



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS FÍSICAS Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y BIOTECNOLOGÍA

# **ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTREMOS HIDROFÓBICOS EN LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE CELULAS RECOMBINANTES**

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVIL QUÍMICO  
E INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

**MARICELLE ANALYSE DELPIANO TEDROS**

**PROFESOR GUÍA:**

MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:**

ORIANA SALAZAR AGUIRRE

JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA

SANTIAGO DE CHILE

OCTUBRE 2009

## RESUMEN

La separación y purificación de una proteína desde una fermentación a gran escala es un elemento crítico en los procesos modernos biotecnológicos, puesto que representa el mayor costo industrial. Es por esto que numerosos estudios se enfocan en mejorar y/o disminuir las etapas de purificación, de manera de aumentar la pureza de la proteína de interés, y al mismo tiempo disminuir los costos de producción. El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar el efecto de la adición de un extremo polipeptídico hidrofóbico a una celulasa del tipo endoglucanasa, en su producción, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC).

Para este estudio se seleccionaron 4 combinaciones de los aminoácidos tirosina (Y), triptófano (W) y prolina (P), de a lo más 6 aminoácidos, para formar la secuencia del extremo que fue adicionado en el extremo carboxilo terminal de la enzima nativa, mediante la técnica Polymerase Chain Reaction (PCR). Se obtuvieron exitosamente las endoglucanasas mutadas Cel-(WP)<sub>2</sub>, Cel-(YP)<sub>2</sub>Y, Cel-(YP)<sub>3</sub> y Cel-Y<sub>3</sub>.

Los cultivos productores de las endoglucanasas modificadas con los extremos hidrofóbicos se crecieron e indujeron bajo condiciones definidas; luego las proteínas fueron recuperadas de la fracción extracelular para la posterior medición de actividad enzimática, proteína total y cálculo de la actividad específica.

La adición de extremos hidrofóbicos no afectó la distribución de la actividad enzimática en las fracciones subcelulares, puesto que la endoglucanasa nativa y las mutadas presentaron comportamiento similar: más del 90% de actividad en el medio extracelular y en el periplasma un 6% aproximadamente. Los valores de proteína total demostraron que la endoglucanasa nativa y las mutadas tienen una igual distribución de proteínas, aproximadamente de un 87% en el medio extracelular y 8% en la fracción periplasmática. Con esto, fue posible concluir que la actividad y recuperación de la endoglucanasa no se vio afectada por la adición de los extremos hidrofóbicos.

Adicionalmente, las endoglucanasas nativa y modificadas se purificaron por HIC, utilizando como matriz hidrofóbica Butil Sefarosa Fast Flow 6FF. De los cromatogramas obtenidos se midieron los tiempos de retención adimensionales (DRT), de acuerdo a la fracción en la cual eluyó cada una de las endoglucanasas. En todos los cromatogramas se observó una tendencia similar, presentándose dos peaks de actividad tanto para la endoglucanasa nativa como para las modificadas. Esto se atribuye a la presencia de proteasas en el medio que posiblemente fragmentaron a la proteína en un sitio previo al extremo hidrofóbico. Se recomienda para futuros estudios, agregar inhibidores de proteasas para evitar estos sucesos.

Por otra parte, se calculó la hidrofobicidad superficial de la endoglucanasa nativa y el aporte de cada extremo polipeptídico, para esto se usó como modelo una endoglucanasa de código pdb 1TVN, que tenía un 88,4 % de identidad a nivel de aminoácidos con la enzima utilizada en este estudio. Las proteínas mutadas presentaron en los valores de DRT un aumento porcentual promedio respecto de la endoglucanasa nativa de 19,7 %, 15,0 %, 14,3 % y 10,9 % para el caso de Cel-(WP)<sub>2</sub>, Cel-(YP)<sub>2</sub>Y, Cel-(YP)<sub>3</sub> y Cel-Y<sub>3</sub> respectivamente, los cuales se relacionan con el porcentaje de aumento de la hidrofobicidad superficial total de la proteína ( $\phi$ ), según la recta:  $DRT = 2,41\phi - 19,36$  con un  $R^2 = 0,96$ .

Finalmente, se estableció como criterio cualitativo para seleccionar el extremo que reporte mayores mejoras en el proceso de purificación, que no es necesario que el extremo hidrofóbico incluya prolina para que esta proteína extracelular mantenga su actividad. Y como criterios cuantitativos, se estableció que el extremo a adicionar debe tener una hidrofobicidad menor a 500 y que existe una relación lineal entre el aumento de DRT y el aumento de hidrofobicidad.

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta importante etapa de mi vida, es un agrado poder dar las gracias a todas las personas que he conocido a lo largo de este camino y que hicieron posible que llegara a esta instancia.

Primero que todo agradezco a mis padres, Erika y Luis, por su apoyo y amor incondicional, por tolerar mis cambios de ánimo cuando las cosas no me salían bien, y porque nunca dejaron de creer en mí. A Mariella, mi casi hermana, que me empapa de energía y alegría siempre, a mis tíos por sus buenos deseos y confianza en mí, a Kena, mi segunda madre, que siempre está ahí cuando la necesito, a mi tío Chago, que si bien ya no está, me inundó con su sabiduría, valores y lecciones de vida que me convirtieron en lo que soy hoy como persona.

También quiero agradecer el cariño y comprensión de mis amigos. A Paula por ser mi amiga y confidente desde que estábamos en el colegio, a Milton por convertirse en un excelente amigo este último tiempo, y a Jorge por ser mi amigo en las buenas y en las malas. A todas las personas que conocí en esta carrera, que compartimos clases, trabajos, alegrías y tristezas, pero que siempre pude y podré contar con ustedes: Victoria, Nonoy, Ricardo, Rolando, Maurice, Alejandro, Sergio, Marcela, Adriana y en general a todos los de la generación, los quiero mucho y recordaré siempre. En particular quisiera agradecer a Catalina, por su infinita ayuda y por estar conmigo todo el tiempo.

Agradezco inmensamente a mis profesoras guía Dra. María Elena Lienqueo y co-guía Dra. Oriana Salazar por su constante preocupación, ánimo, apoyo y buena disposición en todo el desarrollo de este trabajo.

Quiero dar las gracias también a las personas y docentes que conocí en el CIBYB, Iván, Matías, Giannina, Ana y Alexis por ayudarme cada vez que lo necesité. Muchas gracias a Nancy por su apoyo y buena disposición en todo momento. Finalmente agradecer al proyecto Fondecyt 1080143 (*“Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”*), por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS</b> .....	iv
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1 Descripción del proyecto y justificación.....	2
1.2 Celulasas.....	2
1.2.1 Clasificación de celulasas.....	3
1.2.2 Estructura y características de celulasas.....	4
1.2.3 Modo de acción de celulasas.....	4
1.2.4 Aplicaciones industriales de celulasas.....	6
1.2.5 Celulasa a utilizar como proteína modelo.....	8
1.3 Características de los aminoácidos.....	9
1.4 Interacciones hidrofóbicas.....	11
1.5 Técnicas de purificación de proteínas.....	12
1.5.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	12
1.6 Determinación de los tiempos de retención en HIC.....	14
1.7 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos.....	15
1.8 Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de una proteína.....	17
1.9 Limitaciones del uso de los extremos hidrofóbicos.....	18
1.10 Objetivos.....	20
1.10.1 Objetivo General.....	20
1.10.2 Objetivos Específicos.....	20
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
2.1 Materiales.....	21
2.1.1 Cepas bacterianas electrocompetentes.....	21
2.1.2 Reactivos.....	21
2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión.....	22
2.1.4 Enzimas de restricción.....	23
2.1.5 Equipos.....	24
2.1.6 Herramientas computacionales.....	24

2.1.7	Medios de cultivo líquidos y sólidos .....	25
2.1.8	Soluciones stock .....	25
2.1.9	Síntesis de oligonucleótidos .....	25
2.2	Métodos .....	26
2.2.1	Diseño de oligonucleótidos .....	26
2.2.2	Purificación de DNA plasmidial.....	26
2.2.3	Síntesis del gen de celulasa modificado.....	27
2.2.4	Adición de adenina terminal a los productos de PCR .....	27
2.2.5	Clonamiento de los genes de celulasa modificados.....	27
2.2.5.1	Clonamiento en el vector pGem®-T Easy.....	27
2.2.5.2	Clonamiento en el vector de expresión pET22-b(+)......	28
2.2.6	Preparación de bacterias electrocompetentes.....	28
2.2.7	Transformación de bacterias electrocompetentes.....	28
2.2.8	PCR de colonias .....	29
2.2.9	Digestión de DNA plasmidial.....	29
2.2.10	Electroforesis.....	29
2.2.10.1	Electroforesis en gel de agarosa .....	29
2.2.10.2	Electroforesis de proteínas (SDS-Page).....	30
2.2.11	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa .....	30
2.2.12	Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes.....	30
2.2.13	Extracción de celulasas del medio de cultivo.....	31
2.2.14	Caracterización de las celulasas modificadas.....	31
2.2.14.1	Medición de la actividad celulolítica en medio líquido .....	31
2.2.14.2	Determinación de la concentración de proteína .....	32
2.2.14.3	Zimograma de celulasas.....	32
2.2.15	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica .....	32
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
3.1	Diseño de partidores .....	34
3.2	Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a endoglucanasa .....	36
3.2.1	Generación del gen de la celulasa modificada por PCR .....	36
3.2.2	Clonamiento del gen modificado en el vector pGem®-T Easy .....	38
3.2.3	Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pET22-b(+). .....	40
3.3	Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos.....	41
3.4	Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de las celulasas modificadas .....	42
3.5	Producción de celulasas modificadas .....	43
3.5.1	Análisis de actividad .....	43

3.5.2	Análisis de proteína .....	46
3.6	Relación entre hidrofobicidad superficial y actividad específica .....	48
3.7	Purificación de la celulasa desde el medio extracelular .....	50
3.8	Determinación de tiempos de retención adimensionales (DRT) .....	57
3.9	Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT .....	59
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>5.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	63
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	64
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	69
	Anexo A: Aminoácidos .....	69
	Anexo B: Medios de cultivo líquidos y sólidos .....	72
	B.1. Medios de cultivo líquidos .....	72
	B.2. Medios de cultivo sólidos .....	73
	Anexo C: Metodología anexa .....	74
	C.1. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) .....	74
	C.2. Tinción de geles de proteínas con nitrato de plata .....	74
	C.3. Método del DNS para medir azúcares reductores .....	75
	Anexo D: Curvas de calibración .....	76
	D.1. Curva de calibración BSA .....	76
	D.2. Curva de calibración DNS .....	76
	D.3. Curva de calibración Peso Molecular .....	77
	Anexo E: Secuencias de celulasas modificadas .....	78
	Anexo F: Hidrofobicidad superficial teórica celulasa nativa .....	82
	Anexo G: Test Estadístico .....	83
	Anexo H: Cromatogramas pendientes .....	85
	Anexo I: Datos de actividad en medio líquido fracciones cromatografía pendiente .....	88
	Anexo J: Datos de cultivos de cepas nativas y mutadas .....	89

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Modelo de degradación de celulosa por un complejo enzimático multicomponente de celulasa. ....	5
Figura 1.2. Estructura tridimensional del dominio catalítico de cel5G. ....	9
Figura 1.3. Estructura básica de un aminoácido. ....	10
Figura 1.4. Estructura química del aminoácido Prolina (P). ....	10
Figura 1.5. Estructura química del aminoácido Tirosina (Y). ....	11
Figura 1.6. Estructura química del aminoácido Triptófano (W). ....	11
Figura 1.7. Primera etapa en HIC: Ambientación de la Columna. ....	13
Figura 1.8. Segunda etapa HIC: Inyección de la muestra. ....	13
Figura 1.9. Tercera etapa en HIC: Elución de las proteínas. ....	14
Figura 1.10. Esquema de un Cromatograma de HIC y parámetros a considerar. ....	15
Figura 2.1. Vector pGem <sup>®</sup> -T Easy y sus puntos de referencia. ....	22
Figura 2.2. Vector pET-22b(+) y sus puntos de referencia. ....	23
Figura 3.1. Esquema de alineamiento de los partidores y el templado de la celulasa nativa. ....	34
Figura 3.2. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para las variantes Cel-WP2 y Cel-YP2Y. ....	36
Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para las variantes Cel-YP3 y Cel-Y3. ....	37
Figura 3.4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a 55°C para todas las variantes. ....	37
Figura 3.5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de <i>E. coli</i> DH5α transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-WP2 y Cel-YP2Y al vector de clonamiento pGem <sup>®</sup> -T Easy. ....	38
Figura 3.6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de <i>E. coli</i> DH5α transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-YP3 y Cel-Y3 al vector de clonamiento pGem <sup>®</sup> -T Easy. ....	39
Figura 3.7. Digestión del DNA Plasmidial. ....	39
Figura 3.8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-WP2 y Cel-YP2Y al vector de expresión pet22b(+). ....	40
Figura 3.9. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-YP3 y Cel-Y3 al vector de expresión pet22b(+). ....	41
Figura 3.10. Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). ....	44
Figura 3.11. Distribución subcelular de celulasa silvestre y modificadas en <i>E. coli</i> BL21(DE)3. ....	45
Figura 3.12. Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). ....	46
Figura 3.13. Porcentaje proteína total presente en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). ....	47
Figura 3.14. Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). ....	48
Figura 3.15. Porcentaje de actividad específica residual versus hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos. ....	49
Figura 3.16. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WildType. ....	51
Figura 3.17. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WP2. ....	52
Figura 3.18. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP2Y. ....	52

Figura 3.19. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP3..	53
Figura 3.20. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-Y3..	53
Figura 3.21. Ensayo de actividad en medio líquido de fracciones de las cromatografías realizadas.	54
Figura 3.22. Zimograma a las fracciones con mayor actividad de cada celulasa.	55
Figura 3.23. Gel de Poliacrilamida al 12,5% SDS al 0,1% p/v a las fracciones de HIC con mayor actividad.	56
Figura 3.24. Porcentaje de aumento de DRT respecto a la celulasa nativa.	58
Figura 3.25. Relación entre aumento porcentual de DRT versus aumento porcentual de hidrofobicidad.	59
Figura 7.1. Estructura química aminoácidos apolares alifáticos.	69
Figura 7.2. Estructura química aminoácidos aromáticos.	70
Figura 7.3. Estructura química aminoácidos polares sin carga.	70
Figura 7.4. Estructura química aminoácidos cargados positivamente.	71
Figura 7.5. Estructura química aminoácidos cargados negativamente.	71
Figura 7.6. Curva de Calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford	76
Figura 7.7. Curva de Calibración del método de DNS para la detección de azúcares reductores.	77
Figura 7.8. Curva de Calibración para determinar el Peso Molecular de una proteína desde un gel de Poliacrilamida.	77
Figura 7.9. Comparación entre actividad específica residual y su pronóstico.	84
Figura 7.10. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WildType (2).	85
Figura 7.11. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WP2 (2).	85
Figura 7.12. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP2Y (2).	86
Figura 7.13. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP3 (2).	86
Figura 7.14. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-Y3(2).	87
Figura 7.15. Ensayo de actividad en medio líquido de fracciones de las cromatografías realizadas (2).	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Listado de Reactivos. ....	21
Tabla 2.2. Enzimas de Restricción utilizadas.....	23
Tabla 2.3. Equipos utilizados en laboratorio. ....	24
Tabla 2.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas .....	24
Tabla 3.1. Estimación de las hidrofobicidades superficiales .....	42
Tabla 3.2. Valores teóricos de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos .....	49
Tabla 3.3. Peso molecular de la celulasa nativa y sus variantes .....	57
Tabla 3.4. DRT de la celulasa nativa y modificadas.....	58
Tabla 7.1. Composición del gel separador .....	74
Tabla 7.2. Composición del gel concentrador .....	74
Tabla 7.3. Variables a considerar.....	83
Tabla 7.4. Estadísticas de la regresión.....	83
Tabla 7.5. Análisis de Varianza. ....	83
Tabla 7.6. Determinación de coeficientes, error típico, estadístico t y probabilidades.....	83
Tabla 7.7. Análisis de los residuales .....	84
Tabla 7.8. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-WildType .....	89
Tabla 7.9. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-WP2.....	89
Tabla 7.10. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-YP2Y .....	90
Tabla 7.11. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-YP3 .....	90
Tabla 7.12. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-Y3 .....	91

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
Amp	ampicilina
BSA	seroalbúmina de bovino
cm	centímetro
°C	grado Celcius
μF	microfaraday
μg	microgramo
μL	microlitro
CMC	carboximetil celulosa
D.O.	densidad óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido dinitrosalicílico
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfato
HEPES	ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
EDTA	etilendiaminotetraacetato
g	fuerza de gravedad
gr	gramo
h	hora
IPTG	isopropil tio-b-D-galactósido
KDa	kilodalton
Kb	kilobase
L	litro
LB	Luria Bertani
M	molar
mg	miligramo
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
ms	milisegundo
nm	nanómetro

<b>Abreviaturas</b>	<b>Significado</b>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de polimerasa
rpm	revoluciones por minuto
RNA	ácido Ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Tm	temperatura de <i>melting</i>
Tris (TRISMA)	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
TES	Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; 20% Sacarosa
U	unidad de actividad enzimática
U.D.O.	unidades de densidad óptica
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido

## 1. INTRODUCCIÓN

La industria de la biotecnología ha evolucionado significativamente desde la introducción en 1982 de la insulina humana sintetizada en *E. coli*. Desde entonces más de 75 proteínas recombinantes han sido introducidas en el mercado, ya sean hormonas, citocinas, anticuerpos monoclonales y vacunas, entre otras (Ahuja, 2000).

La separación y purificación de una proteína desde una fermentación a gran escala, es un elemento crítico en los procesos modernos biotecnológicos, puesto que representa el mayor costo industrial. Por lo tanto, una ventaja competitiva en la producción dependerá no sólo de innovaciones en biología molecular, inmunología y otras áreas de ciencias biológicas básicas, sino además de la innovación y optimización en la separación y procesos río abajo (Asenjo, 1990).

Factores claves que tienen impacto en la elección de la estrategia de separación son el rendimiento, tamaño de partícula del producto y de las impurezas, y la concentración de producto final deseado (Keller y cols., 2001). Otro factor importante es la pureza del producto final; por ejemplo para proteínas de uso terapéutico ésta debe ser alrededor del 99,99%, por el contrario del caso de insumos industriales, que sólo tiene que ser superior al 40%.

Una de las técnicas altamente selectivas de separación es la cromatografía, la cual es usada comúnmente para aislar y purificar proteínas (Asenjo, 1990). Dentro de las cromatografías más utilizadas se encuentra la de interacción hidrofóbica, que se basa en la interacción entre una fase estacionaria apolar y aminoácidos apolares superficiales de las proteínas. Mientras más hidrofóbicas sean éstas, mayor será la interacción y las proteínas se retendrán con más fuerza en la columna; luego al disminuir la fuerza iónica aplicando un gradiente decreciente de sal, éstas eluirán en fases posteriores de la gradiente.

Recientes estudios han demostrado que es posible modificar la hidrofobicidad superficial de las proteínas mediante la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos (Fexby y cols., 2004; Robinson, 2008; Montecinos, 2009). El presente trabajo de memoria está orientado a estudiar el efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación de una endoglucanasa recombinante, este último paso se realizará utilizando la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

## **1.1 Descripción del proyecto y justificación**

El presente trabajo de título se enmarca dentro del proyecto de investigación Fondecyt N° 1080143 denominado *“Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”*, cuyo objetivo es estudiar el efecto que tiene la adición de un extremo polipeptídico (tag) en el proceso de purificación de una proteína recombinante por cromatografía de interacción hidrofóbica.

Como hipótesis del estudio, se tiene que es posible mejorar la purificación de proteínas por HIC a través de la adición de un extremo hidrofóbico a la proteína de interés. La presencia de este extremo aumentaría la hidrofobicidad superficial total de la proteína, lo que permitiría aumentar el tiempo de retención de la misma y, de esta manera, generar una elución diferenciada de la proteína de interés respecto a las proteínas contaminantes.

Para la construcción de los extremos hidrofóbicos a adicionar a la enzima endoglucanasa, se proponen distintas combinaciones de aminoácidos, y evaluar cualitativamente qué combinación proporcionaría mejoras en la purificación por HIC, analizando también posibles efectos en la expresión, recuperación y actividad de dicha enzima modificada.

## **1.2 Celulasas**

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos  $\beta$ -1,4 de la celulosa, polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa, que forman una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou y cols., 1981; Fan y cols., 1982; Ljungdahl & Eriksson, 1985).

La celulosa es el principal componente estructural de los vegetales, y funciona como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes de sabor o de interés para la industria alimentaria, textil, de papel, entre otras (Rastogi y cols., 1998; Sarker y cols., 1999; Lee y cols., 2005, Bhat, 2000).

Las enzimas celulasas son producidas por una gran variedad de microorganismos, ya sean bacterias aeróbicas: *Cellulomonas sp.*, *Cellvibrio sp.*, *Microbispora bispora* y *Thermomonospora sp.*; bacterias anaeróbicas: *Acetivibrio cellulolyticus*, *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens* y *Clostridium thermocellum*; hongos aeróbicos: *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei*, *Penicillium pinophilum*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Fusarium solani*, *Talaromyces emersonii* y *Trichoderma koningii*; hongos aeróbicos termofílicos: *Sporotrichum thermophile*, *Thermoascus aurantiacus* y *Humicola insolens* y hongos anaeróbicos mesofílicos: *Neocallimastix frontalis*, *Piromonas communis*, *Sphaeromonas communis* (Forsberg & Groleau, 1982; Beguin & Aubert, 1993). Sin embargo, sólo algunos de ellos son capaces de liberarlas al medio extracelular (Ljungdahl & Eriksson, 1985; Marsden & Gray, 1986; Bhat & Bhat, 1997; Dongowski y cols., 2002).

El proceso de degradación de la celulosa parece ser diferente para distintas especies, especialmente entre microorganismos aeróbicos y anaeróbicos. Microorganismos aeróbicos como *Trichoderma reesei* secretan una combinación de endoglucanasas y celobiohidrolasas, las cuales atacan su sustrato individualmente pero de forma sinérgica. Por otro lado, bacterias anaeróbicas como *Clostridium cellulovorans*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium josui*, y *Clostridium thermocellum*, producen complejos multienzimáticos extracelulares que tienen alta actividad degradando celulosa cristalina (Ohara y cols., 2000).

La producción microbiana de la celulasa está sujeta a diferentes mecanismos de regulación. A partir de los estudios realizados tanto en hongos como en bacterias se ha propuesto un modelo general de regulación controlado principalmente por dos mecanismos. Por un lado, la inducción que se lleva a cabo por el sustrato natural celulosa, y por otro la represión por fuentes de carbono de bajo peso molecular como glucosa y celobiosa. Este modelo sugiere, además, la existencia de un nivel basal de enzimas; aquí el microorganismo sintetiza y exporta a la superficie celular pequeñas cantidades de enzimas, que inician la hidrólisis del sustrato y producen pequeños oligosacáridos que entran a la célula siendo los verdaderos inductores que encienden la transcripción de los genes (Pérez y cols., 2002).

### **1.2.1 Clasificación de celulasas**

Las celulasas han sido clasificadas según su actividad en: endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces 1,4- $\beta$ -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de la cadena; celobiohidrolasas o

exoglucanasas, encargadas de hidrolizar los enlaces 1,4-  $\beta$ - glucosídicos, liberando celobiosa desde los extremos no reducidos de la cadena; y  $\beta$ -glucosidasas, que catalizan la hidrólisis de la celobiosa liberando  $\beta$ -D-glucosa.

Además, existe una clasificación en familias basada en la similitud de las secuencias primarias de las glicosil hidrolasas. A partir de ésta se encontró (i) enzimas con EC distintos que pertenecían a la misma familia y (ii) enzimas con especificidad de sustrato similares que pertenecían a familias distintas (Henrissat, 1991). Actualmente, esta clasificación comprende 115 familias las cuales pueden ser revisadas en la base de datos de CAZY (Carbohydrate Active Enzymes, [www.cazy.org](http://www.cazy.org)).

### **1.2.2 Estructura y características de celulasas**

Una celulasa presenta como estructura fundamental un módulo catalítico unido a un dominio de unión a carbohidratos (CBD) por una secuencia corta rica en prolina y/o hidroxí-aminoácidos. El dominio CBD se puede encontrar tanto en el extremo N-terminal, como en el extremos C-terminal de estas enzimas, presentando dos cisteínas conservadas en el dominio CBD, una a cada extremo del dominio, que parecen estar involucradas en los puentes disulfuro. También hay cuatro triptófanos conservados, de los cuales, dos se relacionan con la unión a la celulosa (Baene y cols., 2009).

### **1.2.3 Modo de acción de celulasas**

El mecanismo propuesto en la literatura para la degradación de la celulosa puede resumirse en tres etapas: Primero endo  $\beta$ -1,4-glucanasas actúan al azar sobre los enlaces  $\beta$ -1,4 glucosídicos internos presentes entre las unidades de glucosa que forman la molécula de la celulosa, y convierte las cadenas largas a oligosacáridos, los cuales mantienen la configuración  $\beta$  de su estructura. La acción de esta enzima es sobre las regiones amorfas de la molécula de celulosa o sobre la superficie de las microfibrillas, y tiene como resultado la disminución de la longitud de la cadena de celulosa y la creación de nuevos extremos reactivos que sirven de sustrato para la posterior acción de la exo  $\beta$ -1,4-glucanasa (Ryu & Mandels, 1980; Chou y cols., 1981; Philippidis & Smith, 1995; Lee, 1997).

En la segunda etapa actúa la exo  $\beta$ -1,4-glucanasa, la cual es una enzima que corta la cadena 1,4  $\beta$ -D-glucano a partir del extremo no reductor de la molécula de celulosa y de las celodextrinas, lo que provoca la remoción de unidades de celobiosa o glucosa (Ryu & Mandels, 1980; Marsden & Gray, 1986; Philippidis & Smith, 1995; Bhat & Bhat, 1997; Lee, 1997). Ambas enzimas endoglucanasa y exoglucanasa son inhibidas por uno de los productos de la hidrólisis enzimática, la celobiosa, lo que disminuye la eficiencia de la hidrólisis (Lee, 1997; Hahn-Hägerdal & Palmqvist, 2000).

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman y cols., 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la  $\beta$ -1,4-glucosidasa (Ladisich y cols., 1983; Ljungdahl & Eriksson, 1985; Philippidis & Smith, 1995; Lee, 1997).

A continuación se presenta la Figura 1.1, donde se resume el mecanismo recién expuesto.

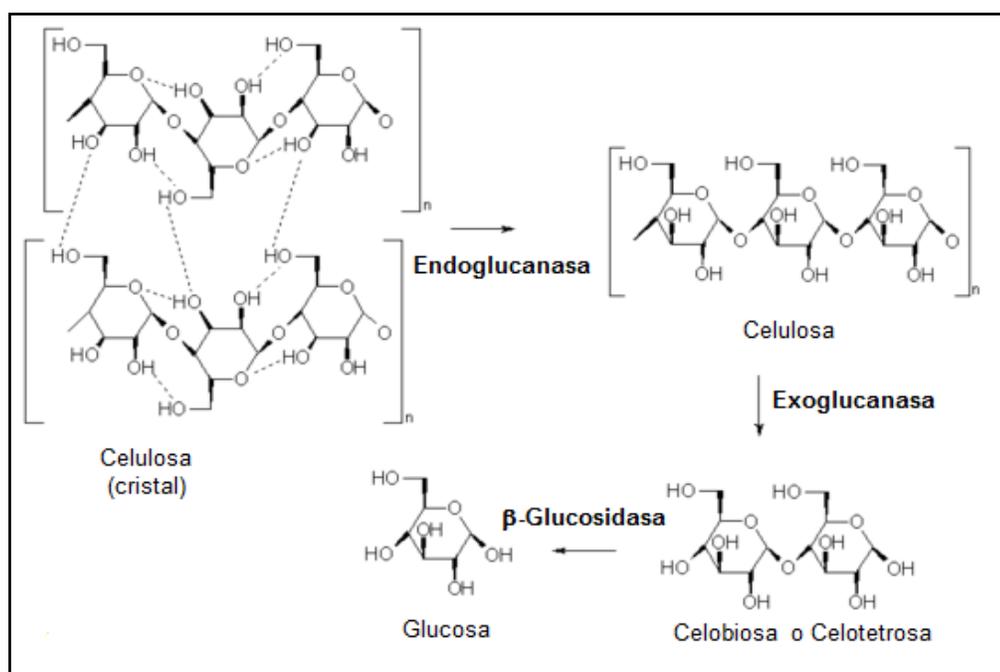


Figura 1.1. Modelo de degradación de celulosa por un complejo enzimático multicomponente de celulosa.

#### 1.2.4 Aplicaciones industriales de celulasas

La biotecnología de las celulasas empezó al principio de los años 80, primero en la alimentación animal seguida por aplicaciones en la industria de alimentos. Posteriormente esta enzima empezó a usarse en las industrias de lavandería, textil y de la pulpa y papel. En las últimas dos décadas su uso se ha incrementado en forma considerable y actualmente, junto con la xilanasa, representan cerca del 20% del mercado mundial de las enzimas (Pérez y cols., 2002).

En la industria del papel, que alcanza ventas de millones de dólares en Estados Unidos y Europa (Beilen & Li, 2002), las celulasas y hemicelulasas usadas en etapas de pretratamiento permiten una mejor deslignificación y ahorro en reactivos químicos en la etapa posterior de blanqueamiento (Dienes y cols., 2003). Las celulasas también mejoran la remoción de tintas de papeles de diario viejos, dando mejores resultados que cuando se utilizan químicos (Pèlach. y cols., 2002)

Por otro lado, la industria del textil se ha convertido en los últimos 14 años en una de las principales áreas para las aplicaciones industriales de enzimas. Las celulasas, del tipo **endoglucanasas**, representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho que cerca del 70 % de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Las aplicaciones más relevantes en esta área son: distinción de prendas para dar apariencia de gastado, tratamiento de las telas para eliminar imperfecciones de las fibras, preparación de la tela previa a tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido (Galante & Formantici, 2003).

El uso de aditivos en los detergentes representa la mayor aplicación en la industria de las enzimas. Contrariamente a las otras enzimas utilizadas en detergentes, la **endoglucanasa** no degrada manchas, si no que es activa en las fibras de celulosa de la ropa, alcanzando uno o más de los siguientes efectos: remoción de manchas de suciedad atrapada en las fibrillas de celulosa; suavidad permanente de la ropa; mejoramiento del color por la remoción de las pelusas formadas por la fibrilación; desfibrilación con efecto antidepositante en la suciedad. Adicionalmente se le suma la cualidad de no dañar el algodón u otros materiales de celulosa de la ropa, manteniendo sin cambios la resistencia a la tensión de la tela. (Galante & Formantici, 2003; Shirai y cols., 2001).

