-0,50	0,01	-2,4	-0,50	0,00	-2,5	-0,51	0,00	-1,0	-0,52	0,06	0,1
72	-0,46	0,00	-0,45	0,01	-3,4	-0,44	0,01	-4,1	-0,46	0,00	-0,9	-0,46	0,09	0,1
73	-0,55	0,00	-0,54	0,00	-2,0	-0,54	0,00	-1,9	-0,54	0,00	-1,1	-0,55	0,04	0,2
74	-0,57	0,00	-0,56	0,00	-2,1	-0,56	0,00	-2,0	-0,57	0,00	-1,0	-0,57	0,03	0,3
75	-0,57	0,00	-0,56	0,00	-2,1	-0,56	0,00	-2,0	-0,56	0,00	-1,1	-0,57	0,03	0,7
76	-0,59	0,00	-0,57	0,00	-1,9	-0,58	0,00	-1,7	-0,58	0,00	-1,0	-0,59	0,02	0,3
77	-0,58	0,00	-0,57	0,00	-1,9	-0,57	0,00	-1,7	-0,57	0,00	-1,0	-0,58	0,02	0,2
78	-0,60	0,00	-0,58	0,00	-1,8	-0,59	0,00	-1,5	-0,59	0,00	-1,0	-0,60	0,01	0,2
79	-0,60	0,00	-0,59	0,00	-1,8	-0,59	0,00	-1,6	-0,60	0,00	-1,1	-0,60	0,01	0,1
80	-0,59	0,00	-0,58	0,00	-2,1	-0,58	0,00	-1,9	-0,59	0,00	-1,1	-0,60	0,01	0,1
81	-0,58	0,00	-0,56	0,00	-2,1	-0,56	0,00	-2,1	-0,57	0,00	-1,1	-0,58	0,02	0,1
82	-0,53	0,00	-0,52	0,01	-2,4	-0,52	0,01	-2,6	-0,53	0,00	-1,1	-0,53	0,05	0,0
83	-0,51	0,00	-0,50	0,01	-3,2	-0,49	0,01	-3,6	-0,51	0,00	-1,1	-0,51	0,06	0,1
84	-0,52	0,00	-0,50	0,01	-3,1	-0,50	0,01	-3,5	-0,51	0,00	-1,1	-0,52	0,06	0,1
85	-0,53	0,00	-0,52	0,01	-2,5	-0,51	0,01	-2,7	-0,52	0,00	-1,1	-0,53	0,05	0,0
86	-0,51	0,00	-0,49	0,01	-2,6	-0,49	0,01	-2,8	-0,50	0,00	-1,3	-0,51	0,06	0,2
87	-0,26	0,02	-0,24	0,03	-10,1	-0,23	0,05	-13,0	-0,26	0,02	-1,8	-0,26	0,21	-1,5
88	0,20	0,05	0,21	0,04	4,9	0,22	0,06	7,4	0,21	0,05	2,3	0,22	0,48	8,9

