

## 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