Dentro de la industria alimentaria, las celulasas se usan para favorecer la extracción y filtración de jugos de frutas o verduras, filtración de mostos, extracción de aceites comestibles, etc. Por ejemplo, en la extracción de jugo de naranja y zanahoria, los preparados enzimáticos tienen un enorme potencial de aplicación, por un lado se incrementa el porcentaje de extracción de los jugos; y por otro lado, el jugo presenta un mejor sabor (Das y cols., 1994). La maceración enzimática es una etapa importante previa, en cualquier proceso industrial en donde se utiliza el tratamiento térmico, por dos razones: primero, para evitar o disminuir la pérdida de los componentes nutricionales presentes en el tejido vegetal y segundo, para evitar la deterioración de las propiedades sensoriales del producto como son la textura y el sabor. (Dinnella y cols., 1998).

Mediante la degradación enzimática de los polisacáridos presentes en el coco es posible liberar la leche de coco extra, que se encuentra retenida en el residuo del fruto extraído (Rastogi y cols., 1998); de la misma manera es posible realizar una extracción del almidón a partir del residuo de desecho de sago (Dos-Mohd y cols., 2001), del aceite de palta (Freitas y cols., 1993), soya (Agrawal y cols., 1997), semillas de ajonjolí, de cacahuete, girasol (Sarker y cols., 1999), oliva (Garrido y cols., 2001), y salvado de arroz (Khare y cols., 2001)

En la industria de la cerveza y el vino las celulasas tienen diversas y atractivas aplicaciones, una de ellas es en el proceso de producción de la cerveza, en donde las celulasas del tipo **endoglucanasa** son utilizadas para la hidrólisis del enlace 1,4- $\beta$ -glucosídicos de las semillas de cebada, lo que reduce la viscosidad y libera azúcares reducidos durante la primera fermentación. Con esto se obtiene un aumento de eficiencia en dicha etapa, y en la etapa de filtración, y un mejoramiento en la calidad de la cerveza. En la industria del vino, celulasas del tipo  $\beta$ -glucosidasa son utilizadas para el mejoramiento del aroma del vino. Así mismo el uso de **endoglucanasas** es conocido para el mejoramiento en las eficiencias de las etapas de maceración, clarificación y filtración, así como también para la obtención de un vino de mejor calidad y estabilidad (Bhat, 2000).

La extracción de colorantes es otra aplicación atribuida a algunos preparados enzimáticos, específicamente la producción de xantófilas extraídas de los pétalos de caléndula (Navarrete-Bolaños y cols., 2005)

La celulasa puede ser beneficiosa para la comida y las alergias ambientales, el abandono de drogas, la eliminación de células, la limpieza del colon y los síndromes de dolor, Cándida (infecciones por la

levadura), gases, hinchazón, las alergias agudas a la comida, el dolor de la cara o parálisis y ayuda a remediar los problemas de la digestión como mala absorción (Baene y cols., 2009).

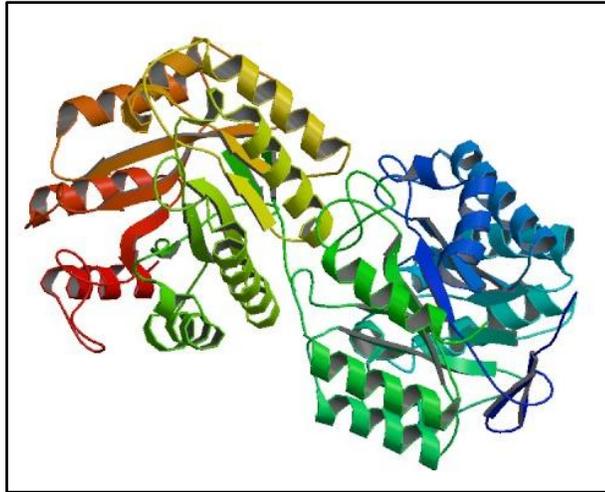
La producción de etanol proveniente de biomasa lignocelulósica, y por ende, mediante el uso de celulasas, emerge como una de las más importantes tecnologías para la producción sostenida de combustibles renovables utilizados en el transporte. El etanol posee más alto índice de octanaje que la gasolina y produce menos emisiones, por lo tanto, ha sido reconocido como un sustituto y/o aditivo para la gasolina (Wyman, 1999). Debido a estas ventajas aparentes, y también por ser una alternativa renovable para las gasolinas existentes usadas en transportes, existe hoy un interés en aumentar la comercialización de tecnologías para la producción de etanol a partir de biomasa de bajo costo (Schell y cols., 2004). La mayor parte del etanol producido en el mundo es usualmente originario del almidón o de la sacarosa (melaza o jugo de caña), pero la tecnología para la producción de etanol proveniente de plantas no comestibles, está siendo desarrollada rápidamente para una producción a gran escala, que será una realidad en los años venideros (Lin y cols., 2006). La producción de etanol proveniente de biomasa lignocelulósica, involucra los diversos pasos de pre-tratamiento, hidrólisis, (sacarificación) y la recuperación del etanol (van Zessen, 2003). La hidrólisis de la biomasa, es esencial para la generación de azúcares fermentables que son luego convertidos en etanol, mediante la acción microbiana. La hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática son, principalmente, empleadas para la hidrólisis de biomasa con diferentes eficiencias dependiendo de las condiciones del tratamiento, tipo de biomasa y propiedades del agente hidrolítico. La primera es una tecnología madura pero con las desventajas de generar desechos ácidos peligrosos y las dificultades técnicas de recuperar el azúcar desde el ácido. El método enzimático, por su parte, es más eficiente y ocurre bajo condiciones ambientales sin generar ningún desecho tóxico, además de tener mucho más potencial para ser mejorado en costo y eficiencia (Mishima y cols., 2006).

### **1.2.5 Celulasa a utilizar como proteína modelo**

La celulasa en estudio corresponde a una endoglucanasa extracelular de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas sp.* A partir de su secuencia aminoacídica, utilizando el programa **Compute pI/Mw tool** ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)), se predijo que su punto isoeléctrico es 4,57 y su peso molecular es 32 kDa.

Dado que no se contaba con la estructura tridimensional de esta enzima, lo cual era trascendental para determinar su área superficial y con esto su hidrofobicidad, se utilizó la enzima que poseía una mayor identidad (88,4%) con la misma, cel5G de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, cuyo código pdb es 1TVN. Ésta resulta ser un buen modelo puesto que ambas son endoglucanasas extracelulares que provienen de microorganismos antárticos.

En la Figura 1.2 es posible apreciar la estructura tridimensional de la enzima a utilizar como modelo.



**Figura 1.2. Estructura tridimensional del dominio catalítico de cel5G.** Endoglucanasa cel5G proveniente de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, perteneciente a la familia 5 de glicosil hidrolasas, cuyo código pdb es 1TVN (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1TVN>).

### 1.3 Características de los aminoácidos

Los aminoácidos son la unidad básica de las proteínas, cuya unión por medio de enlaces covalentes en secuencias lineales conforman finalmente la cadena polipeptídica. La estructura general de los aminoácidos incluye un grupo amino ( $\text{NH}_2$ ) y un grupo carboxilo ( $\text{COOH}$ ), ambos unidos al carbono  $\alpha$ . Además, el carbono  $\alpha$  está unido a un hidrógeno y al grupo de cadena lateral (R). Todos los aminoácidos naturales son alfa aminoácidos, puesto que el grupo amino se encuentra en la posición alfa y se pueden clasificar de diversas formas, dependiendo del grupo radical de cada uno, lo que genera diferencias entre ellos de tamaño, estructura o carga eléctrica (ver Figura 1.3).

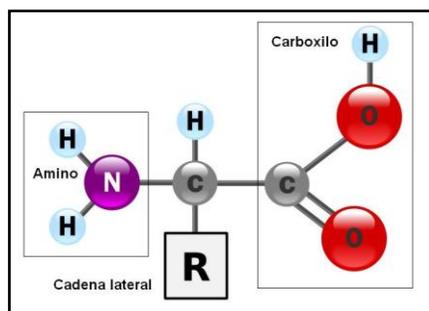


Figura 1.3. Estructura básica de un aminoácido.

La principal propiedad a partir de la cual se clasifican los aminoácidos corresponde a la polaridad del grupo R, el cual tiene directa incidencia en la interacción con agua al pH biológico. De esta clasificación se obtienen 5 grupos: apolares alifáticos, apolares aromáticos, polares sin carga y cargados, positiva y negativamente.

El trabajo desarrollado se centró en los aminoácidos pertenecientes a los grupos apolares alifáticos y aromáticos. Las características del resto de los aminoácidos se detallan en el Anexo A.

**Grupo R apolares alifáticos:** corresponden a grupos con cadena lateral apolar o hidrofóbica. Dentro de este grupo se encuentran las de cadenas laterales voluminosas, como ocurre con **Alanina, Valina, Metionina, Leucina e Isoleucina**. **Glicina**, debido a su pequeño tamaño, genera un mínimo impedimento estérico permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. **Prolina**, a diferencia del resto de los aminoácidos posee un grupo amino secundario, formando un anillo alifático (ver Figura 1.4). Este anillo le da rigidez a la molécula, por lo que suele intercalarse entre aminoácidos hidrofóbicos de manera de impedir la formación de estructuras secundarias, reduciendo así la flexibilidad del extremo polipeptídico.

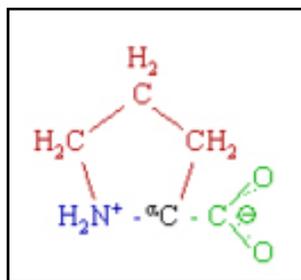


Figura 1.4. Estructura química del aminoácido Prolina (P).

**Grupo R apolares aromáticos:** estos grupos aromáticos conforman la cadena lateral de **Fenilalanina** (benceno), **Tirosina** (fenol) y **Triptófano** (indol), los que son relativamente apolares. Estos aminoácidos pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se concentran. A continuación se presentan sus estructuras químicas en la Figura 1.5 y Figura 1.6.

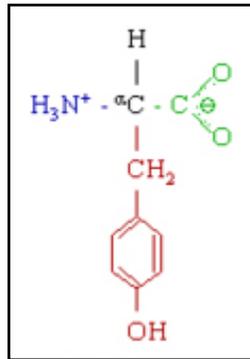


Figura 1.5. Estructura química del aminoácido Tirosina (Y).

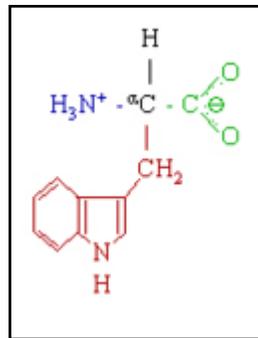


Figura 1.6. Estructura química del aminoácido Triptófano (W).

#### 1.4 Interacciones hidrofóbicas

Se entiende por hidrofobicidad a la repulsión entre un compuesto apolar y un ambiente polar, tal como el agua. Este término ha sido empleado para referirse a ciertos modelos moleculares que involucran el ordenamiento de moléculas de agua alrededor de solutos apolares (Dill y *cols.*, 1990).

En los sistemas biológicos las interacciones hidrofóbicas que se producen entre los aminoácidos son de gran importancia, puesto que son las principales fuerzas responsables del plegamiento de proteínas globulares. Además, son causantes de la asociación entre subunidades, permiten la unión de pequeñas

moléculas a las proteínas (como en el caso de las enzimas) y también son las responsables de la asociación de las proteínas con fosfolípidos y otros lípidos para formar membranas biológicas (Eriksson y cols., 1998)

## **1.5 Técnicas de purificación de proteínas**

Procesos de purificación de proteínas son llevados a cabo a través de varias etapas cromatográficas. Cada una de estas técnicas explota las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas entre la proteína deseada y los contaminantes de la mezcla a ser purificada. La cromatografía de afinidad explota las interacciones bioquímicas específicas entre la proteína y el ligando de la matriz; cromatografía de intercambio aniónico explota las interacciones electrostáticas a diferentes pH; cromatografía de interacción hidrofóbica está basada en las interacciones hidrofóbicas y cromatografía de filtración en gel está basada en diferencias de tamaño (Lienqueo y cols., 2009).

Los métodos más utilizados a escala industrial son las cromatografías en lecho fijo, donde la columna está rellena de un material sólido (fase estacionaria o matriz) con las características químicas adecuadas al tipo de cromatografía, y una solución tampón se hace pasar a través de ella (fase móvil).

### **1.5.1 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

La Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) corresponde a una cromatografía de adsorción, lo que implica que existe una interacción entre los grupos hidrofóbicos superficiales de las proteínas y los sitios hidrofóbicos de la matriz. Cuando las proteínas se encuentran en solución acuosa, localizan la mayoría de sus sitios hidrofóbicos en su interior, pero quedan algunos sitios expuestos que por razones termodinámicas interactúan con la matriz hidrofóbica (Eriksson y cols., 1998).

En el proceso de HIC, la muestra es aplicada bajo condiciones de alta concentración de sal, lo que favorece la interacción entre las zonas hidrofóbicas de las proteínas y la matriz, y luego es eluída por diferentes estrategias tales como, la disminución de fuerza iónica, disminución de la tensión superficial, adición de detergente o cambios de temperatura (Roe y cols., 1989).

El proceso cromatográfico HIC consta de las siguientes etapas (Lienqueo y cols., 1999):

1. Ambientación de la columna con un buffer de elevada fuerza iónica, utilizando usualmente sulfato de amonio 1,5-2,0 M o Cloruro de Sodio 2,0-4,0 M. (Ver Figura 1.7)

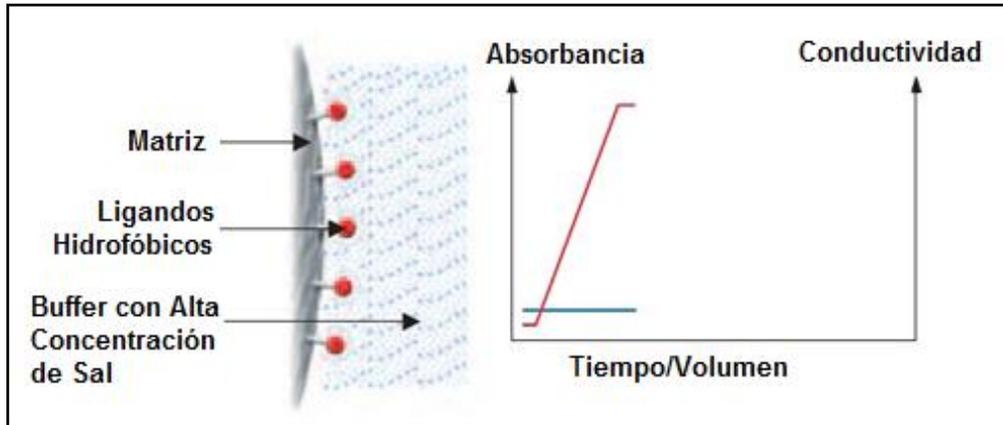


Figura 1.7. Primera etapa en HIC: Ambientación de la Columna.

2. Inyección de la muestra, la que contiene igual concentración de sal que el buffer de equilibrio. Las proteínas se adsorben según su grado de interacción con la matriz. (Ver Figura 1.8)

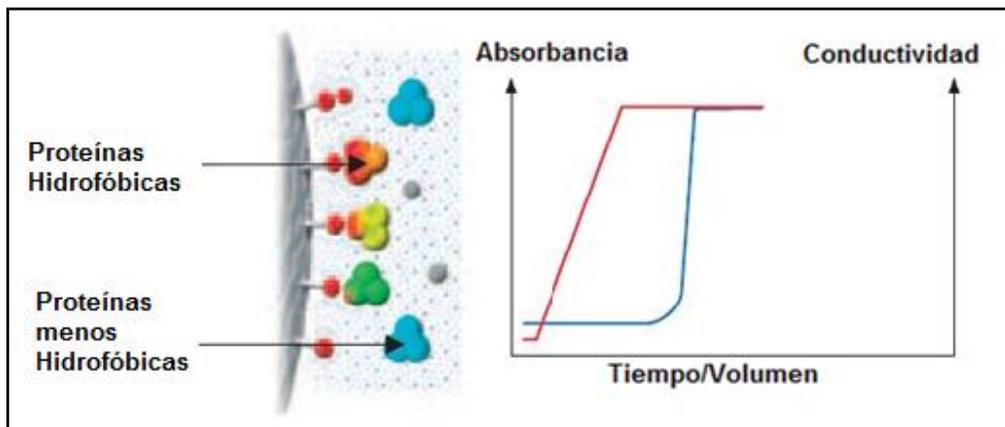


Figura 1.8. Segunda etapa HIC: Inyección de la muestra.

3. Formación de un gradiente decreciente de sal, en esta etapa se produce la elución o desorción de las proteínas de la matriz. Las más hidrofílicas eluyen primero y las más hidrofóbicas al final, ya que son retenidas con más fuerza por la matriz. (Ver Figura 1.9)

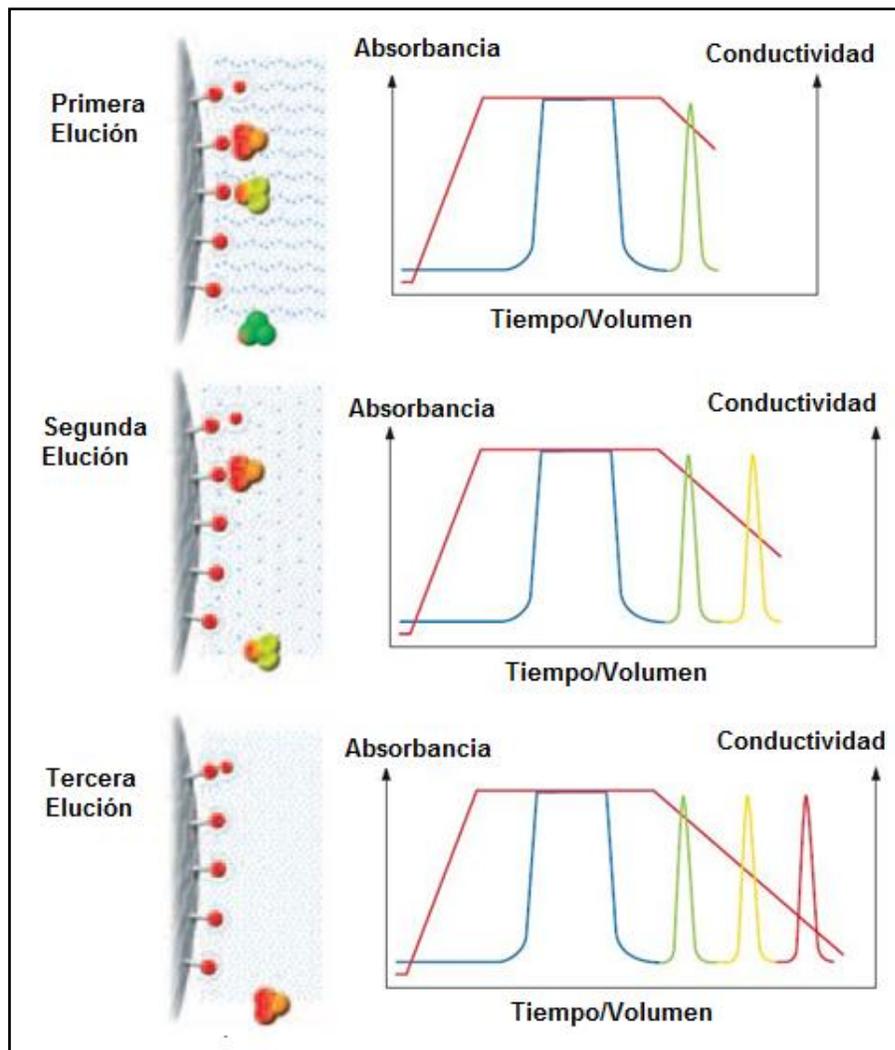


Figura 1.9. Tercera etapa en HIC: Elución de las proteínas.

4. Regeneración de la matriz, se equilibra la columna con el buffer inicial de elevada concentración de sal.

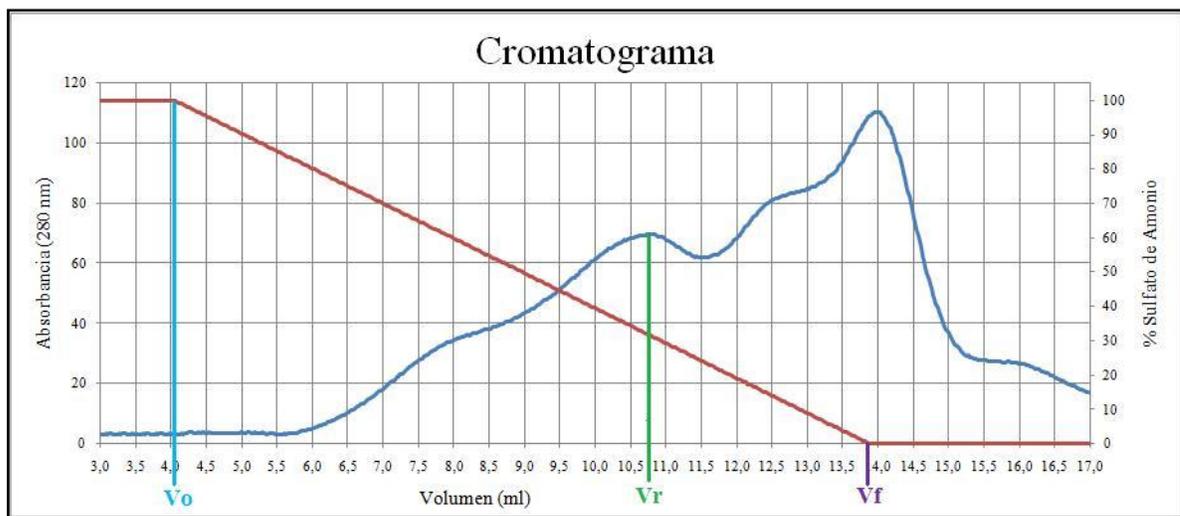
### 1.6 Determinación de los tiempos de retención en HIC

En las cromatografías, el Tiempo de Retención Adimensional (DRT) se calcula a partir de los tiempos o volúmenes a los cuales se inicia ( $t_0$ ,  $V_0$ ) y finaliza ( $t_f$ ,  $V_f$ ) el gradiente de elución, y del tiempo o volumen al cual eluye la proteína de interés ( $t_r$ ,  $V_r$ ).

$$DRT = \frac{t_r - t_0}{t_f - t_0} \quad \text{o} \quad DRT = \frac{V_r - V_0}{V_f - V_0} \quad \text{Ecuación 1}$$

El máximo valor de DRT corresponde a 1, y corresponde a la proteína más hidrofóbica y soluble, que generalmente corresponde a proteína de membrana.

En la Figura 1.10 se muestra un cromatograma típico y los parámetros a considerar para determinar los DRT.



**Figura 1.10. Esquema de un Cromatograma de HIC y parámetros a considerar.**  $V_0$ : volumen inicial donde comienza el gradiente decreciente de sal,  $V_f$ : volumen final correspondiente a donde termina el gradiente decreciente de sal,  $V_r$ : volumen de elución de la proteína de interés.

### 1.7 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos

Las proteínas pueden ser modificadas mediante el reemplazo de aminoácidos específicos, técnica denominada mutación sitio-dirigida o bien adicionar pequeños fragmentos polipeptídicos en los extremos o al interior de la secuencia que codifica para la proteína nativa.

Basándose en las propiedades de los distintos aminoácidos, es posible la modificación de propiedades fisicoquímicas o biológicas de la proteína de interés. Con esto, es posible aumentar su tamaño, hidrofobicidad, alterar estructura tridimensional generando un cambio en su sitio activo y con ello afectar su función, etc.

Una de las más recientes técnicas utilizadas para modificar proteínas es la adición de extremos polipeptídicos que potencian o añaden alguna propiedad a la proteína nativa, con el fin de reducir el número de etapas de purificación y disminuir pérdidas durante el proceso (Simeonidis y cols., 2005). Estos extremos o “tags” pueden ser biomoléculas grandes que presenten alguna afinidad específica hacia otra molécula, o bien pueden ser pequeñas y modificar propiedades físicas de una proteína (Steffens y cols., 1998).

El extremo polipeptídico más usado es la cola de histidinas, la cual permite a las proteínas ser purificadas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC). Desafortunadamente, esta técnica cromatográfica es, en algunos casos, muy cara e incompatible con su uso en procesos de gran escala. Por esta razón, el uso de extremos polipeptídicos que exploten otra propiedad, como la hidrofobicidad, han sido considerados y están actualmente en estudio.

Debido a la alta fuerza de las interacciones hidrofóbicas, se postula que los extremos compuestos por aminoácidos altamente hidrofóbicos pueden ser una herramienta útil en los procesos de purificación de proteínas. Por esta razón, se han generado proteínas con extremos (“tagged proteins”) compuestas por residuos hidrofóbicos, ya que generan un alto efecto sobre la hidrofobicidad superficial relativa de la proteína (Fexby y cols., 2004; Robinson, 2008; Montecinos, 2009).

Si es el objetivo es aumentar la hidrofobicidad global de la proteína, los candidatos a considerar, para conformar el péptido a unirse, son los aminoácidos hidrofóbicos aromáticos debido a su gran tamaño. De esta forma, los extremos más utilizados corresponden primeramente a cadenas de triptófanos, seguido de fenilalaninas, tirosinas e isoleucinas (Fexby y cols., 2004).

Los extremos más utilizados de alto valor hidrofóbico corresponden a repeticiones de triptófano y prolina. Si bien la prolina no clasifica como aminoácido hidrofóbico, se introduce frecuentemente debido a que la estructura rígida del anillo previene la formación de estructuras secundarias, y de esta forma se espera que la superficie del extremo se encuentre mayormente expuesta al medio.

## 1.8 Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de una proteína

Existen diversas formas de determinar la hidrofobicidad superficial de una proteína, a continuación se presenta una de ellas, la cual corresponde a la utilizada en el presente trabajo.

La hidrofobicidad superficial de una proteína es estimada en función del área total expuesta para cada aminoácido y su valor de hidrofobicidad presentado en la escala de Miyazawa y Jernigan, como se muestra en la ecuación 2 (Henríquez, 2005).

$$\Phi_{superficie} = \sum_{i=1}^{20} \Phi_{aai} \cdot r_{aai} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$r_{aai} = \frac{S_{aai}}{\sum_{aai} S_{aai}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $\Phi_{aai}$  es el valor de hidrofobicidad para cada aminoácido, utilizando la escala de Miyazawa y Jernigan,  $r_{aai}$  es el área superficial relativa expuesta para cada aminoácido (ver Ecuación 3), y  $S_{aai}$  es el área total expuesta para cada aminoácido; el denominador corresponde al área superficial total de la proteína.

En el caso de la proteína modificada por la adición de un extremo hidrofóbico, se propone considerar que la hidrofobicidad de la proteína permanece constante y que sólo se debe sumar la contribución relativa que ejerce cada aminoácido del extremo en la hidrofobicidad superficial de la proteína (Simeonidis y cols., 2005). Por lo tanto, la hidrofobicidad total de la proteína se calcula como se muestra en la ecuación 4.

Modelo1: Considera que la hidrofobicidad superficial del extremo se suma de manera independiente a la hidrofobicidad superficial de la proteína.

$$\Phi_{tag\_superficial} = \Phi_{superficie} + \sum_{k=1}^{20} \Phi_{tag\_aak} \cdot r_{tag\_aak} \quad \text{Ecuación 4}$$

Siendo  $\Phi_{tag\_superficial}$  la hidrofobicidad de la proteína mutada. Para calcular el área superficial relativa aportada por los aminoácidos del extremo se postula la siguiente ecuación:

$$r_{tag\_aak} = \frac{S_{tag\_aak} \cdot \eta_k}{S_p + \sum S_{tag\_aak} \cdot \eta_k} \quad \text{Ecuación 5}$$

Correspondiendo  $S_{tag\_aak}$  al área superficial del aminoácido  $aa_k$  del extremo (el cual se considera totalmente expuesto),  $\eta_k$  al número de veces que se repite el aminoácido  $aa_k$  en el extremo y  $S_p$  corresponde al área superficial expuesta de la proteína.

Finalmente, la hidrofobicidad total de la proteína modificada se calcula como se muestra en la ecuación 6:

$$\Phi_{tag\_superficial} = \sum_{i=1}^{20} \frac{S_{aai}}{S_p} \cdot \Phi_{aai} + \sum_{k=1}^{20} \frac{S_{tag\_aak} \cdot \eta_k}{S_p + \sum S_{tag\_aak} \cdot \eta_k} \cdot \Phi_{aak} \quad \text{Ecuación 6}$$

Como se puede apreciar, el segundo término corresponde al aporte del extremo considerando que no afecta a la hidrofobicidad de la proteína nativa; se asume que el extremo queda totalmente expuesto en la solución y mantiene una estructura primaria.

## 1.9 Limitaciones del uso de los extremos hidrofóbicos

Si bien las ventajas del uso de extremos hidrofóbicos son evidentes al momento de la bioseparación, este sistema presenta las desventajas de potenciales efectos negativos sobre la expresión, estabilidad y función biocatalítica de la proteína modificada. Se ha encontrado que los extremos hidrofóbicos generan cambios de expresión, por ejemplo, favorecen que la proteína quede asociada a proteínas de membrana o que se produzca una proteólisis de ella, reduciendo su obtención, o bien produciendo cambios en la estabilidad de los mRNA. El aumento de la hidrofobicidad también puede generar la asociación de multímeros, grandes agregados o la disociación en pequeños fragmentos (Fexby y cols., 2004). Un ejemplo de lo anterior consiste en una cutinasa mutada con 3 tirosinas que presentó una disminución drástica en los niveles de proteína y escasa actividad, en comparación con la cepa nativa (Robinson, 2008).

Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se estudiará el efecto de la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos (tirosina, triptófano, prolina) al extremo carboxilo terminal de la enzima endoglucanasa y su consecuente efecto en la expresión, recuperación y purificación mediante la técnica de cromatografía de interacción hidrofóbica.

## **1.10 Objetivos**

### **1.10.1 Objetivo General**

Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a una endoglucanasa recombinante extracelular en su expresión, recuperación y purificación por HIC, de manera de poder definir criterios cualitativos y/o cuantitativos que permitirán seleccionar el extremo que reporte mayores mejoras en el proceso de purificación.

