



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  
POR HIC DE XILANASAS RECOMBINANTES**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE  
INGENIERO CIVIL QUÍMICO**

**CATALINA AURORA MONTECINOS PAVEZ**

**PROFESORA GUÍA**  
DRA. MARÍA ELENA LIENQUEO  
**MIEMBROS DE LA COMISIÓN**  
DRA. ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
DR. JOSÉ CRISTIAN SALGADO

SANTIAGO DE CHILE  
2009

## RESUMEN

En la producción de proteínas una de las etapas más importantes es la de purificación, por lo que muchos estudios se enfocan en modificar esta etapa de manera de mejorar la pureza de la proteína de interés. El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar el efecto de la adición de un extremo polipeptídico hidrofóbico corto (tag) a una xilanasa, en su producción, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC).

Para el estudio se escogieron 4 combinaciones de los aminoácidos tirosina (Y), triptófano (W) y prolina (P) para formar la secuencia del extremo, y se realizaron mutaciones en la proteína para adicionar esta secuencia en el extremo C terminal de la misma por medio de la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR). Se obtuvieron exitosamente las mutantes Xilanasa-(WP)2, Xilanasa-(YP)2Y, Xilanasa-Y3 y Xilanasa-(YP)3.

Las cepas de la proteína modificada con estos extremos se crecieron e indujeron bajo condiciones definidas, y se les extrajo de la fracción periplasmática de la célula, se midió actividad enzimática y proteína total, y actividad específica. Para la cepa nativa y las mutantes, se observó una baja producción de proteína, como se indica en los resultados de proteína y actividad total. Debido a esto se sugiere hacer un estudio de las condiciones óptimas de crecimiento e inducción tanto para la proteína nativa como para las modificadas.

En el caso de la xilanasa mutada con la secuencia (YP)3, se observó que en la fracción periplasmática obtuvo la menor cantidad de proteína total, pero la mayor actividad xilanolítica total, mientras que para el resto de las mutantes, se obtuvo una mayor actividad total en la fracción extracelular. Por esto, se recomienda hacer un estudio para analizar las causas de esta forma de expresión de la xilanasa en estudio.

Las fracción periplasmática de la cepa nativa y las 4 cepas mutadas se analizó por HIC utilizando como matriz hidrofóbica Butil Sefarosa y se calculó gráficamente los tiempos de retención adimensional (DRT) de acuerdo a la fracción en que eluyó la proteína en cada caso.

Para la xilanasa nativa y las 4 mutadas se observó una tendencia similar en los cromatogramas, y los DRT presentaron un aumento porcentual promedio respecto de la xilanasa nativa de 46,17 % y 31,82 % para las mutantes Xilanasa-(WP)2 y Xilanasa-(YP)2Y respectivamente, mientras que para la Xilanasa-Y3 se observó una disminución de la hidrofobicidad en un 16,6 %. El aumento de los DRT coincide con la presencia de prolinas en el extremo adicionado, mientras que la disminución del mismo se observa en

ausencia de este aminoácido. La Xilanasa-(YP)3 se excluyó del estudio de los DRT, debido a que no presentó actividad en medio sólido en las fracciones de la cromatografía, por lo que no se pudo determinar en qué fracción eluyó dicha proteína. Esto se debe probablemente a la baja cantidad de proteína presente en el periplasma de esta cepa.

Se calculó la hidrofobicidad superficial de la xilanasa nativa, y el aporte de cada cola a ella. Sin embargo, para esto se utilizó un modelo de xilanasa cuya secuencia posee aproximadamente un 38% de parecido, por lo que no es confiable, y se recomienda buscar un modelo que tenga un mayor porcentaje de similitud con la proteína de trabajo o modelar la misma.

Es posible concluir que el aumento de hidrofobicidad superficial de la proteína xilanasa debida a la adición de una secuencia corta de aminoácidos hidrofóbicos, permite un aumento del DRT de las proteínas para el caso de los extremos que contienen prolina como la (WP)2 e (YP)2Y. En el caso del extremo que no tiene prolina (Y3), se observa una disminución de los tiempos de retención adimensional, por lo que se recomienda continuar el estudio de extremos hidrofóbicos sin prolinas, para confirmar la importancia de la presencia de este aminoácido en la secuencia de estos extremos.

## AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta gran etapa de mi vida, tengo la obligación y el agrado de agradecer a muchas personas sin las que no podría haber llegado hasta esta instancia.

En primer lugar, quiero dar mi más sincero agradecimiento a mi profesora guía Dra. María Elena Lienqueo, por haber dirigido este trabajo de título. Sin su guía, apoyo y comprensión en los momentos difíciles, este trabajo no habría sido posible. Del mismo modo agradezco también infinitamente la ayuda y buena disposición de mi profesora co-guía, Dra. Oriana Salazar.

Otro de los más grandes y sinceros agradecimientos va para mis padres, Paulo y Miriam, por ese apoyo incondicional y constante en todos los proyectos que he emprendido desde que nací. Sin uds. No estaría aquí, y habría logrado nada de lo que he obtenido hasta ahora. Agradezco también a mis hermanos, María Teresa y Héctor, por aguantar todos esos momentos de irritabilidad producto del estrés, y también al resto de mi familia: mis abuelos, tíos, primos, por estar ahí siempre que los necesito. Los amo a todos.

Gracias a Matías, por ser mi compañero durante todo este largo proceso, por su gran amor y comprensión en todo momento. También quiero agradecer el cariño y la buena onda de todos mis amigos. A las niñas del liceo, con las que hacemos el esfuerzo de complementar horarios para juntarnos por lo menos una vez al año: Sol, Jenny, Pamela, Brenda, Paula, gracias por su amistad, comprensión y alegría que me dan siempre. A los niños de la universidad, que desde primer año han sido un gran apoyo para mí: Sonia, María de los Ángeles, Ricardo, Maricelle, Nonoy, Victoria, Moris y a todos los que he conocido en los últimos años de especialidad, todos tienen un lugar importante en mi corazón y los recordaré siempre.

Quiero dar gracias también a las personas y docentes que conocí en el CIByB, en especial a Nancy por su ayuda y buena disposición que siempre tiene. Finalmente, gracias al proyecto Fondecyt 1080143 (*"Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography"*) y al proyecto CCF-05 (*"Procesos óptimos para el tratamiento de materiales lignocelulósicos para la producción de Bioetanol"*), por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

# ÍNDICE DEL CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE DEL CONTENIDO</b> .....	<b>v</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Descripción del Proyecto y Justificación.....	1
1.2. Enzimas hidrolíticas: xilanasa.....	2
1.2.1. Estructura de la xilanasa.....	2
1.2.2. Función de la xilanasa.....	4
1.2.3. Aplicaciones biotecnológicas de la xilanasa.....	6
1.3. Características de los aminoácidos.....	7
1.4. Interacciones Hidrofóbicas.....	9
1.5. Técnicas de Purificación de proteínas.....	9
1.5.1. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	9
1.6. Predicción de los Tiempos de Retención en HIC.....	11
1.7. Adición de Extremos Polipeptídicos Hidrofóbicos.....	12
1.8. Limitaciones del uso de los extremos hidrofóbicas.....	13
1.9. Objetivos.....	15
1.9.1. Objetivo General.....	15
1.9.2. Objetivos Específicos.....	15
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
2.1. Materiales.....	16
2.1.1. Cepas bacterianas electrocompetentes.....	16
2.1.2. Reactivos.....	16
2.1.3. Vectores de Clonamiento y Expresión.....	16
2.1.4. Medios de cultivo líquidos y sólidos.....	17
2.1.5. Soluciones Stock.....	17
2.1.6. Síntesis de Oligonucleótidos.....	17
2.2. Métodos.....	17
2.2.1. Diseño de Oligonucleótidos.....	17
2.2.2. Purificación de DNA plasmidial.....	18
2.2.3. Síntesis del gen de xilanasa modificado.....	18
2.2.4. Clonamiento de los genes de xilanasa modificados.....	19
2.2.4.1. Clonamiento en el vector pGEM-T-easy.....	19
2.2.4.2. Clonamiento en el vector de expresión pET22-b(+) .....	19
2.2.5. Preparación de células electrocompetentes.....	19
2.2.6. Transformación de células electrocompetentes.....	20
2.2.7. PCR de Colonias.....	20
2.2.8. Digestión de DNA plasmidial.....	21
2.2.9. Electroforesis.....	21
2.2.9.1. Electroforesis en Gel de Agarosa.....	21
2.2.9.2. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	21
2.2.10. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	22
2.2.11. Inducción de la Síntesis de proteínas recombinantes.....	22
2.2.12. Extracción de xilanasas desde la fracción Periplasmática.....	22

2.2.13.	Caracterización de las xilanasas modificadas.....	23
2.2.13.1.	Medición de la actividad xilanolítica en medio líquido .....	23
2.2.13.2.	Determinación de la concentración de proteína .....	23
2.2.13.3.	Zimograma de xilanasas .....	24
2.2.14.	Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.....	24
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
3.1.	Diseño de Partidores.....	25
3.2.	Adición de Extremos Polipeptídicos hidrofóbicos a xilanasa .....	27
3.2.1.	Generación del gen de xilanasas modificadas por PCR .....	27
3.2.2.	Clonamiento del gen modificado en el vector pGEM-T-easy.....	28
3.2.3.	Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pET22-b(+)	30
3.3.	Secuenciación de los plasmidios obtenidos.....	32
3.4.	Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de las xilanasas modificadas ..	32
3.5.	Producción de xilanasas modificadas .....	35
3.5.1.	Análisis de actividad.....	35
3.5.2.	Análisis de proteína .....	37
3.6.	Purificación de la xilanasas desde las Fracciones Periplasmáticas.....	39
3.7.	Determinación de los Tiempos de Retención Adimensional (DRT).....	46
3.8.	Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT.....	48
<b>4.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>5.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>
<b>ANEXOS.....</b>		<b>56</b>
Anexo A:	Aminoácidos .....	56
Anexo B:	Medios de Cultivo Líquidos y Sólidos.....	59
Anexo C:	Curvas de Calibración .....	61
Anexo D:	Metodología anexa.....	63
Anexo E:	Datos Cultivos cepas nativa y mutadas .....	65
Anexo F:	Cromatogramas con datos fuera de rango .....	68
Anexo G:	Datos actividad en medio líquido fracciones cromatografía.....	69
Anexo H:	Hidrofobicidad superficial teórica xilanasas nativa .....	71
Anexo I:	Secuencias de las Xilanasas modificadas .....	73

# 1. INTRODUCCIÓN

Los procesos de producción de proteínas, se realizan principalmente a través de tres etapas: fermentación, recuperación y purificación. Mientras que la etapa de fermentación es bastante estándar para la mayoría de los productos, la recuperación de la proteína presenta variaciones dependiendo de la ubicación de la misma, pudiendo ser intracelular, periplasmática o extracelular (Belter y cols, 1988).

Generalmente, en los procesos productivos se requieren altos niveles de obtención de proteína, esto se logra utilizando procesos biotecnológicos para producirlas de manera industrial. Es posible insertar el gen de una proteína determinada en microorganismos (ya sea en bacterias y/o levaduras) que luego la producen en forma recombinante. La pureza de la proteína obtenida puede llegar a niveles muy altos, en el caso de productos destinados a utilización terapéutica (99,9%), como también a niveles inferiores, en el caso de ser requerida como insumo industrial (>40%). Para alcanzar altos niveles de pureza se deben realizar varias etapas de purificación, siendo una de las técnicas más utilizadas las cromatografías, debido a su alta eficiencia y resolución.

El presente estudio se orienta a la Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC). Esta técnica es ampliamente utilizada en la purificación de proteínas a nivel industrial. Esta cromatografía se basa en la interacción hidrofóbica entre las zonas hidrofóbicas superficiales de una proteína con un ligando hidrofóbico de la matriz. Como el tiempo de retención de las proteínas en la matriz aumenta con la hidrofobicidad superficial de las mismas, las últimas proteínas en eluir suelen ser las más hidrofóbicas.

El presente trabajo de memoria se orienta a estudiar el efecto de la adición de un extremo hidrofóbico a una xilanasas en aspectos tales como su expresión, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

## 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*”, el cual tiene por objetivo estudiar el efecto que tiene la adición de un extremo polipeptídico (tag) en el proceso de purificación de una proteína recombinante.

Como hipótesis del estudio, se tiene que es posible mejorar la purificación de proteínas en HIC por medio de la adición de extremos hidrofóbicos a la proteína de interés. La presencia de estos extremos

aumentaría la hidrofobicidad superficial total de la proteína, lo que permitiría aumentar el tiempo de retención de la misma en HIC, y así separar la proteína de interés de las contaminantes.

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

## **1.2. Enzimas hidrolíticas: xilanasa**

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que actúan como biocatalizadores en la degradación del xilano, el cual es un polisacárido que está presente de forma abundante en la pared celular vegetal (Gallardo y cols., 2007).

El xilano es el componente polimérico que se encuentra en mayor cantidad en la hemicelulosa, la cual corresponde al 30-40% de los carbohidratos presentes en la pared celular de las plantas (Sipat y cols., 1986).

La xilanasa es producida por una amplia variedad de microorganismos, entre ellos bacterias, hongos y algas (Collins y cols., 2005), con lo que se pueden distinguir xilanasas de distintos tamaños y pesos moleculares.

La expresión de la xilanasa es inducida cuando el microorganismo crece en medios que contienen xilosa o xilobiosa, (monosacárido y disacárido, respectivamente, que forman la estructura del xilano). El principal inductor es xilosa, la cual juega un doble papel en la regulación de la expresión de la xilanasa en función de su concentración: a bajas concentraciones actúa como inductor, mientras que a altas concentraciones reprime la expresión de los genes xilanolíticos (De Vries y cols., 1999).

La gran variedad de microorganismos que producen xilanasa, así como los distintos tipos existentes de esta enzima, hacen que los estudios realizados a esta enzima no se centren en un microorganismo específico.

### **1.2.1. Estructura de la xilanasa**

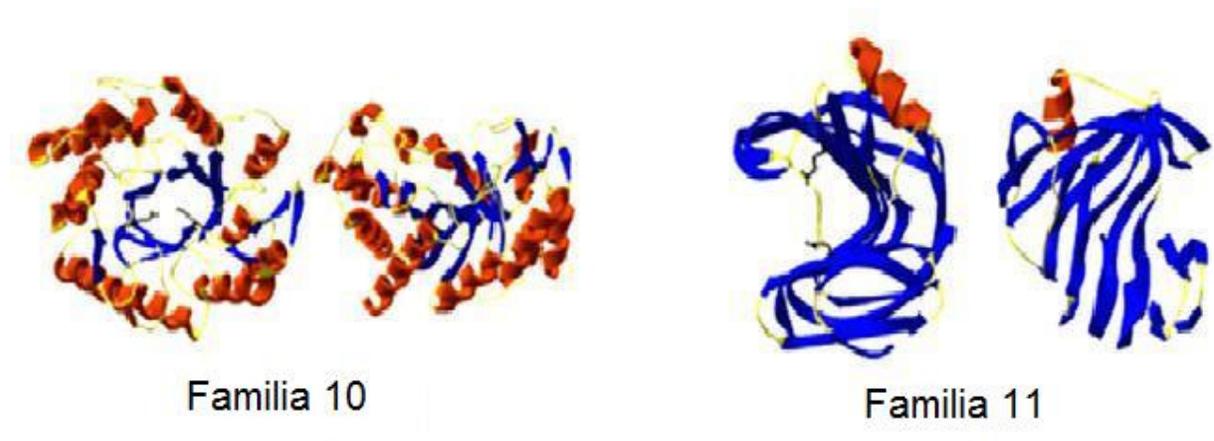
Las xilanasas son generalmente clasificadas en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas y tienen una relación inversa entre su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (Collins y cols., 2002).

De esta forma, en base al peso molecular y punto isoeléctrico, las xilanasas se dividen en dos grupos (Wong y cols.,1988):

- Un primer grupo de bajo peso molecular (menor a 30 kDa) y pI alcalino.
- Un segundo grupo de mayor peso molecular (más de 30 kDa) y pI ácido.

Sin embargo, se han estudiado xilanasas con características intermedias que no se clasifican en ninguno de los dos grupos (Collins y cols., 2005).

En la Figura 1 se muestra la estructura tridimensional de las xilanasas pertenecientes a las principales clasificaciones de éstas: las de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (Zhou y cols., 2007).



**Figura 1: “Estructura tridimensional familias 10 y 11 glicosil hidrolasas”**

La xilanasas que se utilizará en el presente trabajo proviene del microorganismo *Psychrobacter sp.*, y está clasificada como miembro de la familia 10 de las glicosil hidrolasas. A continuación se muestra la estructura tridimensional de una xilanasas de la familia 10 (Figura 2).

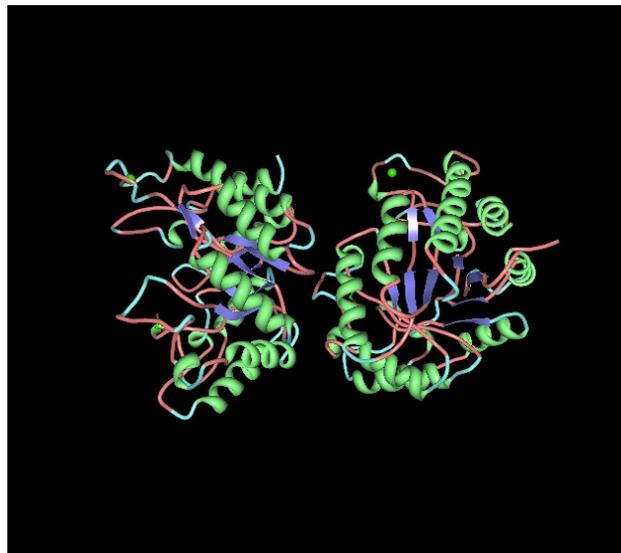


Figura 2: “Estructura tridimensional xilanasa, familia 10 glicosil hidrolasas”

### 1.2.2. Función de la xilanasa

Las endoxilanasas o xilanasas (endo- $\beta$ -1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1985). También pueden hidrolizar xilooligómeros, siendo más efectiva cuando es mayor el grado de polimerización de éstos. Sin embargo, no hidrolizan xilobiosa, lo que permite distinguirlas claramente de las  $\beta$ -xilosidasas.

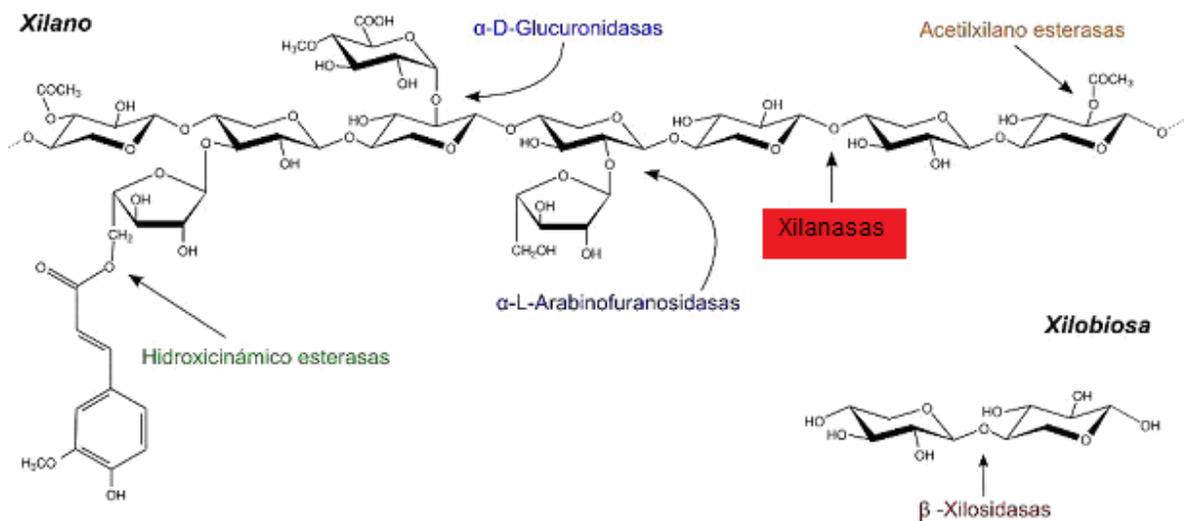


Figura 3: “Enzimas que degradan el xilano”

Entre los microorganismos xilanolíticos (que degradan xilano), se encuentra una gran multiplicidad de xilanasas que difieren en su especificidad con respecto al xilano (Wong y cols., 1988). Esto se debe a la gran complejidad del xilano y la necesidad de degradar las distintas zonas de éste.

Debido a que el xilano es un polímero de elevado grado de polimerización, este no puede ser transportado al interior del microorganismo para ser degradado, por lo que las xilanasas deben ser secretadas al medio extracelular. Sin embargo, se han descrito xilanasas de algunos microorganismos que se localizan en el espacio periplasmático (Fontes y cols., 2000).