89	-0,13	0,02	-0,09	0,06	-30,3	-0,07	0,09	-44,6	-0,12	0,02	-5,5	-0,12	0,29	-2,3
<b>AA</b>	<b>WT</b>	<b><math>\sigma</math> WT</b>	<b>X</b>	<b><math>\sigma</math> X</b>	<b>% de cambio</b>	<b>XI</b>	<b><math>\sigma</math> XI</b>	<b>% de cambio</b>	<b>1-F6</b>	<b><math>\sigma</math> 1-F6</b>	<b>% de cambio</b>	<b>5-F6</b>	<b><math>\sigma</math> 5-F6</b>	<b>% de cambio</b>
90	0,11	0,01	0,15	0,07	41,7	0,17	0,09	63,7	0,10	0,01	-8,0	0,11	0,42	1,2
91	-0,49	0,00	-0,48	0,01	-2,7	-0,48	0,01	-2,8	-0,49	0,00	-0,5	-0,49	0,07	0,1
92	-0,49	0,00	-0,47	0,01	-2,5	-0,47	0,01	-2,6	-0,48	0,00	-2,1	-0,49	0,08	0,0
93	-0,25	0,01	-0,23	0,02	-7,8	-0,23	0,03	-10,0	-0,25	0,01	-0,8	-0,25	0,21	-0,1
94	-0,39	0,01	-0,37	0,02	-5,2	-0,36	0,02	-8,0	-0,39	0,01	-1,8	-0,40	0,13	0,3
95	-0,42	0,01	-0,40	0,02	-4,5	-0,40	0,02	-6,1	-0,42	0,01	-1,4	-0,42	0,11	0,1
96	-0,50	0,00	-0,48	0,02	-3,9	-0,47	0,02	-4,8	-0,49	0,00	-1,1	-0,50	0,07	0,1
97	-0,54	0,00	-0,53	0,01	-2,9	-0,53	0,01	-2,9	-0,54	0,00	-1,1	-0,54	0,04	0,1
98	-0,49	0,00	-0,48	0,01	-3,2	-0,47	0,01	-3,7	-0,49	0,00	-1,0	-0,49	0,07	0,2
99	-0,56	0,00	-0,55	0,01	-2,3	-0,55	0,01	-2,4	-0,56	0,00	-1,1	-0,56	0,03	0,2
100	-0,57	0,00	-0,55	0,00	-2,3	-0,55	0,00	-2,3	-0,56	0,00	-1,2	-0,57	0,03	0,1
101	-0,57	0,00	-0,56	0,00	-2,2	-0,56	0,01	-2,2	-0,57	0,00	-1,1	-0,57	0,03	0,2
102	-0,60	0,00	-0,58	0,00	-2,1	-0,58	0,00	-2,0	-0,59	0,00	-1,1	-0,60	0,01	0,2
103	-0,60	0,00	-0,59	0,00	-1,9	-0,59	0,00	-1,6	-0,60	0,00	-1,1	-0,60	0,01	0,1
104	-0,60	0,00	-0,58	0,00	-2,2	-0,58	0,01	-2,1	-0,59	0,00	-1,1	-0,60	0,01	0,0
105	-0,57	0,00	-0,56	0,01	-2,6	-0,56	0,01	-2,8	-0,57	0,00	-1,1	-0,58	0,02	0,8
106	-0,49	0,00	-0,47	0,02	-4,1	-0,47	0,02	-4,9	-0,49	0,00	-1,1	-0,51	0,06	3,2
107	-0,27	0,01	-0,23	0,05	-14,0	-0,21	0,06	-21,3	-0,26	0,01	-1,9	-0,28	0,20	4,0
108	-0,46	0,01	-0,42	0,04	-6,8	-0,41	0,04	-9,5	-0,45	0,01	-1,5	-0,45	0,10	-1,0
109	-0,11	0,01	-0,07	0,06	-38,4	-0,05	0,07	-58,0	-0,11	0,01	-0,9	-0,11	0,30	-4,8
110	-0,41	0,00	-0,38	0,03	-5,8	-0,37	0,04	-8,5	-0,40	0,00	-0,9	-0,41	0,12	0,7
111	-0,29	0,00	-0,27	0,04	-4,8	-0,26	0,05	-9,1	-0,28	0,00	-1,1	-0,32	0,17	10,9
112	-0,42	0,00	-0,41	0,01	-3,3	-0,40	0,01	-4,9	-0,41	0,00	-1,0	-0,43	0,11	1,8
113	-0,03	0,01	0,00	0,04	-111,9	0,02	0,04	-185,7	-0,03	0,01	-0,3	-0,02	0,34	-15,7
114	-0,41	0,00	-0,38	0,03	-5,8	-0,38	0,03	-7,1	-0,40	0,00	-1,4	-0,41	0,12	-0,1
115	-0,42	0,00	-0,40	0,01	-3,8	-0,40	0,01	-4,9	-0,41	0,00	-1,3	-0,42	0,12	0,1
116	-0,08	0,01	-0,05	0,06	-44,1	-0,03	0,08	-60,2	-0,08	0,01	-7,3	-0,08	0,31	-0,7
117	0,58	0,04	0,69	0,20	19,0	0,74	0,26	28,0	0,57	0,03	-1,5	0,58	0,69	0,0
118	4,23	0,04	4,85	1,17	14,6	5,24	1,41	23,9	4,17	0,04	-1,5	4,23	2,80	0,0
119	8,83	0,16	9,10	0,69	3,1	9,43	0,71	6,8	9,03	0,17	2,3	8,85	5,47	0,3
120	1,60	0,02	1,92	0,59	20,2	2,10	0,73	31,3	1,60	0,02	0,2	1,60	1,28	0,3
121	-0,12	0,01	-0,09	0,05	-26,6	-0,07	0,05	-39,9	-0,12	0,00	-0,6	-0,12	0,29	-0,6
122	-0,40	0,00	-0,38	0,02	-5,1	-0,37	0,02	-6,8	-0,39	0,00	-1,1	-0,40	0,13	0,1
123	-0,52	0,00	-0,50	0,01	-2,8	-0,50	0,01	-3,0	-0,51	0,00	-1,0	-0,52	0,06	0,3
124	-0,54	0,00	-0,53	0,01	-2,5	-0,53	0,01	-2,4	-0,54	0,00	-1,1	-0,54	0,04	0,1
125	-0,56	0,00	-0,55	0,01	-2,4	-0,55	0,01	-2,5	-0,56	0,00	-1,0	-0,56	0,03	0,2
126	-0,56	0,00	-0,54	0,01	-2,5	-0,54	0,01	-2,6	-0,55	0,00	-1,1	-0,56	0,03	0,1
127	-0,51	0,00	-0,49	0,01	-3,5	-0,49	0,02	-4,1	-0,50	0,00	-1,1	-0,51	0,06	0,0
128	-0,48	0,00	-0,46	0,02	-3,6	-0,46	0,02	-4,3	-0,48	0,00	-1,1	-0,48	0,08	0,2
129	-0,40	0,00	-0,38	0,02	-5,1	-0,37	0,02	-6,2	-0,39	0,00	-1,4	-0,40	0,13	0,1
130	-0,08	0,00	-0,03	0,07	-59,6	-0,01	0,08	-86,9	-0,07	0,00	-5,6	-0,08	0,31	0,1
131	-0,20	0,00	-0,18	0,04	-13,4	-0,16	0,04	-19,6	-0,20	0,00	-2,0	-0,20	0,24	-1,2
132	-0,31	0,00	-0,29	0,02	-4,6	-0,29	0,02	-5,3	-0,30	0,00	-1,4	-0,31	0,18	-0,7
133	0,08	0,07	0,56	0,85	635,2	0,84	1,01	995,1	0,08	0,07	2,8	0,08	0,40	1,3
134	0,46	0,04	0,66	0,35	42,6	0,77	0,40	68,1	0,46	0,03	-1,0	0,46	0,63	1,1