### **1.10.2 Objetivos Específicos**

1. Obtener la endoglucanasa modificada con los distintos extremos hidrofóbicos, y transformar bacterias electrocompetentes para la producción de endoglucanasas recombinantes con extremos hidrofóbicos.
2. Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos hidrofóbicos en la actividad y expresión de la endoglucanasa en *E. coli*.
3. Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos hidrofóbicos en la recuperación de la endoglucanasa modificada.
4. Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos hidrofóbicos en el comportamiento de la endoglucanasa en HIC.
5. Seleccionar el mejor extremo, dentro de los propuestos, que aumente el tiempo de retención sin perder actividad celulolítica.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales

#### 2.1.1 Cepas bacterianas electrocompetentes

- *E. coli* DH5 $\alpha$
- *E. coli* BL21 (DE3)

#### 2.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados y sus respectivos proveedores se muestran en la siguiente tabla:

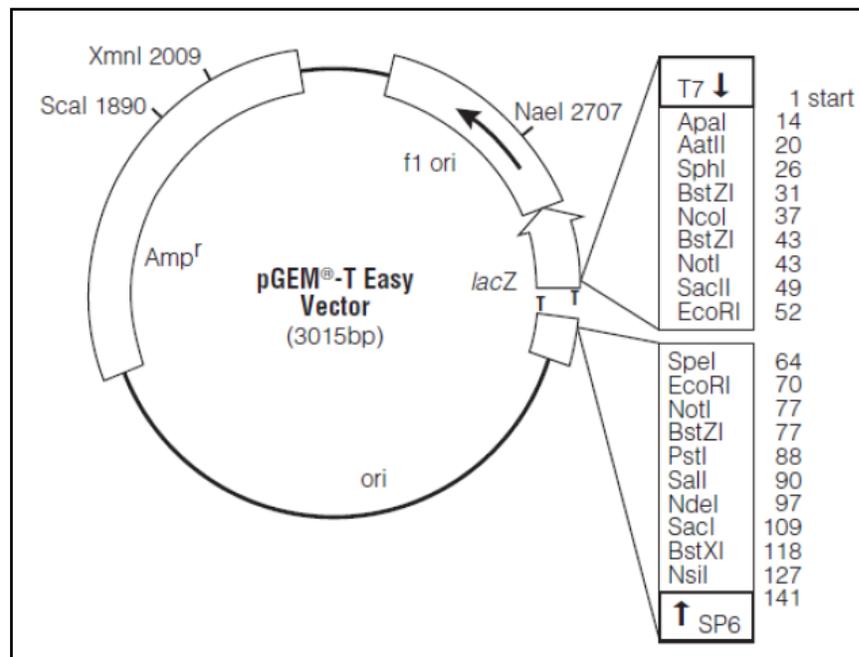
**Tabla 2.1. Listado de Reactivos.**

Proveedor	Reactivos
BiosLab	Vent DNA Polimerasa
CalBiochem	Ampicilina
Difco (DT-USA)	Triptona, extracto de levadura, medio LB, agar.
Fermelo	Agarosa.
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, IPTG, enzimas de restricción NcoI y XhoI.
IDT	Partidores.
Invitrogen (CA-USA)	T4 DNA ligasa, estándar de peso molecular 1 Kb, dNTPs, cepa <i>E. coli</i> DH5a.
J.T. Baker	Cloruro de Sodio.
Merck	El resto de las sales, ácidos, bases, bromuro de etidio y solventes de grado analítico o de biología molecular.
Novagen (WI-USA)	pET22b, <i>E. coli</i> BL21(DE3).
Promega (WI-USA)	Kit Taq DNA Polimerasa, kit pGEM <sup>®</sup> -T Easy
Qiagen	Sistemas de purificación de DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep) y extracción de DNA desde geles de agarosa (Kit QIAEX II).
Sigma (MO-USA)	X-Gal, DNS, dimetilformamida, CMC, HEPES, Tris.
Winkler	SDS, glicerol.

### 2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión

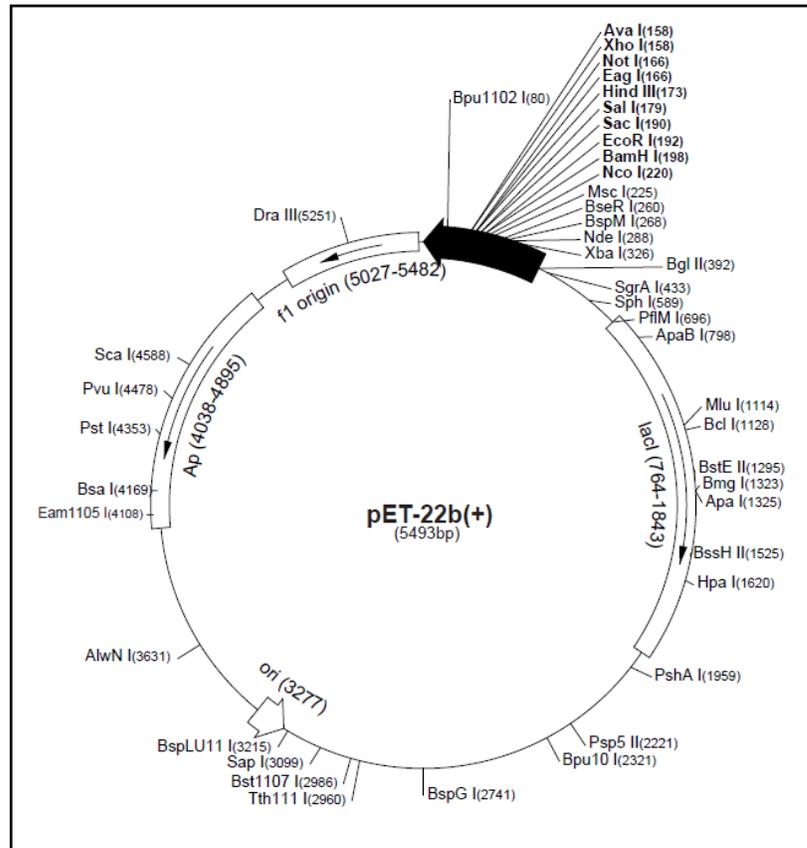
En la transformación de las cepas bacterianas se utilizaron 2 vectores: el plasmidio de clonamiento pGem<sup>®</sup>-T Easy y el plasmidio de expresión pET22b(+).

En la Figura 2.1 se muestra un esquema del vector de clonación pGem<sup>®</sup>-T Easy y sus principales puntos de referencia.



**Figura 2.1. Vector pGem<sup>®</sup>-T Easy y sus puntos de referencia.** Las regiones codificadas de utilidad para este trabajo corresponden a la resistencia a ampicilina *Amp<sup>r</sup>* y el gen *lacZ* región codificante para la  $\beta$ -galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento múltiple. En el recuadro a la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonamiento múltiple.

En la Figura 2.2 se presenta el esquema que corresponde al vector de expresión pET-22b(+):



**Figura 2.2. Vector pET-22b(+)** y sus puntos de referencia. Las regiones codificadas de utilidad para este trabajo corresponden a LacI: gen que codifica para el represor Lac y Ap: secuencia codificante para bla, contiene la región codificante para  $\beta$ -galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento. A la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento.

#### 2.1.4 Enzimas de restricción

Las enzimas utilizadas en este trabajo se muestran en la Tabla 2.2

**Tabla 2.2. Enzimas de Restricción utilizadas.**

/ indica el sitio de corte

Enzima	Sitio de Corte
XhoI	C/T C G A G G A G C T/C
NcoI	C/C A T G G G G T A C/C

## 2.1.5 Equipos

En la Tabla 2.3 se presentan los equipos utilizados con su respectivo fabricante y modelo.

**Tabla 2.3. Equipos utilizados en laboratorio.**

Equipo	Fabricante y modelo
Agitador orbital	LabLine MaxQ 4000
Centrífuga	BOECO M-24 IEC Centra MP4R rotor 224
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer comfort
Lector de D.O. (para placas de 96 pocillos)	Asys UVM 340
Termociclador	MJ Research PTC 100 Eppendorf Mastercycler Gradient
Electroporador	Gibco BRL Cell-Porator
Fuente de poder para electroforesis	BRL Model 500 Bio-Rad Power Pac 1000
Transiluminador para geles de agarosa	Vilber Loumat
Cámara fotográfica	Nikon Coolpix 4500
Cromatógrafo	ÄKTA Purifier 10

## 2.1.6 Herramientas computacionales

Las herramientas computacionales usadas en este trabajo son las siguientes:

**Tabla 2.4. Herramientas bioinformáticas utilizadas**

Herramienta	Fuente	Sitio Web
SwissModel Workspace Swiss-PdbViewer	SwissModel	<a href="http://swissmodel.expasy.org/">http://swissmodel.expasy.org/</a>
Translate Tool Compute pI/Mw tool	ExpASy	<a href="http://www.expasy.org/tools/dna.html">http://www.expasy.org/tools/dna.html</a> <a href="http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html">http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html</a>
Clustal W2	EMBL-EBI	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html?">http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html?</a>
Oligo Calc	Basic Sciences at Northwestern University Medical School	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>
Geno3d	PBIL	<a href="http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html">http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html</a>
Protein Data Bank	RCSB PDB	<a href="http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do">http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do</a>
Stride Web interface	Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der TU München	<a href="http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py">http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py</a>

### **2.1.7 Medios de cultivo líquidos y sólidos**

Los medios de cultivo tanto líquidos como sólidos se detallan en el Anexo B.

### **2.1.8 Soluciones stock**

- IPTG 0,5 M

Se prepararon 5 mL de una solución de IPTG a una concentración de 0,5 M en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius, Hannover-Alemania), se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a 4°C.

- Ampicilina 100 mg/mL

Se preparó una solución stock de 5 mL en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$ , se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a -20°C.

- X-Gal 50 mg/mL

Se preparó una solución stock de X-Gal en di-metilformamida y se almacenó a -20°C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

### **2.1.9 Síntesis de oligonucleótidos**

Los partidores diseñados para la modificación de la endoglucanasa, fueron mandados a sintetizar a Integrated DNA Technologies, IDT.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 4 *partidores antisense* y un *partidor sense* común para todas las enzimas mutadas, para que mediante la técnica de PCR se adicionara un extremo polipeptídico hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal del dominio catalítico de la endoglucanasa.

Para este diseño de *partidores* se tomó en cuenta la secuencia nucleotídica del gen del dominio catalítico de la endoglucanasa nativa (*wild type*), de manera que los *partidores* tuvieran una secuencia complementaria de 12 nucleótidos aproximadamente. Se agregó también un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* en el *partidor antisense* (región 3' de la secuencia codificante), mientras que el *partidor sense* posee un sitio de corte para la enzima de restricción *NcoI* (región 5' de la secuencia codificante). El *partidor antisense* además contiene la secuencia codificante para el extremo hidrofóbico, de entre 3 y 6 aminoácidos (9 y 18 nucleótidos) al final de la proteína, dos codones de término de la traducción y 3 nucleótidos de manera que cada *partidor* termine en C o G para fortalecer la unión entre la DNA polimerasa y la región codificante.

En el diseño de los *partidores* también se tomó en cuenta que la  $T_m$  de ambos fuera similar, que no existiera alineamiento entre ellos, ni la formación de *hairpin* internos en un mismo *partidor*. Todo esto fue determinado a través del programa **Oligo Calc** (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>).

### 2.2.2 Purificación de DNA plasmidial

El DNA Plasmidial se extrajo a partir de un cultivo en 4 mL de LB suplementado con Amp incubado toda la noche a 37°C y 200 rpm. Este cultivo fue inoculado previamente con la cepa *E. coli* que contenía el plasmidio con el gen de la endoglucanasa nativa.

El cultivo se centrifugó a 13.000 rpm por 1 min en un tubo previamente esterilizado por autoclave. De esta manera se obtuvo un sedimento de bacterias. Para la extracción del DNA se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN, y se siguieron las indicaciones del fabricante.

### **2.2.3 Síntesis del gen de celulasa modificado**

Una vez obtenido el DNA Plasmidial, se realizó PCR para cada uno de los partidores *antisense* diseñados y el *partidor sense* común, obteniendo así el gen amplificado de la celulasa con su respectivo extremo polipeptídico hidrofóbico.

Se prepararon 50 mL de mezcla de PCR para cada *partidor antisense* la cual contenía: 5  $\mu$ L de Buffer 10X, 1  $\mu$ L de dNTPs, 1  $\mu$ L de partidor sense, 1  $\mu$ L de partidor antisense, 2,5  $\mu$ L de DNA Plasmidial, 0,5  $\mu$ L de Vent DNA Polimerasa, completando el volumen final con 39  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril.

Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 30 s, 72°C por 45 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.

Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

### **2.2.4 Adición de adenina terminal a los productos de PCR**

A los fragmentos obtenidos del PCR, se incubaron 45 min a 75°C con 1  $\mu$ L de Taq Polimerasa y 0,1  $\mu$ L de dATP (100mM). Este procedimiento se realizó para la posterior ligación de ellos al vector de clonamiento, el cual posee timinas desapareadas en los extremos 3' de ambas hebras.

### **2.2.5 Clonamiento de los genes de celulasa modificados**

#### **2.2.5.1 Clonamiento en el vector pGem<sup>®</sup>-T Easy**

Para ligar al vector pGem<sup>®</sup>-T Easy los productos del PCR purificados desde el gel de agarosa al 1% p/v, se utilizó el siguiente protocolo: la mezcla de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10  $\mu$ L, con 5  $\mu$ L de Buffer de ligación 2X, 0,5  $\mu$ L de vector de clonamiento pGem<sup>®</sup>-T Easy, 3,5  $\mu$ L de inserto y 1  $\mu$ L de enzima T4-DNA ligasa. La mezcla se dejó ligando a 4°C toda la noche. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes.

### **2.2.5.2 Clonamiento en el vector de expresión pET22-b(+)**

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10  $\mu\text{L}$  en una mezcla que contenía 2,5  $\mu\text{L}$  del vector digerido, 4,5  $\mu\text{L}$  de inserto digerido con las mismas enzimas de restricción (*NcoI* y *XhoI*) 1  $\mu\text{L}$  de T4 DNA ligasa y 2  $\mu\text{L}$  de tampón T4 DNA ligasa 5X. La mezcla se dejó ligando a 4°C toda la noche. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes.

### **2.2.6 Preparación de bacterias electrocompetentes**

La preparación de bacterias electrocompetentes de *E. coli* BL21(DE3) y DH5 $\alpha$  se realizó de la misma manera. Se inocularon 10 mL de medio SOB (ver Anexo B) con una colonia de la cepa correspondiente y se creció a 37°C y 200 rpm durante toda la noche. Al cultivo se le midió D.O. a 620 nm, utilizando como blanco medio SOB estéril, y se determinó el volumen necesario para inocular 500 mL de medio estéril a una D.O. final de 0,05. Se creció entre 2 y 4 h hasta alcanzar una D.O. entre 0,6 y 0,8. El cultivo se enfrió en hielo por 10 min y se centrifugó a 5.000 x g y 4°C por 10 min. El sedimento celular se lavó 2 veces con glicerol estéril al 10% v/v. Luego del último lavado, el sedimento se resuspendió en el glicerol residual, para finalmente ser alicuotado en volúmenes precisos para su posterior utilización (entre 20 y 100  $\mu\text{L}$ ). Las bacterias electrocompetentes se mantuvieron a -80°C.

### **2.2.7 Transformación de bacterias electrocompetentes**

Se agregó 1  $\mu\text{L}$  de mezcla de ligación a 20  $\mu\text{L}$  de bacterias electrocompetentes (*E. coli* DH5 $\alpha$  o BL21(DE3)). Las condiciones del electroporador fueron: 420 V, 330  $\mu\text{F}$ , baja impedancia, tasa de carga rápida y tiempo máximo de 2,5 ms. Las bacterias transformadas se traspasaron a 1 mL de medio LB estéril y se incubaron a 37°C y a 200 rpm durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min y se descartaron 900  $\mu\text{L}$  del sobrenadante. El sedimento de células se resuspendió en el sobrenadante restante y se plaqueó sobre placas LB-Agar estériles suplementadas con Amp a una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . En el caso de bacterias electroporadas con el vector pGem<sup>®</sup>-T Easy, las placas además de contener Amp, contenían X-Gal 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e IPTG 0,5 mM. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se mantuvieron a 4°C.

### **2.2.8 PCR de colonias**

Este método se utilizó para corroborar la presencia del inserto en las colonias seleccionadas como clones positivos. En el caso de los clones que poseían el vector pGem<sup>®</sup>-T Easy, se escogieron aquellas que eran blancas, mientras que en los que contenían el vector pET22b(+) se seleccionaron las que lograron crecer en la placa. Estas colonias se transfirieron mediante una punta estéril a tubos Eppendorf con 100  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril, incubándose a 100°C durante 10 min, luego se tomaron 5  $\mu$ L y se agregaron sobre 15  $\mu$ L de mezcla de PCR. Para confirmar la presencia de inserto, se utilizaron los partidores correspondientes al fragmento clonado, utilizando el protocolo de PCR descrito en la sección 2.2.3. Luego, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

### **2.2.9 Digestión de DNA plasmidial**

Para digerir los vectores de clonamiento y expresión, se usaron las enzimas de restricción mencionadas en la sección 2.1.4. Este protocolo se utilizó para linealizar los vectores o recuperar los insertos ligados a ellos. La reacción de ligación doble contenía 2  $\mu$ L de tampón 4 (recomendado por el proveedor Promega), 2  $\mu$ L de BSA, 1  $\mu$ L de cada enzima, 10  $\mu$ L de vector con inserto y 5  $\mu$ L de agua Milli-Q estéril para así completar un volumen final de 20  $\mu$ L. Esta mezcla se dejó a 37°C por 2 h y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v.

### **2.2.10 Electroforesis**

#### **2.2.10.1 Electroforesis en gel de agarosa**

Este protocolo se realizó para determinar el tamaño de los insertos, visualizar resultados de digestión plasmidial y corroborar las transformaciones bacterianas. Las muestras se mezclaron en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v) y posteriormente se cargaron en el gel de agarosa al 1% p/v.

Este gel se preparó con tampón TAE 1X (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Como marcador se utilizó un estándar de peso molecular 1 Kpb DNA ladder y tampón de corrida TAE 1X. La electroforesis fue llevada a cabo con un voltaje constante de 200 V.

#### **2.2.10.2 Electroforesis de proteínas (SDS-Page)**

Se realizó con el fin de determinar la presencia y tamaño de la proteína en las fracciones seleccionadas de la cromatografía.

Luego de haber corrido el gel, éste fue teñido con nitrato de plata para visualizar las bandas. Ambas metodologías se encuentran en el Anexo C.

#### **2.2.11 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

Para purificar fragmentos de DNA desde un gel de agarosa, primero se corta la banda de DNA desde el gel, tratando de arrastrar lo menos posible de agarosa y que la exposición a la luz UV sea mínima. Luego, ésta es dispuesta en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril, para utilizar el sistema QIAEX II Gel Extraction y seguir las instrucciones del fabricante.

#### **2.2.12 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes**

Para inducir la expresión del gen de la endoglucanasa modificada, en un tubo falcon estéril con 8 mL de LB más Amp, se colocó una colonia de las células *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el gen de la endoglucanasa modificada en pET-22b(+) y se dejó toda la noche a 37°C y 200 rpm.

Se midió absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp, a una D.O. final de 0,05. El cultivo se creció a 30°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0,6.

Una vez alcanzada la D.O. deseada, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó toda la noche a 18°C y 200 rpm (alrededor de 4 h).

### **2.2.13 Extracción de celulasas del medio de cultivo**

La fracción extracelular se recuperó centrifugando el cultivo 7 min a 4°C y 4400 rpm.

Para extraer las proteínas de la fracción periplasmática se realizó choque osmótico a los sedimentos celulares de la sección anterior, los cuales se resuspendieron en 5 mL de Buffer TES frío y a las células en suspensión se les agregó EDTA frío a una concentración final de 1 mM.

Se agitó suavemente en hielo durante 10 min, luego se centrifugó por 10 min a 4°C y 4400 rpm, guardándose los sobrenadantes para determinar la pérdida de proteína en esta etapa.

Cada sedimento fue resuspendido en 5 mL de agua fría estéril, agitándose suavemente en hielo por 10 min. Finalmente se centrifugó a 4°C y 4400 rpm por 30 min y se recuperó el sobrenadante, correspondiente a la fracción periplasmática.

### **2.2.14 Caracterización de las celulasas modificadas**

#### **2.2.14.1 Medición de la actividad celulolítica en medio líquido**

La actividad celulolítica fue medida utilizando el método DNS con CMC al 1% p/v en buffer HEPES 50 mM pH=7,5.

Los azúcares reductores obtenidos con el método DNS son calculados midiendo la D.O. a 550 nm, luego con este valor de absorbancia se usa la curva de calibración construida con distintas concentraciones de glucosa (Ver Anexo D) y, de esta manera, se obtiene la concentración que existe en las muestras.

Para este ensayo se incuban 50 µL de muestra con 100 µL de CMC por 1 h a 37°C, luego a 50 µL de la reacción se le adiciona la misma cantidad de DNS y se incuba a 100°C por 10 minutos. Una vez enfriadas 5 min en hielo, se traspasan 50 µL a microplacas desechables de 96 pocillos y se lee la D.O. a 550 nm en un lector de placas.

#### **2.2.14.2 Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína total para las diferentes muestras fue determinado usando el ensayo de Bradford modificado. Se mezclaron 1,2 mL de agua destilada, 500  $\mu$ L de reactivo de Bradford (1 gr/L Coomasi preparado en HCl 2,2% v/v) y 50  $\mu$ L de muestra.

Se realizó una curva de calibración con BSA (ver Anexo D), utilizando como blanco agua destilada. Se midió absorbancia a 465 nm y 595 nm, calculándose la razón entre ellas.

#### **2.2.14.3 Zimograma de celulasas**

Se preparó un gel de poliacrilamida como se indica en la sección 2.2.10.2, pero adicionalmente se le agregó al gel de resolución CMC al 0,2%. Se usó un buffer de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), con lo cual se mezclaron 20  $\mu$ L de muestra y 5 de éste, para luego cargar 20  $\mu$ L en el pocillo. La corrida del gel se realizó de la misma forma que la electroforesis de proteínas, con la única diferencia que la cámara se introdujo en un recipiente con hielo para no denaturar las proteínas por el calor

Luego de finalizada la electroforesis, el gel se lavó 1 h con Tritón X-100 al 2,5% v/v con agitación. Posteriormente se enjuagó con agua destilada por 5 min, para luego incubarlo por 1 h a 37°C con buffer HEPES 50 mM pH=7,5. Para finalizar y poder visualizar las bandas de actividad, el gel fue teñido con Rojo Congo al 1% p/v por 20 minutos, y luego desteñido con NaCl 1 M por 5 min.

#### **2.2.15 Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

Se utilizó la columna empacada HR5-5 con 1 mL de resina Butil Sefarosa Fast Flow 6FF (GE Healthcare, Alemania), cuyas dimensiones son 5 cm de altura y 5 mm de diámetro interno. El cromatógrafo utilizado fue un ÄKTA Purifier 10 y el Software UNICORN 5.1.

Los buffers utilizados fueron, Buffer A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 y Buffer B: Buffer A + 2M Sulfato de Amonio. Ambos fueron filtrados con filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$  y desgasificados con helio durante 5 min.

Se programó iniciar la cromatografía con una concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B, y lentamente se fue mezclando con Buffer A, generando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna, hasta llegar a 0% de concentración de sal. El flujo se mantuvo constante durante todo el proceso, y fue de 0,75 mL/min. Se inyectaron 4 mL de muestra a la columna, la cual estaba constituida por 50% de Buffer B y 50% de la muestra original, utilizando un loop de 2 mL para su almacenamiento.

Se colectaron fracciones de 0,5 mL y una vez finalizada la cromatografía se regeneró la resina con 5 volúmenes de columna del Buffer B. A las muestras colectadas se les realizó ensayo de actividad y medición de la concentración de proteína total.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

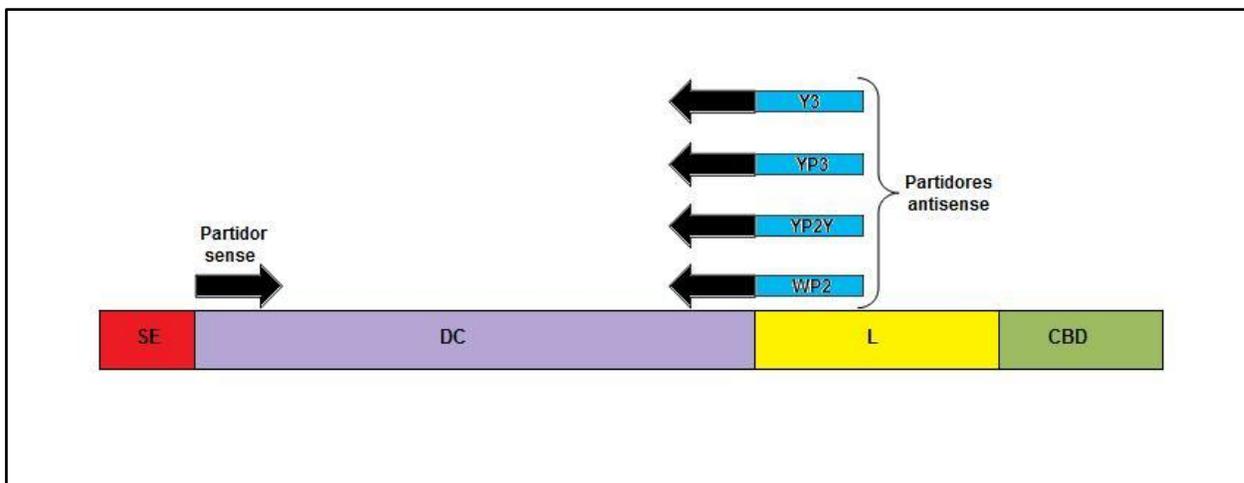
#### 3.1 Diseño de partidores

Como se mencionó en la sección 2.2.1, se diseñó un partidor *sense* común para todas las endoglucanasas mutadas y 4 *partidores antisense*. Estos últimos agregan los extremos: WPWP, YPYPY, YPYPYP e YYY, donde W es el aminoácido triptófano, Y es tirosina y P es prolina.

Los partidores *antisense* poseen la siguiente estructura:

3' – sec endoglucanasa (9-11 nuc) – extremo hidrofóbico (9-18 nuc) – 2 codones de término (6 nuc) – sitio de corte *XhoI* (6 nuc) – 3 nuc adicionales – 5'

En la Figura 3.1 se muestran los lugares de alineamiento entre los partidores diseñados y el gen de la endoglucanasa nativa, con lo cual se obtendrán 4 enzimas mutadas con el sitio catalítico de la endoglucanasa más el extremo hidrofóbico agregado:



**Figura 3.1. Esquema de alineamiento de los partidores y el templado de la endoglucanasa nativa.** SE: Secuencia codificante de la Señal de Exportación; DC: Dominio Catalítico; L: Linker; CBD: Dominio de Unión a Carbohidratos.

A continuación se detallan las secuencias, Tm y tamaño de los partidores diseñados<sup>1</sup>:

- **Partidor sense (Cel33NcoI):**

*NcoI*      Cel

5'- ctt gcc atg gca gcc gtt gag cc -3'

**Tm**= 62°C

**Tamaño**= 23 pb; 7,02 kDa

- **Partidor antisense WPWP (Cel-WP2):**

3'- cca ttg cat acc ggc acc ggc act att gag ctc ttg -5'

5'- gtt ctc gag tta tca cgg cca cgg cca tac gtt acc -3'

**Tm**= 69°C

**Tamaño**= 36 pb; 11,5 kDa

- **Partidor antisense YPYPY (Cel-YP2Y):**

3'- cca ttg cat ata ggc ata ggc ata act att gag ctc ttg -5'

5'- gtt ctc gag tta tca ata cgg ata cgg ata tac gtt acc -3'

**Tm**= 63°C

**Tamaño**= 39 pb; 11,99 kDa

- **Partidor antisense YPYYP (Cel-YP3):**

3'- cca ttg cat ata ggc ata ggc ata ggc act att gag ctc ttg -5'

5'- gtt ctc gag tta tca cgg ata cgg ata cgg ata tac gtt acc -3'

**Tm**= 66°C

**Tamaño**= 42 pb; 12,9 kDa

---

<sup>1</sup> Temperatura de alineamiento (Tm) y peso molecular de los partidores se determinaron usando **Oligo Calc** (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>)

- **Partidor antisense YYY (Cel-Y3):**

3'- ca cca ttg cat ata atg ata act att gag ctc ttg -5'

5'- gtt ctc gag tta tca ata gta ata tac gtt acc ac -3'

T<sub>m</sub>= 60°C

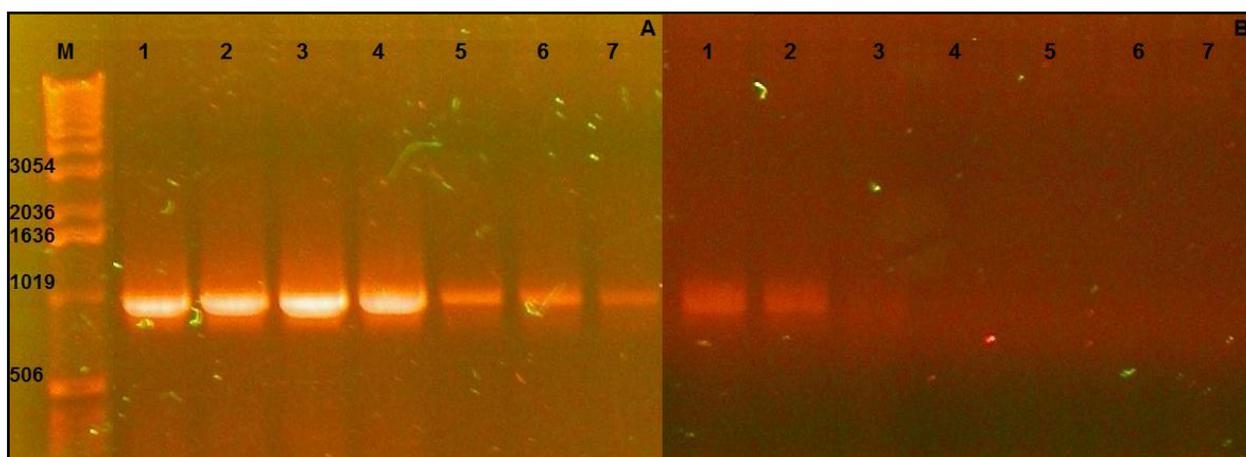
Tamaño= 35 pb; 10,79 kDa

### 3.2 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a endoglucanasa

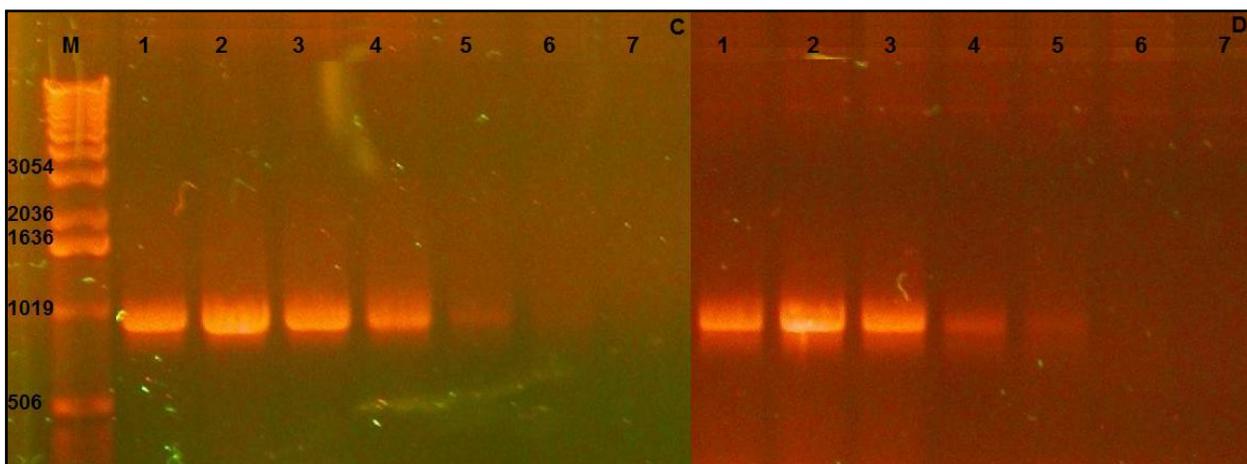
#### 3.2.1 Generación del gen de la celulasa modificada por PCR

La generación del gen de la endoglucanasa modificada con los distintos extremos hidrofóbicos se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, para la cual se usó como templado el DNA plasmidial de la endoglucanasa nativa, sin diluir, y como partidores, el partidor *sense* común y el *antisense* correspondiente a cada extremo.