Como se mencionó anteriormente, las xilanasas pueden ser clasificadas en su gran mayoría en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas, por lo que su mecanismo catabólico corresponde al de estas enzimas. Así, el mecanismo utilizado para la hidrólisis del sustrato corresponde a un doble desplazamiento con retención anomérica ( $\beta \rightarrow \beta$ ) como se muestra en la Figura 4.

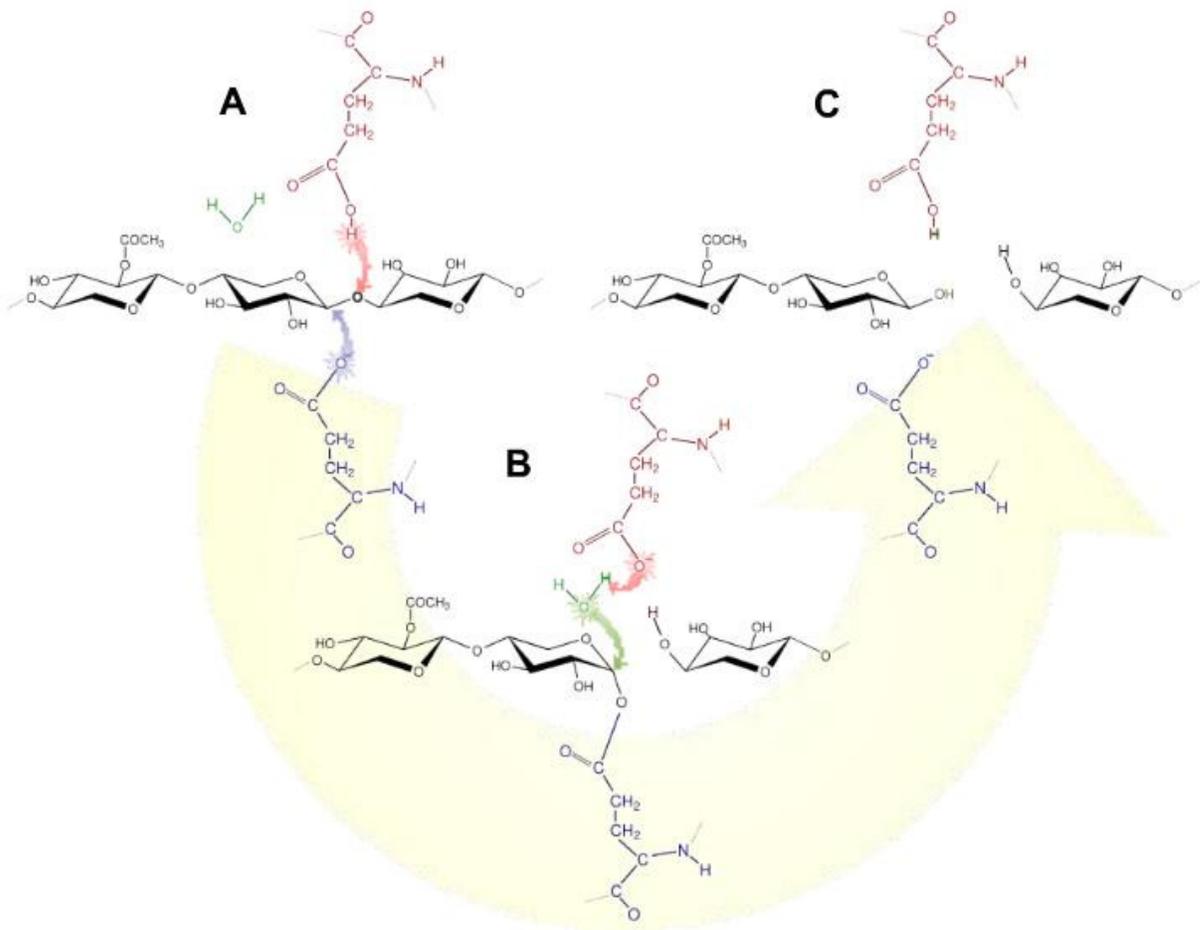


Figura 4: “Mecanismo de acción xilanasasa.”

En la hidrólisis del enlace glucosídico por este mecanismo intervienen 2 residuos glutamato conservados del centro activo de la xilanasas, actuando uno de ellos como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleofílico (Davis y Henrissat, 1995). Una vez el esqueleto de xilosas ha sido posicionado correctamente entre los dos ácidos glutámicos catalíticos, el que actúa como catalizador ácido/base realiza un ataque ácido sobre el enlace glucosídico, protonando el oxígeno de dicho enlace, mientras el otro glutamato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del enlace (Figura 4.A). De este primer paso se libera uno de los productos de reacción y se forma un intermediario  $\alpha$ -glicosilo-enzima. Luego, el glutamato ácido/base actúa como base y capta un protón de una molécula de agua, lo que permite que ésta ataque el enlace entre el glutamato nucleófilo y el carbono anomérico (Figura 4.B), produciendo su hidrólisis, dando como resultado un producto cuyo carbono anomérico vuelve a la misma configuración que en el sustrato ( $\beta \rightarrow \beta$ ), liberándose la enzima de su unión al sustrato para poder iniciar un nuevo proceso de catálisis (Figura 4.C) (Davis y Henrissat, 1995; Collins y cols., 2005).

Las xilanasas que se clasifican en la familia 10 de las glicosil hidrolasas son enzimas multidominio, cuyo dominio catalítico es de 250 a 450 aminoácidos con un plegamiento tipo barril, mientras que las de la familia 11 poseen un único dominio catalítico de 180 a 200 aminoácidos que se pliegan en una conformación de lámina  $\beta$  curvada sobre sí misma. Estas estructuras se muestran en la sección anterior, 1.2.1 (Gallardo y cols., 2007).

### **1.2.3. Aplicaciones biotecnológicas de la xilanasas**

Las xilanasas tienen importantes aplicaciones en la industria debido a su enorme potencial para modificar y transformar la lignocelulosa (compuesta por celulosa, hemicelulosa y lignina) y otros materiales de la pared celular vegetal de la biomasa utilizada como materia prima en un gran número de procesos industriales.

El xilano está presente en grandes cantidades en los desechos de las industrias agroalimentarias, por lo que las xilanasas juegan un papel importante en la bioconversión de estos residuos (ricos en lignocelulosa) a xilosa y otros azúcares fermentables para la producción de etanol (Lee, 1997; Sun y Cheng, 2002; St. John y cols., 2006a).

Otro campo para el uso de las xilanasas es en la bioconversión de xilano a xilitol, edulcorante bajo en calorías utilizado también en salud dental (Parajo y cols., 1998; Polizeli y cols., 2005).

Se pueden utilizar también en la industria textil, donde junto con pectinasas se degrada la pectina y la hemicelulosa de materias primas vegetales como lino o cáñamo, de manera de liberar las fibras de celulosa para fabricar el tejido (Hoondal y cols., 2002).

En las pastas papeleras, la lignina residual que queda después de la cocción kraft produce un color oscuro, por lo que la pasta debe someterse a un tratamiento de blanqueo con cloro y derivados clorados, que dan lugar a la formación de compuestos organoclorados que son tóxicos. Las xilanasas facilitan la extracción de la lignina residual al degradar el xilano presente en los complejos xilano-lignina. Así, se potencia el blanqueo y se disminuye el uso de cloro (Viikari y cols., 2001; Bajpai, 2004).

### 1.3. Características de los aminoácidos

Los aminoácidos son la unidad básica o monómero de las proteínas, cuya unión por medio de enlaces covalentes (enlace peptídico) en secuencias lineales conforman finalmente la cadena polipeptídica de cada proteína. Los aminoácidos están formados por un carbono unido a un grupo carboxilo (COOH), un grupo amino (NH<sub>2</sub>), un hidrógeno y un grupo radical (R). Todos los aminoácidos naturales son alfa aminoácidos (tienen el grupo amino 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 5).

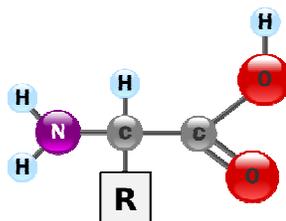


Figura 5: “Estructura básica de un aminoácido.”

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, cargados positivamente y cargados negativamente.

Dentro del trabajo desarrollado, la utilización de aminoácidos se centró en los 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 aminoácidos con cadena lateral apolar o hidrofóbica. Dentro de este grupo se encuentran los de cadenas laterales alifáticas voluminosas, como la alanina, valina, leucina e isoleucina. La glicina posee un grupo R alifático de tamaño pequeño, lo que genera un mínimo impedimento estérico, permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. La **prolina**, aunque está dentro de esta clasificación y a diferencia del resto de los aminoácidos, posee un grupo amino secundario, formando un anillo alifático. 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 la flexibilidad del extremo polipeptídico.

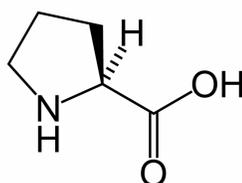


Figura 6: “Estructura química del aminoácido Prolina (P)”.

**Grupo R apolares aromáticos:** estos grupos aromáticos conforman la cadena lateral de la fenilalanina (benceno), **tirosina** (fenol) y **triptófano** (indol), lo que son relativamente apolares. Estos aminoácidos pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se concentran.

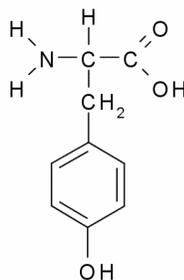


Figura 7: “Estructura química del aminoácido Tirosina (Y)”.

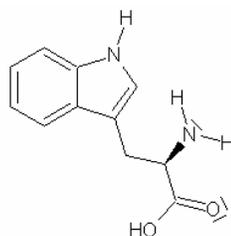


Figura 8: “Estructura química del aminoácido Triptófano (W)”.

## **1.4. Interacciones Hidrofóbicas**

La hidrofobicidad hace referencia a la repulsión entre un compuesto apolar y un ambiente polar como el agua. Como término se utiliza para describir ciertos modelos moleculares que involucran el ordenamiento de moléculas de agua alrededor de solutos apolares (Dill y cols., 1990).

En los sistemas biológicos son de gran importancia las interacciones hidrofóbicas que se producen entre los aminoácidos, ya que son las principales fuerzas responsables del plegamiento de las proteínas globulares. También son causantes de las asociaciones entre subunidades, permiten la unión de pequeñas moléculas a las proteínas (como el caso de enzimas) y son responsables de la asociación de proteínas con fosfolípidos y otros lípidos para formar membranas biológicas (Eriksson y cols., 1998).

## **1.5. Técnicas de Purificación de proteínas**

Las técnicas de purificación por cromatografías se basan en la separación de proteínas a partir de diferencias en propiedades fisicoquímicas o biológicas. Así, se pueden separar proteínas a partir de diferencias de: tamaño (Cromatografía de Exclusión Molecular o Filtración por Gel), carga (Cromatografía de Intercambio Iónico), afinidad (Cromatografía de Afinidad) o hidrofobicidad (Cromatografía de Interacción Hidrofóbica y Cromatografía de Fase Reversa). Los métodos más utilizados a escala industrial son las cromatografías en lecho fijo (columna).

La columna está rellena con un material sólido (fase estacionaria o matriz) con las características químicas adecuadas al tipo de cromatografía, y se hace pasar a través de la columna una solución tampón (fase móvil). El extracto crudo se aplica en la parte superior de la columna, para entrar poco a poco con la fase móvil. La velocidad de migración de cada proteína dependerá del grado de afinidad relativo por la fase estacionaria y la fase móvil.

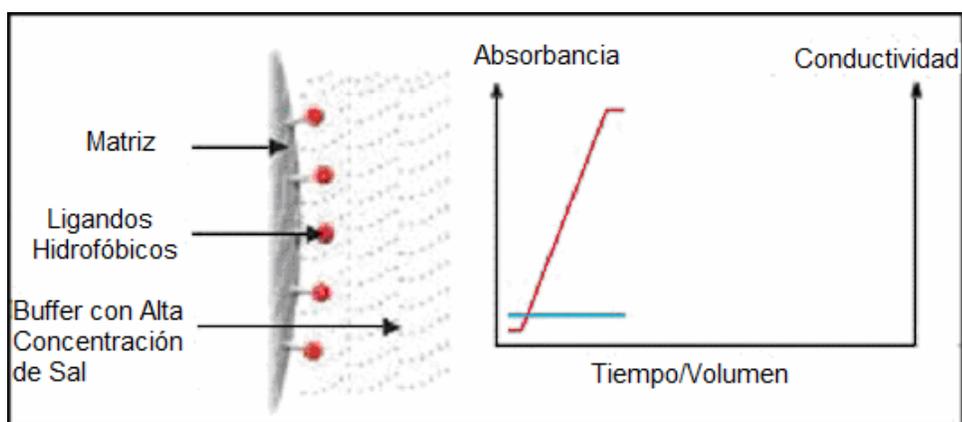
### **1.5.1. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica**

La Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) corresponde a una cromatografía de adsorción, por lo que existe una interacción entre los grupos hidrofóbicos superficiales o expuestos de las proteínas y los ligantes hidrofóbicos de la matriz. Cuando las proteínas se encuentran en solución acuosa, ellas ubican 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).

Para favorecer la interacción entre los sitios hidrofóbicos de las proteínas y la matriz, la muestra es aplicada en condiciones de alta concentración de sal, y es eluída por distintas estrategias, como disminución de la fuerza iónica, disminución de la tensión superficial, adición de detergentes o cambios de temperatura (Roe y cols., 1989).

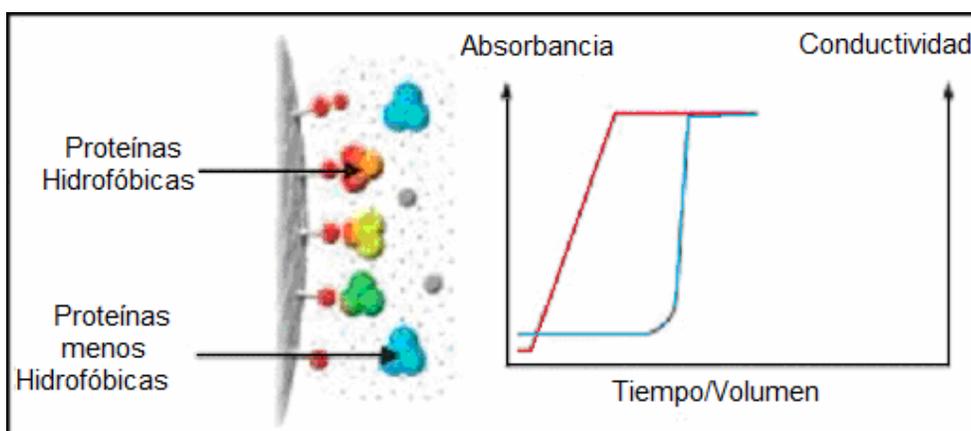
Las etapas del proceso de HIC son las siguientes (Lienqueo y cols, 1999):

1. Ambientación de la columna con un buffer de elevada fuerza iónica. Usualmente se utiliza Sulfato de Amonio 1.5 - 2.0 M o Cloruro de Sodio 2.0 - 4.0 M. (Ver Figura 9).



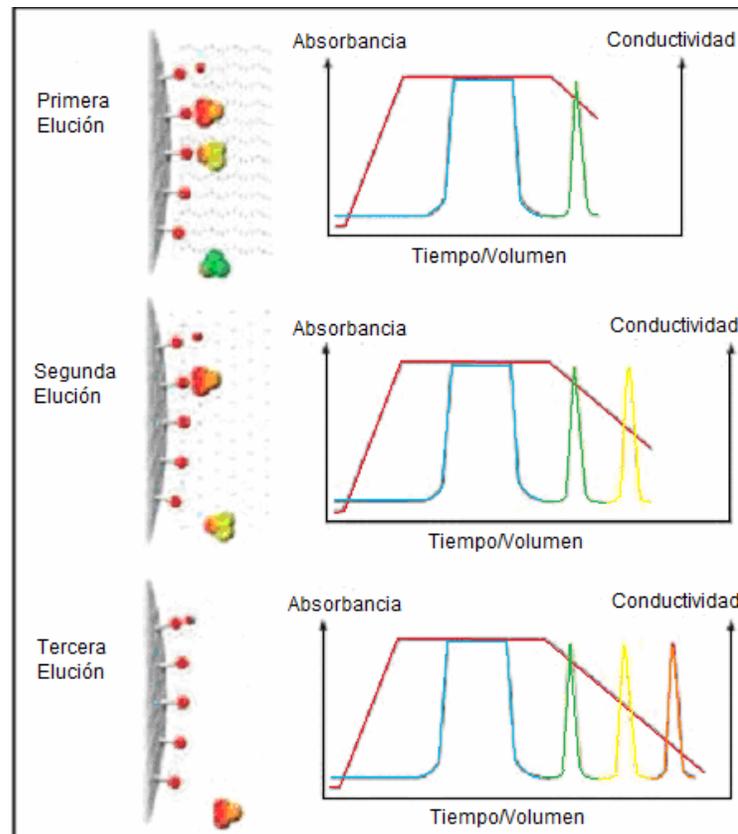
**Figura 9: "Primera etapa HIC: Ambientación de la columna".**

2. Inyección de la muestra, a una concentración de sal igual que la del buffer de equilibrio. Las proteínas se adsorben según su grado de interacción con la matriz.



**Figura 10: "Segunda etapa HIC: inyección de la muestra".**

- 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 hidrofóbica.



**Figura 11: "Tercera etapa en HIC: elución de las proteínas".**

En la Figura 11, se muestra un ejemplo de una mezcla de proteínas con distintos niveles de hidrofobicidad.

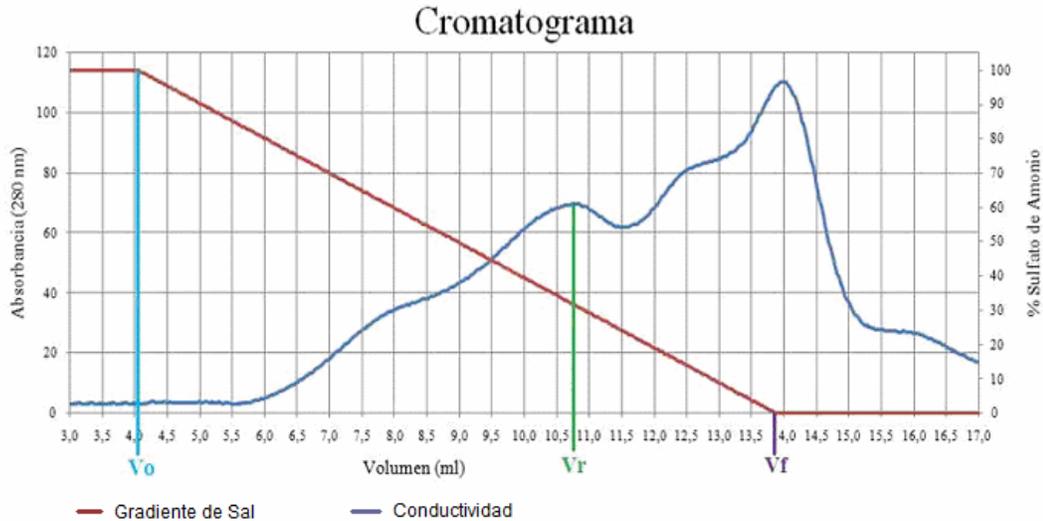
- Regeneración de la matriz. Se equilibra la columna con el buffer inicial de elevada concentración de sal.

## 1.6. Predicción 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 ( $t_r, V_r$ ).

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

**Ecuación 1: "Cálculo del DRT"**



**Figura 12: "Esquema de un Cromatograma de HIC y parámetros a considerar"**

Así, el máximo valor del DRT es 1, y corresponde a la proteína más hidrofóbica y soluble, que generalmente corresponde a proteína de membrana.

### 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 agregar pequeños fragmentos de aminoácidos a la secuencia que conforma la proteína nativa. Esta adición puede realizarse al interior de la proteína o en los extremos de ésta.

Según las propiedades de los distintos aminoácidos, al adicionar algunos es posible modificar propiedades específicas de la proteína, alterando características fisicoquímicas o biológicas de éstas. Así, se puede aumentar su tamaño, variar su hidrofobicidad, cambiar su estructura tridimensional generando una modificación de su sitio activo y con ello afectar su función, entre otros.

Una de las técnicas actuales utilizadas para la modificación de proteínas es la adición de extremos de polipéptidos que potencian o añaden alguna propiedad de la proteína nativa, con el fin de reducir el

número de etapas para su purificación y minimizar pérdidas durante el proceso (Simeonidis y cols., 2005). Estos extremos o “tags” pueden ser biomoléculas grandes que presenten una afinidad específica hacia otra molécula, o pueden ser pequeñas y modificar propiedades físicas de una proteína (Steffens y cols., 1998).

Para diseñar los tags más apropiados, se han postulado distintos modelos, los cuales se basan en las propiedades de la mezcla de proteínas, en las propiedades de los aminoácidos de la extremo y en el objetivo que se busca (Simeonidis y cols, 2005).

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.