135	-0,13	0,01	-0,03	0,15	-75,9	0,02	0,18	-114,3	-0,13	0,01	-0,9	-0,13	0,28	-1,5
136	-0,09	0,01	0,03	0,20	-132,4	0,09	0,23	-199,2	-0,09	0,01	-2,3	-0,09	0,30	-0,6
<b>AA</b>	<b>WT</b>	<b><math>\sigma</math> WT</b>	<b>X</b>	<b><math>\sigma</math> X</b>	<b>% de cambio</b>	<b>XI</b>	<b><math>\sigma</math> XI</b>	<b>% de cambio</b>	<b>1-F6</b>	<b><math>\sigma</math> 1-F6</b>	<b>% de cambio</b>	<b>5-F6</b>	<b><math>\sigma</math> 5-F6</b>	<b>% de cambio</b>
137	-0,28	0,01	-0,23	0,07	-17,4	-0,20	0,08	-26,4	-0,27	0,01	-1,5	-0,27	0,20	-2,2
138	-0,22	0,01	-0,18	0,05	-15,2	-0,17	0,05	-22,6	-0,22	0,00	-1,1	-0,21	0,24	-5,4
139	-0,48	0,00	-0,46	0,02	-4,3	-0,45	0,02	-6,0	-0,48	0,00	-1,2	-0,48	0,08	-0,2
140	-0,55	0,00	-0,54	0,01	-2,6	-0,53	0,01	-3,0	-0,54	0,00	-1,1	-0,55	0,04	0,0
141	-0,42	0,00	-0,40	0,03	-5,6	-0,39	0,03	-7,9	-0,42	0,00	-1,3	-0,42	0,11	-0,1
142	-0,37	0,00	-0,34	0,03	-8,3	-0,33	0,04	-10,7	-0,37	0,00	-1,0	-0,36	0,15	-2,6
143	-0,31	0,00	-0,28	0,02	-7,7	-0,28	0,03	-10,2	-0,30	0,00	-1,4	-0,30	0,18	-1,4
144	-0,44	0,00	-0,43	0,01	-3,7	-0,42	0,01	-4,1	-0,44	0,00	-1,3	-0,43	0,11	-1,5
145	-0,54	0,00	-0,53	0,01	-2,5	-0,52	0,01	-2,6	-0,53	0,00	-1,1	-0,54	0,05	0,0
146	-0,50	0,00	-0,48	0,02	-3,7	-0,48	0,02	-4,7	-0,50	0,00	-1,0	-0,50	0,07	0,2
147	-0,45	0,00	-0,42	0,03	-6,3	-0,41	0,04	-8,9	-0,44	0,00	-0,9	-0,45	0,10	-0,2
148	-0,23	0,01	-0,20	0,04	-14,4	-0,18	0,05	-21,0	-0,23	0,01	-0,7	-0,23	0,22	-1,0
149	0,10	0,02	0,13	0,06	32,3	0,14	0,07	45,4	0,09	0,02	-2,2	0,10	0,41	-0,6
150	0,25	0,00	0,30	0,08	19,3	0,33	0,10	31,3	0,25	0,00	-1,7	0,25	0,50	1,1
151	0,36	0,00	0,42	0,12	19,5	0,47	0,14	31,1	0,35	0,00	-0,8	0,36	0,56	0,7
152	0,54	0,03	0,58	0,07	5,9	0,61	0,05	12,5	0,54	0,04	-0,2	0,55	0,67	1,2
153	0,08	0,00	0,13	0,09	72,4	0,16	0,11	109,8	0,08	0,00	1,4	0,08	0,40	4,4
154	-0,22	0,01	-0,19	0,04	-13,0	-0,18	0,04	-19,6	-0,22	0,01	-1,9	-0,22	0,23	-1,0
155	-0,16	0,01	-0,12	0,05	-23,0	-0,11	0,06	-34,3	-0,16	0,01	-1,9	-0,16	0,26	-0,4
156	0,10	0,02	0,15	0,08	61,2	0,18	0,10	83,0	0,10	0,01	-0,1	0,10	0,41	4,4
157	-0,35	0,00	-0,32	0,04	-8,7	-0,31	0,05	-12,0	-0,34	0,00	-1,1	-0,35	0,16	-0,1
158	-0,42	0,01	-0,40	0,02	-4,1	-0,40	0,03	-4,9	-0,41	0,00	-1,2	-0,42	0,12	0,2
159	-0,09	0,03	-0,07	0,04	-25,3	-0,07	0,06	-28,3	-0,09	0,03	-0,6	-0,09	0,30	-0,1
160	0,00	0,02	0,03	0,05	5219,5	0,04	0,07	6963,7	0,00	0,02	175,8	0,00	0,36	176,8
161	-0,11	0,04	-0,07	0,06	-33,3	-0,07	0,08	-33,9	-0,11	0,04	-0,8	-0,10	0,30	-1,4
162	0,08	0,02	0,14	0,10	80,2	0,16	0,13	116,5	0,08	0,02	0,1	0,08	0,40	4,2
163	0,25	0,03	0,33	0,14	31,9	0,35	0,17	43,5	0,24	0,03	-1,9	0,25	0,50	1,3
164	-0,31	0,01	-0,28	0,04	-8,9	-0,28	0,05	-11,1	-0,31	0,01	-1,1	-0,31	0,18	0,2
165	-0,34	0,00	-0,31	0,04	-7,8	-0,31	0,04	-10,2	-0,34	0,00	-1,1	-0,34	0,16	0,2
166	-0,26	0,01	-0,23	0,04	-10,1	-0,22	0,05	-12,9	-0,25	0,01	-1,2	-0,26	0,21	0,1
167	-0,34	0,01	-0,30	0,05	-9,8	-0,29	0,06	-12,5	-0,33	0,01	-0,9	-0,34	0,16	0,2
168	-0,40	0,00	-0,37	0,03	-6,2	-0,37	0,04	-7,6	-0,39	0,01	-1,0	-0,40	0,13	0,2
169	-0,34	0,01	-0,31	0,04	-8,0	-0,31	0,04	-10,2	-0,34	0,01	-1,0	-0,34	0,16	0,2
170	-0,40	0,01	-0,37	0,04	-7,3	-0,37	0,05	-9,3	-0,40	0,01	-1,1	-0,40	0,12	0,0
171	-0,55	0,01	-0,53	0,01	-3,3	-0,53	0,02	-3,6	-0,54	0,01	-1,1	-0,55	0,04	0,1
172	-0,39	0,01	-0,37	0,02	-5,2	-0,36	0,02	-6,8	-0,38	0,00	-0,9	-0,39	0,13	0,1
173	-0,14	0,03	-0,10	0,06	-25,6	-0,09	0,07	-33,4	-0,14	0,03	-0,5	-0,14	0,28	-0,9
174	-0,21	0,05	-0,17	0,05	-15,5	-0,17	0,06	-19,6	-0,21	0,04	-0,3	-0,20	0,24	-1,6
175	-0,43	0,02	-0,40	0,04	-6,6	-0,39	0,04	-8,1	-0,42	0,02	-1,0	-0,43	0,11	-0,2
176	-0,56	0,00	-0,55	0,01	-2,5	-0,55	0,01	-2,6	-0,55	0,00	-1,0	-0,56	0,03	0,2
177	-0,54	0,00	-0,53	0,01	-2,5	-0,53	0,01	-2,3	-0,54	0,00	-1,1	-0,54	0,04	0,2
178	-0,46	0,00	-0,44	0,02	-4,0	-0,44	0,02	-4,7	-0,46	0,00	-1,2	-0,46	0,09	-0,1
179	0,09	0,00	0,11	0,05	28,0	0,13	0,05	48,0	0,09	0,00	0,1	0,09	0,41	-0,2
180														