Como sólo se conocían las temperaturas de alineamiento teóricas de los partidores, en el programa de PCR se realizó un gradiente de temperaturas para cada extremo, hasta encontrar aquella que mostrara un mejor resultado en cuanto a intensidad de banda en la electroforesis en gel de agarosa.



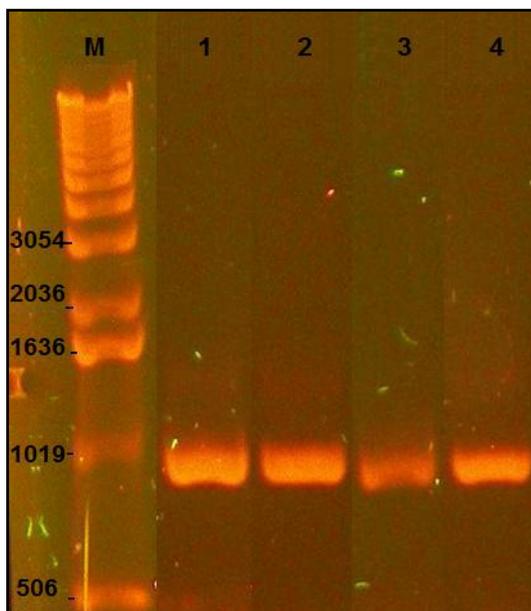
**Figura 3.2.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para las variantes Cel-WP2 y Cel-YP2Y. **M:** Marcador de peso molecular 1 kb, **A:** Cel-WP2, **B:** Cel-YP2Y, Carriles 1-7: Temperaturas primeros ciclos: 50,4°C; 53°C; 55,8°C; 58,5°C; 61°C; 63,1°C; 64,7°C; 65,6°C .



**Figura 3.3. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para las variantes Cel-YP3 y Cel-Y3. M:** Marcador de peso molecular 1 kb, **C:** Cel-YP3, **D:** Cel-Y3, Carriles 1-7: Temperaturas primeros ciclos: 50,4°C; 53°C; 55,8°C; 58,5°C; 61°C; 63,1°C; 64,7°C; 65,6°C.

De las Figura 3.2 y Figura 3.3 se escogió la temperatura 55°C, puesto que era la que presentaba un producto visible para todas las enzimas mutadas.

En la Figura 3.4 se presentan los resultados del gen de la endoglucanasa modificada con los extremos hidrofóbicos con la temperatura escogida:



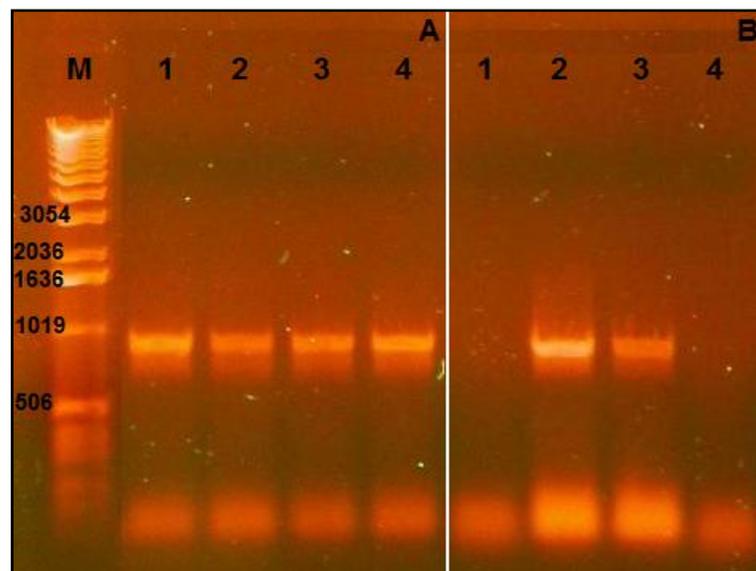
**Figura 3.4. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a 55°C para todas las variantes. M:** Marcador de peso molecular 1 kb, **Carril 1:** Cel-WP2, **Carril 2:** Cel-YP2Y, **Carril 3:** Cel-YP3 y **Carril 4:** Cel-Y3.

Es posible apreciar *a priori*, que la síntesis del gen de la endoglucanasa modificada se logró exitosamente para los 4 tipos de extremos hidrofóbicos, puesto que se observa una sola banda para cada uno de los casos a una altura aproximada de 930 pb, que correspondería al tamaño predicho del gen más el extremo de polinucleótidos.

Cabe destacar que la intensidad de las bandas es similar para todos los extremos, a excepción de Cel-YP3 la que se observa levemente disminuida, lo que significaría que el PCR tuvo un menor rendimiento en comparación con las demás endoglucanasas modificadas. Esto se debe, principalmente, a que es el extremo más largo y podría presentar ciertos problemas para alinearse con el templado de la enzima.

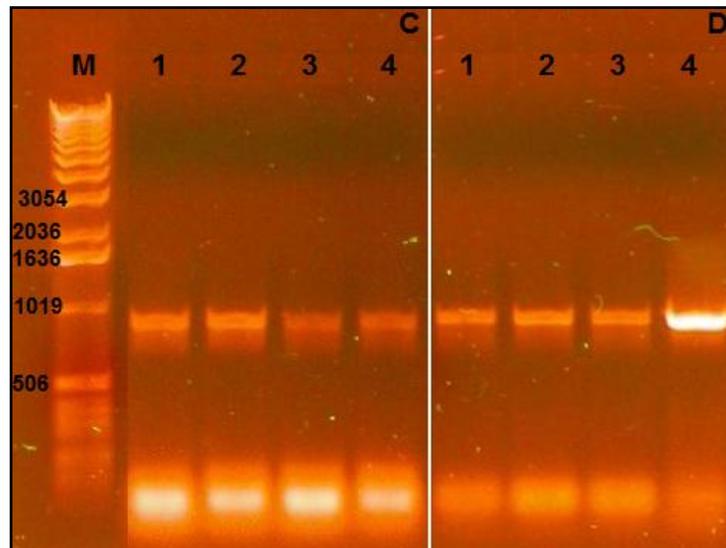
### 3.2.2 Clonamiento del gen modificado en el vector pGem®-T Easy

Luego de generar los fragmentos que contenían el gen de la celulasa modificada, éstos fueron ligados al vector de clonamiento pGem®-T Easy como se indica en la sección 2.2.5.1, para posteriormente electroporar *E. coli* DH5 $\alpha$ . Estas bacterias fueron crecidas en placas LB-Agar con Amp, X-Gal e IPTG. En las Figura 3.5 y Figura 3.6 se muestran los resultados del PCR a las colonias positivas de las 4 variantes, indicando que las bacterias fueron efectivamente transformadas con el plasmidio recombinante.



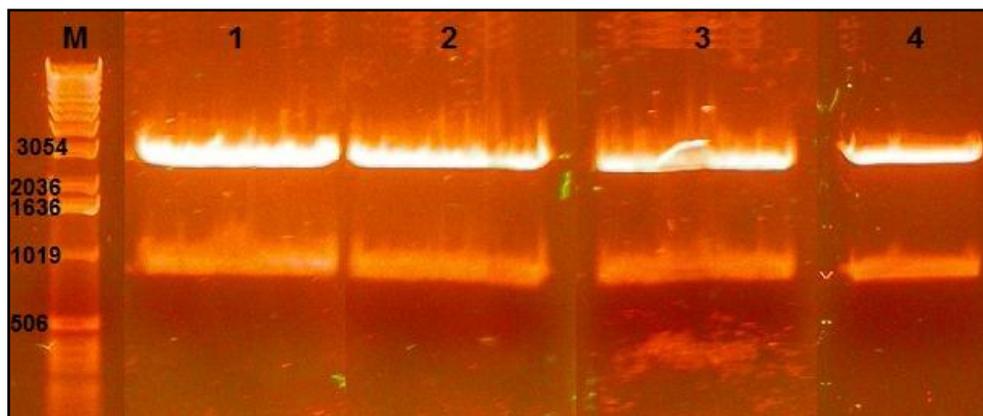
**Figura 3.5. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-WP2 y Cel-YP2Y al vector de clonamiento pGem®-T Easy. M: Marcador de peso molecular 1 kb, A: Carriles 1-4: Colonias para Cel-WP2, B: Carriles 1-4: Colonias para Cel-YP2Y.**

Para el caso de Cel-WP2 las cuatro colonias seleccionadas poseen el inserto, puesto que se observa una única banda alrededor de los 930 pb, en cambio para Cel-YP2Y sólo las colonias 2 y 3 contenían el inserto.



**Figura 3.6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-YP3 y Cel-Y3 al vector de clonamiento pGem<sup>®</sup>-T Easy. M: Marcador de peso molecular 1 kb, C: Carriles 1-4: Colonias para Cel-YP3, D: Carriles 1-4: Colonias para Cel-Y3.**

En la Figura 3.6 es posible observar que para las variantes Cel-YP3 y Cel-Y3, todas las colonias seleccionadas tenían el inserto. A continuación a las colonias que poseían el inserto se les creció para luego extraerles el DNA plasmidial, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *Xho*I y *Nco*I. Se escogió una de las digestiones realizadas para cada caso, las que se muestran en la Figura 3.7.



**Figura 3.7. Digestión del DNA Plasmidial. M: Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Cel-WP2, Carril 2: Cel-YP2Y, Carril 3: Cel-YP3 y Carril 4: Cel-Y3.**

En la Figura 3.7 se observa 2 bandas para cada caso, donde las bandas superiores corresponden al vector de clonamiento (3015 pb) y las inferiores a las endoglucanasas con los distintos extremos hidrofóbicos (930 pb).

### 3.2.3 Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pET22-b(+)

Se purificaron las bandas correspondientes al gen de la celulasa modificada, para luego ligarlas al vector de expresión pET22b(+). Una vez obtenidas las ligaciones, éstas se usaron para electroporar células BL21(DE3), las que fueron crecidas en placas LB Agar con Amp. A las colonias que crecieron se les realizó PCR de colonias para verificar la presencia del inserto, esto se muestra en las Figura 3.8 y Figura 3.9.

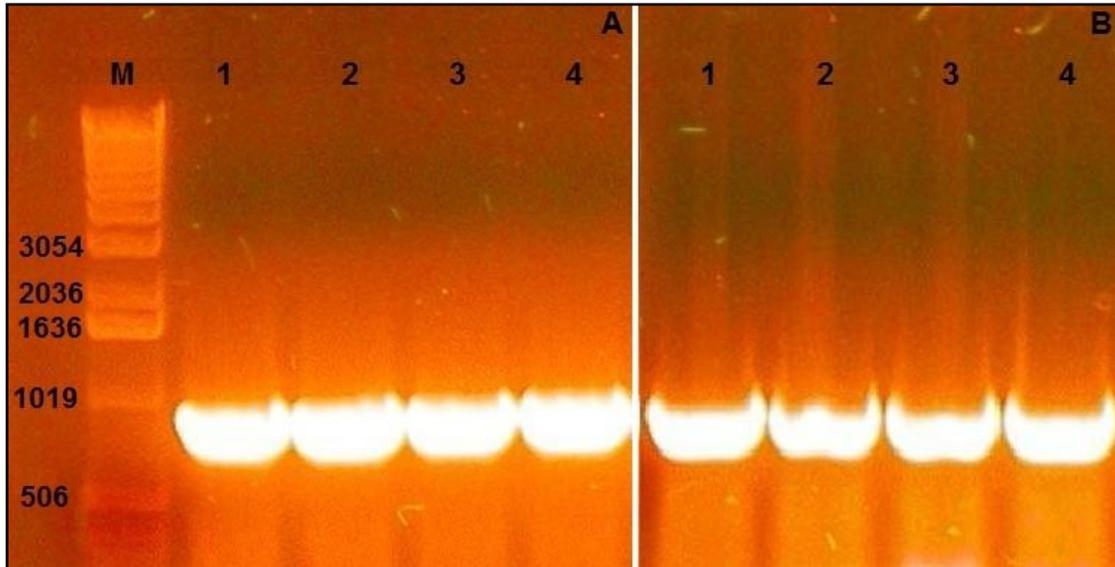
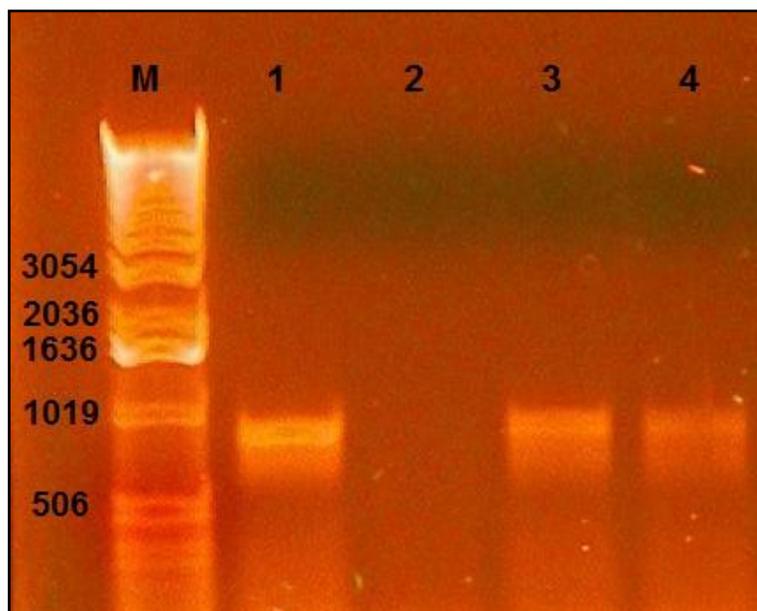


Figura 3.8. Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-WP2 y Cel-YP2Y al vector de expresión pet22b(+). M: Marcador de peso molecular 1 kb, A: Carriles 1-4: Colonias para Cel-WP2, B: Carriles 1-4: Colonias para Cel-YP2Y.

De la Figura 3.8 se tiene que todas las colonias de las variantes Cel-WP2 y Cel-YP2Y resultaron positivas.



**Figura 3.9.** Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR realizado a las colonias de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los productos de ligación de los genes mutados Cel-YP3 y Cel-Y3 al vector de expresión pet22b(+). **M:** Marcador de peso molecular 1 kb, **Carril 1:** Colonia para Cel-YP3, **Carriles 2-4:** Colonias 1, 2 y 3 para Cel-Y3.

De la Figura 3.9 se tiene que la única colonia que creció para la Cel-YP3 poseía el inserto y de la Cel-Y3 sólo lo tenían las colonias 2 y 3. Es posible apreciar que de los casos que resultaron positivos, todos poseen el tamaño esperado de aproximadamente 930 pb.

Se escogieron los siguientes clones para las posteriores etapas de producción y caracterización de las enzimas modificadas: Colonia 2 para Cel-WP2, Cel-YP2Y y Cel-Y3 y la única colonia de Cel-YP3.

### 3.3 Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos

Los plasmidios obtenidos se mandaron a secuenciar a Macrogen para verificar que las construcciones estaban correctas tanto en tamaño como en secuencia nucleotídica.

En el Anexo E se encuentran las secuencias para la endoglucanasa modificada con los 4 extremos hidrofóbicos distintos, tanto nucleotídica como aminoacídica. Además se incluye el alineamiento de ellas con la endoglucanasa nativa, donde es posible observar que las secuencias corresponden exactamente con lo esperado, ya que no existen mutaciones y los extremos polipeptídicos fueron agregados

correctamente, al contrario de lo reportado en los trabajos realizados por Robinson (2008) y Montecinos (2009), donde las secuencias poseían importantes mutaciones; esto demuestra la alta fidelidad que presenta la DNA polimerasa Vent sobre la Taq, al poseer actividad autocorrectora.

### 3.4 Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de las celulasas modificadas

Utilizando las ecuaciones de la sección 1.8, es posible determinar la hidrofobicidad superficial teórica de la endoglucanasa nativa, y de la endoglucanasa modificada con los 4 extremos hidrofóbicos.

Para realizar este cálculo se consideró la estructura molecular del dominio catalítico de una celulasa similar, la cual se obtuvo de la base de datos Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). El código pdb de ésta era **1TVNA**, la cual resultó tener un 88,4% de identidad con la celulasa nativa, porcentaje que fue calculado usando el programa **Geno3D** ([http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d\\_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d\\_home.html](http://geno3d-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/geno3d_automat.pl?page=/GENO3D/geno3d_home.html)). Pese a que la proteína escogida presenta un valor de identidad bastante elevado, se recomienda modelar la enzima en cuestión para obtener resultados más certeros.

El área superficial total de la proteína, así como las áreas superficiales de cada aminoácido se calcularon utilizando **Stride Web interface** (<http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py>). El área superficial de la celulasa 1TVNA es de  $9.934 \text{ \AA}^2$ , y la correspondiente a cada aminoácido se muestra en el Anexo F.

En la Tabla 3.1 se presentan los valores de hidrofobicidad para la endoglucanasa nativa y para las modificadas con los 4 extremos hidrofóbicos distintos:

**Tabla 3.1. Estimación de las hidrofobicidades superficiales**

	Hidrofobicidad superficial extremo	Hidrofobicidad Celulasa modificada
<b>Celulasa nativa</b>	-	0,252
<b>WP2</b>	0,0409	0,293
<b>YP2Y</b>	0,0346	0,287
<b>YP3</b>	0,0361	0,288
<b>Y3</b>	0,0314	0,284

Como se observa en la estimación de la hidrofobicidad superficial que aporta cada extremo hidrofóbico, se tiene que para los extremos que contienen tirosina, este valor resulta menor que para el que posee triptófano (WP2). Por otro lado, cabe destacar que la presencia del aminoácido prolina no influye en gran medida en el valor de la hidrofobicidad, como se puede apreciar al comparar el extremo YP2Y con YP3, que tienen una prolina de diferencia. Es por esto que resulta mucho más interesante comparar el efecto que tiene la presencia de este aminoácido en la expresión y purificación de la enzima, que en el aumento de hidrofobicidad propiamente tal.

A *priori*, se podría predecir que el extremo WP2 será el que aumente más el DRT, puesto que es el extremo que presenta una hidrofobicidad superficial mayor, lo que se traduce en la variante más hidrofóbica de todas y que por ende, eluirá a menor concentración de sal en la cromatografía.

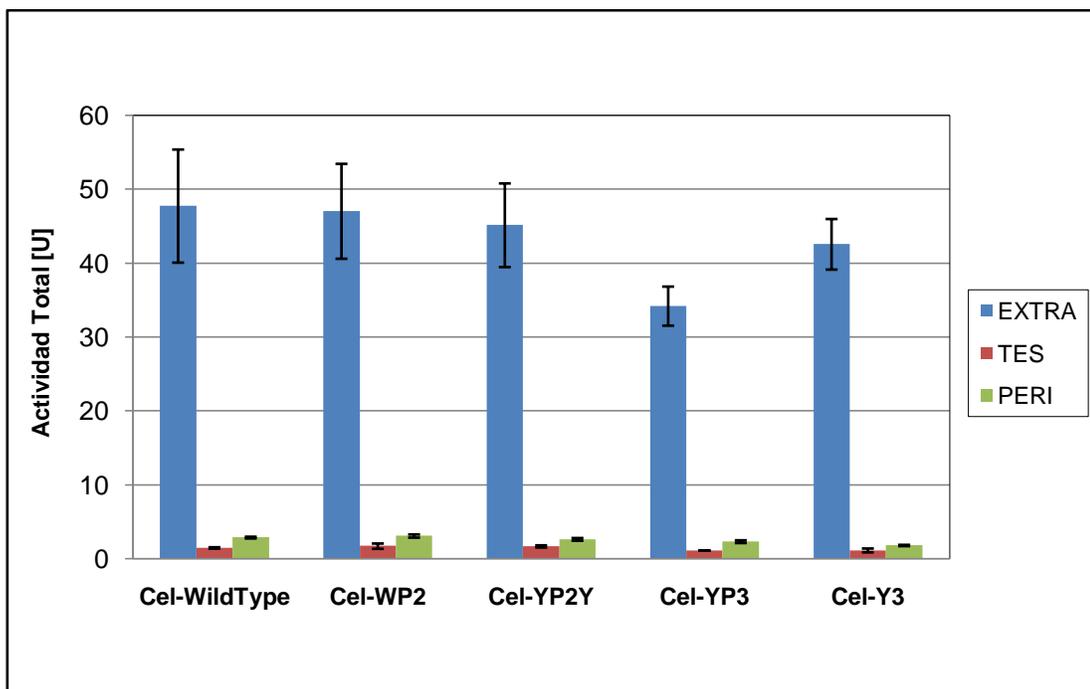
El detalle de los cálculos de este ítem se muestra en el Anexo F.

### **3.5 Producción de celulasas modificadas**

Las variantes de *E. coli* que producían: Cel-WildType, Cel-WP2, Cel-YP2Y, Cel-YP3, Cel-Y3 se cultivaron y posteriormente se indujo su expresión, como se indica en la sección 2.2.12. Luego se asiló la fracción periplasmática y extracelular, a las cuales se les realizó un análisis de proteína total y de actividad, para verificar si las enzimas modificadas presentaban actividad celulolítica o si ésta se veía afectada por la adición de algún extremo hidrofóbico en particular.

#### **3.5.1 Análisis de actividad**

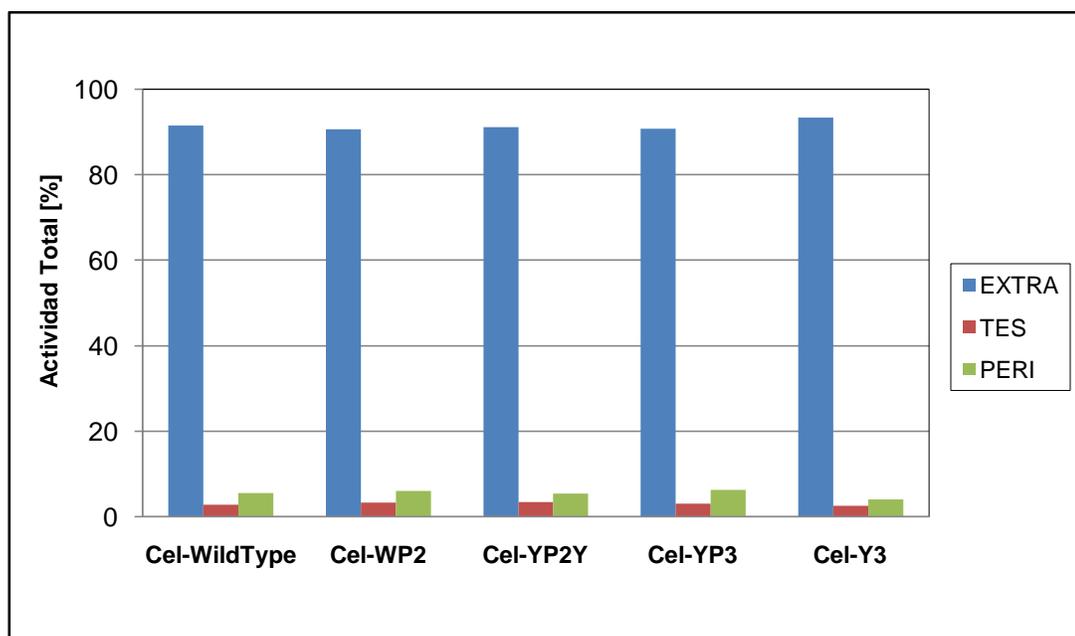
A continuación se presentan los resultados de actividad total de las fracciones: extracelular, lavado con TES y periplasma. El análisis a la fracción lavado con TES se realizó para cuantificar la pérdida de proteínas en esta etapa. Todos los cultivos fueron realizados en triplicado, por lo que los resultados corresponden al promedio de éstos.



**Figura 3.10. Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).** Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.

En la Figura 3.10 se observa que la enzima nativa presenta el mayor error, y Cel-YP3 el menor. De todas maneras, el valor de éstos no supera el 15% por lo que se tiene una buena reproducibilidad de los experimentos; esto se debe principalmente, a que además de realizar las fermentaciones en triplicado y cuidando que las condiciones de cultivo fueran las mismas para todas las cepas, la medición de azúcares reductores con DNS también fue efectuada en triplicado.

De esta misma figura también es posible apreciar que todas las enzimas modificadas presentan el mismo comportamiento que la endoglucanasa nativa en términos de la distribución subcelular, donde la mayor actividad celulolítica se presenta en el medio extracelular. Si se hace un análisis cuantitativo de la actividad, se tiene que Cel-WP2 tiene un 98,5% de actividad con respecto a Cel-WildType, de la misma manera, Cel-YP2Y, Cel-YP3 y Cel-Y3 presentan valores de 94,6%, 71,7% y 89,2% respectivamente. Cel-YP3 es la variante que produce menos unidades de actividad, lo que se puede deber a menor producción (mg de celulasa por litro de cultivo) o menor actividad específica. No obstante, resulta interesante e informativo estudiar la actividad de manera porcentual, es decir, sumar las actividades en las 3 fracciones, y luego calcular qué porcentaje del total corresponde cada una de ellas (Figura 3.11).



**Figura 3.11. Distribución subcelular de celulasa silvestre y modificadas en *E.coli* BL21(DE)3.** Las fracciones corresponden a medio extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).

De la Figura 3.11 se observa que todas las enzimas mutadas y la endoglucanasa nativa presentan el mismo comportamiento en términos de la distribución celular: más del 90% de actividad se obtiene en el medio extracelular, en el lavado con TES se pierde alrededor del 3%, y en el periplasma se retiene un 6% de actividad, aproximadamente.

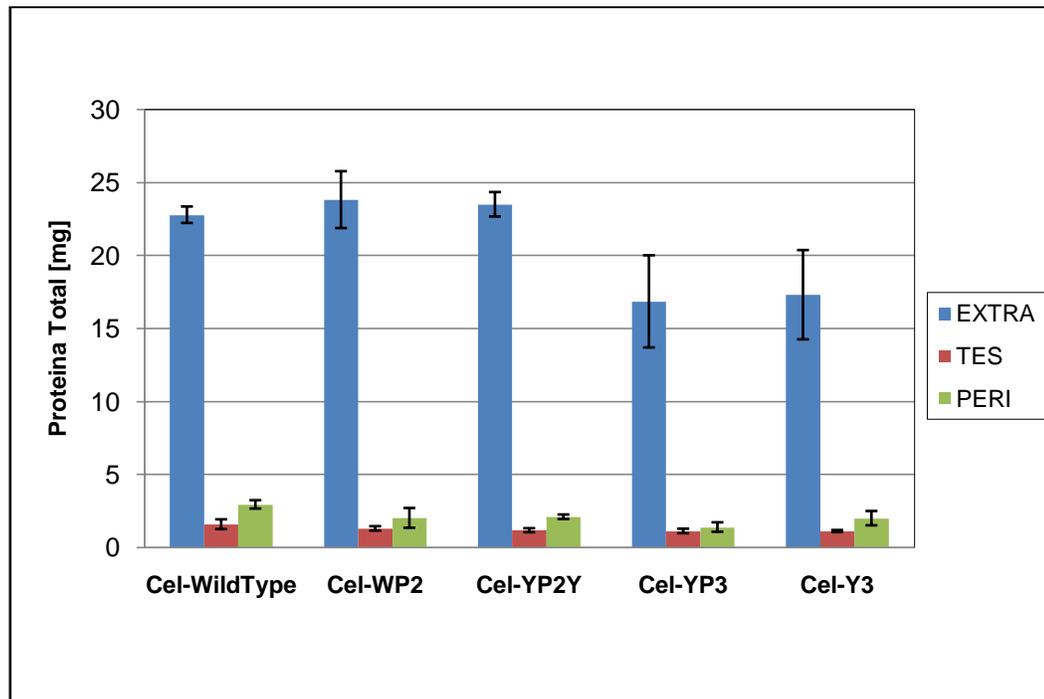
Se tiene que la endoglucanasa nativa presenta un 91,5% de actividad celulolítica en el medio extracelular, Cel-WP2, Cel-YP2Y y Cel-YP3 tienen 90,6%, 91,1% y 90,7% respectivamente. Cel-Y3 por su parte, tiene un valor de 93,4%, el cual es levemente mayor que el de la enzima nativa.

Estos resultados resultan ser bastante positivos para el trabajo, puesto que no se tenía información de lo que le ocurría a la actividad al adicionar estos extremos y se pudo comprobar que ésta no se vio afectada mayormente.

Además se recomienda, realizar un estudio más exhaustivo que pueda establecer las condiciones óptimas de cultivo, de crecimiento e inducción, para cada una de las endoglucanasas mutadas y, de esta manera, poder comparar entre los escenarios óptimos de las distintas variantes.

### 3.5.2 Análisis de proteína

A continuación se presentan los resultados de proteína total en las distintas fracciones: extracelular, lavado con TES y periplasma. Como las fermentaciones fueron realizadas en triplicado los valores corresponden al promedio de éstos.



**Figura 3.12. Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).** Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.