Si el objetivo es aumentar la hidrofobicidad global de la proteína, se consideran los aminoácidos hidrofóbicos aromáticos, en desmedro del resto de los aminoácidos, como candidatos para conformar el péptido a adicionar, debido a su mayor tamaño. De esta forma, las extremos más utilizadas corresponden a las de cadenas de politriptófanos, polifenilalaninas, politirosinas y polisoleucinas, en orden creciente de uso (Fexby y cols, 2004).

Los extremos más utilizados de alto valor hidrofóbico corresponden a repeticiones de triptófano y prolina. Los residuos de prolina, aunque no se clasifican como aminoácidos hidrofóbicos, se intercalan en la extremo ya que la estructura rígida de su anillo previene la formación de estructuras secundarias, y así se espera que la superficie de la extremo se encuentre mayormente expuesta al medio.

### **1.8. Limitaciones del uso de los extremos hidrofóbicas**

Las ventajas del uso de extremos hidrofóbicas son evidentes al momento de la bioseparación, sin embargo, el sistema presenta desventajas que tiene que ver con potenciales efectos negativos sobre la expresión, estabilidad y función biocatalítica de la proteína con extremo. Se ha encontrado que estas extremos hidrofóbicas 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 que se produzcan 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).

Tomando en cuenta los antecedentes anteriores, en el presente trabajo se estudiará el efecto de la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos (tirosina y triptófano, intercalando prolina) al extremo carboxilo terminal de una enzima xilanasas, sobre la expresión, recuperación y purificación mediante HIC.

## **1.9. Objetivos**

### **1.9.1. Objetivo General**

Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a una xilanasa recombinante 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.

### **1.9.2. Objetivos Específicos**

1. Obtener la xilanasa modificada con el extremo hidrofóbico, y transformar células electrocompetentes para la producción de las xilanasas recombinantes con extremo hidrofóbica.
2. Estudiar el efecto de la adición de extremos hidrofóbicas en la expresión de la xilanasa en *E. coli*.
3. Estudiar el efecto de la adición de extremos hidrofóbicas en la recuperación de la xilanasa modificada.
4. Estudiar el efecto de la adición de extremos hidrofóbicas en la purificación de la xilanasa por HIC.
5. Establecer que combinación de aminoácidos es la mejor dentro de las alternativas propuestas. Al analizar la cromatografía HIC, el mejor extremo será aquel que aumenta el tiempo de retención adimensional (DRT) con respecto a la proteína nativa.

## 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:

Proveedor	Reactivos
Promega (WI-USA)	Taq polimerasa, pGEM-T-easy
Invitrogen (CA-USA)	T4 DNA ligasa, estándar de peso molecular 1Kb, dNTPs, cepa <i>E.coli</i> DH5 $\alpha$ .
Sigma (MO-USA)	X-Gal, IPTG, Xylan from Birchwood
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, enzimas de restricción NcoI y XhoI.
Difco (DT-USA)	Triptona, extracto de levadura, medio LB, agar.
Novagen (WI-USA)	pET22b, <i>E. coli</i> BL21(DE3).
Qiagen	Sistemas de purificación de DNA plasmidial y extracción de DNA desde geles de agarosa.
Winkler	Tris, glicina, SDS, glicerol
J.T. Baker	Cloruro de Sodio
Fermelo	Agarosa
Merk	El resto de las sales, ácidos, bases, bromuro de etidio y solventes de grado analítico o de biología molecular.

#### 2.1.3. Vectores de Clonamiento y Expresión

En la transformación de las cepas bacterianas se utilizaron dos vectores: el plasmidio de clonamiento pGEM-T-easy y el plasmidio de expresión pET22b(+).

#### **2.1.4. Medios de cultivo líquidos y sólidos**

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

#### **2.1.5. 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 alícuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a 4°C.

- Ampicilina 100 mg/mL

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

- X-Gal 50 mg/mL

Se preparó una solución de stock de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosido (X-Gal) a una concentración de 50 mg/mL en N,N'-dimetil-formamida y se almacenó a -20°C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

#### **2.1.6. Síntesis de Oligonucleótidos**

Los partidores diseñados para la modificación de la xilanasas se mandaron a sintetizar a MacroGen (Korea) y Fermelo (Chile).

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Diseño de Oligonucleótidos**

Se diseñaron cuatro *partidores antisense* para adicionar un extremo polipeptídico hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal de la xilanasas. Además, se utilizó un *partidor sense* previamente diseñado

(Acevedo y cols, 2008). De esta forma, mediante el uso de cada par sense y antisense, se añade mediante la técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) un extremo específico.

Para este diseño de partidores se tomó en cuenta la secuencia de nucleótidos del gen de la xilanasa nativa (wild type), de manera que los partidores tengan 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* contiene 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 la extremo hidrofóbica, de entre 3 y 6 aminoácidos (entre 9 y 18 nucleótidos) al final de la proteína, y un codón de término de la traducción.

En el diseño de los partidores también se tomó en cuenta que la  $T_m$  (temperatura de alineamiento) de ambos partidores deben ser similares, que deben evitarse en lo posible alineamientos entre ambos partidores, entre moléculas distintas de un mismo partidor y la formación hairpin internos en un partidor por autoalineamiento.

### **2.2.2. Purificación de DNA plasmidial**

El DNA plasmidial se extrajo a partir de un cultivo en 4 mL de LB suplementado con ampicilina e inoculado con la cepa de *E.coli* que contiene el plasmidio con el gen de la xilanasa nativa, el cual se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. El cultivo se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) por 1 minuto en un tubo previamente esterilizado por autoclave. Así se obtuvo un pellet 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 xilanasa modificado**

Una vez obtenido el DNA plasmidial, se realizó PCR (Polymerase Chain Reaction) para cada uno de los *partidores antisense* diseñados para agregar las extremos hidrofóbicas y el *partidor sense* común. De esta forma se obtiene el gen amplificado de la xilanasa con la respectiva extremo.

Se prepararon 50  $\mu$ L de mezcla de PCR para cada partidor antisense, la cual contiene: 10  $\mu$ L de Buffer 5X, 3  $\mu$ L de  $MgCl_2$ , 1  $\mu$ L de dNTPs, 1  $\mu$ L de partidor sense, 1  $\mu$ L de partidor antisense, 5  $\mu$ L de DNA plasmidial, 0,5  $\mu$ L de Taq polimerasa, completando el volumen final con 28,5  $\mu$ L de agua estéril.

Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos; 3 ciclos (inespecíficos) a 94°C por 2 minutos, gradiente de temperatura (30-50°C) por 30 seg y 72°C por 1,5 minutos; 25 ciclos a 94°C por 1 minuto, gradiente de temperatura (40-60°C) por 30 seg y 72°C por 1,5 minutos; y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 minutos.

Las reacciones fueron llevadas a cabo en el termociclador Eppendorf Master Cycler Gradiente (HA, Alemania). Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

## **2.2.4. Clonamiento de los genes de xilanasa modificados**

### **2.2.4.1. Clonamiento en el vector pGEM-T-easy**

Los fragmentos de DNA productos del PCR se purificaron desde un gel de agarosa al 1% p/v y se ligaron al vector pGEM-T-easy utilizando el siguiente protocolo: la mezcla de ligación se llevo a cabo en un volumen final de 10 µL, y contenía 5 µL de tampón de ligación 2X, 0,5 µL de vector de clonamiento pGEM-T-easy, 3,5 µL de DNA del inserto y 1 µL de enzima T4-DNA ligasa. La mezcla se dejó ligando toda la noche a 4°C. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5α electrocompetentes.

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

En la reacción de ligación al vector de expresión pET22-b, se utilizó el inserto digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, y vector digerido con las mismas enzimas. La mezcla se realizó en un volumen final de 10 µL que contenía 0,5 µL de vector pET22-b, 3,5 µL de DNA del inserto, 5 µL de tampón T4 DNA ligasa 5X (Tris-HCL 250 mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, polietilenglicol-8000 25% p/v) y 1 µL de T4 DNA ligasa. Se dejó ligando toda la noche a 4°C, y el producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes.

## **2.2.5. Preparación de células electrocompetentes**

La preparación de células electrocompetentes de *E.coli* BL21(DE3) y DH5α se realizó de la misma forma. Se inocularon 10 mL de medio SOB (ver Anexo B) con una colonia de la cepa correspondiente y se creció a 37°C, 200 rpm de agitación durante toda la noche. Al cultivo se le midió densidad óptica (O.D) a 620 nm, utilizando como blanco medio SOB estéril, y se determinó el volumen

necesario para inocular 500 mL de medio estéril a una O.D<sub>620</sub> final de 0,05. Se creció entre 2 y 4 horas hasta alcanzar una O.D<sub>620</sub> entre 0,6 y 0,8. El cultivo se enfrió en hielo por 10 minutos y se centrifugó a 5.000 x g y 4°C por 10 minutos (centrífuga Sorvall® RC-28S, rotor GS-3 Sorvall®, Dupont, CT, USA). El pellet se lavó 2 veces con glicerol estéril al 10% v/v. Luego del último lavado, el pellet se resuspendió en el glicerol residual, para finalmente ser alicuotado en volúmenes precisos para su utilización (entre 20 y 100 µL). Las células electrocompetentes se mantuvieron a -80 °C.

### **2.2.6. Transformación de células electrocompetentes**

Para transformar células electrocompetentes, se agregó 1 µL de mezcla de ligación a 20 µL de células BL21(DE3) o DH5α. Esta transformación se llevó a cabo por electroporación en un equipo Cell-Porator® Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) con las siguientes condiciones: 420 V, 330 µF, baja impedancia, tasa de carga rápida y tiempo máximo de 2,5 ms. Las células transformadas se traspasaron a 1 mL de medio LB estéril y se incubaron a 37°C, 200 rpm de agitación durante 1 hora. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 1 minuto y se descartaron 900 µL del sobrenadante. El pellet de células se resuspendió en el sobrenadante restante y se plaqueó sobre placas LB-agar suplementadas con ampicilina y estériles. En el caso de células electroporadas con el vector de clonamiento pGEM-T-easy, las placas fueron previamente suplementadas con ampicilina a concentración final de 100 µg/mL, X-Gal 50 µg/mL e IPTG 1 mM. Para las células electroporadas con el vector de expresión pET22-b, se utilizaron placas LB-agar estériles suplementadas con ampicilina a concentración final 100 µg/mL. Estas placas se incubaron a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se mantuvieron a 4°C.

### **2.2.7. PCR de Colonias**

Este método se utilizó para comprobar la presencia del inserto en las colonias seleccionadas como clones positivos. En el caso de los clones que contenían el vector de clonamiento, se seleccionaron colonias blancas, mientras que en los que contienen el vector de expresión, se seleccionaron las colonias que lograron crecer como clones positivos. Estas colonias se transfirieron mediante una punta estéril desde la placa a tubos Eppendor con 100 µL de agua Milli-Q estéril. Estos tubos se incubaron a 100°C durante 10 minutos, luego se tomaron 5 µL y se agregaron sobre 15 µL 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. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

### **2.2.8. Digestión de DNA plasmidial**

Las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* se utilizaron para digerir los vectores pGEM-T-easy y pET22-b, para linealizar los vectores, o recuperar los insertos ligados a ellos. Para la reacción de digestión doble se utilizaron 2 µL de tampón 4 recomendado por el proveedor Promega, 2 µL de BSA, 1 µL de cada enzima, 10 µL de vector con el inserto y se llevó a un volumen final de 20 µL con agua Milli-Q estéril. La reacción se lleva a cabo a 37°C durante 2 horas, y el resultado se visualiza mediante un gel de agarosa 1% p/v.

### **2.2.9. Electroforesis**

#### **2.2.9.1. Electroforesis en Gel de Agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v se realizó para corroborar la transformación de las cepas, así como para determinar el tamaño del inserto y visualizar los resultados de la digestión plasmidial. Se utilizó una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA). 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.

El gel de agarosa se preparó en tampón TAE: Tris-Acetato-EDTA 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 se llevo a cabo bajo voltaje constante igual a 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA).

#### **2.2.9.2. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

Las separaciones electroforéticas en condiciones denaturantes se realizaron con el fin de determinar la presencia y tamaño de la proteína en las muestras analizadas. Se llevaron a cabo en una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratorios Inc., CA-USA).

Luego de corrido el gel, se realizó una tinción con nitrato de plata para visualizar las bandas. La metodología de la electroforesis de proteínas y de tinción se indica en el Anexo D.

### **2.2.10. Purificación de DNA a partir de geles de agarosa**

Para purificar fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó la banda de DNA desde el gel, tratando de minimizar el exceso de agarosa, y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril. Luego, para la purificación se utilizó el sistema QIAEX II Gel Extraction, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Finalmente, el DNA se eluyó en agua Milli-Q estéril, pH 8,0 y previamente calentada a 50°C.

### **2.2.11. Inducción de la Síntesis de proteínas recombinantes**

La expresión recombinante de xilanasa en *E. coli* BL21(DE3) transformada con pET-22b(+)-xilanasa se realizó de acuerdo a las instrucciones entregadas por el proveedor (pET system, Invitrogen).

Un cultivo de 250 mL con medio TB estéril suplementado con ampicilina 100 µg/mL, previamente inoculado a una D.O.<sub>600</sub> de 0,05, se creció a 30°C hasta una D.O.<sub>600</sub> de 0,6. Luego, se agregó IPTG a una concentración final de 0,7 mM y se incubó durante toda la noche a 18 °C.

Finalmente, el pellet de células se recuperó mediante centrifugación del cultivo a 5.000 x g durante 5 minutos y a temperatura ambiente. La fracción extracelular y el pellet se guardaron por separado.

### **2.2.12. Extracción de xilanasas desde la fracción Periplasmática**

Para purificar la proteína recombinante desde la fracción periplasmática, el pellet se resuspendió en 25 mL de una solución Tris-HCl 30 mM, sucrosa 20% p/v, pH 8,0. Luego, a las células suspendidas se les agregó 50 µL de EDTA 0,5 M, pH 8,0 y se agitó lentamente durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó a 10.000 x g durante 10 min y a 4 °C, y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió nuevamente en una solución de MgCl<sub>2</sub> 5 mM y se agitó lentamente en un baño con hielo durante 10 min. Finalmente se centrifugó a 10.000 x g por 10 min y a 4 °C, y se recuperó el sobrenadante, correspondiente a la fracción periplasmática.

## **2.2.13. Caracterización de las xilanasas modificadas**

### **2.2.13.1. Medición de la actividad xilanolítica en medio líquido**

La actividad xilanolítica de preparaciones de xilanasas fue medida utilizando el método DNS (Ver Anexo D) con xilano de abedul soluble como sustrato (*xylan from birchwood*, SIGMA), y en presencia de un buffer Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM y pH 8,0. Para obtener el xilano soluble, se disolvió xilano de abedul a una concentración de 50 mg/mL en el buffer antes descrito, a temperatura ambiente en agitación durante 1 hr, luego se centrifugó la solución a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante correspondió a la fracción soluble del xilano.

Los azúcares reductores obtenidos con el método del DNS son calculados midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 550 nm, y el valor numérico es calculado a partir de una curva estándar construida en este caso con diferentes concentraciones de xilosa, la unidad monomérica del xilano (ver Anexo C).

Para la medición de la actividad de las muestras de xilanasas, se toman 50 µL de muestra y se incuban con 100 µL de xilano soluble a 37 °C durante 1 hr. Luego, la reacción xilanolítica se detiene agregando 100 µL del reactivo DNS a cada muestra y se calientan a 100 °C durante 10 min. Una vez enfriadas 5 min en hielo, se toman 100 µL de las reacciones y se trasladan a microplacas desechables de 96 posillos (Falcon 3912) para ser leída su absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Anthos 2010).

### **2.2.13.2. Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína total para las diferentes muestras se determinó mediante el ensayo de Bradford modificado, para lo cual se mezcló: 1,2 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo de Bradford (1 g/L Coomassie preparado en HCl 2,2% v/v) y 50 µL de muestra o proteína estándar de calibración.

Se realizó una curva de calibración con BSA (ver Anexo C) en concentraciones entre 0,03125 y 0,5 mg/mL, utilizando como blanco agua destilada. Se midió absorbancia a 465 (O.D<sub>465</sub>) y 595 nm (O.D<sub>595</sub>) y se calculó la razón O.D<sub>465</sub>/O.D<sub>595</sub>.

El valor obtenido para el blanco (en ausencia de BSA) se restó a todas las demás razones y se graficó en función de la concentración de BSA.

### 2.2.13.3. Zimograma de xilanasas

Se preparó un gel de poliacrilamida de acuerdo a los procedimientos estándares que se indican en la sección 2.2.9.2, pero adicionalmente se le agregó 125 µL de xilano de abedul soluble (*xylan from birchwood*), que se preparó igual que como se indica en la sección 2.2.13.1. Las muestras de proteína se mezclaron en una proporción 1:1 con el buffer de muestra 2X (Tris-HCl 125 mM, glicerol 20% v/v, SDS 4% p/v, azul de bromofenol 0,005% p/v, pH 6,8). Luego de mezclar las muestras con el buffer, éstas se cargaron en el gel. La corrida del gel se realizó igual que la electroforesis normal de proteínas (sección 2.2.9.2), pero la cámara de electroforesis se introdujo en un recipiente con hielo para no denaturar las proteínas por el calor.

Luego de realizada la electroforesis, el gel se incubó con Tritón X-100 1% v/v por 15 min con agitación. Posteriormente se dejó incubando toda la noche a 4°C en un buffer adecuado para la actividad xilanolítica (Tris-HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub> 2 mM, pH 8,0). Finalmente, para visualizar las bandas de actividad, se realizó una tinción con Rojo Congo al 0,2% p/v y destinción con NaCl 1 M.

### 2.2.14. Cromatografía de Interacción Hidrofóbica

Para realizar las purificaciones cromatográficas se utilizó el cromatógrafo ÄKTA Purifier 10 (GE Healthcare, Alemania) y el software UNICORN 5.1.

Se utilizó una columna empacada con 1 mL de resina Butil Sefarosa Fast Flow 6FF (GE Healthcare).

Los buffers utilizados en los experimentos fueron: Buffer A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,0) y Buffer B (Tris-HCl 20 mM, 2 M de sulfato de amonio, pH 7,0), ambos filtrados con filtros Millipore de 0,22 µm (Stratorius, Hannover-Alemania) 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 paulatinamente se mezcló con Buffer A, generando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna, hasta llegar al 0% de concentración de sal. El flujo se mantuvo constante durante todo el proceso e igual a 0.75 mL/min. Se inyectaron 2 mL de muestra diluída al 50% en Buffer B, utilizando un loop de 1 mL para el almacenamiento de la muestra.

Se colectaron fracciones de 0,5 mL y una vez finalizada la cromatografía se regeneró la resina con 5 volúmenes de columna de Buffer B.

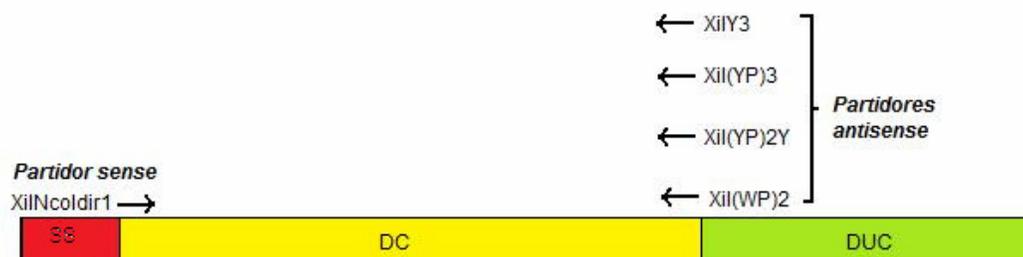
### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de estudiar el efecto de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de una xilanasa recombinante, se modificó una xilanasa nativa con los siguientes extremos hidrofóbicos: WPWP, YPYPY, YPYYP e YYY. A continuación se muestran los resultados obtenidos.

#### 3.1. Diseño de Partidores

Como se mencionó en la sección 2.2.1, se diseñaron 4 *partidores antisense* para adicionar un extremo hidrofóbico en el extremo carboxilo terminal de la xilanasa nativa. De esta forma, el extremo se añade al sitio catalítico de la enzima. También se mencionaron las variables a tener en cuenta para el diseño de estos partidores.

Las extremos hidrofóbicas para las cuales se diseñaron los *partidores antisense* son: WPWP, YPYPY, YPYYP e YYY, con W triptófano, Y tirosina y P prolina. Los *partidores antisense* se denominan: XIL(WP)2, XIL(YP)2Y, XIL(YP)3 y XIL(Y)3. El nombre del *partidor sense* que ya se encontraba diseñado es XilNcoIdir1.



**Figura 13: “Esquema de alineamiento de los partidores y el templado de la xilanasa nativa”**

SS: Secuencia Señal; DC: Dominio Catalítico; DUC: Dominio de Unión a Carbohidratos.

En la Figura 13 se muestra en qué parte del gen de la proteína nativa se alinearán los partidores correspondientes. De este alineamiento, se obtiene el sitio catalítico de la xilanasa modificado con cada extremo hidrofóbico.

Las secuencias de los *partidores sense* y *antisense*, así como su tamaño y T<sub>m</sub> (temperatura de alineamiento) se detallan a continuación.