## **Anexo C Secuencia primaria dominio catalítico xilanasa Xyl-L**

>|Xyl-L| Psychrobacter sp. (strain 2-17)

SLKALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFY  
DDSDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATH  
FEEMGDNDTVVSWDVVNEAFMNNGKYRGEKTTDDSADES VWFENIGAEFLPLAYKAA  
RAADPDADLYYNDYNLIWNALKLDAVIAMVNDFHNGVPIIDGIGFQSHISLNSPDISTIQ  
AHLQKVVDIRPKIKVFITELDVRMNNEGGIPLTYLTSEWAWEQKQYYYDIVKTYLETVP  
EDQRGGITIWGVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLFFNDFTAKPALQGAFANALKNLIEV

### Anexo D Anexo Fluctuaciones normalizadas Xyl-L y Xil-R13.

AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
1					
2	-0,256	0,0083	-0,252	0,0089	1
3	-0,335	0,0035	-0,330	0,0046	2
4	-0,239	0,0248	-0,237	0,0251	1
5	-0,272	0,0069	-0,270	0,0113	1
6	-0,190	0,0182	-0,184	0,0232	3
7	0,345	0,3199	0,248	0,2815	-28
8	0,373	0,1630	0,340	0,1321	-9
9	-0,179	0,0024	-0,182	0,0049	-1
10	-0,415	0,0003	-0,405	0,0018	2
11	-0,443	0,0012	-0,432	0,0015	2
12	-0,457	0,0001	-0,446	0,0002	3
13	-0,460	0,0002	-0,448	0,0000	3
14	-0,456	0,0001	-0,444	0,0001	3
15	-0,440	0,0004	-0,429	0,0001	2
16	-0,357	0,0014	-0,349	0,0001	2
17	-0,323	0,0005	-0,317	0,0007	2
18	0,622	0,0153	0,578	0,0022	-7
19	0,497	0,0024	0,477	0,0084	-4
20	1,526	0,0126	1,414	0,0240	-7
21	0,186	0,0036	0,191	0,0046	3
22	-0,235	0,0049	-0,222	0,0021	6
23	-0,370	0,0004	-0,362	0,0005	2
24	-0,328	0,0008	-0,322	0,0008	2
25	0,075	0,0049	0,046	0,0043	-38
26	0,096	0,0049	0,088	0,0012	-9
27	-0,146	0,0041	-0,145	0,0047	1
28	-0,005	0,0017	-0,008	0,0003	-61
29	0,013	0,0045	0,006	0,0047	-53
30	-0,282	0,0025	-0,278	0,0012	1
31	-0,274	0,0035	-0,269	0,0003	2
32	-0,214	0,0025	-0,210	0,0003	2
33	-0,280	0,0031	-0,274	0,0018	2
34	-0,343	0,0016	-0,335	0,0013	2
35	-0,284	0,0023	-0,276	0,0018	3
36	-0,217	0,0039	-0,213	0,0045	2
37	-0,362	0,0016	-0,354	0,0004	2
38	-0,418	0,0005	-0,408	0,0006	2
39	-0,424	0,0010	-0,414	0,0011	2
40	-0,448	0,0001	-0,436	0,0001	2,5
41	-0,455	0,0001	-0,443	0,0001	2,5
42	-0,455	0,0002	-0,443	0,0002	2,5

AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
43	-0,451	0,0002	-0,440	0,0002	2,5
44	-0,424	0,0005	-0,414	0,0003	2,4
45	-0,336	0,0017	-0,327	0,0039	2,8
46	-0,372	0,0009	-0,363	0,0004	2
47	-0,423	0,0004	-0,411	0,0011	3
48	-0,412	0,0009	-0,399	0,0037	3
49	-0,412	0,0008	-0,391	0,0119	4,9
50	-0,394	0,0007	-0,367	0,0194	6,9
51	-0,352	0,0012	-0,334	0,0115	5,1
52	-0,323	0,0016	-0,312	0,0058	3
53	-0,356	0,0018	-0,346	0,0048	3
54	-0,308	0,0017	-0,293	0,0091	5
55	-0,078	0,0036	-0,066	0,0200	15
56	0,747	0,0163	0,752	0,0173	1
57	0,481	0,0070	0,486	0,0116	1
58	0,175	0,0213	0,167	0,0032	-4,7
59	-0,056	0,0059	-0,063	0,0036	-11,1
60	0,022	0,0049	-0,004	0,0137	-119,8
61	-0,035	0,0050	-0,058	0,0035	-63,7
62	0,00037	0,0053	-0,032	0,0038	-8681,7
63	-0,073	0,0018	-0,085	0,0020	-16,3
64	-0,289	0,0011	-0,285	0,0007	1
65	-0,322	0,0005	-0,322	0,0009	0
66	-0,241	0,0014	-0,250	0,0003	-4
67	-0,313	0,0026	-0,312	0,0004	0
68	-0,369	0,0057	-0,359	0,0020	3
69	-0,320	0,0143	-0,301	0,0044	6
70	-0,297	0,0099	-0,278	0,0034	6
71	-0,396	0,0021	-0,385	0,0004	3
72	-0,348	0,0057	-0,338	0,0014	3
73	-0,165	0,0116	-0,159	0,0052	3
74	-0,146	0,0084	-0,137	0,0140	7
75	-0,223	0,0078	-0,218	0,0081	2
76	-0,407	0,0012	-0,398	0,0003	2
77	-0,432	0,0006	-0,422	0,0001	2
78	-0,448	0,0002	-0,436	0,0001	3
79	-0,453	0,0001	-0,440	0,0003	3
80	-0,452	0,0002	-0,440	0,0002	3
81	-0,441	0,0005	-0,430	0,0001	2
82	-0,442	0,0010	-0,429	0,0005	3
83	-0,436	0,0009	-0,424	0,0004	3
84	-0,422	0,0006	-0,412	0,0004	2
85	-0,279	0,0029	-0,278	0,0012	0



AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
86	-0,150	0,0061	-0,166	0,0119	-11
87	0,151	0,0136	0,222	0,0261	46
88	-0,061	0,0055	0,176	0,2725	388
89	-0,188	0,00333	0,014	0,2180	107
90	-0,287	0,0018	-0,249	0,0356	13
91	-0,036	0,0068	-0,037	0,0082	-3
92	0,102	0,0083	0,123	0,0350	20
93	-0,123	0,00391	-0,088	0,0450	29
94	-0,029	0,00377	-0,010	0,0287	64
95	0,736	0,0769	0,672	0,0675	-9
96	0,657	0,0114	0,665	0,0443	1
97	6,239	0,4426	7,533	0,5959	21
98	1,370	0,0515	1,442	0,0234	5
99	0,608	0,0167	0,565	0,0155	-7
100	0,012	0,0029	0,005	0,0040	-56
101	0,163	0,0016	0,151	0,0072	-8
102	0,117	0,0043	0,112	0,0021	-4
103	-0,187	0,0109	-0,207	0,0055	-11
104	-0,262	0,0073	-0,260	0,0024	1
105	-0,197	0,0049	-0,190	0,0033	4
106	-0,199	0,0054	-0,195	0,0028	2
107	-0,291	0,0043	-0,288	0,0023	1
108	-0,322	0,0033	-0,318	0,0020	1
109	-0,316	0,0026	-0,310	0,0018	2
110	-0,359	0,0022	-0,350	0,0014	3
111	-0,427	0,0008	-0,417	0,0005	2
112	-0,420	0,0006	-0,411	0,0004	2
113	-0,357	0,0017	-0,353	0,0007	1
114	-0,379	0,0015	-0,372	0,0012	2
115	-0,434	0,0002	-0,423	0,0003	3
116	-0,417	0,0004	-0,407	0,0004	2
117	-0,354	0,0015	-0,353	0,0029	0
118	-0,361	0,0034	-0,360	0,0044	0
119	-0,366	0,0053	-0,353	0,0063	3
120	-0,258	0,0197	-0,280	0,0115	-8
121	-0,061	0,0728	-0,169	0,0302	-178
122	1,129	0,5062	1,550	0,2259	37
123	0,734	0,4066	0,604	0,1053	-18
124	-0,306	0,0099	-0,287	0,0145	6
125	-0,359	0,0091	-0,315	0,0278	12
126	-0,361	0,0037	-0,365	0,0024	-1
127	-0,434	0,0018	-0,421	0,0017	3
128	-0,437	0,0012	-0,424	0,0022	3

AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
129	-0,436	0,0004	-0,425	0,0006	3
130	-0,424	0,0014	-0,414	0,0006	2
131	-0,456	0,0001	-0,445	0,0001	3
132	-0,459	0,0001	-0,447	0,0001	3
133	-0,453	0,0003	-0,442	0,0002	3
134	-0,445	0,0005	-0,433	0,0004	3
<u>135</u>	-0,409	<u>0,0007</u>	-0,398	<u>0,0003</u>	2,7
<u>136</u>	-0,374	<u>0,0008</u>	-0,368	<u>0,0015</u>	2
<u>137</u>	-0,369	<u>0,0008</u>	-0,361	<u>0,0011</u>	2
<u>138</u>	-0,302	<u>0,0026</u>	-0,294	<u>0,0014</u>	3
<u>139</u>	0,299	<u>0,0169</u>	0,283	<u>0,0108</u>	-5
<u>140</u>	1,144	<u>0,0238</u>	1,127	<u>0,0085</u>	-1
<u>141</u>	2,657	<u>0,0275</u>	2,378	<u>0,1483</u>	-11
<u>142</u>	1,810	<u>0,0615</u>	1,764	<u>0,0365</u>	-3
<u>143</u>	1,452	<u>0,0546</u>	1,498	<u>0,0541</u>	3
<u>144</u>	6,230	<u>0,1827</u>	5,829	<u>0,3492</u>	-6
<u>145</u>	4,816	<u>0,0587</u>	5,073	<u>0,3559</u>	5
<u>146</u>	2,636	<u>0,0232</u>	2,740	<u>0,1319</u>	4
<u>147</u>	2,211	<u>0,0212</u>	2,211	<u>0,0377</u>	0
<u>148</u>	1,385	<u>0,0325</u>	1,470	<u>0,0232</u>	6
<u>149</u>	0,122	<u>0,0071</u>	0,095	<u>0,0057</u>	-22
<u>150</u>	0,207	<u>0,0058</u>	0,178	<u>0,0035</u>	-14
<u>151</u>	1,212	<u>0,0125</u>	1,142	<u>0,0241</u>	-6
<u>152</u>	-0,273	<u>0,0024</u>	-0,267	<u>0,0009</u>	2
<u>153</u>	-0,363	<u>0,0012</u>	-0,354	<u>0,0004</u>	2
<u>154</u>	-0,353	<u>0,0016</u>	-0,344	<u>0,0008</u>	2
<u>155</u>	-0,311	<u>0,0026</u>	-0,303	<u>0,0024</u>	2
<u>156</u>	-0,329	<u>0,0018</u>	-0,322	<u>0,0007</u>	2
<u>157</u>	-0,250	<u>0,0029</u>	-0,247	<u>0,0021</u>	1
<u>158</u>	-0,266	<u>0,0030</u>	-0,263	<u>0,0007</u>	1
<u>159</u>	-0,323	<u>0,0014</u>	-0,319	<u>0,0004</u>	2
<u>160</u>	-0,251	<u>0,0033</u>	-0,249	<u>0,0020</u>	1
<u>161</u>	-0,231	<u>0,0038</u>	-0,229	<u>0,0026</u>	1
<u>162</u>	-0,294	<u>0,0042</u>	-0,288	<u>0,0008</u>	2
<u>163</u>	-0,275	<u>0,0032</u>	-0,276	<u>0,0026</u>	0
<u>164</u>	-0,323	<u>0,0019</u>	-0,321	<u>0,0017</u>	1
<u>165</u>	-0,182	<u>0,0028</u>	-0,180	<u>0,0025</u>	1
<u>166</u>	-0,301	<u>0,0021</u>	-0,297	<u>0,0014</u>	1
<u>167</u>	-0,346	<u>0,0013</u>	-0,339	<u>0,0009</u>	2
168	-0,350	0,0018	-0,342	0,0013	2
169	-0,407	0,0014	-0,399	0,0007	2
170	-0,438	0,0005	-0,428	0,0002	2
171	-0,431	0,0006	-0,421	0,0002	2

AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
172	-0,417	0,0008	-0,407	0,0003	2
173	-0,431	0,0004	-0,421	0,0003	2
174	-0,438	0,0003	-0,427	0,0003	2
175	-0,386	0,0006	-0,378	0,0006	2
176	-0,368	0,0006	-0,361	0,0005	2
177	-0,414	0,0001	-0,404	0,0005	2
178	-0,367	0,0008	-0,359	0,0030	2
179	-0,325	0,0015	-0,320	0,0016	1
180	-0,091	0,0051	-0,067	0,0081	27
181	-0,404	0,0012	-0,394	0,0028	2
182	-0,433	0,0002	-0,422	0,0004	2
183	-0,454	0,0002	-0,442	0,0001	3
184	-0,443	0,0003	-0,432	0,0002	2
185	-0,446	0,0004	-0,435	0,0001	2
186	-0,440	0,0005	-0,427	0,0002	3
<u>187</u>	<u>-0,390</u>	<u>0,0020</u>	<u>-0,337</u>	<u>0,0020</u>	14
188	-0,425	0,0006	-0,416	0,0001	2
189	-0,421	0,0005	-0,412	0,0003	2
190	-0,422	0,0005	-0,413	0,0002	2
191	-0,415	0,0008	-0,406	0,0004	2
192	-0,375	0,0010	-0,367	0,0003	2
193	-0,399	0,0004	-0,389	0,0011	3
<u>194</u>	<u>-0,227</u>	<u>0,0038</u>	<u>-0,229</u>	<u>0,0075</u>	-1
<u>195</u>	<u>-0,196</u>	<u>0,0035</u>	<u>-0,167</u>	<u>0,0127</u>	15
196	-0,356	0,0015	-0,349	0,0009	2
197	-0,422	0,0006	-0,412	0,0004	2
198	-0,377	0,0010	-0,365	0,0006	3
199	-0,387	0,0010	-0,379	0,0010	2
200	-0,392	0,0005	-0,382	0,0009	2
201	-0,352	0,0010	-0,344	0,0012	2
202	-0,318	0,0017	-0,312	0,0012	2
203	-0,291	0,0020	-0,285	0,0012	2
204	-0,313	0,0022	-0,308	0,0009	2
205	-0,269	0,0023	-0,262	0,0010	3
206	-0,220	0,0033	-0,216	0,0013	2
<u>207</u>	<u>-0,273</u>	<u>0,0019</u>	<u>-0,277</u>	<u>0,0009</u>	-1
208	-0,146	0,0043	-0,159	0,0034	-9
209	0,350	0,0163	0,255	0,0047	-27
210	0,260	0,0037	0,233	0,0038	-11
211	0,242	0,0077	0,052	0,0045	-79
212	-0,355	0,0010	-0,339	0,0006	4
213	-0,382	0,0012	-0,374	0,0001	2
214	-0,385	0,0018	-0,374	0,0003	3
215	-0,434	0,0004	-0,423	0,0003	3

216	-0,448	0,0004	-0,437	0,0003	2
AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
217	-0,457	0,0001	-0,446	0,0001	3
218	-0,459	0,0001	-0,447	0,0001	3
219	-0,452	0,0002	-0,441	0,0001	3
220	-0,445	0,0003	-0,435	0,0002	2
221	-0,441	0,0004	-0,431	0,0002	2
222	-0,401	0,0010	-0,393	0,0004	2
223	-0,249	0,0046	-0,249	0,0010	0
224	-0,424	0,0009	-0,412	0,0001	3
225	-0,403	0,0012	-0,393	0,0006	3
226	-0,036	0,0072	-0,037	0,0041	-1
227	-0,314	0,0031	-0,307	0,0048	2
228	-0,040	0,0048	-0,057	0,0117	-44
229	-0,193	0,0027	-0,186	0,0020	3
230	-0,243	0,0037	-0,240	0,0007	1
231	-0,314	0,0019	-0,306	0,0021	3
232	-0,409	0,0007	-0,399	0,0005	3
233	-0,424	0,0006	-0,413	0,0002	3
234	-0,394	0,0012	-0,385	0,0005	2
235	-0,403	0,0008	-0,394	0,0006	2
236	-0,411	0,0009	-0,401	0,0005	2
237	-0,404	0,0007	-0,395	0,0003	2
238	-0,396	0,0006	-0,388	0,0003	2
239	-0,351	0,0002	-0,344	0,0001	2
240	-0,359	0,0012	-0,354	0,0004	1
241	-0,354	0,0010	-0,349	0,0001	1
242	-0,206	0,0011	-0,208	0,0009	-1
243	-0,080	0,0040	-0,091	0,0019	-14
244	0,062	<u>0,0085</u>	0,040	<u>0,0063</u>	-35
245	1,195	<u>0,0175</u>	1,084	<u>0,0187</u>	-9
246	0,251	<u>0,0169</u>	0,220	<u>0,0133</u>	-13
247	-0,373	<u>0,0025</u>	-0,371	<u>0,0017</u>	1
248	-0,429	<u>0,0007</u>	-0,419	<u>0,0002</u>	2
249	-0,448	<u>0,0003</u>	-0,437	<u>0,0003</u>	2
250	-0,430	<u>0,0009</u>	-0,421	<u>0,0009</u>	2
251	-0,453	<u>0,0001</u>	-0,442	<u>0,0002</u>	2
252	-0,455	<u>0,0002</u>	-0,444	<u>0,0000</u>	2
253	-0,449	<u>0,0002</u>	-0,439	<u>0,0001</u>	2,3
254	-0,448	<u>0,0004</u>	-0,437	<u>0,0001</u>	2
255	-0,397	<u>0,0006</u>	-0,392	<u>0,0015</u>	1
256	-0,446	<u>0,0004</u>	-0,434	<u>0,0001</u>	3
257	-0,402	<u>0,0010</u>	-0,391	<u>0,0003</u>	3
258	-0,374	<u>0,0016</u>	-0,365	<u>0,0017</u>	3
259	-0,038	<u>0,0038</u>	-0,068	<u>0,0268</u>	-78