De la Figura 3.12, se tiene que todas las celulasas mutadas y Cel-WildType presentan una mayor cantidad de proteínas en el medio extracelular que en las otras fracciones. En el lavado con TES, por otro lado, se perdió muy poca cantidad de proteínas. Cel-YP3 presenta el mayor error en el medio extracelular, y la endoglucanasa nativa el menor. De todas maneras, el valor de éstos no supera el 13% por lo que se tiene una buena reproducibilidad de los experimentos.

De esta misma figura se puede apreciar que Cel-WP2, Cel-YP2Y y Cel-WildType presentan valores similares de proteína total (superiores a los 20 mg), mientras que Cel-YP3 y Cel-Y3 registraron una cantidad inferior. Con esto, y recordando que Cel-YP3 tenía el menor valor de actividad total, es posible deducir que las celulasas que produce esta variante son menos activas que las de Cel-Y3.

Como los valores de cantidad de proteína son muy distintos entre las variantes se precisa realizar un gráfico porcentual y así poder analizar de mejor manera la distribución de proteína total en las fracciones.

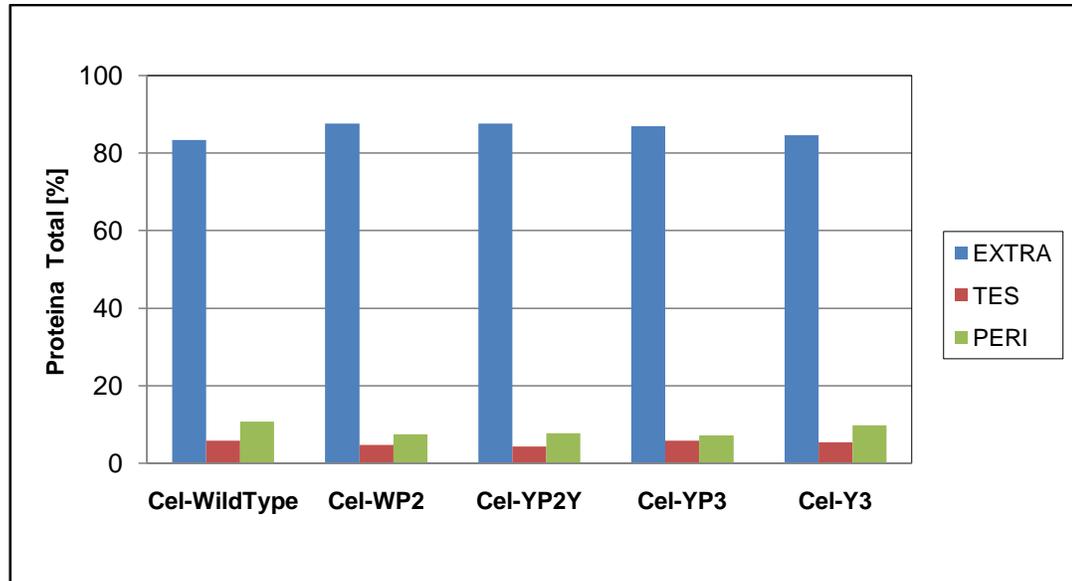
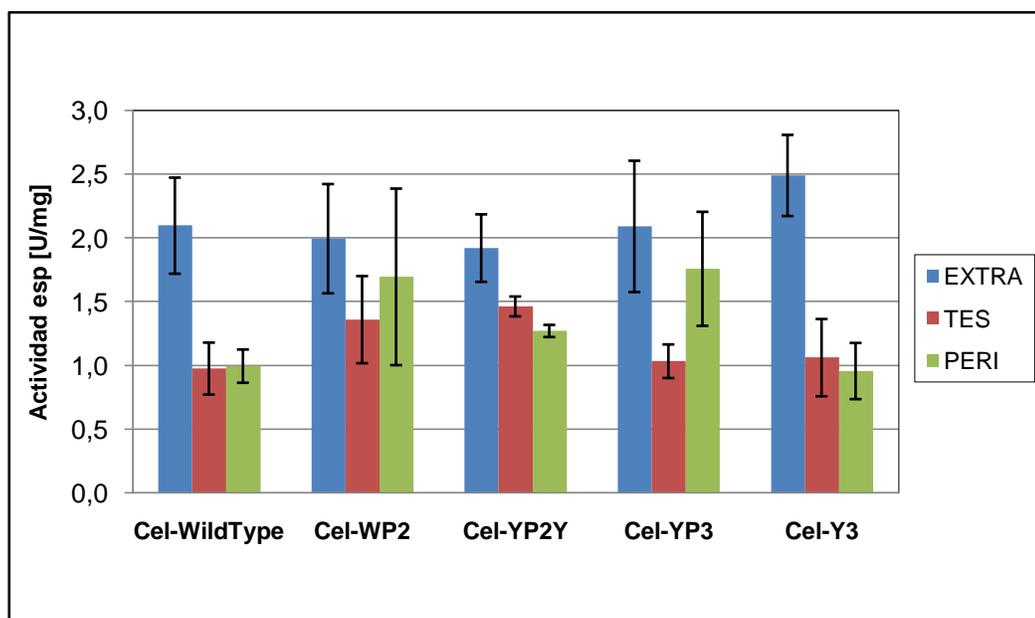


Figura 3.13. Porcentaje proteína total presente en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).

De la Figura 3.13 es posible apreciar que para la endoglucanasa nativa y las modificadas, se tiene una igual distribución de proteína total, aproximadamente de un 87% en el medio extracelular, 5% para el lavado con TES y 8% en la fracción periplasmática.

A partir de los resultados de actividad y proteína total, se puede calcular la actividad específica para cada una de las fracciones, los resultados se muestran a continuación:



**Figura 3.14. Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).** Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden al valor más alto y más bajo de las desviaciones estándar de los tres cultivos para cada variante.

De la Figura 3.14 se observa que todas las endoglucanasas mutadas más la Cel-WildType, presentan una mayor actividad específica en la fracción extracelular que en las otras fracciones. Esto significa que el medio extracelular es el que se ve más enriquecido con la enzima, porque es la fracción que tiene más actividad por mg de proteína total.

Considerando los errores, se tiene que todas las variantes presentan valores similares de actividad específica en el periplasma y en el lavado con TES, a excepción de Cel-YP3 donde el periplasma se encuentra mucho más enriquecido de la enzima. Por otro lado, Cel-Y3 presenta mayor actividad específica que Cel-WildType, pero dado que los errores son cercanos al 20%, esta diferencia no es significativa.

### 3.6 Relación entre hidrofobicidad superficial y actividad específica

Con los datos de actividad específica y los valores de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos, es posible determinar si existe una relación entre estos parámetros, y de qué tipo es.

Para simplificar cálculos, la hidrofobicidad de los extremos se calculó usando la siguiente ecuación:

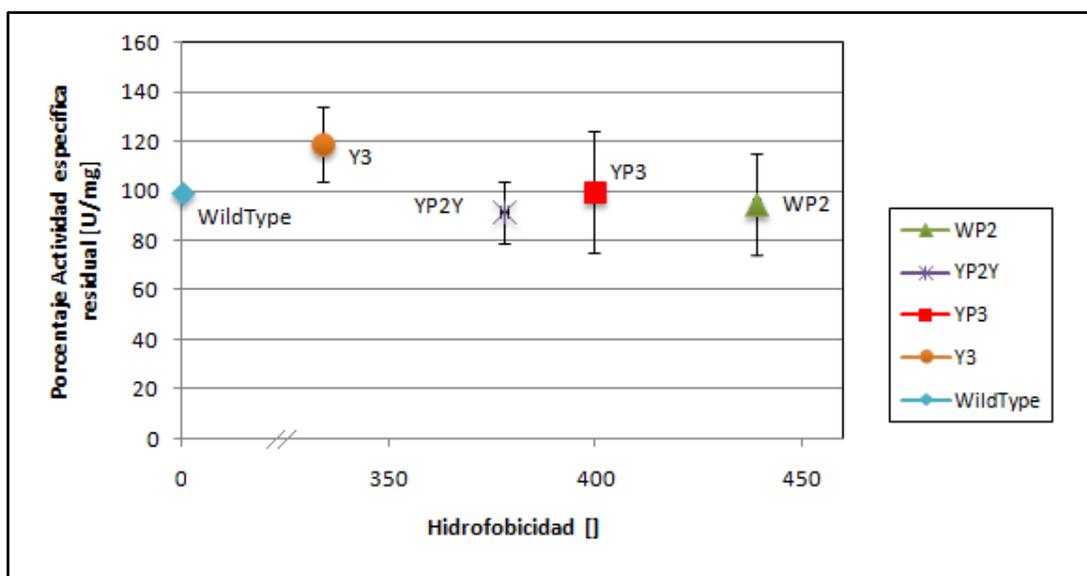
$$\Phi_{tag} = \sum_{k=1}^{20} S_{tag\_aa_k} \cdot \eta_k \cdot \Phi_{aa_k} \quad \text{Ecuación 7}$$

Usando la misma notación que en la sección 1.8,  $\Phi_{aa_k}$  es el valor de hidrofobicidad para cada aminoácido (según escala de Miyazawa y Jernigan),  $S_{tag\_aa_k}$  corresponde al área superficial del aminoácido  $aa_k$  y  $n_k$  al número de veces que se repite el aminoácido  $aa_k$ .

En la Tabla 3.2 se muestran los valores obtenidos al usar la ecuación 7:

**Tabla 3.2. Valores teóricos de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos**

Extremo Hidrofóbico	Hidrofobicidad extremo [ ]
WP2	439
YP2Y	378
YP3	400
Y3	334



**Figura 3.15. Porcentaje de actividad específica residual versus hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos.** La hidrofobicidad de los extremos es calculada usando la Ecuación 7, mientras que el porcentaje de actividad específica residual se determinó tomando como 100% el valor de la celulasa nativa.

En la Figura 3.15 es posible apreciar que no existe una relación lineal descendente entre la hidrofobicidad de los extremos y la actividad específica de ellos, como fue previamente observado (Lienqueo y cols, 2009), sino más bien no fue posible encontrar una relación (Ver Anexo G), puesto que al aumentar la hidrofobicidad de los extremos, la actividad no se vio afectada, presentando valores de 95,1%, 91,6% y 99,7% para Cel-YP2Y, Cel-YP3 y Cel-WP2 respectivamente. La diferencia radica en que la

endoglucanasa es una proteína extracelular y las proteínas del trabajo que se hace mención son periplasmáticas.

La variante Cel-Y3, nuevamente presenta valores superiores a los de la endoglucanasa nativa, muy por el contrario de los trabajos antes realizados (Robinson, 2008), donde Y3 disminuía drásticamente los valores de actividad de las enzimas y se definía como criterio cualitativo que el extremo hidrofóbico a agregar debía contener prolina. El criterio cuantitativo que se definió era que el extremo a agregar debía tener un valor de hidrofobicidad menor a 500 para no afectar a la actividad de la enzima, este criterio es válido por los resultados previamente mostrados. De todas maneras se recomienda probar con el extremo WP4, el que posee una hidrofobicidad de 878, y verificar que efectivamente ocurre esto.

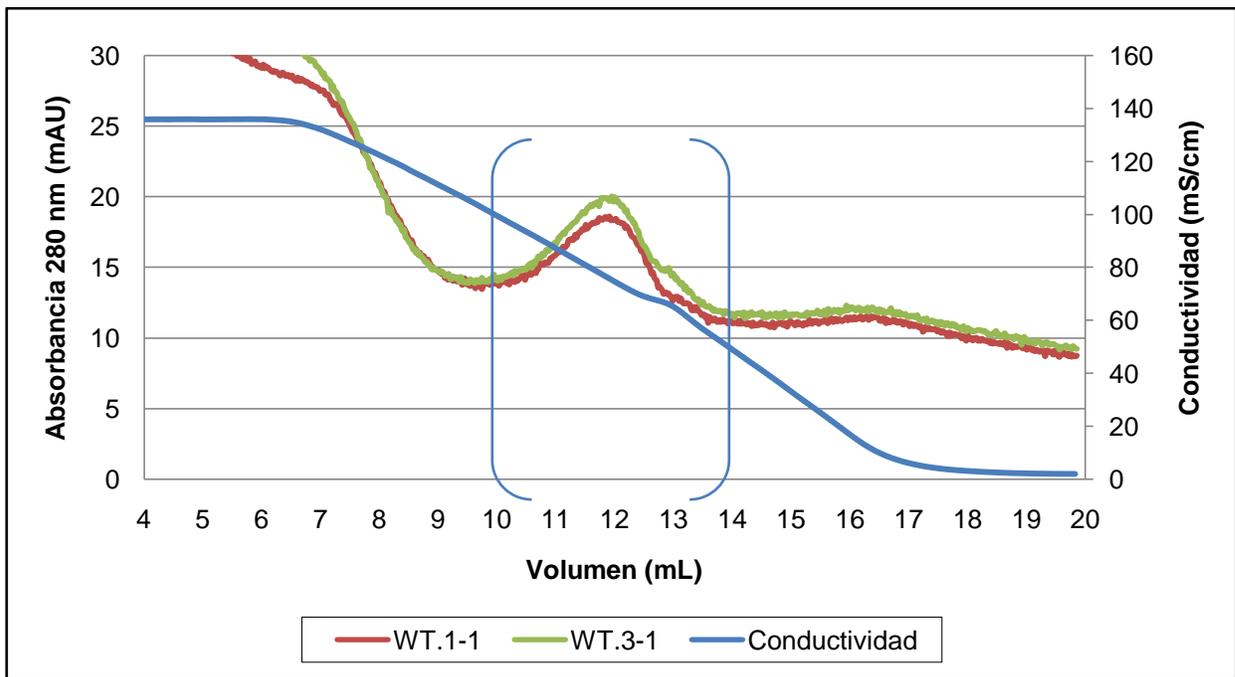
Por lo tanto, *a priori* no es posible elegir ningún extremo hidrofóbico en particular, puesto que todos presentan buenos valores de actividad, incluido el extremo sin prolina, por lo que se recomienda nuevamente realizar un estudio completo en donde se optimice la producción de la enzima con cada uno de los extremos y luego comparar el mejor escenario de cada una de ellas.

Se define como criterio que si la proteína es extracelular no es necesario que el extremo hidrofóbico posea prolina respecto a posibles pérdidas en la recuperación.

### **3.7 Purificación de la celulasa desde el medio extracelular**

En esta sección se describen las cromatografías de interacción hidrofóbicas realizadas a las fracciones extracelulares de los cultivos de la endoglucanasa nativa y las 4 endoglucanasas mutadas. Para los 3 cultivos que se tenía de cada cepa, se escogieron los que presentaban mayor y menor actividad; cuando se obtuvieron perfiles con mucha discrepancia se realizó nuevamente la cromatografía y hubo casos donde fue necesario evaluar el cultivo con actividad promedio. A continuación se presentan los 2 casos que tenían un mejor comportamiento en los cromatogramas para cada endoglucanasa y en el Anexo H se muestran los perfiles restantes. La nomenclatura utilizada corresponde a: (nombre de la endoglucanasa).(número de cultivo)-(número de cromatograma).

Con estos experimentos fue posible determinar los volúmenes de elución de las proteínas y, de esta forma, calcular los DRT para cada una de ellas.

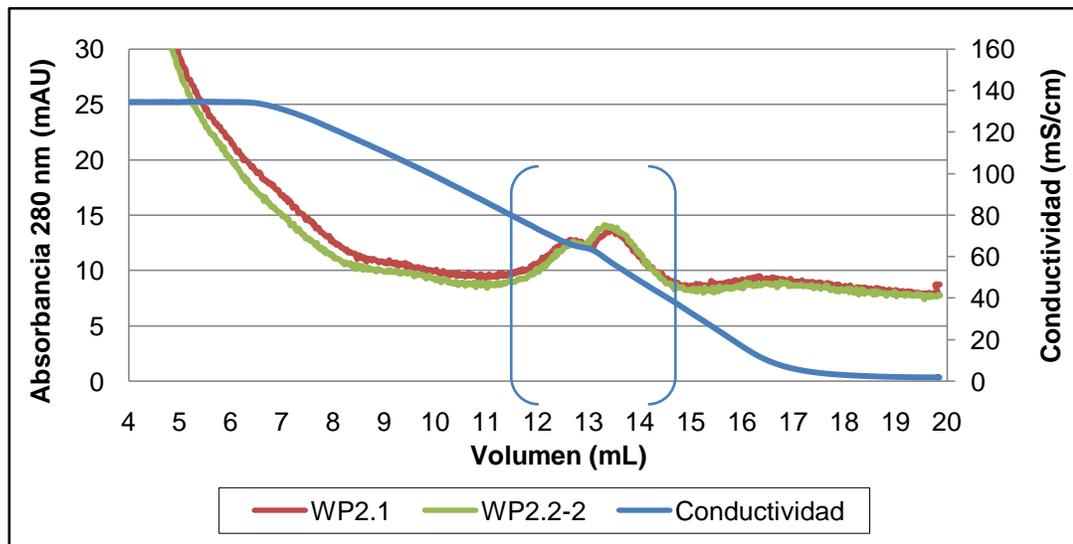


**Figura 3.16. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WildType.** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.

A las fracciones provenientes de las cromatografías se les realizó un ensayo de actividad en medio líquido, primeramente a todas las fracciones, para poder identificar en cuáles eluía la proteína de interés. Luego se seleccionaron aquellas que presentaban los mayores valores para ensayos posteriores.

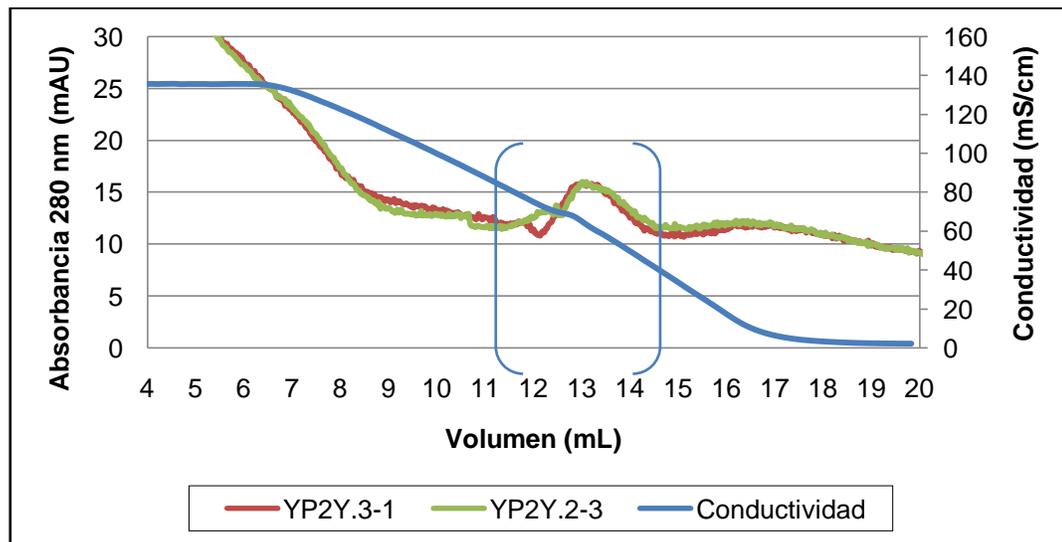
De la Figura 3.16, se observa que entre los dos cultivos de la endoglucanasa silvestre no existe una diferencia notoria en el cromatograma, al contrario, ambos perfiles son tan parecidos que se solapan en casi toda la cromatografía. Además, se señaló donde se encuentra la mayor actividad celulolítica, la cual coincide con los 2 máximos que presenta el cromatograma. Según el ensayo de actividad en medio líquido la enzima nativa eluiría a los 12,5 mL (fracción 17), es decir un poco después del mayor peak.

En la Figura 3.17 a Figura 3.20, se observa el mismo comportamiento: los perfiles de ambos cultivos seleccionados también se traslapan y presentan una tendencia parecida a la de la endoglucanasa nativa. La diferencia radica en que los dos peaks resultan ser muy marcados, esto puede deberse a la presencia de proteasas que cortaron a la proteína cerca del extremo hidrofóbico agregado, con lo cual un máximo correspondería a la proteína completa y el otro a la proteína fragmentada.



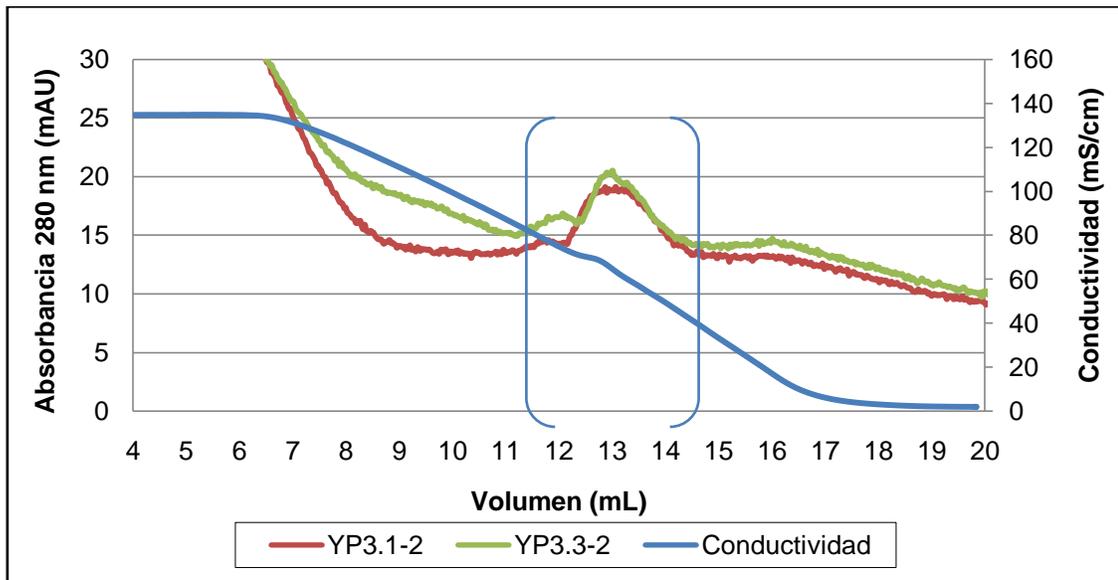
**Figura 3.17. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WP2.** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.

De Figura 3.17 se aprecia que el volumen de elución, en comparación con la endoglucanasa nativa, fue desplazado hasta un valor de 13,5 mL aproximadamente (fracción 19). Esto era lo esperado puesto que la adición del extremo hidrofóbico contribuye a aumentar la hidrofobicidad total de la proteína y, por lo tanto, provocar que ésta quede adherida a la matriz de la columna por más tiempo.

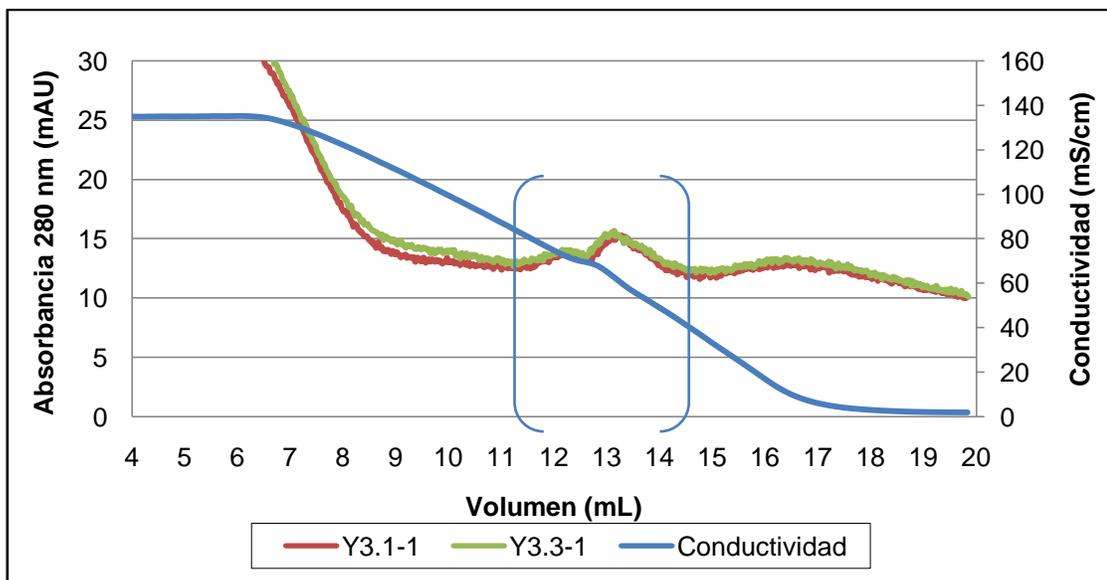


**Figura 3.18. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP2Y.** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.

De la Figura 3.18 se tiene que el volumen de elución es desplazado hasta los 13 mL aproximadamente, comportamiento que se repite en las dos Figuras siguientes.



**Figura 3.19. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP3.** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.



**Figura 3.20. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-Y3.** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.

A continuación se presentan los ensayos de actividad para las mismas muestras utilizadas en las cromatografías previamente mostradas.

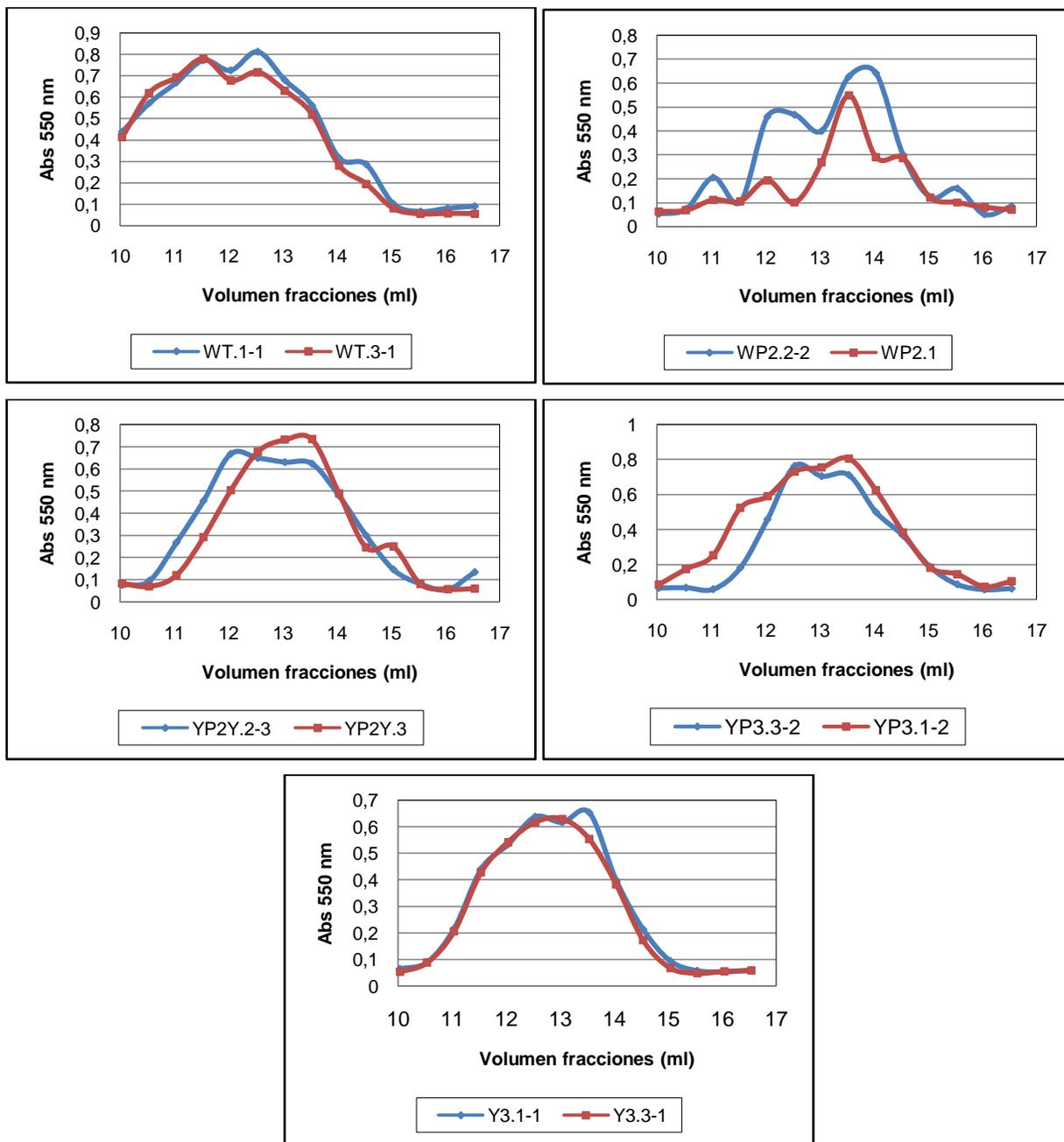


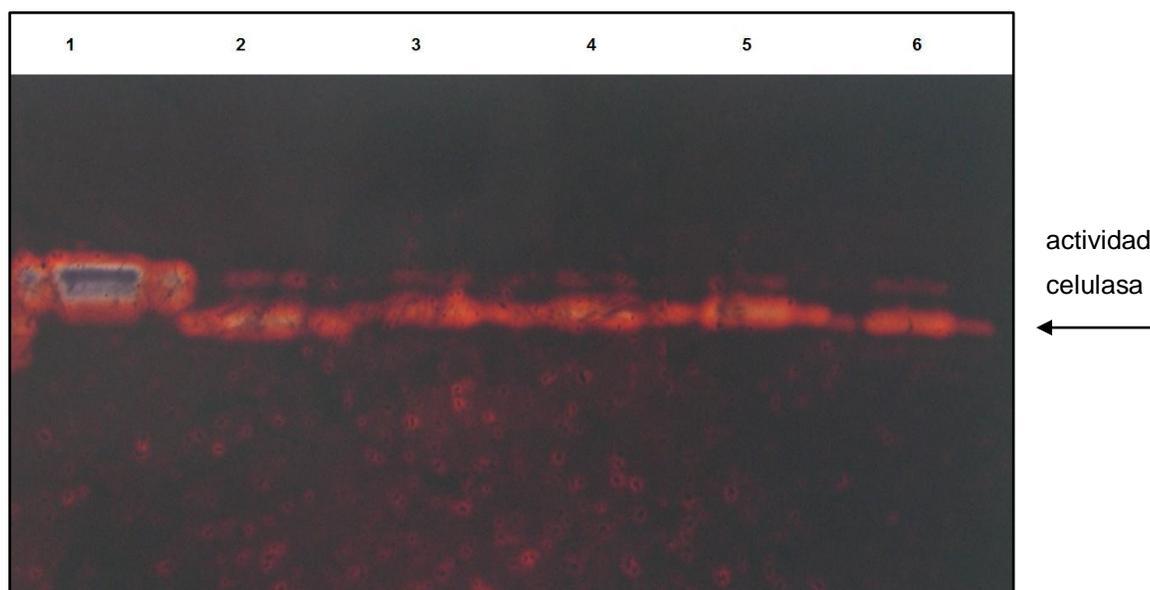
Figura 3.21. Ensayo de actividad en medio líquido de fracciones de las cromatografías realizadas.