○ ***Partidor sense***

Denominación: XilNcoIdir1

Tamaño: 31 pb

Tm: 64°C

Secuencia en la dirección 5' → 3':

CTT TCC ATG GCG TGC GGG GGG AAT AAT AAA G

○ ***Partidor antisense para WPWP***

Denominación: XIL(WP)2

Tamaño: 36 pb

Tm: 68°C

Secuencia en la dirección 5' → 3':

GCT CGA GTT ATC ACG GCC ACG GCC ATA ATG CAT TAG

○ ***Partidor antisense para YPYPY***

Denominación: XIL(YP)2Y

Tamaño: 39 pb

Tm: 64°C

Secuencia en la dirección 5' → 3':

GCT CGA GTC ATC AAT ACG GAT ACG GAT ATA ATG CAT TAG

○ ***Partidor antisense para YPYYPY***

Denominación: XIL(YP)3

Tamaño: 42 pb

Tm: 67°C

Secuencia en la dirección 5' → 3':

GCT CGA GTC ATC ACG GAT ACG GAT ACG GAT ATA ATG CAT TAG

○ ***Partidor antisense para YYY***

Denominación: XIL(Y)3

Tamaño: 33 pb

Tm: 57°C

Secuencia en la dirección 5' → 3':

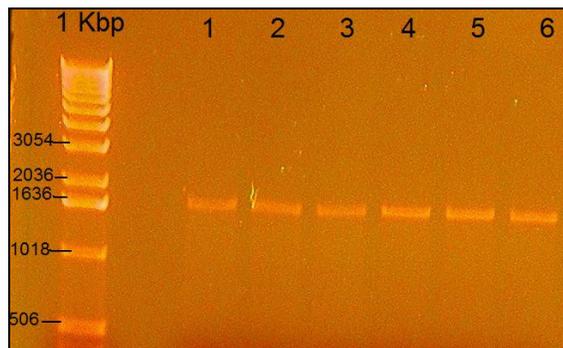
GCT CGA GTC ATC AAT AAT AAT ATA ATG CAT TAG

## 3.2. Adición de Extremos Poli-peptídicos hidrofóbicos a xilanasas

### 3.2.1. Generación del gen de xilanasas modificadas por PCR

La generación del gen de la xilanasas modificadas con la adición de extremos hidrofóbicos, se llevó a cabo mediante una amplificación por PCR. Para esta amplificación se utilizó como plantilla el DNA plasmidial de la cepa nativa, a la cual se le agregó el respectivo extremo hidrofóbico mediante el uso de primers (uno sense común, y otro para cada extremo).

Al no conocerse las temperaturas de alineamiento de los primers, se realizó un gradiente de temperaturas de alineamiento, de manera de seleccionar la que arrojará un mejor resultado para el PCR.

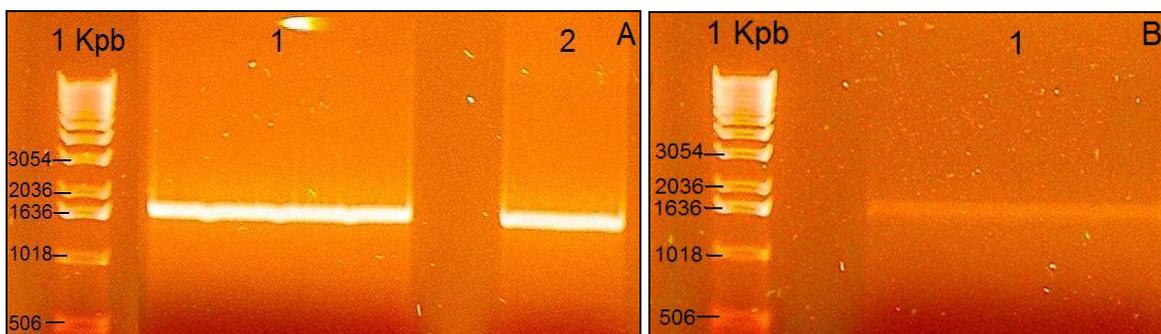


**Figura 14: “ Producto de la amplificación por PCR”**

Carriles (1)-(6): Resultados del PCR para la xilanasas-(WP)2. Gradiente de temperatura entre 40 y 50°C (primeros ciclos) y entre 50 y 60°C (últimos ciclos)

En la Figura 14, se muestra el resultado para las 6 temperaturas más altas del gradiente, las que arrojaron los mejores resultados para el PCR de la extremo (WP)2. De éstas se eligió la más alta para trabajar.

Con el resto de los extremos se procedió de la misma forma. Así, las temperaturas de alineamiento usadas fueron aproximadamente de 45 °C y 58 °C para los ciclos de alineamiento inespecífico y específico respectivamente para todas las modificaciones.



**Figura 15: “Producto de la amplificación por PCR (2)”**

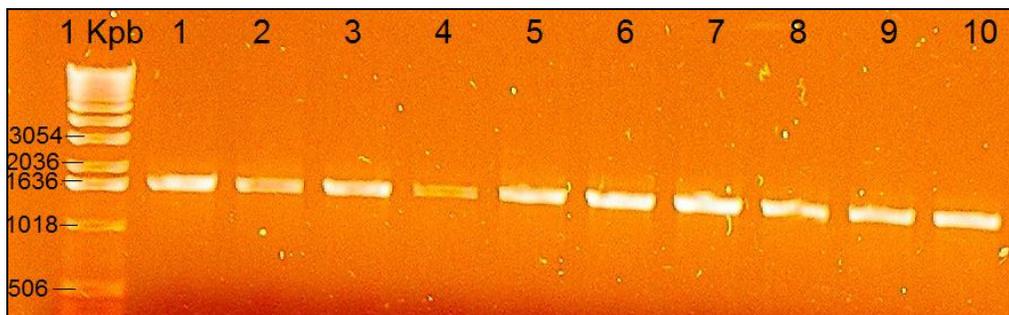
**(A):** Carril (1): xilanasa-(YP)2Y. Carril (2): xilanasa-Y3, **(B):** Carril (1): xilanasa-(YP)3.

Como se observa en las Figuras 14 y 15, la generación del gen de la xilanasa modificada se logró exitosamente para los cuatro tipo de extremos hidrofóbicas utilizadas, pues es posible observar una sola banda en cada caso, la cual correspondería al tamaño de esta proteína más la secuencia polipeptídica adicionada ( aprox. 1700 pb).

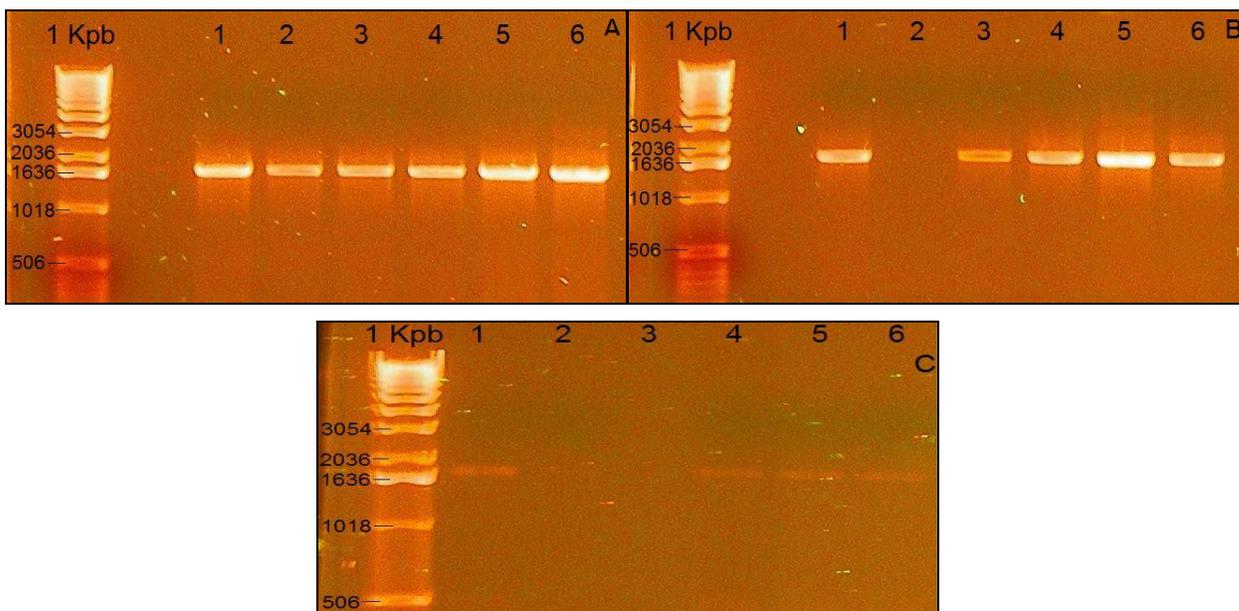
Para los extremos (WP)2 e (YP)3 (Figuras 14 y 15.B) se observa una menor intensidad de banda que para el resto de las extremos. Esto incide en un menor rendimiento de la amplificación por PCR para estos extremos, lo que se puede deber a que ambas tienen *partidores antisense* con las temperaturas de alineamiento mayores y más distintas al *partidor sense*. Además, entre estas dos la que tiene una intensidad aún menor es la (YP)3, la que al ser el extremo más largo de las cuatro, presentaría aún más problemas para alinearse con el templado de la xilanasa y el *partidor sense*.

### 3.2.2. Clonamiento del gen modificado en el vector pGEM-T-easy

Luego de obtener los insertos codificantes para la xilanasa modificada, éstos se ligaron al vector de clonamiento pGEM-T-easy como se indica en la sección 2.2.4.1. Luego se electroporaron células DH5 $\alpha$  para introducir el producto de ligación (vector de clonamiento e inserto). Se crecieron en placas LB-agar suplementadas con ampilicina, X-Gal e IPTG, y luego se realizó PCR a las colonias positivas con el plasmidio, para verificar que contuvieran el inserto.



**Figura 16:” PCR de colonias cepa xilanasa-(WP)2, vector de clonamiento pGEM-T-easy”**  
 Carriles (1)-(10): Resultado del PCR de colonias para las colonias 1 a la 10 de la xilanasa-(WP)2

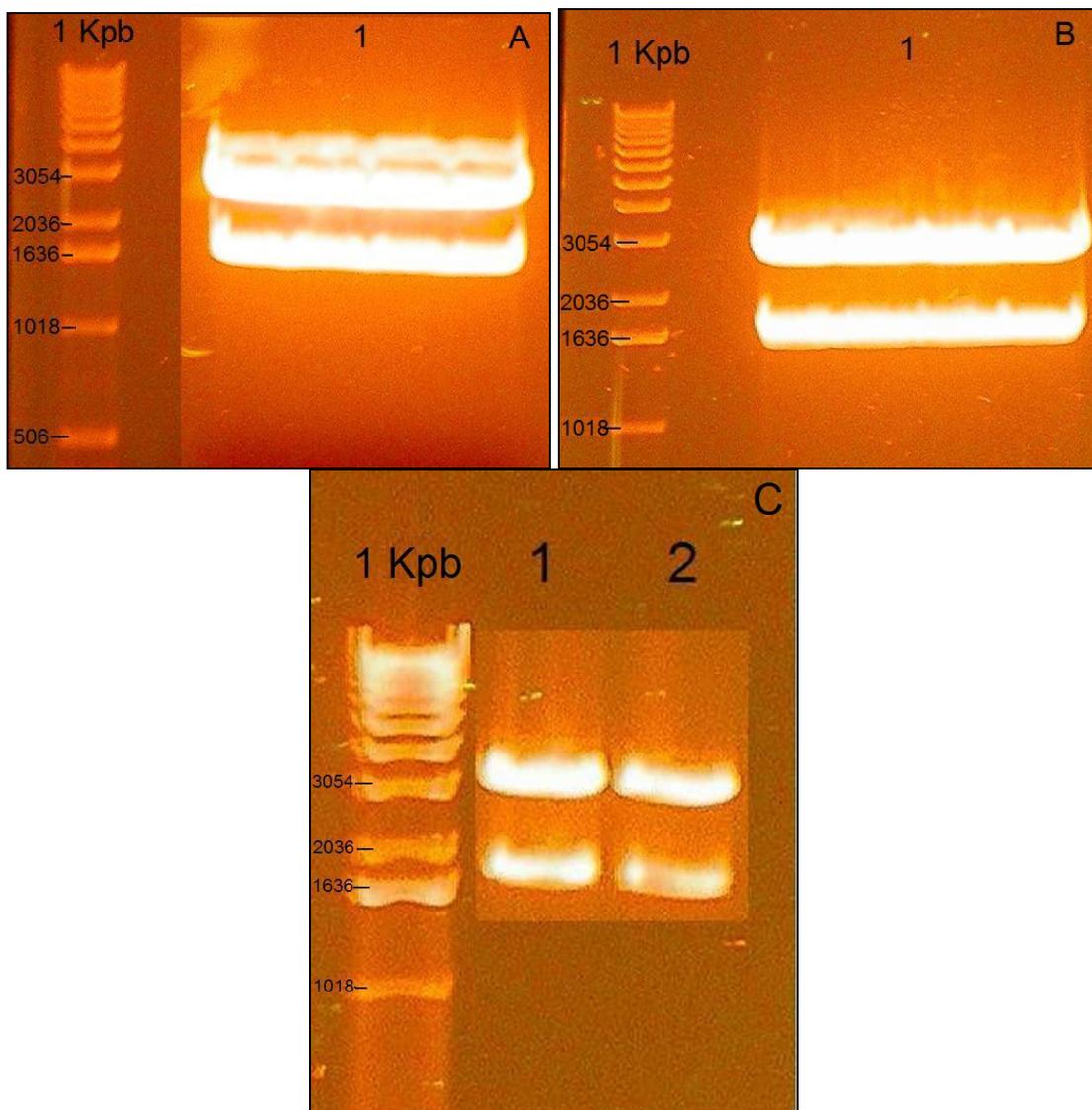


**Figura 17: “PCR de colonias vector de clonamiento pGEM-T-easy”**

Resultados del PCR de colonias. **(A):** Carriles 1-6: Colonias xilanasa-(YP)2Y; **(B):** Carriles 1-6: Colonias xilanasa-Y3; **(C):** Carriles 1-6: Colonias xilanasa (YP)3.

En la Figura 16 y la Figura 17 se observan los resultados de los PCR de colonias para las mutantes en el vector de clonamiento pGEM-T-easy. Los carriles en que se aprecia la banda de aproximadamente 1700 pb, corresponden a las colonias que dieron positivo, es decir aquellas que poseen el inserto de la xilanasa modificada. En los carriles donde no se aprecia la banda, se ven las colonias que dieron negativo para e PCR de colonias.

Las colonias que dieron positivo para el inserto de la xilanasa modificada se crecieron en medio líquido LB suplementado con ampicilina. A estas células se les extrajo el DNA plasmidial, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI*, las cuáles cortan la secuencia de la xilanasa con el fin de verificar los tamaños tanto del vector como del inserto.



**Figura 18: "Digestión del DNA plasmidial de los clones de xilanasa modificada en pGEM-T-easy"**  
**(A):** Carril (1): xilanasa-(WP)2. **(B):** Carril (1): xilanasa-(YP)3. **(C):** Carril (1): xilanasa-(YP)2Y; Carril (2): xilanasa-Y3

En la Figura 18 se muestra la digestión para la xilanasa con cada extremo. Las bandas superiores muestran el correspondiente tamaño del vector de clonamiento pGEM-T-easy (3015 pb) y las inferiores el de los insertos (aprox. 1700 pb).

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

Para cada extremo hidrofóbica, se purificó la banda correspondiente al inserto en los productos de restricción de los plasmidios pGEM-T-easy recombinantes, y luego se ligaron al vector de expresión pET22-b(+). Una vez obtenidos los plasmidios de expresión recombinantes, se electroporaron a células de

*E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes, las cuales se crecieron en placas LB-agar suplementadas con ampicilina. Se seleccionaron 4-5 colonias a las que se les realizó PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto.

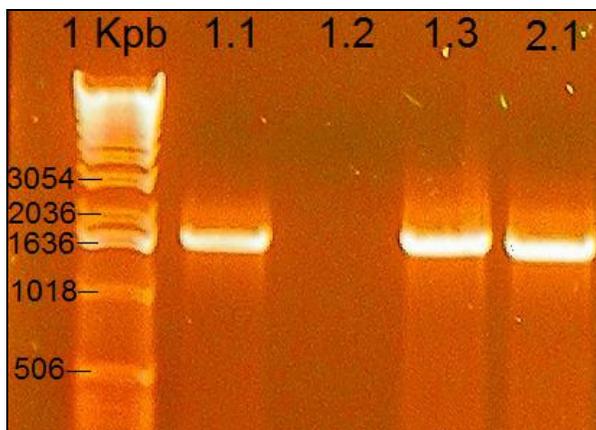


Figura 19: "PCR colonias xilanasas-(WP)2, vector de expresión pET22-b(+)"

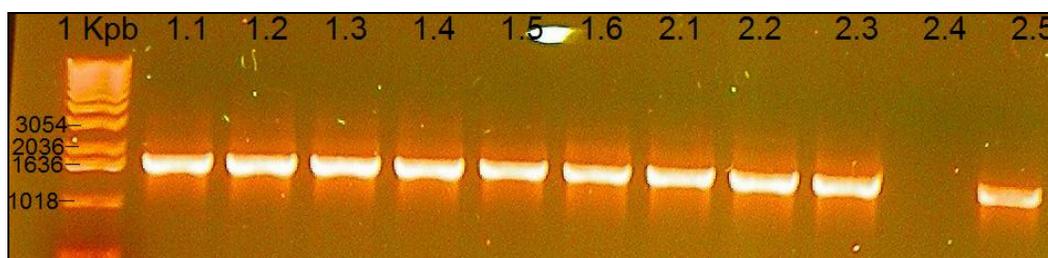


Figura 20: "PCR de colonias xilanasas-(YP)2Y, vector de expresión pET22-b(+)"

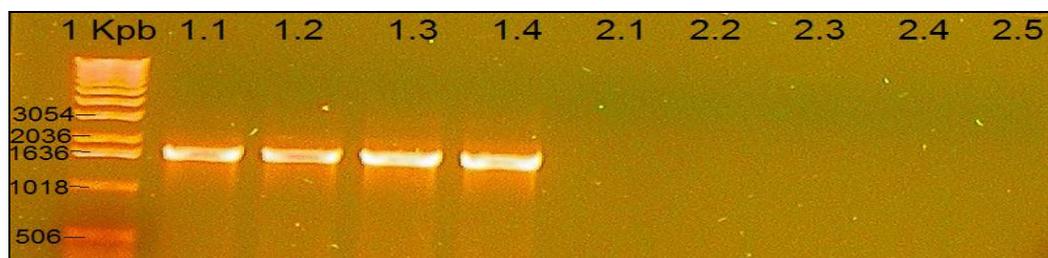


Figura 21: "PCR de colonias xilanasas-Y3, vector de expresión pET22-b(+)"

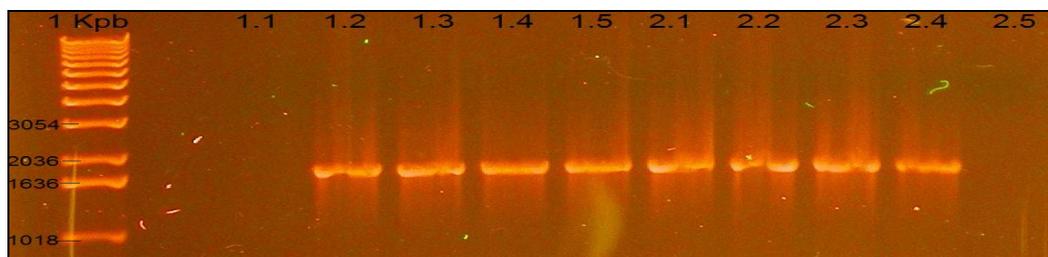


Figura 22: "PCR de colonias xilanasas-(YP)3, vector de expresión pET22-b(+)"

En las Figuras 18 a la 21 se muestran los resultados de los PCR de colonias para las cepas que contenían el inserto de la xilanasa modificada en el vector de expresión pET-22b(+). En ellas, los carriles que presentan la banda de aproximadamente 1700 pb corresponden a las colonias que dieron positivo para el PCR, mientras que los carriles vacíos corresponden a las colonias negativas.

Como se aprecia en las Figuras 18 a la 21, todos los insertos tienen el tamaño esperado de 1700 pb aproximadamente.

Este resultado se corroboró con la digestión de los plasmidios de expresión recombinantes con las enzimas de restricción que separan la secuencia del inserto (resultados no mostrados).

### **3.3. Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos**

Los plasmidios obtenidos se mandaron a secuenciar a Macrogen (Korea) para verificar la secuencia nucleotídica de los insertos clonados.