<u>260</u>	0,443	<u>0,0020</u>	0,430	<u>0,0179</u>	-3
AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
<u>261</u>	2,154	<u>0,1365</u>	2,295	<u>0,0677</u>	7
<u>262</u>	4,801	<u>0,0494</u>	5,147	<u>0,3740</u>	7
<u>263</u>	3,367	<u>0,3308</u>	3,077	<u>0,0678</u>	-9
<u>264</u>	6,117	<u>0,3064</u>	6,213	<u>0,1360</u>	2
<u>265</u>	4,693	<u>0,2497</u>	4,435	<u>0,1414</u>	-5
<u>266</u>	2,244	<u>0,2271</u>	1,973	<u>0,0643</u>	-12
<u>267</u>	2,439	<u>0,2072</u>	2,021	<u>0,0590</u>	-17
<u>268</u>	2,735	<u>0,1273</u>	2,620	<u>0,0340</u>	-4
<u>269</u>	1,186	<u>0,1191</u>	0,979	<u>0,0071</u>	-17
<u>270</u>	1,436	<u>0,0884</u>	1,326	<u>0,0118</u>	-8
<u>271</u>	0,809	<u>0,0026</u>	0,743	<u>0,0025</u>	-8
<u>272</u>	0,492	<u>0,0069</u>	0,462	<u>0,0020</u>	-6
<u>273</u>	-0,167	<u>0,0016</u>	-0,212	<u>0,0014</u>	-27
<u>274</u>	-0,335	<u>0,0009</u>	-0,324	<u>0,0004</u>	3
<u>275</u>	-0,324	<u>0,0007</u>	-0,268	<u>0,0009</u>	17
<u>276</u>	-0,338	<u>0,0007</u>	-0,310	<u>0,0005</u>	8
277	-0,422	0,0004	-0,410	0,0004	3
278	-0,437	0,0003	-0,426	0,0002	2
279	-0,414	0,0009	-0,405	0,0003	2
280	-0,398	0,0011	-0,389	0,0004	2
281	-0,430	0,0006	-0,419	0,0002	2
282	-0,441	0,0004	-0,431	0,0002	2
283	-0,420	0,0005	-0,410	0,0004	2
284	-0,411	0,0007	-0,401	0,0005	2
285	-0,425	0,0006	-0,414	0,0004	2
286	-0,423	0,0007	-0,413	0,0002	2
287	-0,391	0,0010	-0,381	0,0006	3
288	-0,349	0,0018	-0,341	0,0008	2
289	-0,283	0,0031	-0,280	0,0009	1
290	-0,250	0,0028	-0,249	0,0014	0
291	-0,386	0,0008	-0,379	0,0003	2
292	-0,384	0,0011	-0,374	0,0003	2
293	-0,134	0,0099	-0,138	0,0068	-3
294	0,131	0,0308	0,111	0,0178	-15
295	0,238	0,0088	0,213	0,0062	-10
296	-0,356	0,0016	-0,349	0,0007	2
297	-0,398	0,0007	-0,388	0,0003	3
298	-0,440	0,0002	-0,429	0,0003	2
299	-0,440	0,0004	-0,430	0,0002	2
300	-0,453	0,0002	-0,442	0,0001	3
301	-0,452	0,0002	-0,441	0,0001	2
302	-0,449	0,0003	-0,439	0,0002	2

303	-0,441	0,0003	-0,431	0,0002	2
304	-0,455	0,0001	-0,443	0,0001	2
AA	Xyl-L	$\sigma$ Xyl-L	Xil-R13	$\sigma$ Xil-R13	% cambio
305	-0,444	0,0003	-0,433	0,0001	2
306	-0,434	0,0005	-0,423	0,0002	3
307	-0,419	0,0004	-0,409	0,0004	2
308	-0,324	0,0016	-0,318	0,0036	2
309	-0,314	0,0020	-0,309	0,0017	2
310	-0,377	0,0005	-0,369	0,0005	2
311	0,201	0,0039	0,197	0,0058	-2
312	-0,211	0,0033	-0,207	0,0104	2
313	-0,312	0,0018	-0,301	0,0053	4
314	0,037	0,0071	0,054	0,0082	48
315	0,848	0,0268	0,599	0,1756	-29
316	4,864	0,0764	4,439	0,4443	-9
317	3,898	0,1302	2,922	0,5416	-25
318	2,104	0,1223	2,318	0,0887	10
319	0,104	0,0216	0,056	0,0148	-46
320	0,034	0,0281	0,039	0,0339	15
321	-0,348	0,0018	-0,343	0,0030	2
322	-0,400	0,0012	-0,390	0,0014	2
323	-0,441	0,0005	-0,430	0,0003	3
324	-0,451	0,0003	-0,440	0,0002	3
325	-0,437	0,0003	-0,427	0,0003	2
326	-0,383	0,0012	-0,371	0,0005	3
327	-0,343	0,0022	-0,333	0,0006	3
328	-0,081	0,0035	-0,071	0,0066	12
329	0,533	0,0409	0,547	0,0705	2
330	-0,139	0,0041	-0,145	0,0043	-4
331	0,043	0,0156	0,059	0,0083	38
332	-0,219	0,0022	-0,216	0,0030	1
333	-0,300	0,0006	-0,300	0,0020	0
334	-0,411	0,0005	-0,401	0,0007	2
335	-0,441	0,0003	-0,430	0,0003	3
336	-0,414	0,0006	-0,405	0,0009	2
337	-0,403	0,0008	-0,396	0,0006	2
338	-0,442	0,0003	-0,432	0,0001	2
339	-0,430	0,0005	-0,420	0,0007	2
340	-0,392	0,0012	-0,383	0,0017	2
341	-0,405	0,0007	-0,396	0,0005	2
342	-0,418	0,0005	-0,409	0,0004	2
343	-0,347	0,0024	-0,342	0,0036	2
344	-0,138	0,0128	-0,145	0,0108	-5
345	0,163	0,0140	0,126	0,0148	-22

346	0,263	0,0181	0,236	0,0050	-10
347	1,458	0,0469	1,372	0,0237	-6
348	-0,063	0,0102	-0,075	0,0059	-19
349		0,0645		0,0214	

---