Las fracciones seleccionadas para realizar las pruebas de actividad fueron desde la 12 a la 25, puesto que las demás presentaban valores constantes cercanos a cero.

Para el caso de la endoglucanasa nativa, se observa que los 2 valores más altos de absorbancia, por ende, de actividad, corresponden a las fracciones 15 y 17, para luego disminuir gradualmente para ambos costados. El hecho de que existan dos máximos sugiere que aparece una segunda población de moléculas con menor hidrofobicidad, pero con actividad celulolítica. Una explicación para esto es que la endoglucanasa esté siendo cortada por una proteasa del medio en un sitio previo al extremo hidrofóbico, generando la enzima sin el extremo carboxilo modificado. Esta hipótesis permitiría explicar el comportamiento observado en todas las variantes.

Para el resto de las cepas se tiene que sus mayores valores ocurren en la fracciones 19, tal como se predijo con los Cromatogramas. Se observan algunos comportamientos extraños en Cel-WP2 y Cel-YP2Y pero lo primordial es la tendencia general. Este ensayo se ve afectado por la sal presente en las muestras, la cantidad de sustrato con la cual se incubó (donde imprecisiones o descalibración de las pipetas es fundamental en los resultados finales), placas Falcon de 96 pocillos reutilizadas que pueden no estar en las mejores condiciones de limpieza, etc. Se recomienda realizar este ensayo de manera más prolija, cuidando todos esos detalles, dializando la muestra previamente si es posible, y en duplicado o triplicado.

A las fracciones con mayor actividad de cada variante, se les realizó un zimograma utilizando como sustrato CMC, para visualizar la actividad a través de bandas y de esta forma poder predecir su tamaño.



**Figura 3.22. Zimograma a las fracciones con mayor actividad de cada celulasa.** Gel de Poliacrilamida con CMC al 0,2%, **Carril 1:** Celulasa de características similares, **Carriles 2-6:** Cel-WildType, Cel-WP2, Cel-YP2Y, Cel-YP3 y Cel-Y3 respectivamente.

De la Figura 3.22, se observa que todas las enzimas con actividad migran hasta una posición similar, la cual es un poco menor que la de la celulasa que se usó como referencia, que tiene un peso estimado de 36 kDa. Cada variante presenta dos bandas, una bien marcada, y otra un poco más tenue. Este resultado es consistente con la hipótesis del fraccionamiento de la enzima en una posición anterior al extremo hidrofóbico.

Se recomienda para próximos estudios, realizarlos en presencia de inhibidores de proteasas, para de esta manera asegurar que la proteína de interés que esté actuando sea completa y no sólo una parte de ella.

Para determinar el tamaño de la proteína de una manera mucho más precisa, se realizó un gel de Poliacrilamida en condiciones denaturantes, como se muestra en la Figura 3.23.



**Figura 3.23. Gel de Poliacrilamida al 12,5% SDS al 0,1% p/v a las fracciones de HIC con mayor actividad. M:** Marcador de peso molecular, en kDa, **Carril 1:** Cel-WildType, **Carriles 2-5:** Cel-WP2, Cel-YP2Y, Cel-YP3 y Cel-Y3 respectivamente.

En la Figura 3.23 el primer carril corresponde a la endoglucanasa nativa, es la que migra más dado que es la de menor tamaño, luego los carriles 2-5 migran casi a la misma altura, puesto que tienen el tamaño de la enzima nativa más el extremo hidrofóbico adicionado. Utilizando la curva de calibración  $\ln(\text{PM})$  versus distancia recorrida en el gel por las muestras (Ver Anexo D), es posible determinar los pesos moleculares de éstas.

A continuación se presenta una tabla resumen con los pesos moleculares de todas las endoglucanasas, determinados desde el gel y los valores teóricos basados en su secuencia usando la herramienta **Compute pI/Mw tool** ([http://www.expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html)). Con éstos, y considerando el bajo error entre ellos, es posible afirmar que la proteína no forma dímeros ni agregados.

**Tabla 3.3. Peso molecular de la celulasa nativa y sus variantes**

	<b>Peso molecular teórico (kDa)</b>	<b>Peso molecular desde gel (kDa)</b>	<b>Error (%)</b>
<b>Celulasa nativa</b>	32,1	34,1	6,2
<b>WP2</b>	32,7	35,8	9,4
<b>YP2Y</b>	32,8	35,8	9,0
<b>YP3</b>	32,9	36,6	11,3
<b>Y3</b>	32,6	36,6	12,3

### **3.8 Determinación de tiempos de retención adimensionales (DRT)**

Se determinaron los tiempos de retención adimensionales en HIC, para la celulasa nativa y para todas las variantes. A partir de los datos obtenidos de las cromatografías, se determinaron los parámetros  $V_0$  (volumen inicial, correspondiente a donde comienza el gradiente decreciente de sal),  $V_f$  (volumen final correspondiente a donde termina el gradiente de sal) y  $V_r$  (volumen de elución de la proteína).

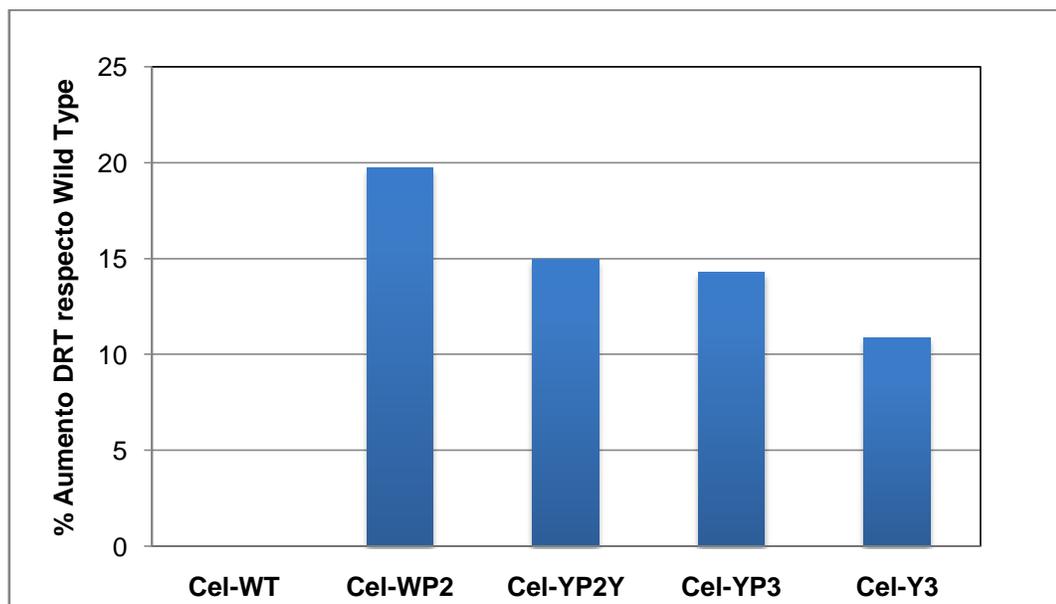
Es importante la determinación de los tiempos de retención, porque de esta manera es posible evaluar si la adición del extremo hidrofóbico afecta el tiempo que la proteína queda adherida a la matriz. Para esto fue necesario definir en qué fracción eluía la proteína de interés. En el caso de la celulasa nativa, se tiene que su mayor valor de actividad en el ensayo en medio líquido ocurre en la fracción 17, por lo que se supone que ésta corresponde a la enzima completa y la fracción 15 que también presenta un valor considerable de actividad, corresponde a la celulasa fragmentada. Para las celulasas modificadas, por su parte, la fracción que presentaba mayor actividad correspondía a la 19 principalmente, la cual coincide con el segundo peak apreciado en todos los cromatogramas. Este segundo y mayor máximo, correspondería a la enzima con el extremo hidrofóbico agregado, y el otro peak a la enzima fragmentada, que como eluye antes en la cromatografía posee una menor hidrofobicidad por la posible pérdida del extremo hidrofóbico.

**Tabla 3.4. DRT de la celulasa nativa y modificadas**

	<b>Fracción con mayor actividad</b>	<b>Vr</b>	<b>Vo</b>	<b>Vf</b>	<b>DRT</b>	<b>DRT promedio</b>
<b>Cel-WT.1-1</b>	17	12,54	5,81	19,83	0,48	0,474
<b>Cel-WT.3-1</b>	17	12,53	6,16	19,79	0,47	
<b>Cel-WP2.1</b>	19	13,53	5,95	19,78	0,55	0,567
<b>Cel-WP2.2-2</b>	20	14,04	6,02	19,70	0,59	
<b>Cel-YP2Y.3-1</b>	19	13,55	6,05	19,73	0,55	0,545
<b>Cel-YP2Y.2-3</b>	19	13,55	6,08	19,89	0,54	
<b>Cel-YP3.1-2</b>	19	13,53	6,20	19,76	0,54	0,541
<b>Cel-YP3.3-2</b>	19	13,53	6,16	19,75	0,54	
<b>Cel-Y3.1-1</b>	19	13,53	6,08	19,76	0,54	0,525
<b>Cel-Y3.3-1</b>	18	13,04	6,17	19,75	0,51	

De la Tabla 3.4 se observa que para cada variante se determinaron dos DRT, uno para cada cultivo, estos valores resultan ser bastante similares entre sí por lo que se calculó su promedio. Cabe destacar que los volúmenes Vo y Vf fueron determinados gráficamente y luego verificados con los datos numéricos registrados.

Luego se determinó el porcentaje de incremento de DRT de las proteínas modificadas respecto de la endoglucanasa nativa.



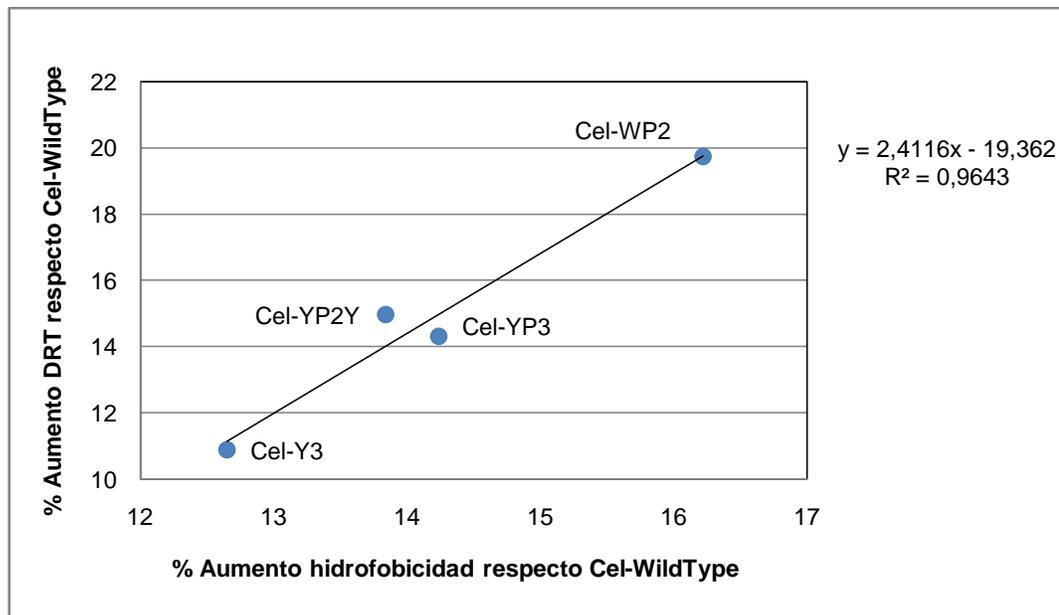
**Figura 3.24. Porcentaje de aumento de DRT respecto a la celulasa nativa.**

En la Figura 3.24 se observa que todas las endoglucanasas modificadas mostraron un aumento en los valores de DRT, tal como era lo esperado según el modelo para determinar la hidrofobicidad superficial de proteínas con extremos, donde éstos aportaban positivamente a la hidrofobicidad total.

Se tiene que el mayor DRT se presentó en Cel-WP2 con un 19,73% de variación respecto a la enzima nativa, luego entre Cel-YP2Y y Cel-YP3 no hay una diferencia significativa, tienen valores de 14,97% y 14,30% respectivamente. Para finalizar Cel-Y3 es la que muestra el menor incremento con un 10,88%.

### 3.9 Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT

En la Figura 3.25 se muestra la relación entre la hidrofobicidad superficial y el tiempo de retención adimensional para las endoglucanasas modificadas. Ambos de manera porcentual con respecto a la endoglucanasa nativa.



**Figura 3.25. Relación entre aumento porcentual de DRT versus aumento porcentual de hidrofobicidad.** Ambos determinados respecto a la celulasa nativa.

Como es posible notar, el aumento en la hidrofobicidad superficial teórica concuerda con el aumento de DRT para todas las endoglucanasas modificadas, según la recta cuya pendiente es 2,41; intercepto -19,36 y coeficiente de correlación 0,96. Como era lo esperado, Cel-WP2 que presenta el mayor incremento de hidrofobicidad, también lo hace con el tiempo de retención y Cel-Y3 que posee el menor aumento de

hidrofobicidad, tiene el menor aumento de DRT. Las variantes Cel-YP3 y Cel-YP2Y poseen valores intermedios para ambas variables y similares entre sí.

Estos resultados demuestran que la adición de extremos hidrofóbicos produce que en la cromatografía la enzima quede adsorbida a la matriz de la columna por más tiempo, el cual es directamente proporcional a la hidrofobicidad que posea el extremo agregado. Si bien fue posible encontrar una relación lineal entre estas variables, cuyo coeficiente de correlación es cercano a la unidad, se recomienda probar con el extremo WP4 para asegurarse que la relación se mantiene.

Como todas las endoglucanasas mutadas presentaron altos valores de actividad, superiores al 91%, y todas aumentaron el DRT, podría escogerse cualquiera de ellas y se obtendrían buenos resultados, una celulasa activa y que se puede purificar más fácilmente que la nativa. De todas maneras se recomienda optimizar la producción de todas estas endoglucanasas modificadas, para así poder comparar el mejor de los casos para cada una de ellas entre sí. Esto ya que en este trabajo se utilizaron las mismas condiciones para todas las variantes, y puede que estas condiciones hayan sido más favorables para unas endoglucanasas modificadas que para otras.

Si se consideran los resultados previamente analizados, es posible determinar que la variante que tuvo un mejor comportamiento, con estas condiciones de cultivo, es Cel-WP2, esto debido a dos razones: la primera, es que es el extremo hidrofóbico que aporta un mayor incremento en la hidrofobicidad superficial total de la proteína y por lo tanto, una elución retardada en la cromatografía, que se traduce en una fracción menos contaminada, y la segunda, es que presenta un 99,7% de actividad residual específica; con lo que se estaría obteniendo una endoglucanasa igualmente activa que la nativa pero con un DRT un 19,7% mayor.

## 4. CONCLUSIONES

Fue posible modificar proteínas mediante la adición de extremos formados por secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos, utilizando la técnica de PCR. Se logró, de forma exitosa, modificar y posteriormente producir de manera recombinante, el dominio catalítico de una endoglucanasa nativa con 4 extremos carboxilo hidrofóbicos: WP2, YP2Y, YP3 y Y3.

Se observa una buena reproducibilidad de los resultados de los cultivos de las cepas recombinantes de endoglucanasa, obteniéndose valores similares de actividad, proteína total y distribución subcelular para los tres cultivos de cada cepa.

Se concluye que las variantes de endoglucanasa modificadas con extremos hidrofóbicos son activas, todas presentan valores superiores al 91% de actividad específica residual con respecto a la nativa, y por lo tanto, esta adición no afecta significativamente su actividad catalítica. Además, se observa que todas las enzimas mutadas presentaron el mismo comportamiento que la endoglucanasa nativa, donde la mayor actividad celulolítica, cerca del 90%, se obtiene en el medio extracelular. Los valores de proteína total demostraron que la endoglucanasa nativa y las mutadas tienen una igual distribución de proteínas, aproximadamente de un 87% en el medio extracelular. A partir de estos resultados, actividad y proteína total, se aprecia que no hay disminución en la recuperación de la enzima en comparación con la endoglucanasa nativa, por lo que esta adición tampoco afectaría la recuperación de la misma.

Dado que los parámetros de actividad y proteína total presentaron valores similares para todas las endoglucanasas, se sugiere hacer un estudio más profundo de las condiciones óptimas de cultivo tanto para la enzima nativa, como para las modificadas. Así será posible comparar el mejor escenario para la producción de cada una de ellas.

En el proceso de purificación de la endoglucanasa por HIC, se aprecia un perfil de elución similar para los cromatogramas obtenidos para los dos cultivos de cada cepa. Se observa que tanto la enzima nativa como las modificadas poseen dos máximos, eluyendo la primera a los 12,5 mL y las variantes a los 13,5 mL aproximadamente. Esto se explica vía la presencia de proteasas en el medio que fragmentaron a la proteína justo antes del extremo hidrofóbico. Se recomienda para estudios posteriores agregar inhibidores de proteasas para evitarlo.

Los DRT de las variantes de endoglucanasa se calcularon de manera gráfica, el mayor DRT se presenta en Cel-WP2 con un 19,73% de aumento respecto a la enzima nativa, por lo que ésta se presenta como la mejor candidata dentro de las alternativas propuestas. Luego, entre Cel-YP2Y y Cel-YP3 no hay una diferencia significativa, con valores de 14,97% y 14,30% respectivamente. Finalmente, Cel-Y3 muestra el menor incremento con un 10,88%. Se concluye que la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos permite un aumento del DRT de la proteína mutada para todos los extremos estudiados; es decir, la variación de hidrofobicidad total de la proteína es directamente proporcional a la variación de DRT.

Finalmente, se define como criterio cualitativo que no es necesario que el extremo hidrofóbico incluya prolina para que la proteína extracelular sea activa. Y como criterios cuantitativos, se establecen que el extremo a adicionar debe tener una hidrofobicidad menor a 500 y que el aumento de DRT varía con respecto al aumento de hidrofobicidad según la recta  $y=2,41x-19,36$  con un  $R^2= 0,96$ .

## 5. RECOMENDACIONES

Para añadir la secuencia del extremo hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal de la proteína en estudio, se recomienda usar Vent DNA polimerasa sobre la Taq, debido a la gran fidelidad que presenta al poseer actividad autocorrectora.

Pese a que la proteína escogida como modelo presenta un grado de identidad bastante elevado con la endoglucanasa utilizada en este trabajo, se recomienda modelar la enzima en cuestión para obtener resultados más certeros.

Además, se recomienda realizar un estudio más exhaustivo que pueda establecer las condiciones óptimas de cultivo, de crecimiento e inducción, para cada una de las endoglucanasas mutadas y, de esta manera, poder comparar entre los escenarios óptimos de las distintas variantes. Esto ya que en este trabajo se utilizaron las mismas condiciones para todas las variantes, y puede que estas condiciones hayan sido más favorables para unas variantes que para otras.

Dado que el ensayo de actividad en medio líquido realizado a las fracciones provenientes de la cromatografía se ve afectado por la sal presente en las muestras, se recomienda su diálisis previa, además de contar con una pipeta calibrada, placas Falcon de 96 pocillos en las mejores condiciones de limpieza, y si es posible, realizar el ensayo en duplicado o triplicado.

Se recomienda para próximos estudios realizarlos en presencia de inhibidores de proteasas, para de esta manera asegurar que la proteína de interés que esté actuando sea completa y no sólo una parte de ella.

El criterio cuantitativo que se definió era que el extremo a agregar debía tener un valor de hidrofobicidad menor a 500 para no afectar a la actividad de la enzima, este criterio es válido por los resultados mostrados a lo largo del estudio. De todas maneras se recomienda probar con el extremo WP4, el que posee una hidrofobicidad de 878, y verificar que efectivamente ocurre esto.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

1. Agrawal YC, Kashyap MC, Sarkar BC, Singh BPN (1997) Response surface analysis of enzyme aided extraction of soybean. *Journal of Food Science and Technology*. 34: 386-390.
2. Ahuja, Satinder. *Handbook of bioseparations*. Estados Unidos, 2000. 722 p.
3. Asenjo, Juan. *Separation processes in Biotechnology*. Estados Unidos, Marcel Dekker, 1990. 801 p.
4. Baene E., Carvajal C. y Garcia L. (2009) *Bioinformática de Celulasas*.
5. Beguin P, Aubert JP. (1993) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiology Reviews*. 13: 25-58.
6. Beilen J. B., Li Z. (2002) Enzyme Technology: an overview. *Current Opinion in Biotechnology*. 13: 338-344.
7. Beldman G, Voragen AGJ, Rombouts FM, Pilnik W (1988) Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*. 31: 173-178.
8. Bhat MK (2000) Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*. 18: 355-383.
9. Bhat MK, Bhat S (1997) Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*. 15: 583-601.
10. Chou TYC, Chang MM, Tsao GT (1981) Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. *Advances in Biochemical Engineering*. 20: 16-42.
11. Das K, Solehah A, Balaumani VT, Amiza MA (1994) Enzymes for improved extraction and stabilization of colour and flavour of orange juice. *Journal of Food Science and Technology*. 31: 508-510.
12. Dienes D., Egyházi A., Réczey K. (2003) Treatment of recycled fiber with *Trichoderma cellulases*. *Industrial Crops and Products*. 20: 11-21.
13. Dill K. A. (1990) Dominant force in protein folding. *Biochemistry*. 29: 7133-7155.
14. Dinnella C, Lanzarini G, Monteleone E (1998) Enzymatic carrot tissue maceration: optimization by response surface analysis. *Sciences Des Aliments*. 18: 497-505.

15. Dongowski G, Sembries S, Bauckhage K, Will F, Dietrich H (2002) Degradation of apple cell wall material by commercial enzyme preparations. *Nahrung/Food*. 46: 105-111.
16. Dos-Mohd AM, Islam MN, Noor BM (2001) Enzymic extraction of native starch from sago (Metroxylon sagu) waste residue. *Starch/Stärke*. 53: 639-643.
17. Eriksson K. (1998) Hydrophobic Interaction Chromatography. *Protein purification: Principles High-Resolution Methods and Applications*. New York. 283-309.
18. Fan LT, Lee YH, Gharpuray MM (1982) The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Advances in Biochemical Engineering*. 23: 158-187.
19. Fexby S., Bullow L. (2004) Hydrophobic peptide tags as tools in bioseparations. *Science Direct*. 22(10).
20. Forsberg CW, Groleau D (1982) Stability of the endo- $\beta$ -1,4-glucanase and  $\beta$ -1,4-glucosidase from *Bacteroides succinogenes*. *Canadian Journal of Microbiology*. 28: 144-148.
21. Freitas SP, Lago RCA, Jablonka FH, Hartman L (1993) Extraction aqueuse enzymatique de l'huile d'avocat á partir de la pulpe fraiche. *Revue Francaise des Corps Gras*. 2: 365-371.
22. Galante Y. M., Formantici C. (2003) Enzyme Application in Detergency and in Manufacturing Industries. *Current Organic Chemistry*. 7: 1399-1422.
23. Garrido A, García A, Brenes M, Moyano MJ, Alba J, García P (2001) Improvement of phenolic compound content in virgin olive oils by using enzymes during malaxation. *Journal of Food Engineering*. 48: 189-194.
24. Hahn-Hägerdal B, Palmqvist E (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74: 25-33.
25. Henríquez K. Memoria de título: "Estudio del efecto de un extremo polipeptídico en el comportamiento cromatográfico de proteínas: Cromatografía de Interacción Hidrofóbica". Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2005.
26. Henrissat B. (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J*. 280: 309-316.
27. Keller K.; Friedmann T.; Boxman A. (2001) The bioseparation needs for tomorrow. *Trends in Biotechnology*. 19: 438-441.

28. Khare SK, Sharma A, Gupta MN (2001) Enzyme-assisted aqueous extraction of rice bran oil. *Journal of American Oil Chemical Society*. 78: 949-951.
29. Ladisch MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT (1983) Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 5: 82-102.
30. Lee CH, Kim DH, Kim JH, Bae SE, Seo JH, Oh TK (2005) Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus* species xylanase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 2541-2545.
31. Lee J (1997) Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 56: 1-24.
32. Lienqueo M. E. Tesis de Doctorado: "Desarrollo de un sistema experto para la selección racional de procesos de purificación de proteínas: optimización de criterios de selección de secuencias". Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile, 1999.
33. Lienqueo M.E., Salazar O., Robinson M., Quilodran C., Montecinos C., Asenjo J.A. (2009) Identification of criteria for selection of optimal hydrophobic tags for protein purification by HIC.
34. Lienqueo, M. E., Salgado, J.C., Giaverini, O., Asenjo, J.A. (2009) Computer-aided design to select optimal polypeptide tags to assist the purification of recombinant proteins. *Separation and Purification Technology*. 65: 86-94.
35. Lin Y. y Tanaka S.(2006) Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects, *Appl Microbiol Biotechnol*. 69: 627-642.
36. Ljungdahl LG, Eriksson KE (1985) Ecology of microbial cellulose degradation. *Advances in Microbiology and Ecology*. 8: 237-299.
37. Marsden WL, Gray PP (1986) Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. 3: 235-274.
38. Mishima D., Tateda M., Ike M. y Fujita M. (2006) Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. *Bioresour Technol*. 97: 2166-2172.
39. Montecinos C. Memoria de Título: "Estudio del efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de xilanasas recombinantes". Departamento de

Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2009.

40. Navarrete-Bolaños JL, Rangel-Cruz CL, Jiménez-Islas H, Botello-Alvarez E, Rico-Martínez R (2005) Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International*. 38: 159-165.
41. Ohara H., Noguchi J., Karita S., Kimura T., Sakka K., Ohmiya K. (2000) Sequence of eg Vand Properties of Eg V, a Ruminococcus albus Endoglucanase Containing a Dockering Domain. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 80-88.
42. Pèlach M.A., Pastor F.J., Puig J., Vilaseca F. Mutjé P. 2002 Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. *Process Biochemistry*. 38: 1063-1067.
43. Pérez O. y Ponce T. (2002). Celulasas y xilanasas en la industria. Avance y perspectiva. 21: 273-277.
44. Philippidis GP, Smith TK (1995) Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 51/52: 117-124.
45. Rastogi NK, Rajesh G, Shamala TR (1998) Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 76: 129-134.
46. Robinson M. Memoria de Título: "Efecto de la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de cutinasas". Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2008.
47. Roe S. (1989) Separation based on structure. *Protein purification methods: a practical approach*. Edv Harris and S. Angal, IRL pres. Oxford. 221-232.
48. Ryu DDY, Mandels M (1980) Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 2: 91-102.
49. Sarker BC, Singh RK, Kumbhar BK, Agrawal YC, Kulshreshtha MK (1999) Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 36: 511-514.
50. Schell D.J., Riley C.J., Dowe N., Farmer J., Ibsen K.N. and Ruth M.F. et al. (2004) A bioethanol process development unit: initial operating experiences and results with a corn fiber feedstock. *Bioresour Technol*. 91: 179-188.

51. Shirai T., Ishida H., Noda J., Yamane T., Ozaki K., Hakamada Y., Ito S. (2001) Crystal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaptation of an Industrial Enzyme. *J. Mol. Biol.* 310: 1079-1087.
52. Simeonidis E., Pinto J. M., Lienqueo M. E., Tsoka S., Papageorgiou L.G. (2005) MINLP models for the synthesis of optimal peptide tags and downstream processing. *Biotechnology Progress.* 21: 875-884.
53. Steffens, M.A., Fraga, E.S., Bogle I.D.L (1998). Synthesis of purification tags for optimal downstream processing. *Comp. Chemical Engineering.* 24: 717-220.
54. van Zessen E., Weismann M., Bakker R.R., Elbersen H.W., Reith J.H. and den Uil H. (2003) Lignocellulosic ethanol, a second opinion Report 2GAVE-03.11, Netherlands Agency for Energy & Environment.
55. Wyman C. (1999) Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. In: R. Socolow, D. Anderson and J. Harte, Editors, *Ann Rev Energy Environ*, 24: 189-226 Annual Reviews, Palo Alto, CA.

## 7. ANEXOS

### Anexo A: Aminoácidos

En el presente anexo se presenta la estructura de los aminoácidos y su principal clasificación en función de las características determinadas por su cadena lateral.

**Grupo R apolares alifáticos:** corresponden a grupos con cadena lateral apolar o hidrofóbica. Dentro de este grupo se encuentran las de cadenas laterales voluminosas, como ocurre con la **Alanina, Valina, Metionina, Leucina** e **Isoleucina**. **Glicina**, debido a su pequeño tamaño, genera un mínimo impedimento estérico permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. **Prolina**, por el contrario, al poseer un segundo grupo amino mantiene una conformación rígida.

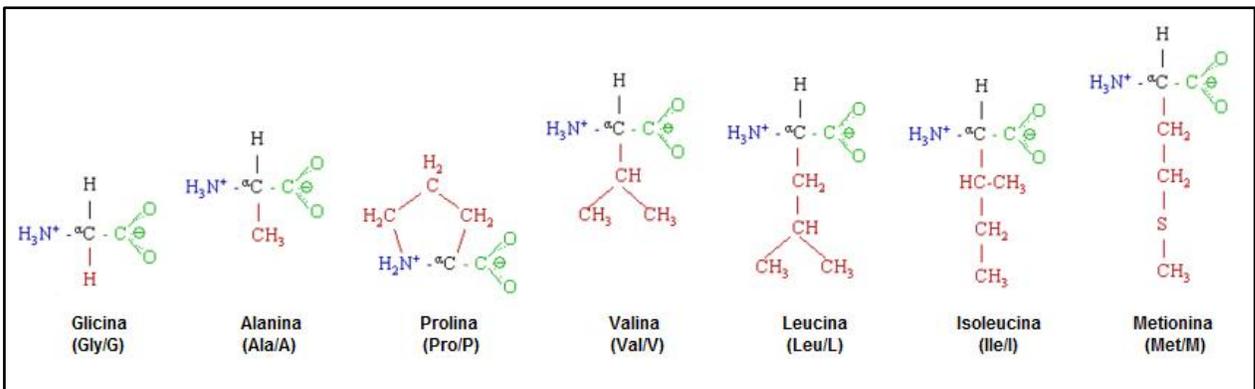


Figura 7.1. Estructura química aminoácidos apolares alifáticos.

**Grupo R aromáticos:** este grupo está conformado por **Fenilalanina, Tirosina** y **Triptófano**, los cuales son relativamente apolares. Pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se concentran.