Los resultados indicaron que las secuencias de la xilanasa modificada con los extremos (WP)2, (YP)2Y, (YP)3 e Y3 correspondían a la secuencia del dominio catalítico de la xilanasa wild type más la secuencia de cada extremo agregada. Sin embargo, se observan mutaciones en varias de ellas al principio de la secuencia, lo que podría incidir en cambios en su expresión o en la actividad de la proteína. También a todas ellas les falta parte de la secuencia al centro de la misma, debido a que la proteína posee un tamaño mayor al que puede secuenciar Macrogen. Por esta razón, se sugiere diseñar un partidador común al centro de la secuencia, para mandar a secuenciar la parte faltante, de manera de descartar más mutaciones en esta zona.

Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de las variantes, así como la secuencia de las mismas alineada con la de la proteína nativa se encuentran en el Anexo I.

### **3.4. Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica de las xilanasas modificadas**

La hidrofobicidad superficial se estimó como se describe en el trabajo realizado por Henríquez (2005). Para proteínas modificadas por la adición de un extremo, se propone considerar que la hidrofobicidad de la proteína permanece constante que sólo se debe sumar la contribución relativa que

ejerce cada aminoácido (según la escala de hidrofobicidad de Miyazawa-Jernigan) del extremo en la hidrofobicidad superficial de la proteína (Simeonidis y cols., 2005).

Para realizar este cálculo, se consideró la estructura molecular del sitio catalítico de una xilanasas, la cual se obtuvo de la base de datos de ExpASy Proteomics Server<sup>1</sup>. El código de la xilanasas elegida es 1W3HB, y el porcentaje de similitud de su secuencia con la xilanasas nativa utilizada para el trabajo es de un 37,7%. Este grado de similitud de las secuencias se calculó con un programa online<sup>2</sup> que alinea ambas secuencias y entrega el porcentaje de parecido entre ambas.

La hidrofobicidad superficial total de la xilanasas nativa se calculó utilizando la expresión que muestra a continuación.

$$\Phi_{surface} = \sum_{i=1}^{20} (R_{aai} \times \Phi_{aai}) \text{ donde } R_{aai} = \frac{S_{aai}}{S_p}$$

**Ecuación 2: "Hidrofobicidad superficial de una proteína"**

En la Ecuación 2,  $R_{aai}$  corresponde al área total expuesta de cada aminoácido,  $S_{aai}$  es el área superficial de el aminoácido  $i$ ,  $S_p$  es el área superficial total de la proteína y  $\Phi_{aai}$  es la hidrofobicidad superficial del aminoácido  $i$  (escala Miyazawa-Jernigan).

El área superficial total de la proteína, así como las áreas superficiales de cada aminoácido fueron calculadas con el programa Stride que es una interface online<sup>3</sup>. El área superficial de la xilanasas 1W3HB es de 13304, y la correspondiente a cada aminoácido se muestra en el Anexo H.

Luego, a partir de las áreas superficiales se calculó la hidrofobicidad de la xilanasas modificada con los extremos hidrofóbicas con la siguiente expresión:

$$\Phi_{tagged} = \Phi_{surface} + \sum_{i=1}^{20} \left( \frac{S_{tag\_aai} \times n_i}{S_p + \sum (S_{tag\_aai} \times n_i)} \times \Phi_{aai} \right)$$

**Ecuación 3: "Hidrofobicidad proteína modificada con una extremo o tag."**

De esta forma, a partir de la Ecuación 2 se calculó la hidrofobicidad superficial de la xilanasas utilizada como modelo, estimándose su valor en 0,260, y a partir de ella se calcularon las hidrofobicidades

<sup>1</sup> <http://www.expasy.org>

<sup>2</sup> <http://swissmodel.expasy.org/workspace/>

<sup>3</sup> <http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py>

que aportan los extremos que se le agregaron a la proteína por medio de la Ecuación 3. Estos resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

**Tabla 1: "Hidrofobicidad superficial"**

<b>Extremo</b>	<b>Hidrofobicidad superficial extremo</b>	<b>Hidrofobicidad xilanasa modificada</b>
<b>WPWP</b>	0,031	0,291
<b>YPYPY</b>	0,026	0,287
<b>YYY</b>	0,024	0,284
<b>YPYPYP</b>	0,028	0,288

Como se observa en la estimación de la hidrofobicidad superficial que aporta cada extremo a la proteína nativa, se ve que para el caso de los extremos que contienen tirosina, esta hidrofobicidad es menor que para el extremo que contiene triptófano. Además, se observa que en cuanto a hidrofobicidad, se puede despreciar el aporte del aminoácido prolina, ya que entre el extremo Y3 (que contiene solo tirosina), y los extremos (YP)2Y e (YP)3 se observa una diferencia poco significativa en la hidrofobicidad. Por esta razón, entre los extremos con tirosina, es más significativo ver el efecto que tiene la prolina en la expresión y purificación de manera experimental, que el aumento teórico de hidrofobicidad que aporta cada una.

De estos resultados también se puede anticipar que el extremo que mayor aporte le da a la hidrofobicidad superficial de la xilanasa nativa es aquella que contiene triptófano.

Como el porcentaje de similitud de la secuencia de la xilanasa usada como modelo con el de la xilanasa de trabajo es bajo (~38%), la estimación de las hidrofobicidades no es completamente confiable. Se descartó analizar la estructura terciaria de la xilanasa modificada, ya que se escapa de los objetivos propuestos, y por otro lado no se encuentra una secuencia homóloga a la de la proteína modificada (con las distintas extremos) de estructura conocida para realizar una simulación de su estructura tridimensional. Por esto se sugiere buscar un modelo de xilanasa que tenga una mayor similitud con la proteína de trabajo, o modelar esta misma para obtener datos confiables de hidrofobicidad superficial.

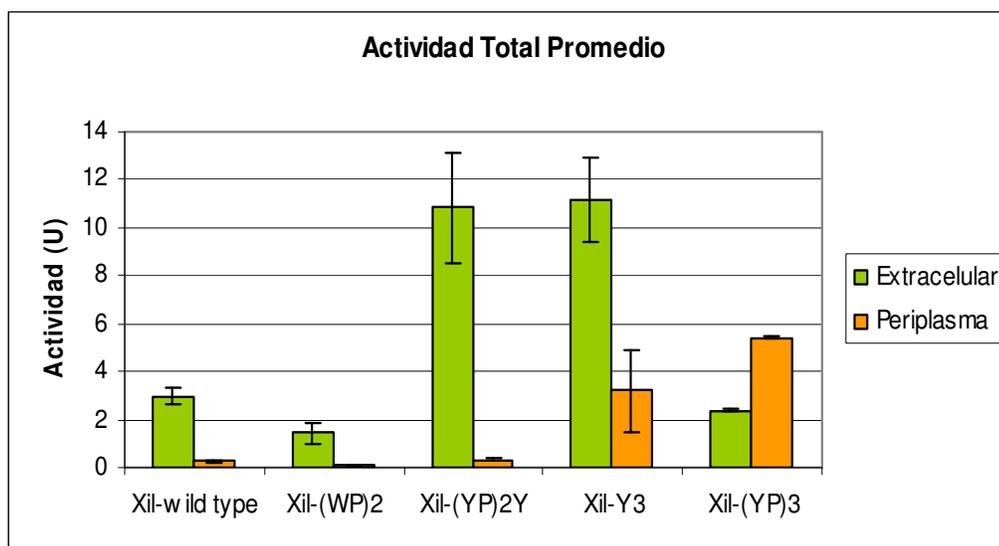
Los datos de la hidrofobicidad superficial de cada aminoácido de la xilanasa nativa se encuentran en el Anexo H.

### 3.5. Producción de xilanasas modificadas

Las cepas de *E. coli* productoras de la xilanasas recombinante modificada se cultivaron y se indujo la expresión de la enzima como se indica en la sección 2.2.11. Luego se les realizó un análisis de actividad y proteína total, para verificar que las mutantes modificadas con los extremos hidrofóbicos presentaran actividad xilanolítica.

#### 3.5.1. Análisis de actividad

A continuación se muestra el resultado para la actividad xilanolítica total de las fracciones extracelular y periplasmática de los cultivos de las cepas con la proteína mutada. Los resultados corresponden al promedio de los 2 experimentos realizados para cada fermentación.

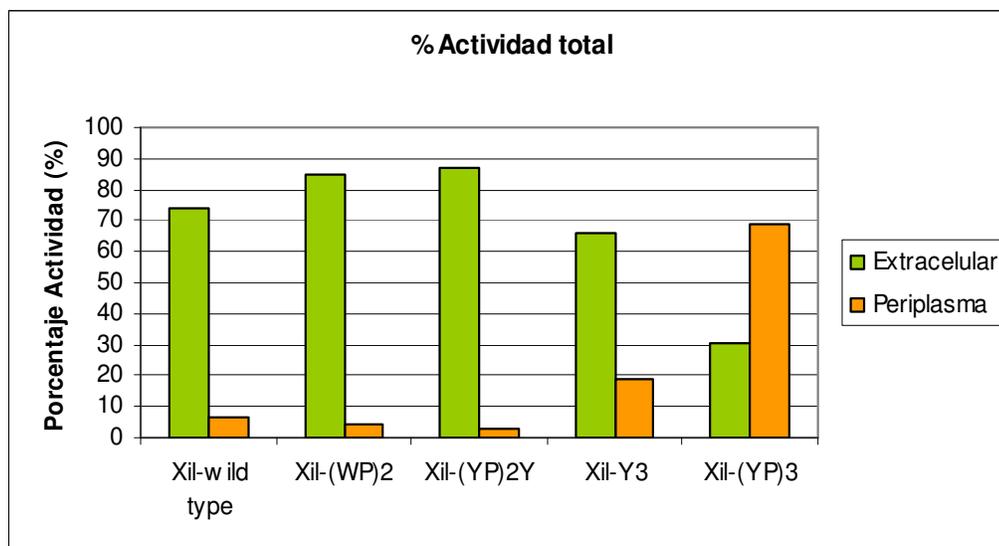


**Gráfico 1: "Actividad xilanolítica total de las fracciones extracelular y periplasmática"**

En el Gráfico 1 se observan las barras de error de los datos promedio, las cuales indican el valor más alto y el más bajo de los 2 cultivos para cada variante. Como se observa, las mayores diferencias entre ambos cultivos se obtuvieron para la Xilanasas-(YP)2Y y la Xilanasas-Y3, sin embargo para el resto de las variantes se observa una buena reproducibilidad entre los experimentos.

De los datos de actividad total, se ve un comportamiento similar a la proteína nativa para las 3 primeras variantes, es decir, se observa una mayor actividad en la fracción extracelular que en la periplasmática. Para la Xilanasas-(YP)3 sin embargo, se observa una relación inversa, ya que presenta una mayor actividad en el periplasma. Del Gráfico 1 se puede deducir también que la proteína nativa presenta

una menor actividad que la mayoría de las variantes modificadas, lo que parece extraño y no se podría explicar. Por esta razón, se calculó el porcentaje de la actividad total (la suma de la actividad en las 3 fracciones obtenidas) que se encuentra en estas dos fracciones, resultado que se muestra a continuación.



**Gráfico 2: "Porcentaje de la actividad total presente en las fracciones extracelular y periplasmática"**

En el Gráfico 2 se observa que la relación entre la fracción extracelular y la periplasmática de los cultivos para las dos primeras variantes (Xilanasas-(WP)2 y Xilanasas-(YP)2Y) es similar a la de la proteína nativa, presentando entre un 73% y 87% de la actividad en la fracción extracelular. Para la variante Xilanasas-Y3 se observa un aumento en la actividad en el periplasma, mientras que para la Xilanasas-(YP)3 se observa una relación inversa, presentando cerca de un 69% de la actividad total en el periplasma.

De esta forma, la gran diferencia en cantidad de actividad entre la proteína nativa y las modificadas que se observa en el Gráfico 1 no corresponden a un aumento de actividad producto de la adición de los extremos, sino que puede deberse a cambios inesperados en las condiciones de cultivo de la cepa nativa que no se pueden controlar.

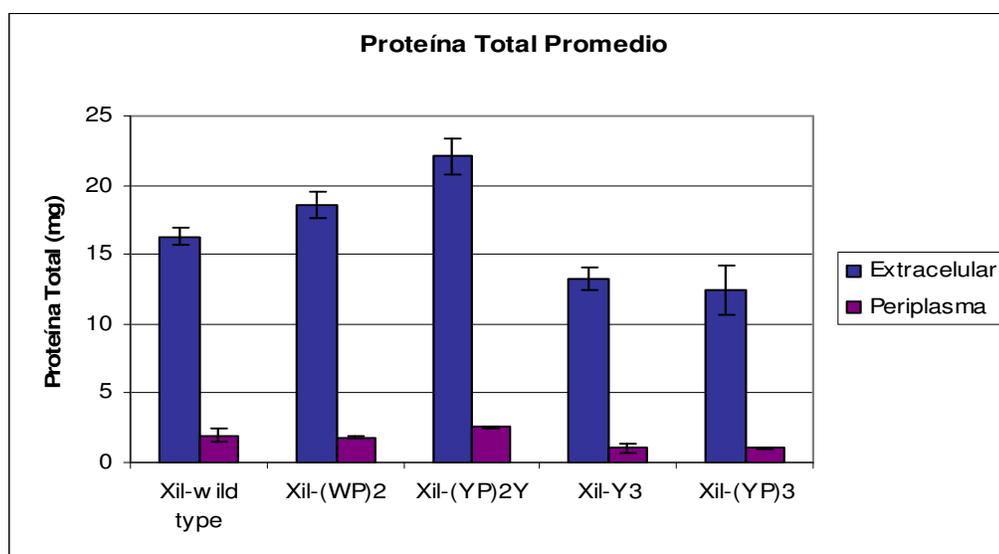
Con estos resultados, se comprueba que las variantes modificadas con los extremos hidrofóbicos presentan actividad xilanolítica, lo que es bastante importante para el trabajo, ya que no se tenía información de que al adicionar estos extremos no se perdiera la actividad enzimática de la proteína.

También se recomienda hacer un estudio más amplio de las condiciones de cultivo (crecimiento e inducción) para todas las variantes, nativa y modificada, de manera de optimizarlas ya que como se observa en los resultados, a pesar de que se cultivaron en las mismas condiciones todas las mutantes, se obtuvieron

resultados distintos para todas ellas, por lo que hay que buscar condiciones óptimas para cada una por separado.

### 3.5.2. Análisis de proteína

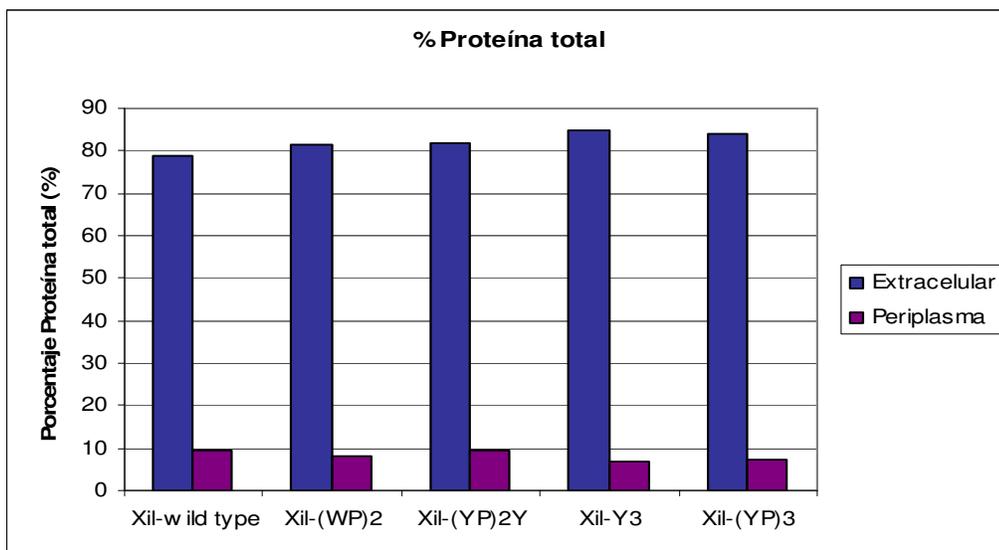
Los resultados obtenidos para la proteína total presente en las fracciones extracelular y periplasmática de los cultivos de las variantes de xilanasas, se utilizaron de la misma forma que los de actividad total. Se presentan la cantidad de proteína total promedio de los dos cultivos con sus correspondientes barras de error.



**Gráfico 3: "Proteína total promedio de las fracciones extracelular y periplasmática de los cultivos"**

Como se observa en el Gráfico 3 para todas las variantes de xilanasas se observa una mayor cantidad de proteína total en la fracción extracelular en comparación con la proteína presente en el periplasma. Esto se esperaba ya que el espacio periplasmático es pequeño y siempre presenta una menor cantidad de proteína. De acuerdo a las barras de error que indican el mayor y el menor valor obtenido para los 2 cultivos, se puede decir que hay una buena reproducibilidad de los experimentos.

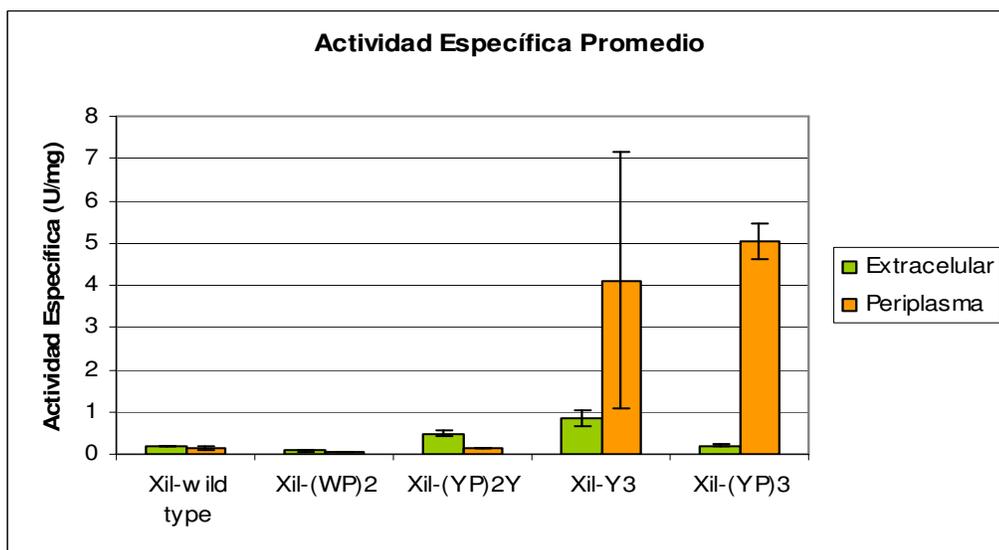
Se observa también, que entre las cepas hay diferencias en la cantidad de proteína total, sin embargo, esto se puede comparar mejor con el porcentaje de proteína total presente en cada fracción, datos que se presentan a continuación.



**Gráfico 4: "Porcentaje de proteína total presente en las fracciones extracelular y periplasmática."**

Del Gráfico 4 se observa que la proteína total se divide entre la fracción extracelular y la periplasmática de la misma forma para todas las variantes.

A partir de los resultados de actividad y proteína total se puede obtener la actividad específica de cada fracción del cultivo. Estos resultados se muestran a continuación.



**Gráfico 5: "Actividad específica promedio presente en las fracciones extracelular y periplasmática"**

A partir del Gráfico 5 puede decir las variantes Xilanasas-(WP)2 y Xilanasas-(YP)2Y presentan un comportamiento similar al de la xilanasas nativa, presentando una mayor actividad específica en la fracción

extracelular, mientras que las variantes Xilanasa-Y3 y Xilanasa-(YP)3 presentan mayor actividad específica en la fracción periplasmática. Para estos datos los experimentos son reproducibles, a excepción del caso de la Xilanasa-Y3, que tiene una varianza de datos bastante alta.

En general, de los resultados obtenidos, se puede ver que la variante que se diferencia más en el comportamiento con respecto a la proteína nativa es la Xilanasa-(YP)3. Esto coincide con que el extremo (YP)3 es el más largo de los cuatro utilizados, además de ser la variante que presentó más mutaciones en su secuencia (ver Anexo I). Estas características podrían provocar que la proteína Xilanasa-(YP)3 quede más retenida en la fracción periplasmática, a diferencia del resto.

Las tablas con los resultados obtenidos en los experimentos y los gráficos de actividad y proteína para la fracción proteica restante de los cultivos se muestran en el Anexo E.

### **3.6. Purificación de la xilanasa desde las Fracciones Periplasmáticas**

En esta sección se describen las cromatografías realizadas a las muestras correspondientes a las fracciones periplasmáticas de los 2 experimentos realizados para proteína nativa y las cuatro mutantes. Con estos experimentos se determinaron los volúmenes de elución de las proteínas (nativa y mutantes) con los cuales se estimó el Tiempo de Retención Adimensional (DRT) para cada una.

Se analizó la fracción periplasmática ya que se utilizó la cepa con la xilanasa nativa proveniente de un trabajo anterior, en el cuál se recuperaba la xilanasa de esta fracción.

Para los 2 cultivos de cada cepa (productoras de xilanasa nativa y mutantes), se realizó la cromatografía por HIC en duplicado, por lo tanto para cada variante de la proteína se tienen 4 cromatogramas.

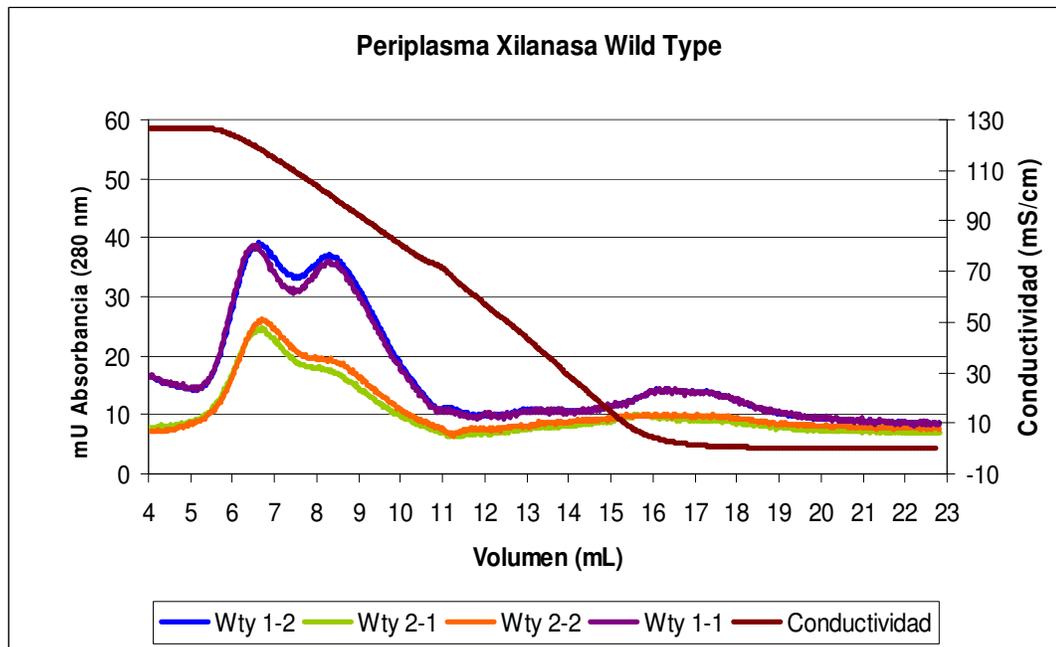


Gráfico 6: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de xilanasa Wild type"

Para la xilanasa nativa, se observa que para ambos cultivos las cromatografías HIC de la fracción periplasmática son reproducibles, sin embargo entre cultivos se observa una diferencia en la cantidad de proteína total, lo que concuerda con lo que se muestra en el Gráfico 3, donde se observa según las barras de error que hay una diferencia en la cantidad de proteína de ambos cultivos.

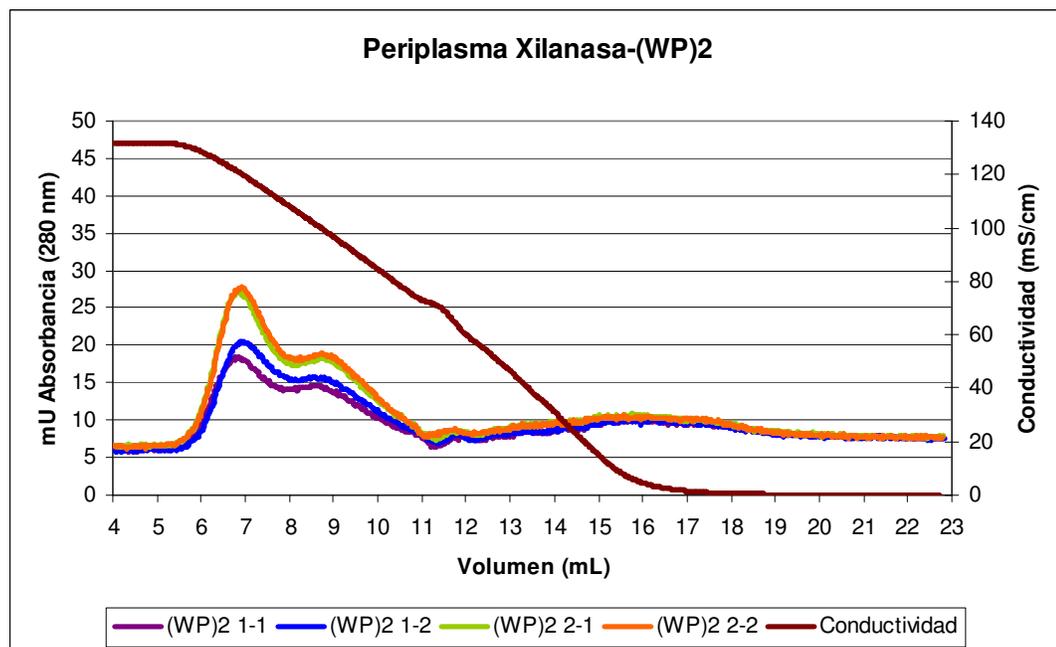


Gráfico 7: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de xilanasa-(WP)2"

En el Gráfico 7 se observa una reproducibilidad entre cromatogramas del mismo cultivo, y también una concordancia con la cantidad de proteína total obtenida para la fracción periplasmática de esta cepa, que en este caso era mayor para el cultivo 2.

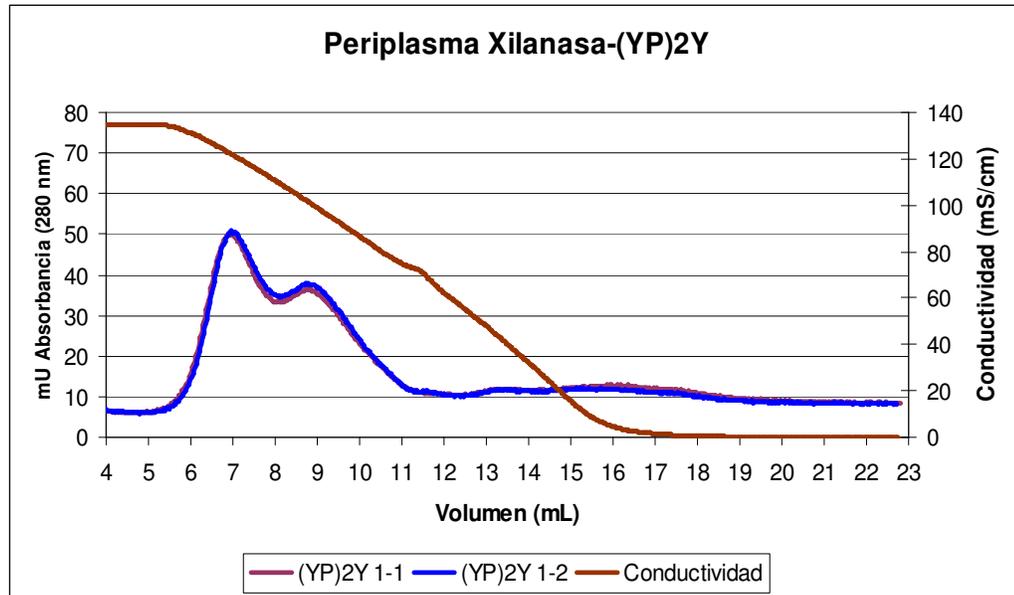


Gráfico 8: “Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de xilanasa-(YP)2Y”

Para la cepa xilanasa-(YP)2Y se descartaron los cromatogramas correspondientes al cultivo 2, por presentar irregularidades, y valores que sobrepasaban las 300 mU de Absorbancia o incluso más (ver Anexo F).

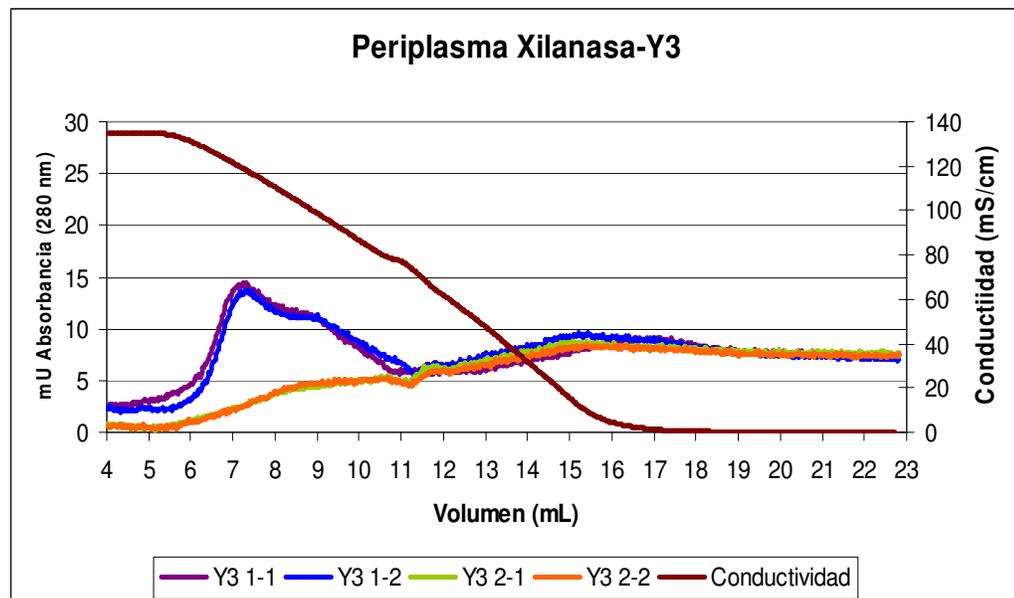
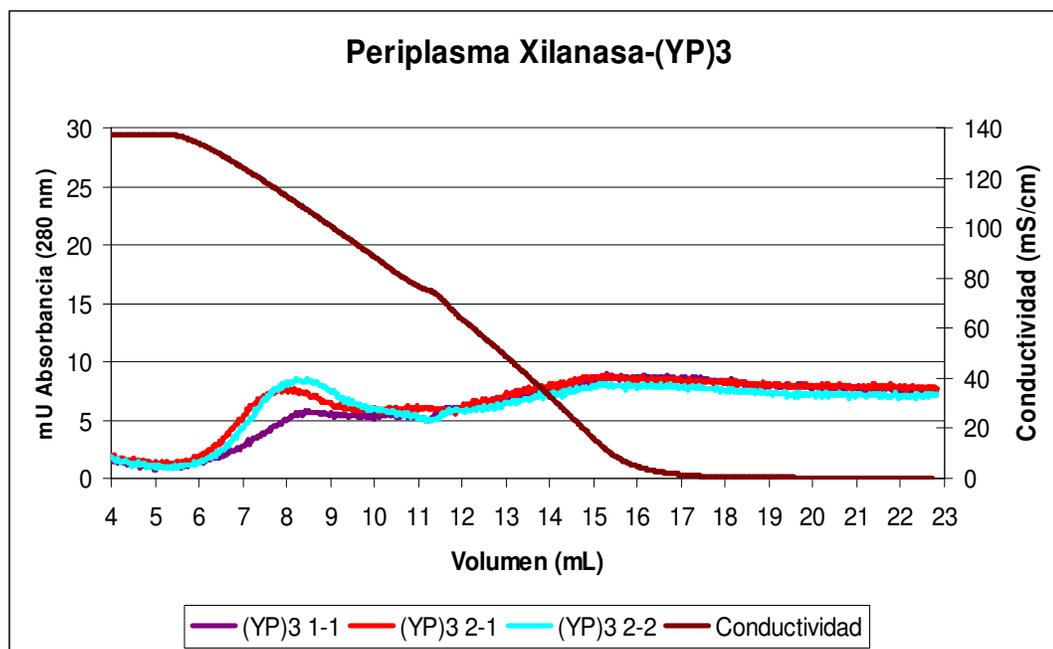


Gráfico 9: “Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de xilanasa-Y3”

Como se observa en los cromatogramas de la fracción periplasmática de la cepa xilanasa-Y3 (Gráfico 9), entre el cultivo 1 y el 2 existe una diferencia de peaks entre el volumen de elución 6 y 11 mL. Sin embargo, a partir del volumen 11 (fracción en que comienza a eluir la xilanasa, como se verá más adelante) hay una concordancia entre estos cromatogramas y el del resto de las mutantes.



**Gráfico 10: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de xilanasa-(YP3)"**

En el caso de xilanasa-(YP)3 (Gráfico 10), se descartó el cromatograma del duplicado del periplasma 1, por tener valores que se salen de rango (ver Anexo F).

En los 5 cromatogramas anteriores se observa una tendencia similar con respecto a los peaks de proteínas. Las diferencias que se observan tiene que ver con la cantidad de proteína obtenida en las fracciones periplasmáticas luego de la extracción.

La presencia de la xilanasa en las fracciones de la cromatografía se corroboró mediante distintos ensayos de actividad.

El primer ensayo de actividad xilanolítica que se realizó, fue el de actividad en medio líquido descrito en la sección 2.2.13.1. Sin embargo, este ensayo presentó grandes diferencias entre duplicados realizados para la misma muestra y bajo las mismas condiciones. Por esto se decidió que ellos no servirían para ubicar la fracción en que eluye la xilanasa. Los resultados de estos ensayos se muestran en el Anexo

G. El factor que podría estar influyendo en esta varianza de datos puede ser la sal presente en las fracciones obtenidas de la cromatografía, por lo que sería interesante analizar la influencia de esta sal en la actividad medida en medio líquido, y buscar una técnica para retirarle la sal a las muestras de la cromatografía, ya que este ensayo en medio líquido permite cuantificar la actividad de la proteína, y de esta manera asegurar en qué fracción eluye la mayor cantidad.

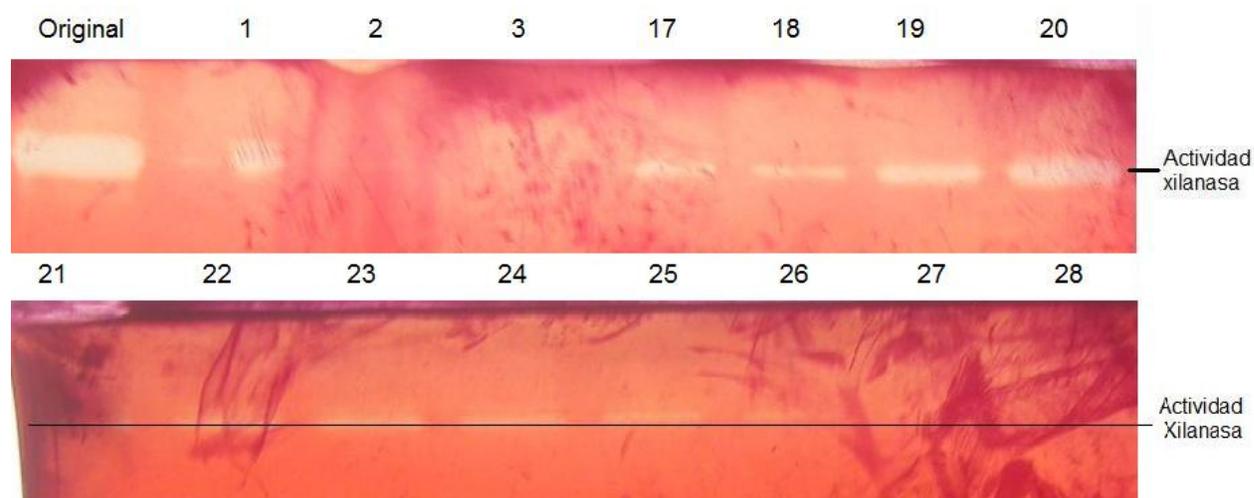
Al no obtenerse buenos resultados con el método anterior, se procedió a realizar ensayos de actividad xilanólica en medio sólido (placas y zimogramas), los que arrojan resultados del tipo cualitativo.

El primer ensayo de actividad se realizó en una placa de agarosa que contenía el sustrato xilano soluble de abedul (*xylan from birchwood*, SIGMA). En este se analizaron todas las fracciones de la cromatografía de la xilanasa wild type.

Este ensayo se realizó para ubicar las fracciones de la cromatografía en las cuales había actividad xilanólica. Se llevó a cabo para la cepa nativa 1, y arrojó como resultado actividad en las fracciones 17 a 28 de la cromatografía.

Luego de este ensayo en placa, se realizó un zimograma de xilanasas a las fracciones que mostraron actividad en la placa, como se indica en la sección 2.2.13.3.

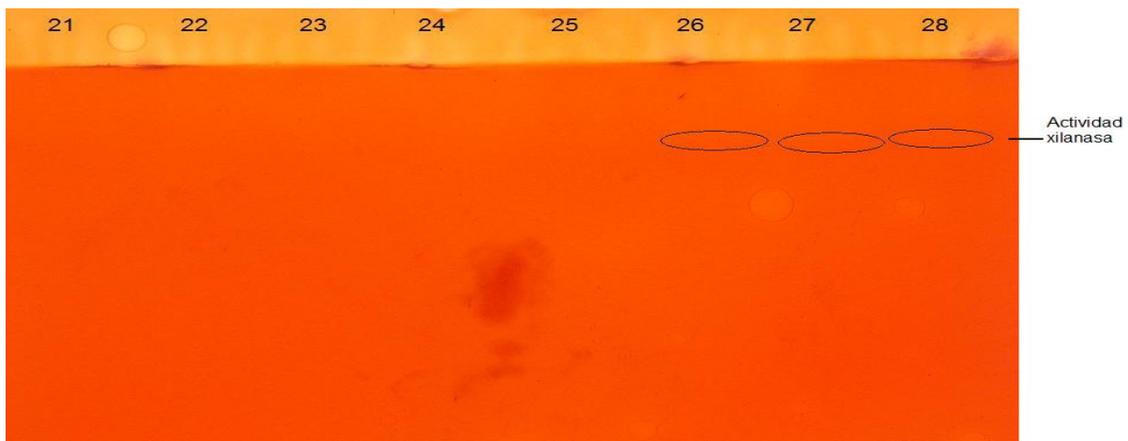
El primer zimograma realizado corresponde al de la xilanasa nativa, y se muestra en la Figura 23. La fracción original corresponde a la muestra inyectada en la columna al inicio de la cromatografía HIC.



**Figura 23: " Zimograma xilanasas fracciones cromatografía: original, 1-3, 17-28 wild type "**

En los zimogramas para la xilanasas wild type, se observa que la mayor actividad se encuentra en las fracciones 19 y 20 de la cromatografía HIC. Por lo tanto, con respecto a estas fracciones se hará la comparación para las xilanasas mutadas con las extremos hidrofóbicas.

Para la xilanasas-(WP)2, en el zimograma realizado se observaron bandas de actividad en las fracciones 26, 27 y 28 de la cromatografía. En la Figura 24 siguiente se indica dónde se observó esta actividad.

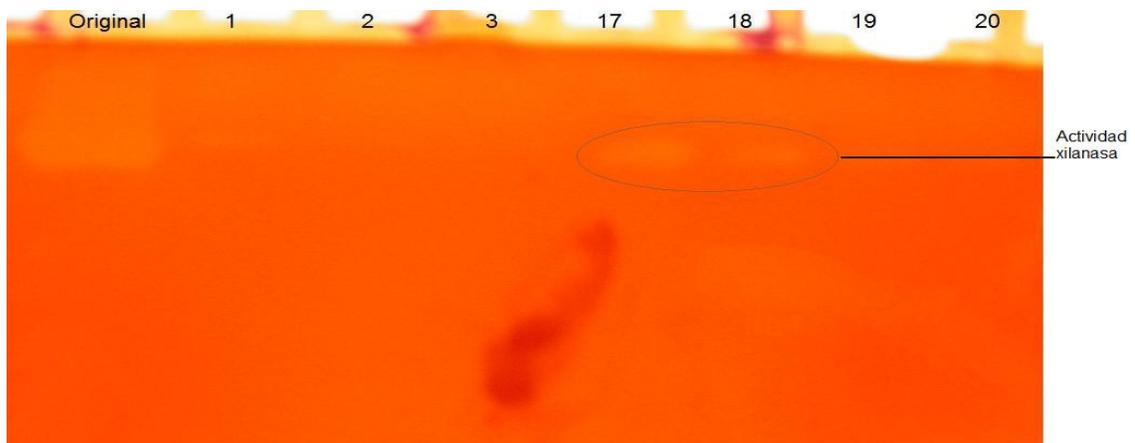


**Figura 24: " Zimograma xilanasas-(WP)2 fracciones cromatografía: 21-28"**

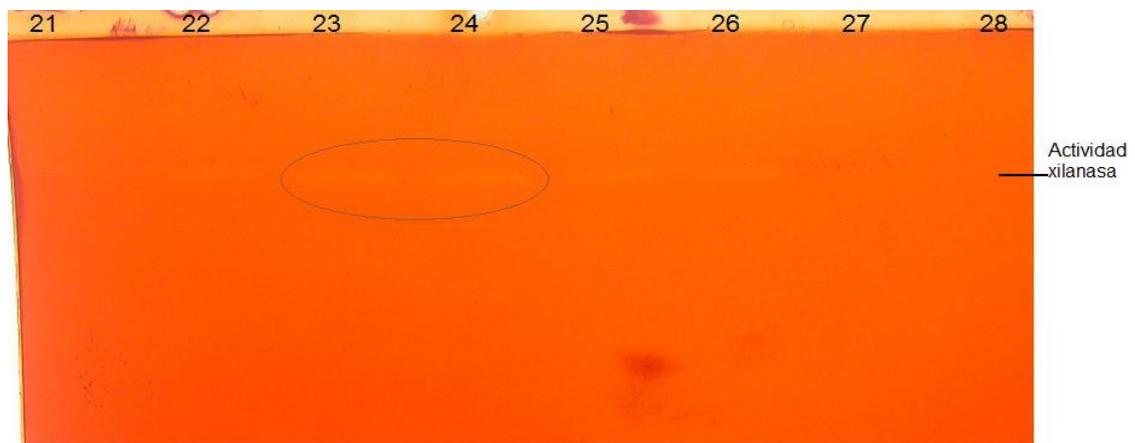
La baja intensidad de las bandas obtenidas, concuerda con la baja cantidad de proteína total y actividad total para la fracción periplasmática del cultivo de esta cepa.