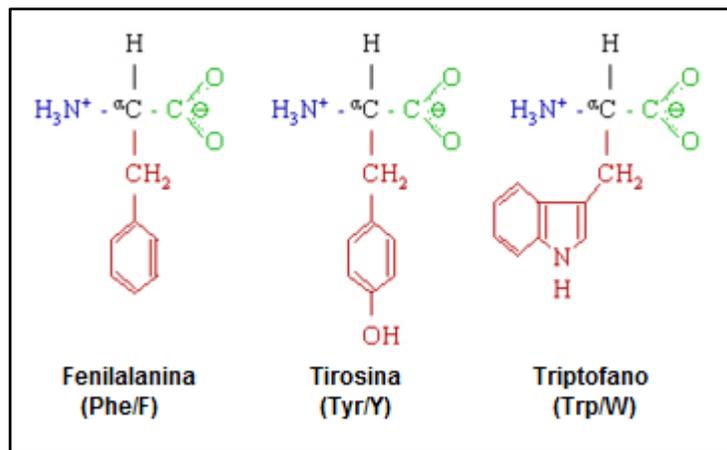


Figura 7.2. Estructura química aminoácidos aromáticos.

**Grupo R polares sin carga:** estos grupos son bastante solubles en agua a diferencia de los hidrofóbicos, debido, principalmente, a que sus grupos funcionales forman puentes de hidrógeno con el agua. Se encuentran la **Serina, Treonina, Cisteína, Asparagina y Glutamina**.

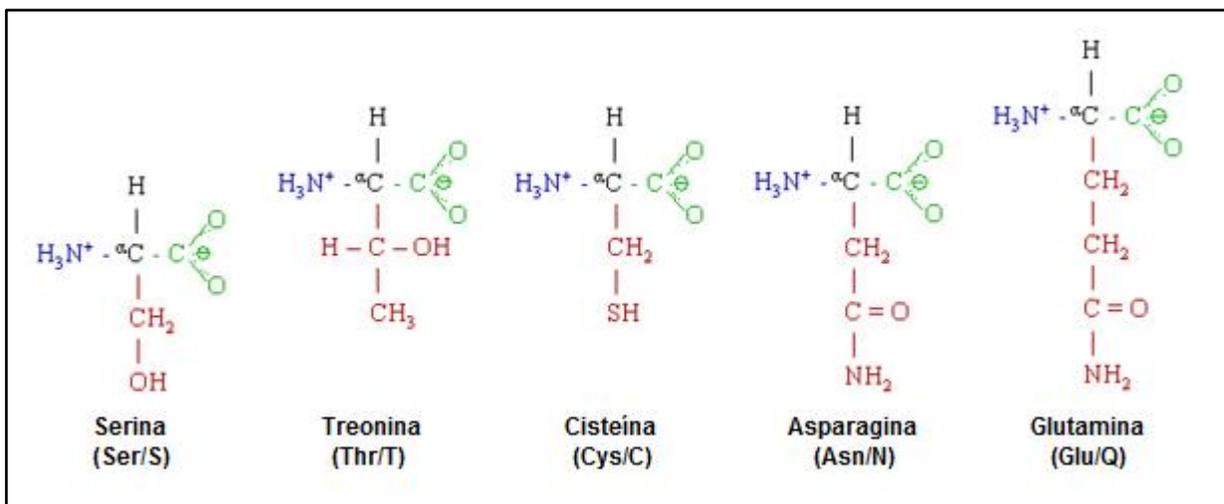


Figura 7.3. Estructura química aminoácidos polares sin carga.

**Grupo R cargado positivamente:** poseen carga positiva neta a pH 7,0 y todos poseen seis átomos de carbono. Aquí se encuentran la **Lisina, Arginina e Histidina**.

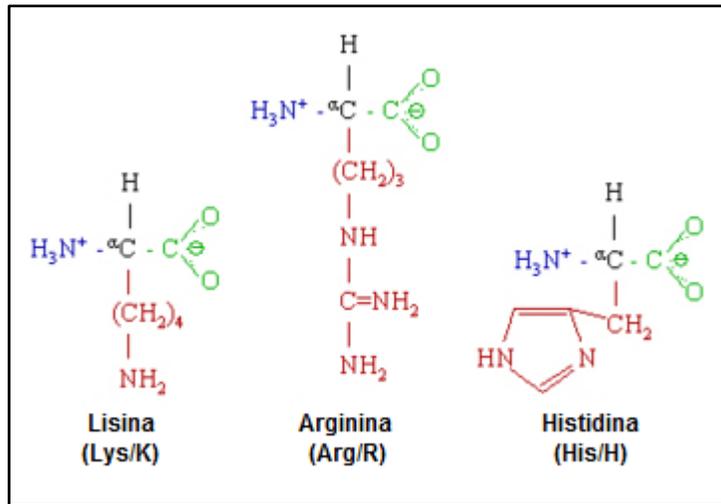


Figura 7.4. Estructura química aminoácidos cargados positivamente.

**Grupo R cargado negativamente:** Los dos miembros de esta clase son: **Ácido Aspártico** y **Glutámico**, cada uno de los cuales posee un segundo grupo carboxilo que se encuentra completamente ionizado y por tanto cargado negativamente a pH 6,0 y 7,0.

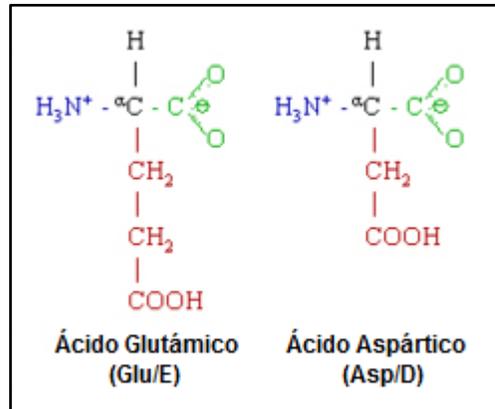


Figura 7.5. Estructura química aminoácidos cargados negativamente.

## Anexo B: Medios de cultivo líquidos y sólidos

### B.1. Medios de cultivo líquidos

a) **Medio Luria-Broth (LB):** Por cada 1000 mL de solución, el medio LB contiene:

- 10 gr de triptona
- 5 gr de extracto de levadura
- 10 gr de cloruro de sodio

Se ajusta el volumen a 1000 mL con agua Milli-Q y se esteriliza por autoclave.

b) **Medio LB más ampicilina:** Corresponde al medio LB estéril, al cual previo a su utilización se le agrega ampicilina estéril a una concentración final de 100 µg/mL.

c) **Medio SOB:** Por cada 1000 mL de solución, el medio SOB contiene:

- 20 gr de triptona
- 5 gr de extracto de levadura
- 0,5 gr de cloruro de sodio

Se ajusta el volumen a 1000 mL con agua Milli-Q y se ajusta el pH a 7,0. Se esteriliza por autoclave.

d) **Medio Terrific Broth (TB):** Por cada 1000 mL de solución, el medio TB contiene:

- 900 mL de agua Milli-Q
- 12 gr de triptona
- 24 gr de extracto de levadura
- 4 mL de glicerol

Por separado se preparan 100 mL de una solución 0,17 M de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,72 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , la cual contiene:

- 90 mL agua Milli-Q
- 2,31 gr de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$
- 12,54 gr  $\text{K}_2\text{HPO}_4$

Se ajusta el volumen a 100 mL con agua Milli-Q. El medio TB y las sales se esterilizan por separado usando la autoclave. Previo uso del medio TB se agrega la solución de sales.

## **B.2. Medios de cultivo sólidos**

**a) Placas LB-agar con Amp:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 mL de medio LB, se esterilizó por autoclave y se dejó enfriar a 50°C. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (100  $\mu\text{L}$  del stock de Amp 100 mg/mL) y se repartió el contenido en 4 placas Petri estériles. Se dejaron gelificar, se sellaron con Parafilm y luego se guardaron a 4°C.

**b) Placas Lb-agar con Amp/IPTG/X-Gal:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 mL de medio LB, se esterilizó por autoclave y se dejó enfriar a 50°C. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (100  $\mu\text{L}$  del stock de Amp 100 mg/mL), se agregó IPTG para obtener una concentración final de 0,5 mM (100  $\mu\text{L}$  del stock de IPTG 0,5 M) y se agregó X-Gal para una concentración final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (100  $\mu\text{L}$  del stock de X-Gal 50 mg/mL). Luego se repartió el contenido en 4 placas Petri estériles, se dejaron gelificar, sellaron y posteriormente se guardaron a 4°C.

## Anexo C: Metodología anexa

### C.1. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

A continuación se muestran las composiciones de los geles separador y concentrador:

**Tabla 7.1. Composición del gel separador**

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	1,58 mL
Tampón Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, SDS 0,4%	0,95 mL
Agua destilada	1,27 mL
PSA 10%	20 $\mu$ L
TEMED	2 $\mu$ L

**Tabla 7.2. Composición del gel concentrador**

Reactivo	Volumen
Acrilamida Bisacrilamida 29:1	0,17 mL
Tampón Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, SDS 0,4%	0,25 mL
Agua destilada	0,58 mL
PSA 10%	7,5 $\mu$ L
TEMED	1,25 $\mu$ L

Las muestras se mezclaron en proporción 4:1 con tampón de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25% v/v, SDS 2% p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1% p/v pH 6,8), se denaturaron calentándolas a 100°C por 5 min y posteriormente se cargaron en el gel. Las electroforesis se realizaron bajo un voltaje de 200 V. Se utilizó tampón de corrida Tris-glicina-SDS (Tris 25 mM, glicina 192 mM y SDS 0,1% p/v) y estándar de peso molecular preteñido de proteínas.

### C.2. Tinción de geles de proteínas con nitrato de plata

Se incuba el gel durante 1 h con 100 mL de una solución al 40% etanol y 10% ácido acético, luego se lava con agua destilada varias veces durante 1 h. A continuación se incuba durante 30 min con una solución 0,005 mg/mL DTT, posteriormente se retira el reactivo DTT y se incuba con una solución de nitrato de plata a 0,001 gr/mL por 30 min a oscuras.

Para el revelado, se retira la solución anterior y se remoja con una solución de 250 mL que contiene 9 gr de carbonato de sodio y 0,15 mL de formaldehído al 37%. Se verifica la aparición de bandas (de 2 a 10 min) y se detiene la reacción añadiendo 6 gr de ácido cítrico. Finalmente el gel es lavado con agua 2 veces.

### **C.3. Método del DNS para medir azúcares reductores**

Este método consiste en la incubación del sustrato con la muestra de enzima por un tiempo definido y a las temperaturas requeridas por el ensayo. Luego la reacción se detiene agregando el reactivo DNS en una proporción volumétrica 1:1, con el volumen de la reacción enzima-sustrato. Luego se calientan las muestras a 100°C por 10 minutos y se enfrían en hielo por 5 min. Los azúcares reductores se calculan midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 550 nm, y luego el valor numérico se determina utilizando una curva de calibración estándar construida para diferentes concentraciones del azúcar reductor a calcular.

## Anexo D: Curvas de calibración

### D.1. Curva de calibración BSA

Se utilizaron distintas concentraciones de BSA, entre 1 y 0,015625 mg/mL. El blanco se realizó con agua en vez de proteína. Se determinó la concentración de proteínas según el método de Bradford.

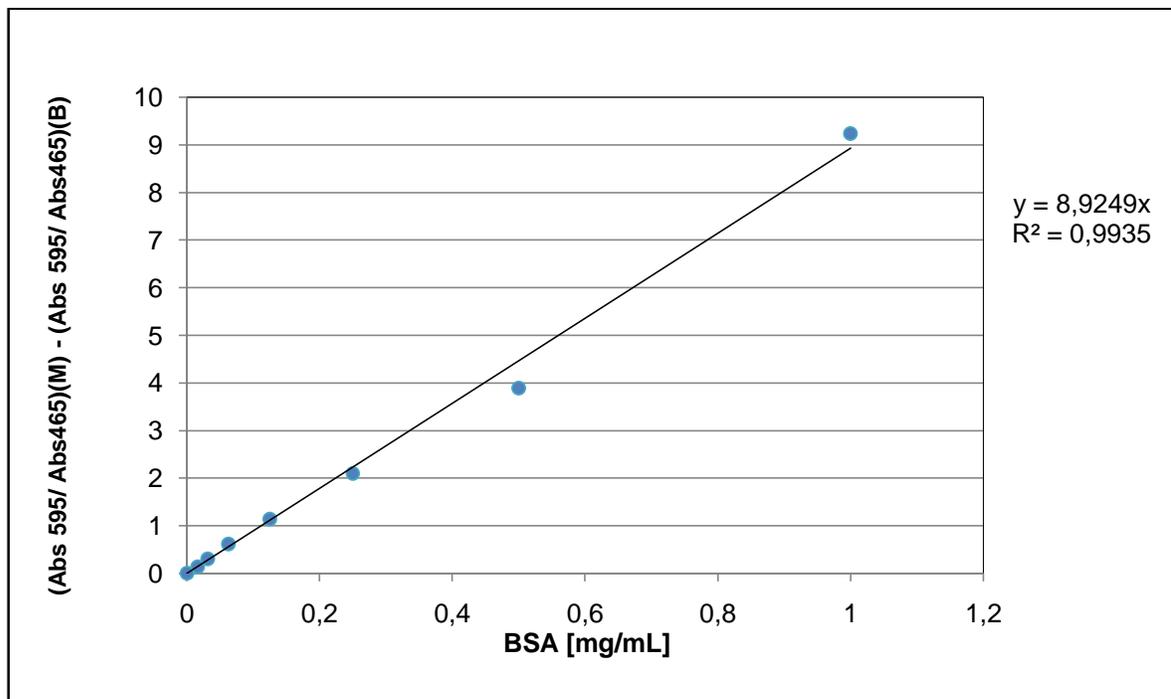


Figura 7.6. Curva de Calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford. BSA se usó como estándar

### D.2. Curva de calibración DNS

Se utilizaron distintas diluciones de una solución de glucosa de concentración de 2 mg/mL. A 50  $\mu$ L de cada dilución se le agregó 50  $\mu$ L de DNS en una placa de 96 pocillos. Se incubó por 10 minutos a 100°C, se enfrió en hielo y se leyó la absorbancia a 550 nm a 50  $\mu$ L de la reacción. Se utilizó como blanco agua.

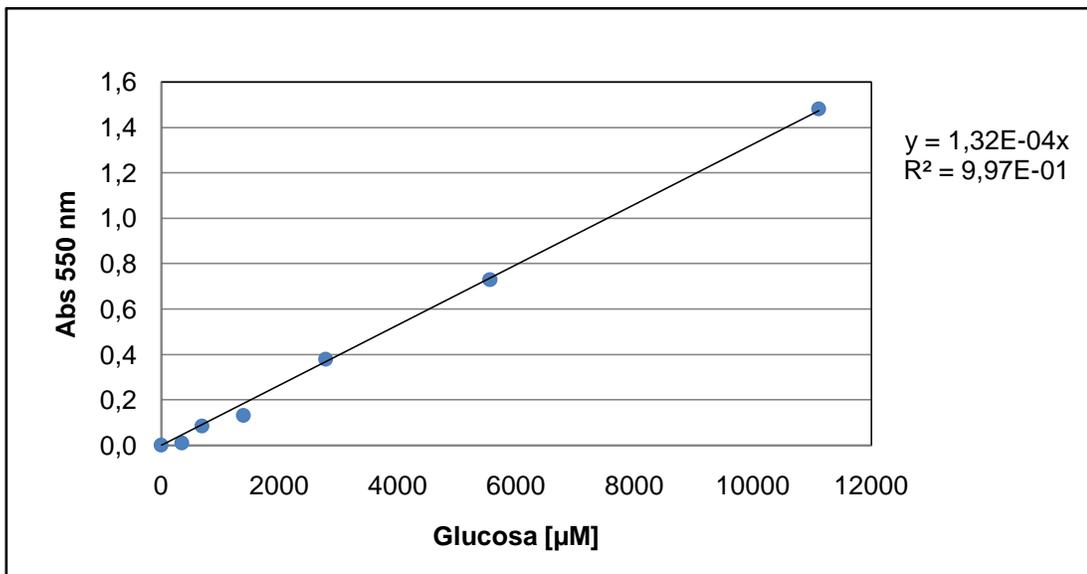


Figura 7.7. Curva de Calibración del método de DNS para la detección de azúcares reductores.

### D.3. Curva de calibración Peso Molecular

Para realizar esta curva de calibración de calibración se midió la distancia que recorría cada banda del marcador de peso molecular, luego fue graficado el logaritmo natural del peso molecular versus esta distancia en (cm).

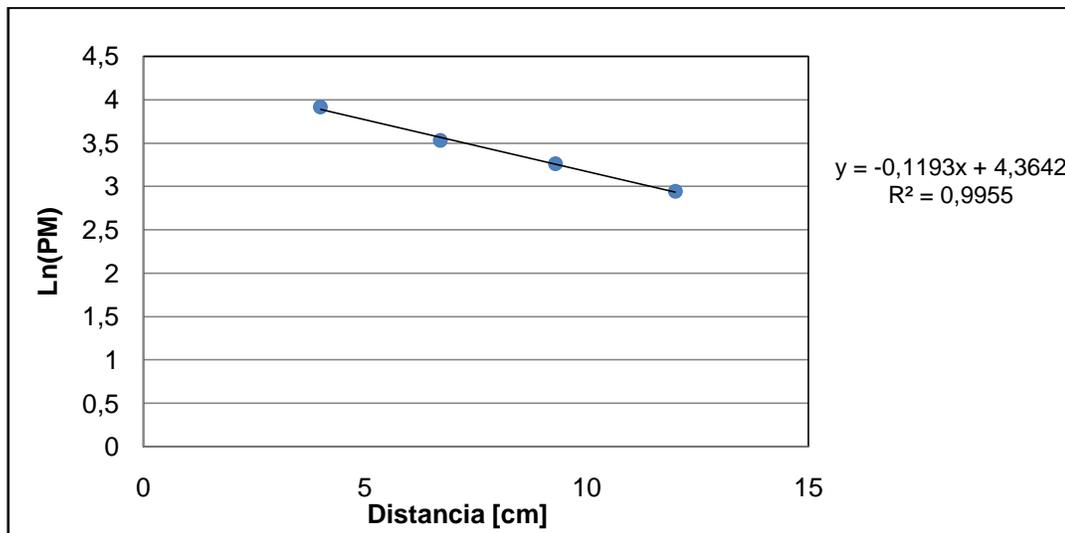


Figura 7.8. Curva de Calibración para determinar el Peso Molecular de una proteína desde un gel de Poliacrilamida.

## Anexo E: Secuencias de celulasas modificadas

A continuación se presentan las secuencias aminoacídica y nucleotídica de las endoglucanasas mutadas, el extremo hidrofóbico se encuentra destacado.

- **Cel-WP2**

```
gccgttgagccattaacgtgagcggaaatcaaataattagctgatggaaaaagtgttagc
A V E P L N V S G N Q I L A D G K S V S
tttgctggtactagtttattttggagtaataccggttgggggtggcgaagatttttacaca
F A G T S L F W S N T G W G G E D F Y T
gcagacaccggttgccaaggctaagtcagaatttggtgcaacaataattcgtgctgcaatt
A D T V A K A K S E F G A T I I R A A I
gggcatggagcaagtgctggtggcagtttaaattatgattgggatgggaatatgaaccgt
G H G A S A G G S L N Y D W D G N M N R
cttgatactgttgttaatgctgctatagcacaagacatgtacgttattattgattttcat
L D T V V N A A I A Q D M Y V I I D F H
agccatgaagcccacacagatcaagcaacagccgttcgcttttttgaagaagttgcaact
S H E A H T D Q A T A V R F F E E V A T
aaatacgggtgaatacagataacggtattttacgaaatttataatgaaccactgcaaatatct
K Y G E Y D N V I Y E I Y N E P L Q I S
tgggctaattgccataaaaccatacgcagaaaccggtatttgataaaattagagcaattgac
W A N A I K P Y A E T V I D K I R A I D
ccagataacttaattggttaggtacgccaacgtggtcacaagatggtgatggtgctgctg
P D N L I V V G T P T W S Q D V D V A S
ctagatccaattgatcgcgctaataattgcatacactcttcatttttatgcaggtacacat
L D P I D R A N I A Y T L H F Y A G T H
ggtcaatcttatagaataaaagcacaacagcttttagataatggaattgctttatttgct
G Q S Y R N K A Q T A L D N G I A L F A
accgaatgggggtacagttaatgccgatggtaatggcagtgtaaatgtaaatgaaactgat
T E W G T V N A D G N G S V N V N E T D
gcatggatggcatttttttaagacaaataatattagccatgctaactgggctcttaatgac
A W M A F F K T N N I S H A N W A L N D
aaaaatgaaggcgcttctacttttactccaggtggaggttgggactcattaactgcttct
K N E G A S T F T P G G G W D S L T A S
ggtacaaaagttaaagagattattaaaggttggcaaggcagtggtaacgtatggccctgg
G T K V K E I I K G W Q G S G N V W P W
ccgtgataa
P - -
```

- **Cel-YP2Y**

```
gccgttgagccattaacgtgagcggaaatcaaataattagctgatggaaaaagtgttagc
A V E P L N V S G N Q I L A D G K S V S
tttgctggtactagtttattttggagtaataccggttgggggtggcgaagatttttacaca
F A G T S L F W S N T G W G G E D F Y T
gcagacaccggttgccaaggctaagtcagaatttggtgcaacaataattcgtgctgcaatt
A D T V A K A K S E F G A T I I R A A I
gggcatggagcaagtgctggtggcagtttaaattatgattgggatgggaatatgaaccgt
```

G H G A S A G G S L N Y D W D G N M N R  
 cttgatactggttgaatgctgctatagcacaagacatgtacgttattattgattttcat  
 L D T V V N A A I A Q D M Y V I I D F H  
 agccatgaagcccacacagatcaagcaacagccgttcgcttttttgaagaagttgcaact  
 S H E A H T D Q A T A V R F F E E V A T  
 aaatacgggtgaatacagataacggtattttacgaaatttataatgaaccactgcaaatatct  
 K Y G E Y D N V I Y E I Y N E P L Q I S  
 tgggctaattgccataaaaccatacgcagaaaccgttattgataaaattagagcaattgac  
 W A N A I K P Y A E T V I D K I R A I D  
 ccagataacttaattggttaggtacgccaacgtggtcacaagatggtgatggtgcgctg  
 P D N L I V V G T P T W S Q D V D V A S  
 ctagatccaattgatcgcgctaatttgcatacactcttcattttttatgcaggtacacat  
 L D P I D R A N I A Y T L H F Y A G T H  
 ggtcaatcttatagaataaagcacaacagcttttagataatggaattgctttatttgct  
 G Q S Y R N K A Q T A L D N G I A L F A  
 accgaatgggggtacagttaatgccgatggtaatggcagtgtaaatgtaaatgaaactgat  
 T E W G T V N A D G N G S V N V N E T D  
 gcatggatggcattttttaagacaaataatattagccatgctaactgggctccttaatgac  
 A W M A F F K T N N I S H A N W A L N D  
 aaaaatgaagggcgttctacttttactccaggtggaggttgggactcattaactgcttct  
 K N E G A S T F T P G G G W D S L T A S  
 ggtacaaaagttaaagagattattaaggttggcaaggcagtggttaacgta **tatccgta**  
 G T K V K E I I K G W Q G S G N V **Y P Y**  
**ccgtattgataa**  
**P Y - -**

- **Cel-YP3**

gccgttgagccattaacgtgagcggaaatcaaataattagctgatggaaaaagtggttagc  
 A V E P L N V S G N Q I L A D G K S V S  
 tttgctggtactagtttattttggagtaataaccggttgggggtggcgaagatttttacaca  
 F A G T S L F W S N T G W G G E D F Y T  
 gcagacaccggttgccaaggctaagtcagaatttgggtgcaacaataattcgtgctgcaatt  
 A D T V A K A K S E F G A T I I R A A I  
 gggcatggagcaagtgctggtggcagtttaaattatgattgggatgggaatatgaaccgt  
 G H G A S A G G S L N Y D W D G N M N R  
 cttgatactggttgaatgctgctatagcacaagacatgtacgttattattgattttcat  
 L D T V V N A A I A Q D M Y V I I D F H  
 agccatgaagcccacacagatcaagcaacagccgttcgcttttttgaagaagttgcaact  
 S H E A H T D Q A T A V R F F E E V A T  
 aaatacgggtgaatacagataacggtattttacgaaatttataatgaaccactgcaaatatct  
 K Y G E Y D N V I Y E I Y N E P L Q I S  
 tgggctaattgccataaaaccatacgcagaaaccgttattgataaaattagagcaattgac  
 W A N A I K P Y A E T V I D K I R A I D  
 ccagataacttaattggttaggtacgccaacgtggtcacaagatggtgatggtgcgctg  
 P D N L I V V G T P T W S Q D V D V A S  
 ctagatccaattgatcgcgctaatttgcatacactcttcattttttatgcaggtacacat  
 L D P I D R A N I A Y T L H F Y A G T H  
 ggtcaatcttatagaataaagcacaacagcttttagataatggaattgctttatttgct  
 G Q S Y R N K A Q T A L D N G I A L F A  
 accgaatgggggtacagttaatgccgatggtaatggcagtgtaaatgtaaatgaaactgat

T E W G T V N A D G N G S V N V N E T D  
gcatggatggcattttttaagacaaataatattagccatgctaactgggctcctaagac  
A W M A F F K T N N I S H A N W A L N D  
aaaaatgaaggcgcttctacttttactccaggtggagggtgggactcattaactgcttct  
K N E G A S T F T P G G G W D S L T A S  
ggtacaaaagttaaagagattattaaaggttggcaaggcagtggtaacgta **tatccgtat**  
G T K V K E I I K G W Q G S G N V **Y P Y**  
**ccgtatccg**tgataa  
**P Y P** - -

• **Cel-Y3**

gccgttgagccattaaacgtgagcggaaatcaaataattagctgatggaaaaagtgttagc  
A V E P L N V S G N Q I L A D G K S V S  
tttgctggtagcttagttttttggagtaataccggttgggggtggcgaagatttttacaca  
F A G T S L F W S N T G W G G E D F Y T  
gcagacaccggttgccaaggctaagtcagaatttggtgcaacaataattcgtgctgcaatt  
A D T V A K A K S E F G A T I I R A A I  
gggcatggagcaagtgctggtggcagtttaaattatgattgggatgggaatatgaaccgt  
G H G A S A G G S L N Y D W D G N M N R  
cttgatactggttgaatgctgctatagcacaagacatgtacgttattattgattttcat  
L D T V V N A A I A Q D M Y V I I D F H  
agccatgaagcccacacagatcaagcaacagccgcttcgcttttttgaagaagttgcaact  
S H E A H T D Q A T A V R F F E E V A T  
aaatacgggtgaatacagataacgttattttacgaaatttataatgaaccactgcaaatatct  
K Y G E Y D N V I Y E I Y N E P L Q I S  
tgggctaattgccataaaaccatacgcagaaaccggttattgataaaattagagcaattgac  
W A N A I K P Y A E T V I D K I R A I D  
ccagataacttaattggttaggtacgccaacgtgggcacaagatggtgatggtgctg  
P D N L I V V G T P T W S Q D V D V A S  
ctagatccaattgatcgcgctaataattgcatacactcttcatttttatgcaggtacacat  
L D P I D R A N I A Y T L H F Y A G T H  
ggtcaatcttatagaataaagcacaacagcttttagataatggaattgctttatttgct  
G Q S Y R N K A Q T A L D N G I A L F A  
accgaatggggtacagttaatgccgatggtaatggcagtgtaaatgtaaatgaaactgat  
T E W G T V N A D G N G S V N V N E T D  
gcatggatggcattttttaagacaaataatattagccatgctaactgggctcctaagac  
A W M A F F K T N N I S H A N W A L N D  
aaaaatgaaggcgcttctacttttactccaggtggagggtgggactcattaactgcttct  
K N E G A S T F T P G G G W D S L T A S  
ggtacaaaagttaaagagattattaaaggttggcaaggcagtggtaacgta **tattactat**  
G T K V K E I I K G W Q G S G N V **Y Y Y**  
tgataa  
- -

- Alineamiento aminoacídico de todas las secuencias**

```

WildType      AVEPLNVSGNQILADGKSVSFAGTSLFWSNTGWGGEDFYTADTVAKAKSEFGATIIIRAAI 60
WP2           AVEPLNVSGNQILADGKSVSFAGTSLFWSNTGWGGEDFYTADTVAKAKSEFGATIIIRAAI 60
YP2Y         AVEPLNVSGNQILADGKSVSFAGTSLFWSNTGWGGEDFYTADTVAKAKSEFGATIIIRAAI 60
YP3          AVEPLNVSGNQILADGKSVSFAGTSLFWSNTGWGGEDFYTADTVAKAKSEFGATIIIRAAI 60
Y3           AVEPLNVSGNQILADGKSVSFAGTSLFWSNTGWGGEDFYTADTVAKAKSEFGATIIIRAAI 60
*****

WildType      GHGASAGGSLNYDWDGNNRDLDTVVNAIIAQDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEEVAT 120
WP2           GHGASAGGSLNYDWDGNNRDLDTVVNAIIAQDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEEVAT 120
YP2Y         GHGASAGGSLNYDWDGNNRDLDTVVNAIIAQDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEEVAT 120
YP3          GHGASAGGSLNYDWDGNNRDLDTVVNAIIAQDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEEVAT 120
Y3           GHGASAGGSLNYDWDGNNRDLDTVVNAIIAQDMYVIIDFHSHEAHTDQATAVRFFEEVAT 120
*****

WildType      KYGEYDNVIYEIYNEPLQISWANAIKPYAETVIDKIRAIDPDNLIVVGTPTWSQDVDVAS 180
WP2           KYGEYDNVIYEIYNEPLQISWANAIKPYAETVIDKIRAIDPDNLIVVGTPTWSQDVDVAS 180
YP2Y         KYGEYDNVIYEIYNEPLQISWANAIKPYAETVIDKIRAIDPDNLIVVGTPTWSQDVDVAS 180
YP3          KYGEYDNVIYEIYNEPLQISWANAIKPYAETVIDKIRAIDPDNLIVVGTPTWSQDVDVAS 180
Y3           KYGEYDNVIYEIYNEPLQISWANAIKPYAETVIDKIRAIDPDNLIVVGTPTWSQDVDVAS 180
*****

WildType      LDPIDRANIAYTLHFYAGTHGQSYRNKAQTALDNGIALFATEWGTVNADGNGSVNVNETD 240
WP2           LDPIDRANIAYTLHFYAGTHGQSYRNKAQTALDNGIALFATEWGTVNADGNGSVNVNETD 240
YP2Y         LDPIDRANIAYTLHFYAGTHGQSYRNKAQTALDNGIALFATEWGTVNADGNGSVNVNETD 240
YP3          LDPIDRANIAYTLHFYAGTHGQSYRNKAQTALDNGIALFATEWGTVNADGNGSVNVNETD 240
Y3           LDPIDRANIAYTLHFYAGTHGQSYRNKAQTALDNGIALFATEWGTVNADGNGSVNVNETD 240
*****

WildType      AWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASTFTPGGGWDSLSTASGTVKVEI IKGWQGSQGNV--- 297
WP2           AWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASTFTPGGGWDSLSTASGTVKVEI IKGWQGSQGNVWPW 300
YP2Y         AWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASTFTPGGGWDSLSTASGTVKVEI IKGWQGSQGNVYYPY 300
YP3          AWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASTFTPGGGWDSLSTASGTVKVEI IKGWQGSQGNVYYPY 300
Y3           AWMAFFKTNNISHANWALNDKNEGASTFTPGGGWDSLSTASGTVKVEI IKGWQGSQGNVYYYY 300
*****

WildType      -----
WP2           P----LE 303
YP2Y         PY---LE 304
YP3          PYP--LE 305
Y3           -----LE 302