En el caso de la xilanasas-(YP)2Y, se observó actividad en las fracciones 23 y 24 de la cromatografía (resultado no se muestra).

A continuación se muestra el zimograma de la xilanasas-Y3.



**Figura 25: "Zimograma xilanasa-Y3 fracciones cromatografía: original, 1-3, 17-20"**



**Figura 26: "Zimograma xilanasa-Y3 fracciones cromatografía: 21-28"**

En la Figura 25, se observa que la fracción 17 presenta una banda de mayor actividad para la xilansa-Y3. También se observa que las fracciones 23 y 24 tienen una actividad importante (Figura 26).

Esta mayor actividad en la fracción 17 de la mutante con el extremo Y3 indicaría una disminución en la hidrofobicidad superficial con respecto a la proteína nativa que presentaba mayor actividad en las fracciones 19 y 20 de la cromatografía. Esto podría deberse a que la extremo Y3 es el único que no posee prolinas, responsables de darle rigidez a la extremo adherida, lo que podría incidir en que los sitios hidrofóbicos que debe aportar el extremo no estén completamente expuestos y, por lo tanto, no estén disponibles para interactuar con la matriz hidrofóbica de la columna. Sin embargo, este efecto sería parcial, ya que se observa actividad en fracciones posteriores (con respecto a la proteína nativa).

Los resultados obtenidos en los zimogramas de la xilansa-(YP)3, a pesar de que se realizaron 2 veces, fueron negativos, para la fracción original y para el resto de las fracciones de la cromatografía. Esto no concuerda con los resultados de actividad total en que esta variante presenta la mayor actividad en la

fracción periplasmática. Debido a esto, no se puede establecer si esta extremo aporta a la hidrofobicidad superficial de la proteína o no.

En general, en los zimogramas realizados se obtuvieron halos pequeños, o de baja intensidad, lo que se puede deber a una baja concentración de sustrato presente en el gel de poliacrilamida, y/o a una baja cantidad de proteína presente en las muestras. Se sugiere estudiar el ensayo de actividad en medio sólido con distintas concentraciones de sustrato, para descartar que esto sea el problema.

De acuerdo a estos resultados, se corrió un gel de peso molecular de proteínas para las fracciones en las que se observó una mayor actividad para cada variante y la proteína nativa.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los geles de peso molecular (resultados no mostrados), se observó que para las fracciones que presentaron mayor actividad en los zimogramas se encuentra la banda correspondiente a la xilanasas, de aproximadamente 83 kDa para la xilanasas wild type, y cerca de 65 kDa, para las xilanasas mutadas, ya que los extremos se adhirieron al extremo C terminal de la xilanasas (sitio catalítico). Sin embargo, debido a la resolución del gel, no se aprecia bien esta diferencia de peso molecular entre las variantes mutadas y la nativa. El cambio en el peso molecular de la proteína nativa y las modificadas se debe a que para las cromatografías se utilizó la xilanasas nativa completa, y no una troncada en el sitio catalítico. Al haber comparado los volúmenes de elución con la xilanasas nativa completa que posee también su sitio de unión a carbohidratos, se obtiene una diferencia que podría ser aún mayor, si en esta zona existieran más sitios hidrofóbicos. Por lo tanto, se recomienda utilizar una proteína nativa troncada en el sitio catalítico para realizar la comparación de los volúmenes de elución.

Con los resultados obtenidos de los ensayos de actividad en medio sólido, más la estimación de los Tiempos de Retención Adimensional (DRT) se podrá establecer que extremo mejora el proceso de purificación por HIC.

### **3.7. Determinación de los Tiempos de Retención Adimensional (DRT)**

Se determinaron los tiempos de retención en HIC de la xilanasas nativa y de las modificadas. Esto se realizó para los periplasma 1, que fueron los que se analizaron mediante zimogramas.

A partir de los datos obtenidos de las cromatografías, se determinaron los parámetros  $V_0$  (volumen inicial donde comienza el gradiente decreciente de sal),  $V_f$  (volumen final correspondiente a donde termina el gradiente decreciente de sal) y  $V_r$  (volumen de elución de la proteína, correspondiente a

cada una de las mutantes, y dependiente de la fracción a la que eluyó la misma). La fracción de elución de la proteína se considerará como aquella en que se observó la mayor actividad en los zimogramas. Así, para la proteína nativa se considerará la fracción 20, para la xilanas-(WP)2 la fracción 26, para xilanas-(YP)2Y la fracción 24, y para la xilanas-Y3 la fracción 17. Se excluye del estudio la xilanas-(YP)3 ya que no se observó actividad en los zimogramas.

Estimados estos parámetros, se procedió a calcular los DRT a cada muestra según la Ecuación 1, lo que se muestra a continuación en la Tabla 2.

**Tabla 2: “DRT de las xilanasas nativa y modificadas de los periplasmas 1 y 2”.**

	<b>Wild type 1</b>	<b>Wild type 2</b>	<b>(WP)2 1</b>	<b>(WP)2 2</b>	<b>(YP)2Y 1</b>	<b>(YP)2Y 2</b>	<b>Y3 1</b>	<b>Y3 2</b>
Vo (mL)	5,36	5,48	5,71	5,64	5,90	5,57	5,57	5,50
Vf (mL)	19,93	20,55	19,50	19,41	19,51	19,38	19,52	19,52
Vr (mL)	13,04	13,03	16,03	16,03	15,03	15,02	11,53	11,53
<b>DRT</b>	<b>0,527</b>	<b>0,501</b>	<b>0,748</b>	<b>0,755</b>	<b>0,671</b>	<b>0,684</b>	<b>0,427</b>	<b>0,430</b>

Los coeficientes 1 y 2 indican que los datos provienen del cultivo 1 y 2 respectivamente.

Como se observa en la Tabla 2, las variaciones de los volúmenes de elución entre los 2 cultivos para cada cepa son muy bajos, por lo que es válido calcular un promedio de éstos para trabajar. Así, se calculó el porcentaje de incremento del DRT de las proteínas mutadas respecto de la nativa. Los valores se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3: “Variación de DRT con respecto a la xilanas wild type”.**

	<b>Wild type</b>	<b>(WP)2</b>	<b>(YP)2Y</b>	<b>Y3</b>
<b>DRT</b>	0,514	0,751	0,678	0,429
<b>%Diferencia con respecto a wild type</b>	0	+46,17	+31,82	-16,60

Como se ve en la tabla anterior, la xilanas-(WP)2 tiene un DRT 46,17% mayor que la xilanas nativa, mientras que el DRT de la xilanas-(YP)2Y es un 31,82% mayor. También se observa, que el DRT de la xilanas-Y3 es un 16,6% menor que el de la proteína nativa.

El resultado esperado era que los DRT aumente con respecto a la cepa nativa para todas las variantes modificadas con los extremos hidrofóbicos, ya que según el modelo para determinar la hidrofobicidad superficial de proteínas con extremos (tagged proteins), éstos aportarán positivamente a la hidrofobicidad superficial total. Sin embargo, para la Xilanasa-Y3 ocurrió el efecto contrario, se observó una disminución del DRT, que como se dijo en la sección anterior, puede deberse a que los sitios hidrofóbicos del extremo Y3 no estén completamente expuestos. Esto no es predecible por el modelo planteado en la sección 3.4, ya que dicho modelo toma como hipótesis que los extremos adheridos se encuentran completamente expuestos.

### 3.8. Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT

En la Tabla 4 se muestra la comparación de los resultados obtenidos para hidrofobicidad superficial y DRT de la proteína nativa y las variantes modificadas con los distintos extremos.

**Tabla 4: "Comparación Hidrofobicidad-Tiempos de Retención."**

	<b>Hidrofobicidad superficial</b>	<b>DRT promedio</b>	<b>Diferencia DRT respecto nativa (%)</b>	<b>Aumento hidrofobicidad respecto nativa (%)</b>
<b>Xilanasa nativa</b>	0,26	0,514	---	---
<b>Xilanasa-(WP)2</b>	0,291	0,751	+46,17	12,09
<b>Xilanasa-(YP)2Y</b>	0,287	0,678	+31,82	10,29
<b>Xilanasa-Y3</b>	0,284	0,429	-16,60	9,30
<b>Xilanasa-(YP)3</b>	0,288	No Determinado	No Determinado	10,77

Como se observa en la Tabla 4, para la xilanasa modificada con los extremos (WP)2 e (YP)2Y se observa que el aumento en la hidrofobicidad teórica concuerda con el aumento en los DRT de estas variantes. Sin embargo, para el extremo Y3 se observa una relación inversa, es decir, a pesar de que teóricamente este extremo aumenta la hidrofobicidad de la xilanasa, su DRT en la cromatografía HIC es menor que para la proteína nativa. Como se dijo anteriormente, esto puede deberse a la falta de prolina en este extremo, lo que no impide que la misma forme estructuras secundarias, de modo que estos sitios hidrofóbicos probablemente no estén expuestos total o parcialmente.

Por otro lado, no se pudo obtener una relación entre la hidrofobicidad superficial y el DRT para la xilanasa modificada con el extremo (YP)3 por las razones expuestas en la sección 3.7. Sería interesante obtener el DRT para esta mutante, de manera de confirmar la importancia de la presencia de prolina en los extremos hidrofóbicos.

Se recomienda realizar este análisis a las fracciones extracelulares de los cultivos para ver si se obtiene la misma reacción.

## 4. CONCLUSIONES

Fue posible modificar proteínas mediante la adición de extremos formados por secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos. Se modificó exitosamente una xilanasa nativa con los cuatro extremos hidrofóbicos: WPWP, YPYPY, YPYYP e YYY, obteniéndose la secuencia correcta del dominio catalítico de la xilanasa nativa más la secuencia de la extremo adicionada en cada caso.

Se observó una buena reproducibilidad en los cultivos de las cepas recombinantes de xilanasa, obteniéndose valores similares de actividad y proteína total para los dos cultivos de cada cepa recombinante. Sin embargo, para todos los casos (incluida la cepa nativa) se obtuvieron bajos valores de proteína y actividad total, siendo estos valores aún más bajos en la fracción periplasmática. Esto indica una baja producción, por lo que, para mejorar estos valores, se recomienda hacer un estudio para encontrar condiciones óptimas de crecimiento e inducción de la cepa nativa, así como un estudio que confirme la presencia de la xilanasa en la fracción periplasmática.

Se concluye también, que las variantes de xilanasa modificadas con extremos hidrofóbicos son activas, es decir, esta adición aparentemente no afecta la actividad enzimática de la xilanasa. A partir de los resultados de actividad y proteína total, se observa que no hay disminución de la recuperación de la proteína en comparación con la xilanasa nativa, por lo que esta adición de extremos hidrofóbicos no tendría un efecto negativo en la recuperación de la proteína. También se observa que hay una mayor actividad en la fracción extracelular de los cultivos, a excepción de la xilanasa-(YP)3 que presenta mayor actividad en la fracción periplasmática. Con esto se puede decir que la adición de esta extremo modifica la fracción del cultivo en la que se recupera la xilanasa.

En el proceso de purificación, se aprecia en los cromatogramas obtenidos para los dos cultivos de cada cepa, un perfil de elución similar. Con los ensayos de actividad realizados a las fracciones de las cromatografías, no se encontró actividad para la xilansa-(YP)3, lo que puede atribuirse a la baja cantidad de proteína presente en e periplasma de esta cepa, por lo que se excluyó de los análisis posteriores. También se observó que mientras que la xilanasa nativa eluye a los 13 mL en HIC, para las xilanasas mutadas se observa una elución a los 16 y 15 mL para la xilanasa-(WP)2 y xilanasas-(YP)2Y respectivamente. La xilanasa-Y3 por otro lado, se presenta en mayor cantidad a los 11 mL, lo que podría explicarse debido a la falta de prolinas de esta extremo, lo que incidiría en una exposición parcial de los sitios hidrofóbicos de ésta.

Debido a que la presencia de sal en las muestras obtenidas de las cromatografías afecta el ensayo de actividad xilanolítica en medio líquido que permite cuantificar esta misma, se descartaron estos resultados y se analizó esta actividad sólo de forma cualitativa. Se sugiere buscar un método para eliminar la sal de éstas muestras para poder realizar un análisis cuantitativo de actividad.

Los DRT de las variantes de xilanasas se calcularon de manera gráfica, obteniéndose diferencias porcentuales de +46,17% para la xilanasas-(WP)<sub>2</sub>, +31,82% para la xilanasas-(YP)<sub>2</sub>Y y un -16,6% para la xilanasas-Y<sub>3</sub>. De estos estudios se puede concluir que la adición de estas secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos permite un aumento del DRT de la proteína mutada en el caso en que el extremo posee prolina, sin embargo, al parecer este DRT disminuiría al adicionar extremos que contienen sólo aminoácidos hidrofóbicos y no prolina, como en el caso de la extremo Y<sub>3</sub>. Por lo tanto el aumento de la hidrofobicidad total de la proteína concuerda con el cambio en el DRT de la misma para los extremos con prolina, y la relación es inversa en el caso de los extremos sin este aminoácido.

De la estimación de la hidrofobicidad superficial de la xilanasas se puede concluir que, a pesar de que el modelo predice que la adición de todos los extremos aumentan la hidrofobicidad superficial de la proteína, no predice si los sitios hidrofóbicos del extremo están totalmente expuestos, ya que toma como hipótesis que esto es así. Por lo tanto, es necesario el análisis de los DRT para concluir si aumenta la hidrofobicidad superficial realmente.

Finalmente, se recomienda continuar con el estudio utilizando distintas secuencias para las mutaciones, que varíen en tamaño y combinación de los aminoácidos W, P e Y, para confirmar la importancia de la presencia de prolina en ellos, tanto en la recuperación como purificación de la proteína.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Acevedo Cox, Juan Pablo. Tesis de Doctorado: “Aislamiento y producción recombinante de nuevas proteasas bacterianas adaptadas a bajas temperaturas”. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile. 2008.
2. Bajpai P. Biological bleaching of chemical pulps. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2004. **24(1)**: 1-58.
3. Belter P., Cussler E. L., Hu W. *Processing for Biotechnology*. John Wiley & Sons. New York. 1988, pp 368.
4. Biely P. Microbial xylanolytic systems. *Trends in Biotechnology*. 1985. **3**: 286-290.
5. Collins T., Meuwis M., Stals I., Claeysens M., Feller G., Gerday C. A novel Family 8 xylanasa, functional and physicochemical characterization. *The Journal of Biological Chemistry*. 2002. **277**: 35133-35139.
6. Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*. 2005. **29**: 3-23.
7. Davis G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 1995. **3(9)**: 853-859.
8. De Vries R. P., Visser J., De Graaf L.H. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Research in Microbiology*. 1999. **150(4)**: 281-285.
9. Dill K. A. Dominant forces in protein holding. *Biochemistry*. 1990. **29**: 7133-7155.
10. Eriksson K. *Hydrophobic Interaction Chromatography*. Protein purification: Principles High-Resolution Methods and Applications. New York. 1998. pp 283-309.

11. Fexby S., Bullock L. Hydrophobic peptide tags as tools in bioseparations. *Science Direct*. 2004, **22(10)**.
12. Fontes C.M., Gilbert H.J., Hazlewood G.P., Clarke J.H., Prates J.A., Mckie V.A., Nagy T., Fernandes T.H., Ferreira L.M. A novel cellvibrio mixtus family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. *Microbiology*. 2000. **146**: 1959-1967.
13. Gallardo Román, Óscar. Tesis de Doctorado: “Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasa B de *Paenibacillus barcinonensis*”. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universitat de Barcelona. 2007.
14. Henríquez Canales, Karin Escarlen. 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.
15. Hoondal G.S., Tiwari R.P., Tewari R., Dahiya N., Beg Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002. **59(4)**: 409-418.
16. Irwin D., Jung E., Wilson D. Characterization and sequence of a *Thermomonospora fusca* xylanase. *Applied and Environmental Microbiology*. Marzo 1994. **60**: 763-770.
17. Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology*. 1997. **56(1)**: 1-24.
18. 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.
19. Lienqueo M. E., Salazar O., Henríquez K., Calado C. R. C., Fonseca L. P., Cabral J. M. S. Prediction of retention time of cutinases tagged with hydrophobic peptides in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007. **1154**: 460-463.
20. Matte A., Forsberg C. Purification, characterization, and mode of action of endoxylanases 1 and 2 from *Fibrobacter succinogenes* S85. *Applied and Environmental Microbiology*. Enero 1992. **58**: 157-168.

21. Nakamura S., Wakabayashi K., Nakai R., Aono R., Horikoshi K. Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkaliphilic *Bacillus sp.* Strain 41M-1. *Applied and Environmental Microbiology*. Julio 1993. **59**: 2311-2316.
22. Parajo J.C., Dominguez H., Dominguez J. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Biosource Technology*. 1998. **65(3)**: 203-212.
23. Polizeli M.L.T.M., Rizzatti A.C.S., Monti R., Terenzi H.F., Jorge J.A., Amorim D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. **67(5)**: 577-591.
24. Robinson R, María del Carmen. 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.
25. Roe S. Separation based on structure. *Protein purification methods: a practical approach*. Elv Harris and S. Angal, IRL press. Oxford. 1989. pp 221-232.
26. Royer J., Nakas J. P. Simple, sensitive zymogram technique for detection of xylanase activity in polyacrylamide gels. *Applied and Environmental Microbiology*. Junio 1990. **56**: 1516-1517.
27. Simeonidis E., Pinto J. M., Lienqueo M. E., Tsoka S., Papageorgiou L. G. MINLP models for the synthesis of optimal peptide tags and downstream protein processing. *Biotechnology Progress*. 2005. **21**: 875-884.
28. Sipat A., Taylor K., Lo R., Forsberg C. Molecular cloning of a xylanase gene from *Bacteroides succinogenes* and its expression in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Marzo 1987, p: 447-481.
29. St. John F.J., Rice J.D., Preston J.F. *Paenabacillus sp* strain JDR-2 and XynA1: a novel system for methylglucuronxyylan utilization. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006a. **72(2)**: 1496-1506.

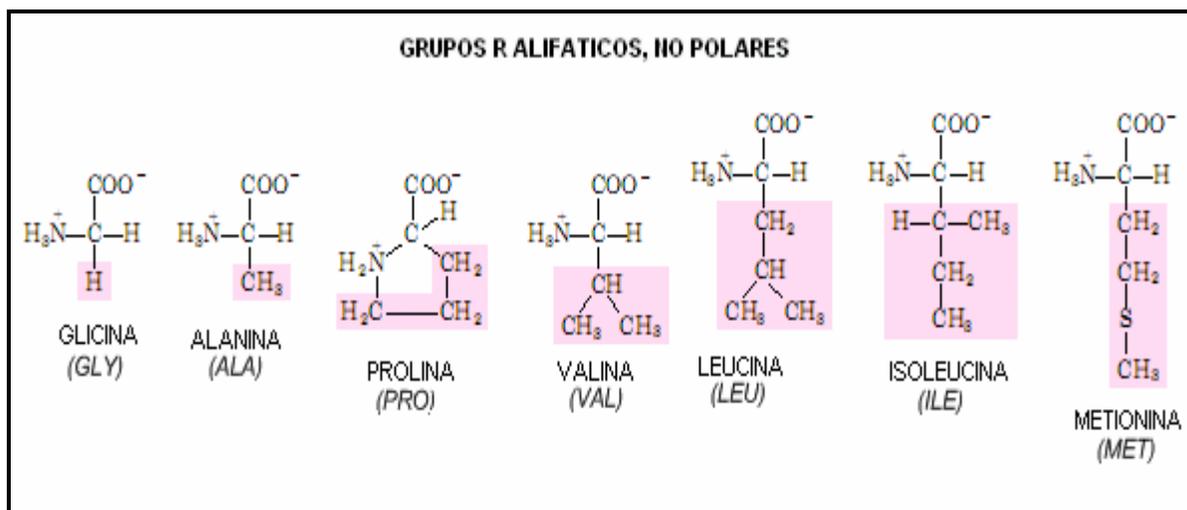
30. Steffens M. A., Fraga E. S., Bogle I. D. L. Synthesis of purification tags for optimal downstream processing. *Comp. Chemical Engineering*. 1998. **24**: 717-720.
31. Sun Y., Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Biosource Technology*. 2002. **83(1)**: 1-11.
32. Viikari L., Tenkanen M., Suurnäkki A. *Biotechnology in the pulp and paper industry*. REHM, H.J. (ed) *Biotechnology*. Weinheim: Wiley-VCH. 2001. **10**: 523-546.
33. Wong K.K.Y., Tan L.U.L, Saddler J.N. Multiplicity of  $\beta$ -1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. *Microbiological Reviews*. 1988. **52**: 305-317.
34. Zhou C., Bai J., Deng S., Wang J., Zhu J., Wu., Wang W. *Biosource Technology*. 2008. **99**: 831-838.