```

**Anexo F: Hidrofobicidad superficial teórica celulasa nativa**

Aminoácidos		Área Superficial $S_{aai}$	Hidrofobicidad superficial escala Miyazawa-Jernigan $\Phi_{aai}$	Área total expuesta de cada aminoácido $R_{aai}$	Hidrofobicidad total para cada aminoácido $\Phi_i$ M-J	Área superficial totalmente expuesta $S_{tag aai}$
A	ALA	652,4	0,391	0,066	0,026	115
R	ARG	311,8	0,202	0,031	0,006	225
N	ASN	1313,6	0,125	0,132	0,017	160
D	ASP	979,1	0,105	0,099	0,010	150
C	CYS	0	0,819	0	0	135
Q	GLN	792,4	0,151	0,080	0,012	180
E	GLU	1047,0	0,115	0,105	0,012	190
G	GLY	728,3	0,252	0,073	0,018	75
H	HIS	97,5	0,354	0,010	0,003	195
I	ILE	280,7	0,967	0,028	0,027	175
L	LEU	116,5	0,908	0,012	0,011	170
K	LYS	826,2	0,000	0,083	0,000	200
M	MET	18,6	0,987	0,002	0,002	185
F	PHE	194,9	1,000	0,020	0,020	210
P	PRO	278,0	0,151	0,028	0,004	145
S	SER	559,2	0,188	0,056	0,011	115
T	THR	1082,6	0,253	0,109	0,028	140
W	TRP	220,8	0,775	0,022	0,017	255
Y	TYR	194,3	0,484	0,020	0,009	230
V	VAL	239,6	0,770	0,024	0,019	155
<b>Área superficial total celulasa nativa Sp</b>		<b>9933,5</b>			<b>0,252</b>	

## Anexo G: Test Estadístico

Utilizando la herramienta análisis de datos-Regresión de Excel, se realizó un análisis estadístico de las variables actividad específica residual versus hidrofobicidad de los extremos, con un 99% de nivel de confianza. A continuación se presentan los resultados obtenidos:

**Tabla 7.3. Variables a considerar**

	Hidrofobicidad	Act. Esp. Residual
<b>WildType</b>	0,0	100,0
<b>Y3</b>	334,0	118,8
<b>YP2Y</b>	377,8	91,6
<b>YP3</b>	399,7	99,7
<b>WP2</b>	439,0	95,1

**Tabla 7.4. Estadísticas de la regresión.**

<b>Coefficiente de correlación múltiple</b>	0,104
<b>Coefficiente de determinación R<sup>2</sup></b>	0,011
<b>R<sup>2</sup> ajustado</b>	-0,319
<b>Error típico</b>	12,053
<b>Observaciones</b>	5

**Tabla 7.5. Análisis de Varianza.**

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
<b>Regresión</b>	1	4,73	4,73	0,033	0,868
<b>Residuos</b>	3	435,83	145,28		
<b>Total</b>	4	440,56			

**Tabla 7.6. Determinación de coeficientes, error típico, estadístico t y probabilidades.**

	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>	<i>Inferior 99,0%</i>	<i>Superior 99,0%</i>
<b>Intercepción</b>	<b>102,946</b>	11,83	8,701	0,0032	65,30	140,60	33,84	172,05
<b>Hidrofobicidad</b>	<b>-0,00613</b>	0,034	-0,180	0,868	-0,11	0,10	-0,20	0,19

De la tabla anterior se tiene que la recta que relaciona estas dos variables corresponde a  $Y = -0,00613X + 102,946$ , donde Y es la actividad específica residual y X la hidrofobicidad del extremo. Esta regresión no resulta ser un buen modelo, puesto que los coeficientes de correlación presentan valores muy alejados de la unidad.

Tabla 7.7. Análisis de los residuales

<i>Observación</i>	<i>Pronóstico Act. Esp. Residual</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
<b>1: WildType</b>	100,26	-5,13	-0,49
<b>2: Y3</b>	100,63	-9,01	-0,86
<b>3: YP2Y</b>	100,50	-0,78	-0,075
<b>4: YP3</b>	100,90	17,86	1,711
<b>5: WP2</b>	102,95	-2,95	-0,28

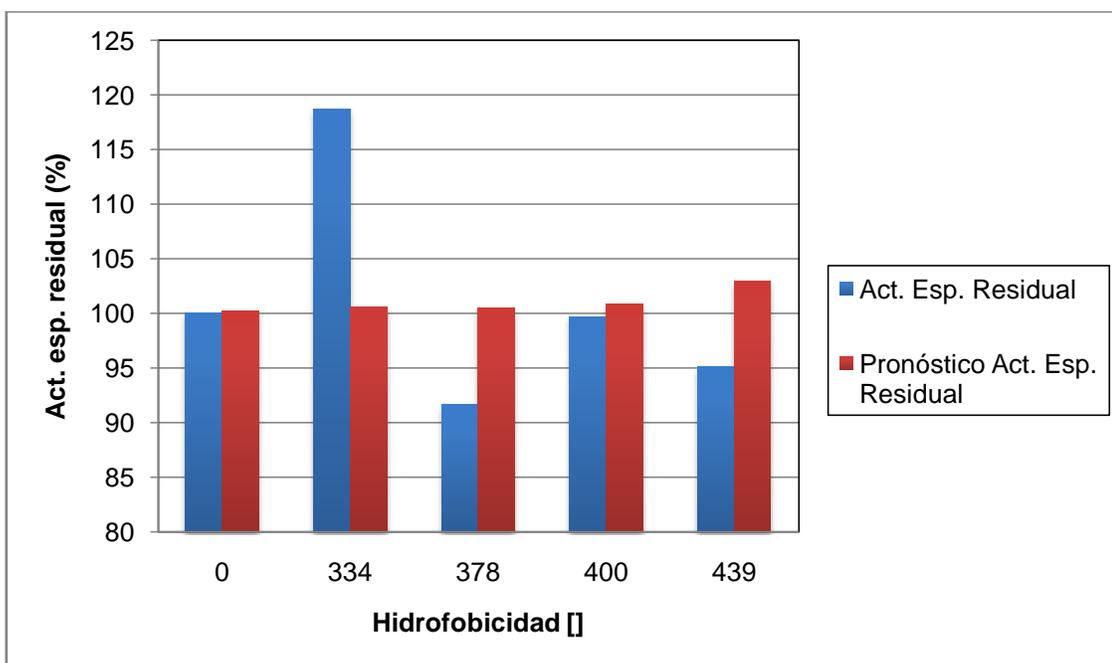
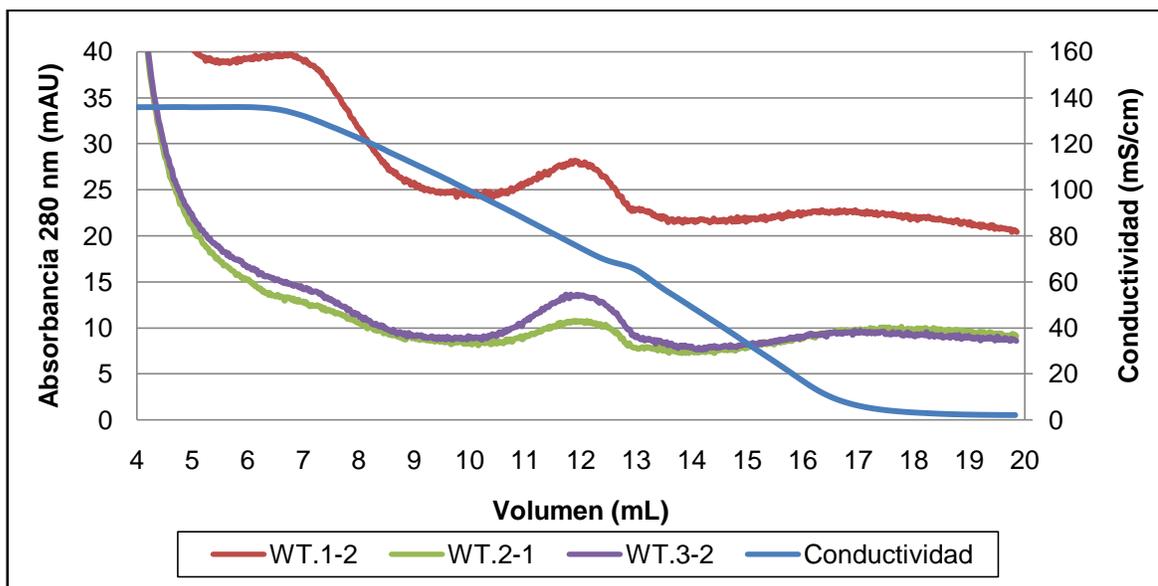
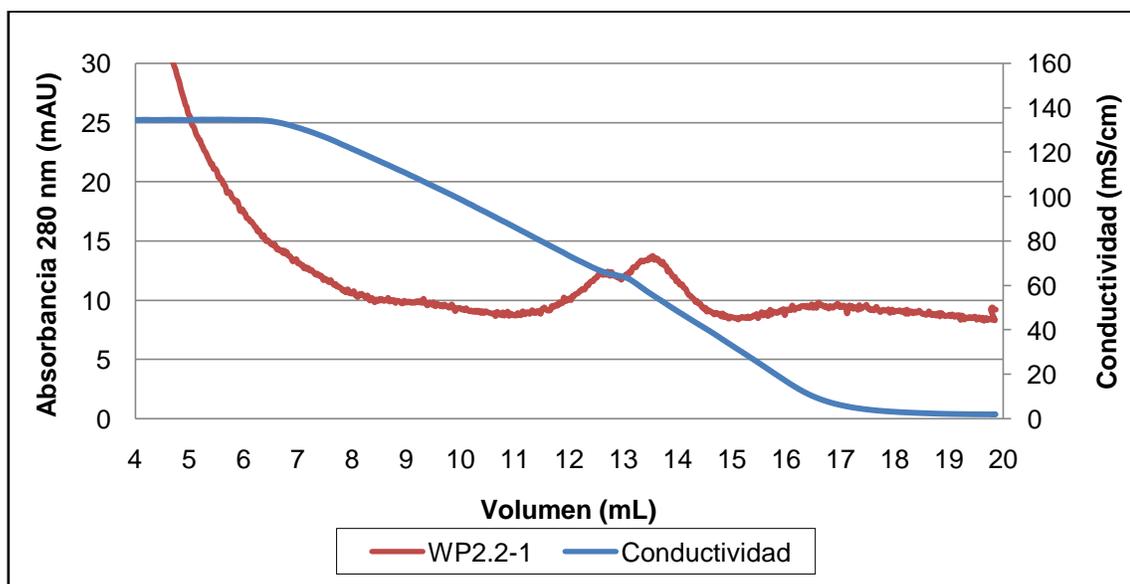


Figura 7.9. Comparación entre actividad específica residual y su pronóstico.

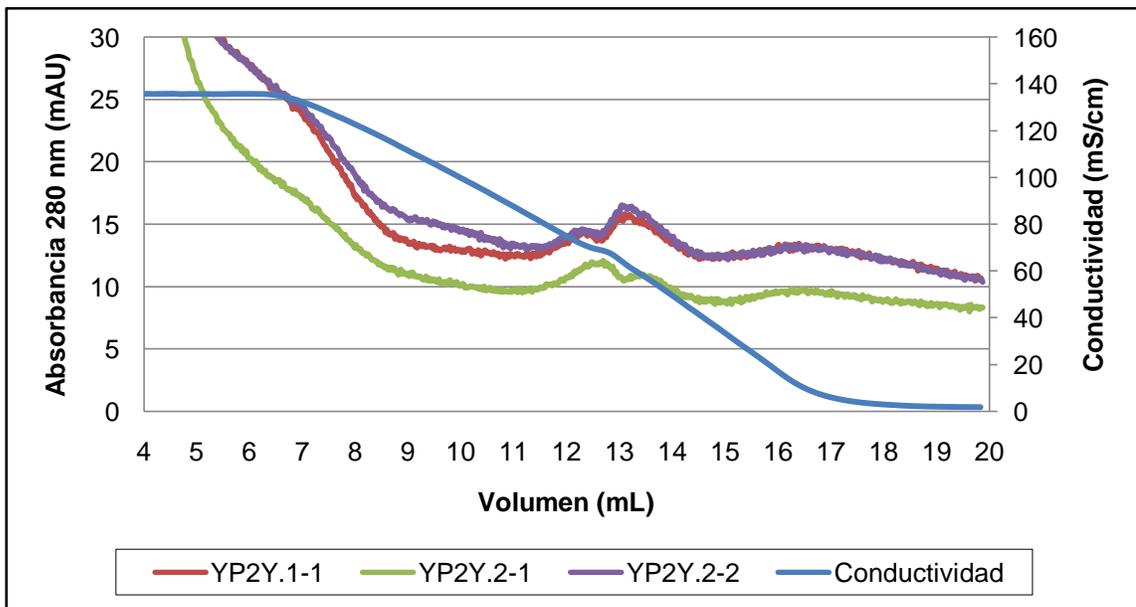
## Anexo H: Cromatogramas pendientes



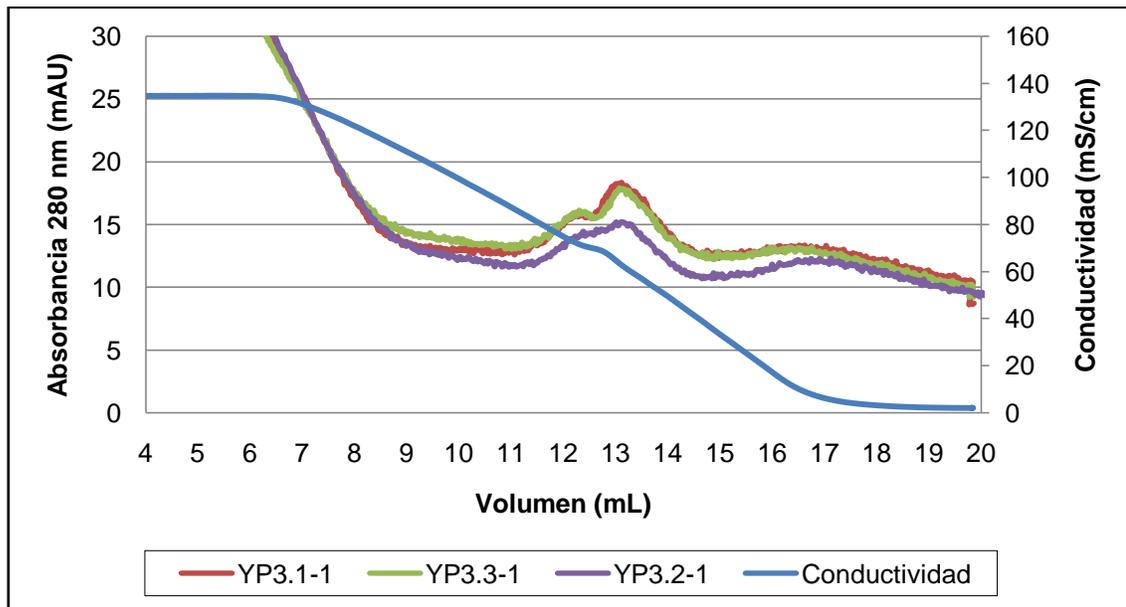
**Figura 7.10. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WildType (2).** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.



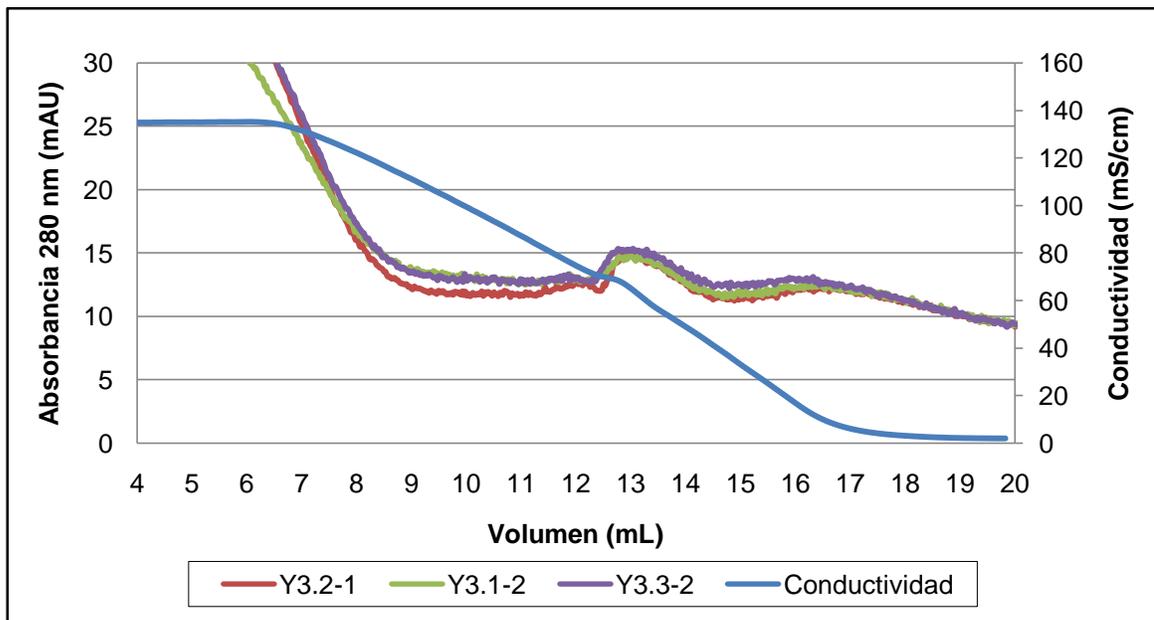
**Figura 7.11. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-WP2 (2).** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.



**Figura 7.12. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP2Y (2).** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.



**Figura 7.13. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-YP3 (2).** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.



**Figura 7.14. Cromatograma HIC correspondiente a las fracciones extracelulares de Cel-Y3 (2).** Cromatografía se inició con concentración de sal equivalente al 50% con respecto al Buffer B (Buffer A + 2M sulfato de amonio) y paulatinamente se mezcló con Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0), generando gradiente lineal hasta llegar al 0% de concentración de sal. Flujo constante 0,75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluida en 50% de Buffer B.

Anexo I: Datos de actividad en medio líquido fracciones cromatografía pendiente

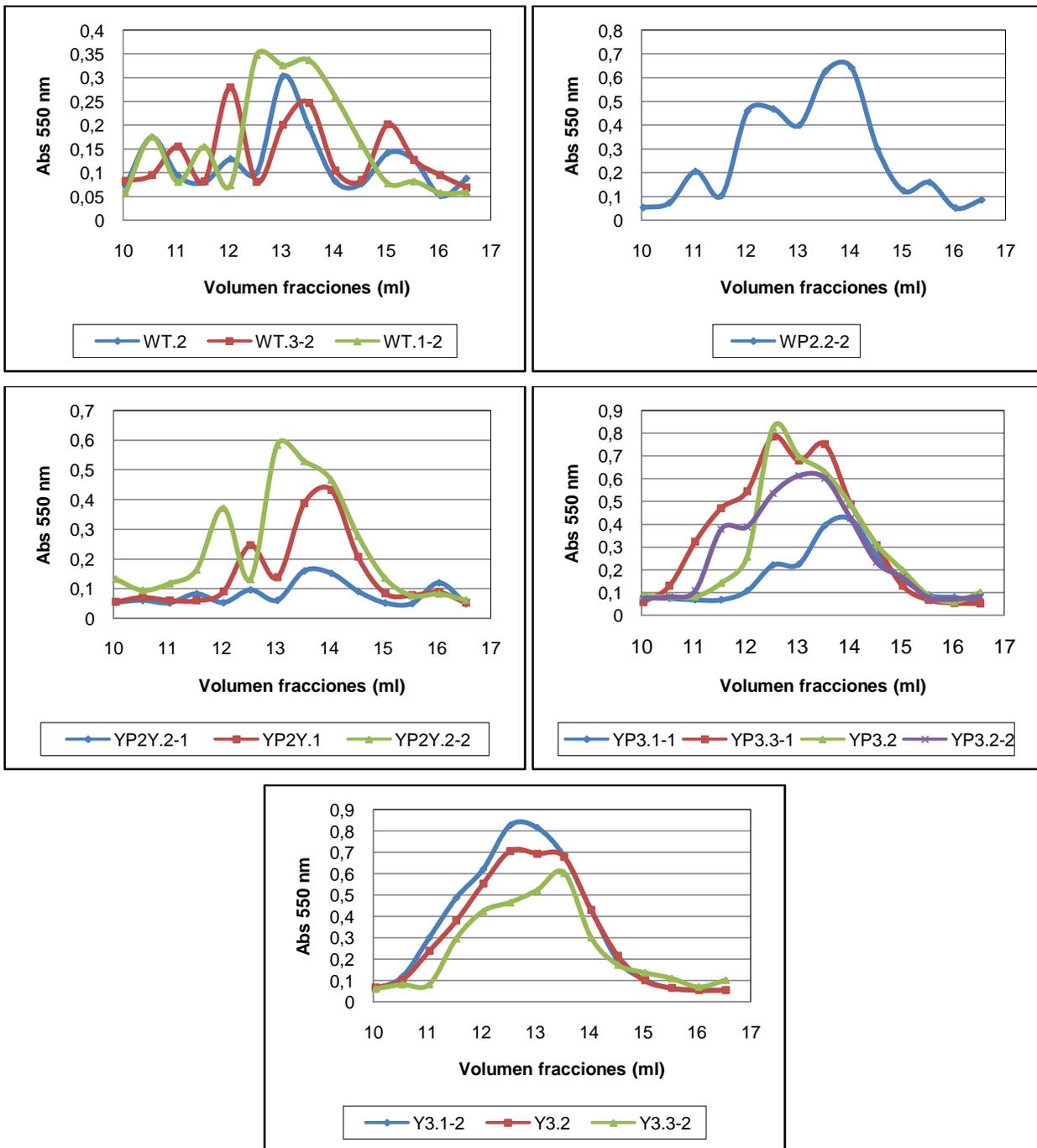


Figura 7.15. Ensayo de actividad en medio líquido de fracciones de las cromatografías realizadas (2).

## Anexo J: Datos de cultivos de cepas nativas y mutadas

**Tabla 7.8. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-WildType**

Cel-Wild Type	ABS (550nm)	Actividad [U/L]	Volumen [mL]	Actividad total [U]	Promedio Actividad Total [U]	% Actividad	Desv. estándar	Error (%)	Proteína [mg]	Promedio Proteína [mg]	% Proteína	Desv. estándar	Error (%)	Actividad específica [U/mg]	Promedio Actividad Esp [U/mg]	Desv. estándar	%	Error (%)
Extra1	0,576	434,108	100	43,411					22,613					1,920				
Extra2	0,751	565,622	100	56,562					22,328					2,533				
Extra3	0,574	432,224	100	43,222	47,732	91,509	7,648	16,023	23,414	22,785	83,379	0,563	2,470	1,846	2,100	0,377	51,533	17,969
Tes1	0,431	324,827	5	1,624					1,519					1,070				
Tes2	0,386	290,913	5	1,455					1,299					1,120				
Tes3	0,387	291,290	5	1,456	1,512	2,898	0,097	6,441	1,958	1,592	5,825	0,335	21,072	0,744	0,978	0,204	23,998	20,867
Peri1	0,756	569,767	5	2,849					2,905					0,981				
Peri2	0,810	610,465	5	3,052					2,689					1,135				
Peri3	0,757	570,144	5	2,851	2,917	5,593	0,117	4,009	3,257	2,950	10,796	0,286	9,707	0,875	0,997	0,131	24,470	13,096
				<b>Total</b>	52,161				<b>Total</b>	27,327				<b>Total</b>	4,074			

**Tabla 7.9. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-WP2**

Cel-WP2	ABS (550nm)	Actividad [U/L]	Volumen [mL]	Actividad total [U]	Promedio Actividad Total [U]	% Actividad	Desv. estándar	Error (%)	Proteína [mg]	Promedio Proteína [mg]	% Proteína	Desv. estándar	Error (%)	Actividad específica [U/mg]	Promedio Actividad Esp [U/mg]	Desv. estándar	%	Error (%)
Extra1	0,531	400,445	100	40,044					25,648					1,561				
Extra2	0,699	526,557	100	52,656					21,774					2,418				
Extra3	0,642	483,850	100	48,385	47,028	90,586	6,414	13,639	24,041	23,821	87,728	1,946	8,171	2,013	1,997	0,429	39,498	21,463
Tes1	0,515	388,386	5	1,942					1,146					1,694				
Tes2	0,358	269,559	5	1,348					1,333					1,011				
Tes3	0,528	398,184	5	1,991	1,760	3,391	0,358	20,339	1,442	1,307	4,814	0,150	11,468	1,380	1,362	0,342	26,931	25,123
Peri1	0,778	586,096	5	2,930					2,432					1,205				
Peri2	0,891	671,260	5	3,356					2,401					1,398				
Peri3	0,821	618,755	5	3,094	3,127	6,023	0,215	6,870	1,242	2,025	7,458	0,678	33,474	2,490	1,698	0,693	33,572	40,813

**Tabla 7.10. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-YP2Y**

Cel-YP2Y	ABS (550nm)	Actividad [U/L]	Volumen [mL]	Actividad total [U]	Promedio Actividad Total [U]	% Actividad	Desv. estándar	Error (%)	Proteína [mg]	Promedio Proteína [mg]	% Proteína	Desv. estándar	Error (%)	Actividad específica [U/mg]	Promedio Actividad Esp [U/mg]	Desv. estándar	%	Error (%)			
Extra1	0,557	419,537	100	41,954					24,435					1,717							
Extra2	0,686	516,760	100	51,676					23,254					2,222							
Extra3	0,555	418,030	100	41,803	45,144	91,122	5,657	12,531	22,821	23,503	87,747	0,835	3,554	1,832	1,924	0,265	41,258	13,770			
Tes1	0,486	366,279	5	1,831					1,216					1,506							
Tes2	0,413	311,513	5	1,558					1,028					1,515							
Tes3	0,474	357,235	5	1,786	1,725	3,482	0,147	8,510	1,298	1,181	4,408	0,139	11,743	1,376	1,466	0,078	31,436	5,318			
Peri1	0,654	492,642	5	2,463					1,962					1,255							
Peri2	0,729	549,669	5	2,748					2,071					1,327							
Peri3	0,745	561,728	5	2,809	2,673	5,396	0,185	6,902	2,270	2,101	7,845	0,156	7,439	1,237	1,273	0,048	27,306	3,743			
<b>Total</b>					<b>49,543</b>					<b>Total</b>	<b>26,785</b>					<b>Total</b>	<b>4,663</b>				

**Tabla 7.11. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-YP3**

Cel-YP3	ABS (550nm)	Actividad [U/L]	Volumen [mL]	Actividad total [U]	Promedio Actividad Total [U]	% Actividad	Desv. estándar	Error (%)	Proteína [mg]	Promedio Proteína [mg]	% Proteína	Desv. estándar	Error (%)	Actividad específica [U/mg]	Promedio Actividad Esp [U/mg]	Desv. estándar	%	Error (%)			
Extra1	0,414	312,015	100	31,202					19,832					1,573							
Extra2	0,480	361,506	100	36,151					17,186					2,104							
Extra3	0,468	352,713	100	35,271	34,208	90,660	2,640	7,719	13,543	16,854	86,961	3,158	18,736	2,604	2,094	0,516	42,816	24,627			
Tes1	0,306	230,620	5	1,153					0,985					1,170							
Tes2	0,304	229,364	5	1,147					1,113					1,030							
Tes3	0,311	234,137	5	1,171	1,157	3,066	0,012	1,069	1,292	1,130	5,831	0,154	13,609	0,906	1,036	0,132	21,177	12,748			
Peri1	0,618	466,013	5	2,330					1,026					2,271							
Peri2	0,584	440,389	5	2,202					1,536					1,433							
Peri3	0,682	513,996	5	2,570	2,367	6,274	0,187	7,892	1,628	1,397	7,208	0,324	23,212	1,579	1,761	0,447	36,007	25,408			
<b>Total</b>					<b>37,732</b>					<b>Total</b>	<b>19,381</b>					<b>Total</b>	<b>4,890</b>				

**Tabla 7.12. Datos de actividad, proteína total y actividad específica para cada fracción del triplicado de Cel-Y3**

Cel-Y3	ABS (550nm)	Actividad [U/L]	Volumen [mL]	Actividad total [U]	Promedio Actividad Total [U]	% Actividad	Desv. estándar	Error (%)	Proteína [mg]	Promedio Proteína [mg]	% Proteína	Desv. estándar	Error (%)	Actividad específica [U/mg]	Promedio Actividad Esp [U/mg]	Desv. estándar	%	Error (%)			
Extra1	0,579	436,369	100	43,637					20,528					2,126							
Extra2	0,601	453,201	100	45,320					16,951					2,674							
Extra3	0,514	387,381	100	38,738	42,565	93,354	3,419	8,033	14,447	17,309	84,697	3,056	17,656	2,681	2,494	0,319	55,218	12,776			
Tes1	0,266	200,474	5	1,002					1,192					0,841							
Tes2	0,281	211,778	5	1,059					1,125					0,941							
Tes3	0,393	295,812	5	1,479	1,180	2,588	0,260	22,069	1,050	1,122	5,492	0,071	6,328	1,409	1,064	0,303	23,554	28,500			
Peri1	0,485	365,525	5	1,828					2,497					0,732							
Peri2	0,516	389,140	5	1,946					2,002					0,972							
Peri3	0,472	355,476	5	1,777	1,850	4,058	0,086	4,670	1,516	2,005	9,812	0,490	24,454	1,172	0,959	0,220	21,228	22,994			
<b>Total</b>					45,595					<b>Total</b>	20,436					<b>Total</b>	4,516				