## ANEXOS

### Anexo A: Aminoácidos

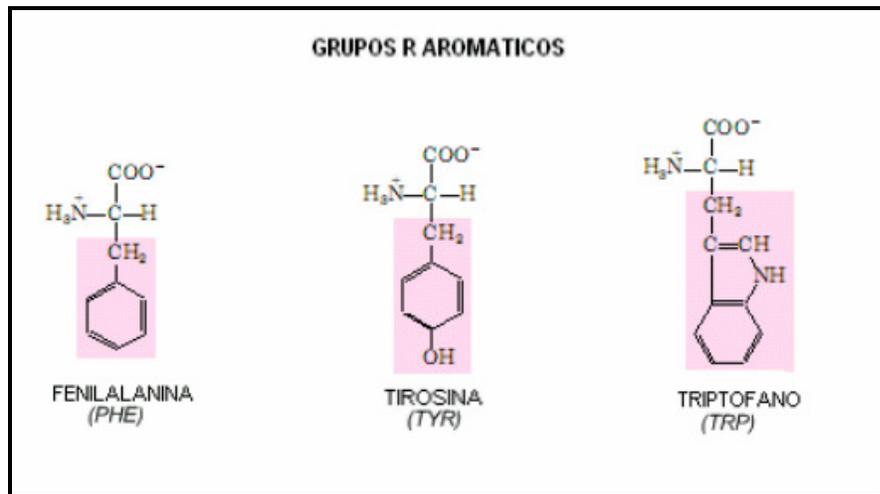
En el presente anexo se muestra la estructura de los aminoácidos y su principal clasificación en función de las características determinadas por su cadena lateral.

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



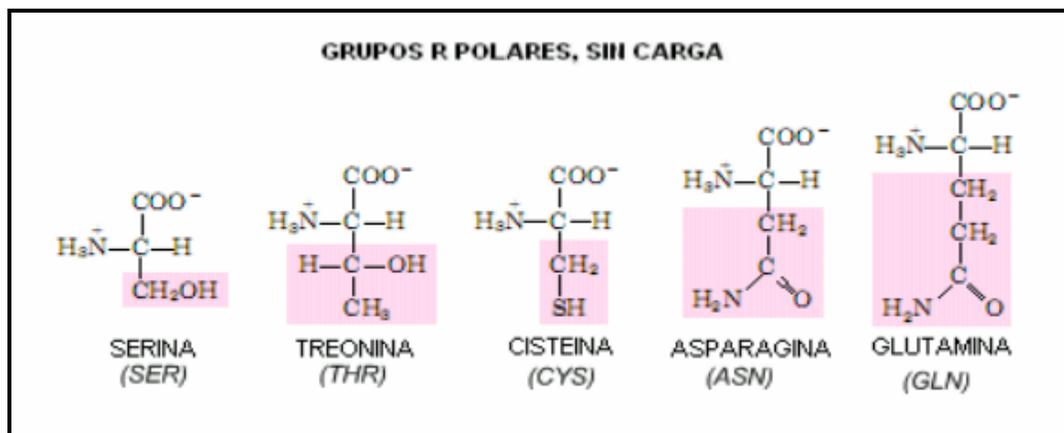
**Ilustración 1: "Estructura química aminoácidos apolares alifáticos"**

**Grupo R aromáticos:** conforman la cadena lateral de **Fenilalanina** (benceno), **Tirosina** (fenol) y **Triptófano** (indol), son relativamente apolares. Pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se concentran.



**Ilustración 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 en agua. Se encuentran en **Serina, Treonina, Cistina, Metionina, Asparagina y Glutamina.**



**Ilustración 3: "Estructura química aminoácidos polares sin carga"**

**Grupo R cargado positivamente (ácidos):** poseen carga positiva neta a pH 7.0 y todos poseen seis átomos de carbono. Aquí se encuentra la **Lisina**, la **Arginina** y la **Histidina.**

**Grupo R cargado negativamente (básicos):** los dos miembros de esta clase son los **Ácidos 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 y 7.

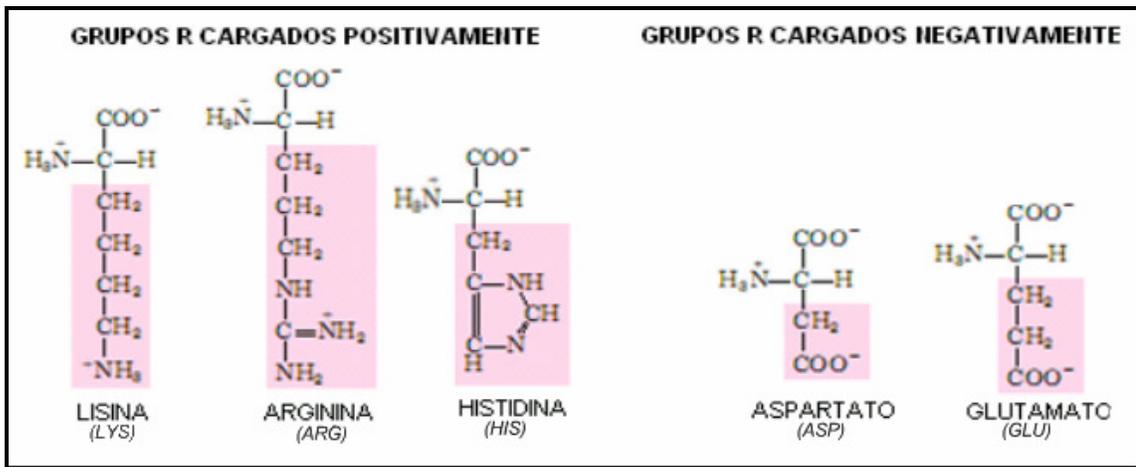


Ilustración 4: "Estructura química aminoácidos cargados positiva y negativamente"

## **Anexo B: Medios de Cultivo Líquidos y Sólidos**

### **Medios de Cultivo Líquidos**

**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 volumen a 1000 mL con agua milli-Q y se esteriliza por autoclave.

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

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

- 900 mL agua Milli-Q
- 12 gr 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 de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$
- disolver y ajustar volumen a 100 mL

El medio TB y las sales de potasio se esterilizan separados por autoclave. Previo uso del medio TB se agrega la solución de sales.

**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 volumen a 985 mL con agua Milli-Q y se esteriliza por autoclave.

### **Medios de Cultivo Sólidos**

**Placas LB-agar con ampicilina:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 mL de medio LB, se autoclave y se dejó enfriar a 50°C. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL (100 µL del stock de ampicilina de 100 mg/mL) y se repartió el contenido en cuatro placas petri esteriles. Se dejaron melificar, se sellaron con parafilm (Pechiney, Chicago, IL-USA) y luego se guardaron a 4°C.

**Placas LB-agar con ampicilina/IPTG/X-Gal:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 mL de medio LB, se autoclave y se dejó enfriar a 50°C. Se agregó ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL (100 µL del stock de ampicilina de 100 mg/mL), se agregó IPTG para obtener una concentración final de 0,5 mM (100 µL del stock de IPTG 0,5M) y se agregó X-Gal para una concentración final de 80 µg/mL (160 µL del stock de X-Gal de 50 mg/mL). Luego se repartió el contenido en cuatro placas petri estériles, se dejaron melificar, se sellaron y luego se guardaron a 4°C.

## Anexo C: Curvas de Calibración

### Curva Calibración BSA para calcular proteína total

Tabla 5: "Datos Curva de Calibración concentración de BSA"

Concentración BSA (mg/ml)	Absorbancia (595nm/465nm)
0	0
0,0625	0,563
0,125	1,251
0,25	2,767
0,5	4,456

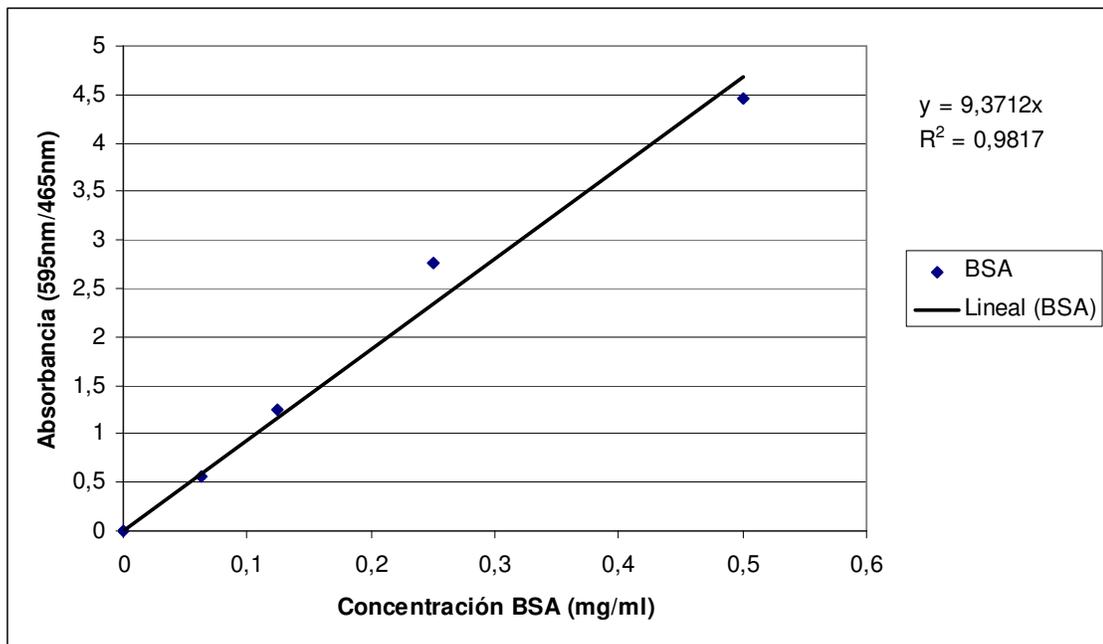


Gráfico 11: "Curva de Calibración concentración BSA"

### Curva de Calibración para calcular concentración de Xilosa (azúcares reductores)

Tabla 6: "Datos Curva de Calibración concentración de xilosa"

Abs (550 nm)	Concentración xilosa (mM)
0	0
0,391	0,5
0,844	1
1,334	1,5
1,786	2
2,335	2,5
2,704	3
3,155	3,5

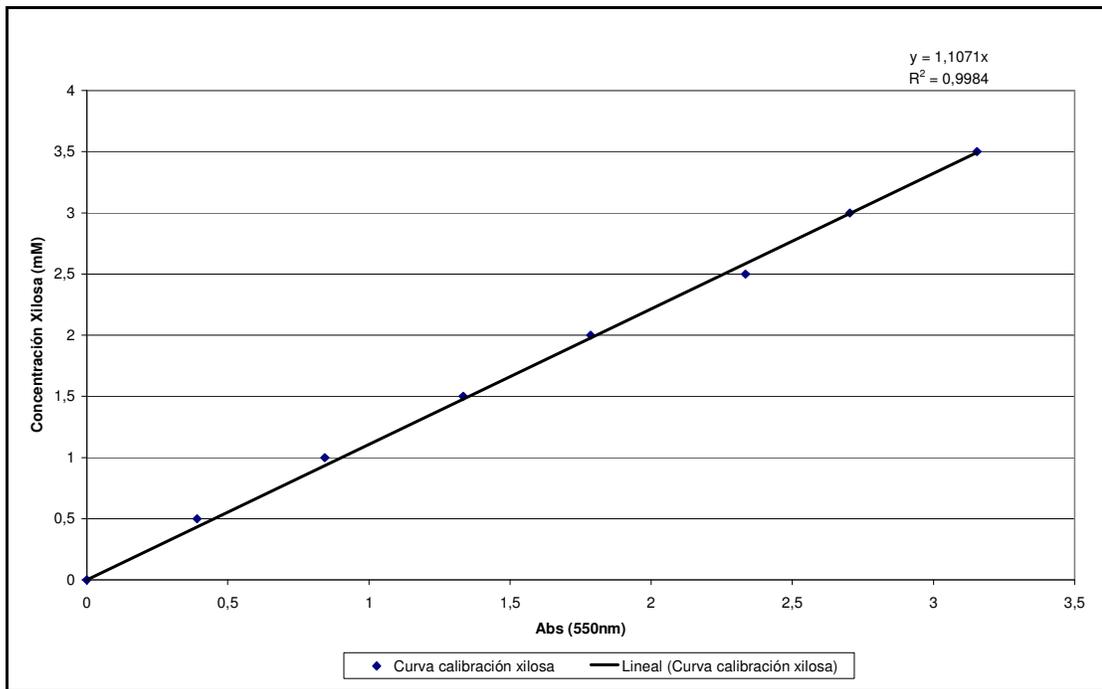


Gráfico 12: "Curva de Calibración concentración xilosa"

## **Anexo D: Metodología anexa**

### **Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)**

A continuación se muestran las composiciones de los geles separador y concentrador de la electroforesis de proteínas.

**Tabla 7: "Composición del gel separador"**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
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 µL
TEMED	2 µL

**Tabla 8: "Composición gel concentrador"**

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
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 µL
TEMED	1,25 µL

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 por ebullición 5 minutos y posteriormente se cargaron en el gel de acrilamida. Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratorios Inc., CA-USA). 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.

### **Tinción de geles de poliacrilamida con nitrato de plata**

Se incuba el gel durante 1 hr con 100 mL de una solución al 40 % Etanol y 10 % Ácido Acético, y luego se lava varias veces con agua durante 1 hr. Se deja remojar durante 30 min con una solución 0,005 mg/mL DTT. Posteriormente se retira el reactivo DTT y se añade una solución de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ) a 0,001 gr/mL y se incuba durante 30 minutos a oscuras.

Luego para revelar el gel, se cambia de pocillo y se remoja en agua. Se pone en presencia de una solución de 250 mL que contiene 9 gr de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  y 0,15 mL de formaldehído al 37%. Se verifica la aparición de las bandas (de 2 a 10 min) y se detiene la reacción añadiendo 3 gr de ácido cítrico en cuanto cambia el gel de color. Finalmente, se lava el gel 2 veces en agua.

### **Método del DNS para medir azúcares reductoras**

El método DNS 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 por 10 min a 100 °C y se enfrían en hielo por 5 min. Los azúcares reducidos son calculados midiendo la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 550 nm, y el valor numérico se calcula a partir de una curva de calibración estándar construida para diferentes concentraciones del azúcar reductor a calcular.

## Anexo E: Datos Cultivos cepas nativa y mutadas

Wild Type				
<b>Experimento 1</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	3,30	16,88	0,20
Buffer TES	25	0,81	2,39	0,34
Periplasma	25	0,22	2,39	0,09

<b>Experimento 2</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	2,64	15,73	0,17
Buffer TES	25	0,79	2,49	0,32
Periplasma	25	0,28	1,54	0,18

Xilanasa-(WP)2				
<b>Experimento 1</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	1,85	19,56	0,09
Buffer TES	25	0,22	2,41	0,09
Periplasma	25	0,09	1,76	0,05

<b>Experimento 2</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	1,02	17,67	0,06
Buffer TES	25	0,14	2,41	0,06
Periplasma	25	0,06	1,90	0,03

Xilanasa-(YP)2Y				
<b>Experimento 1</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	13,10	23,42	0,56
Buffer TES	25	1,35	2,31	0,58
Periplasma	25	0,34	2,51	0,14

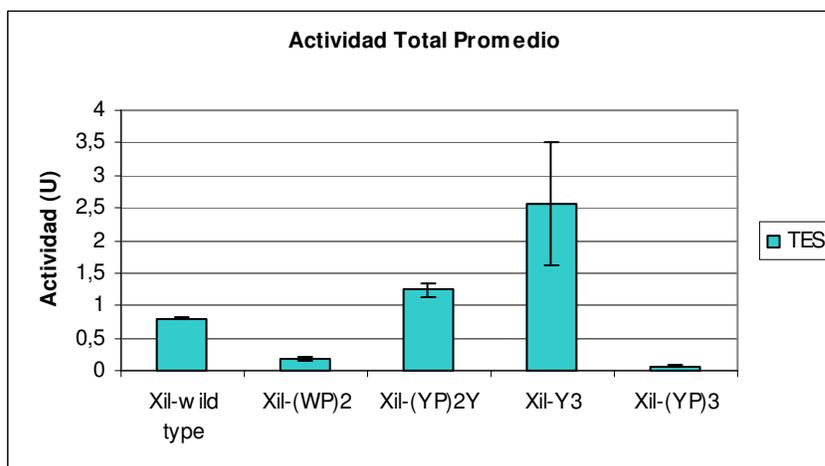
<b>Experimento 2</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	8,55	20,73	0,41
Buffer TES	25	1,13	2,27	0,49
Periplasma	25	0,34	2,60	0,13

Xilanasas-(Y)3				
<b>Experimento 1</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	12,93	12,38	1,04
Buffer TES	25	1,62	1,22	1,33
Periplasma	25	1,51	1,39	1,09

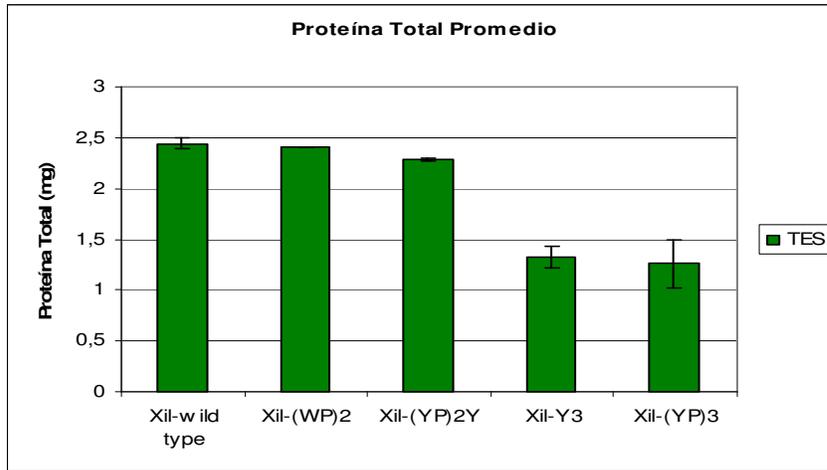
<b>Experimento 2</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	9,40	14,02	0,67
Buffer TES	25	3,50	1,43	2,45
Periplasma	25	4,93	0,69	7,14

Xilanasas-(YP)3				
<b>Experimento 1</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	2,42	14,15	0,17
Buffer TES	25	0,06	1,50	0,04
Periplasma	25	5,44	0,99	5,48

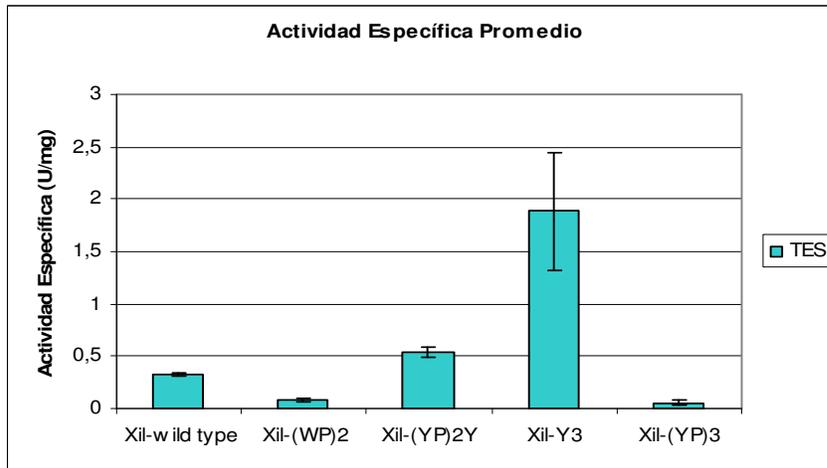
<b>Experimento 2</b>				
Fracción	Volumen (mL)	Actividad (U)	Proteína total (mg)	Actividad específica (U/mg)
Extracelular	250	2,32	10,59	0,22
Buffer TES	25	0,08	1,03	0,08
Periplasma	25	5,34	1,15	4,63



**Gráfico 13: "Actividad total en la fracción en Buffer TES de los cultivos"**



**Gráfico 14: "Proteína total en la fracción en Buffer TES de los cultivos"**



**Gráfico 15: "Actividad específica de la fracción en Buffer TES de los cultivos"**

## Anexo F: Cromatogramas con datos fuera de rango

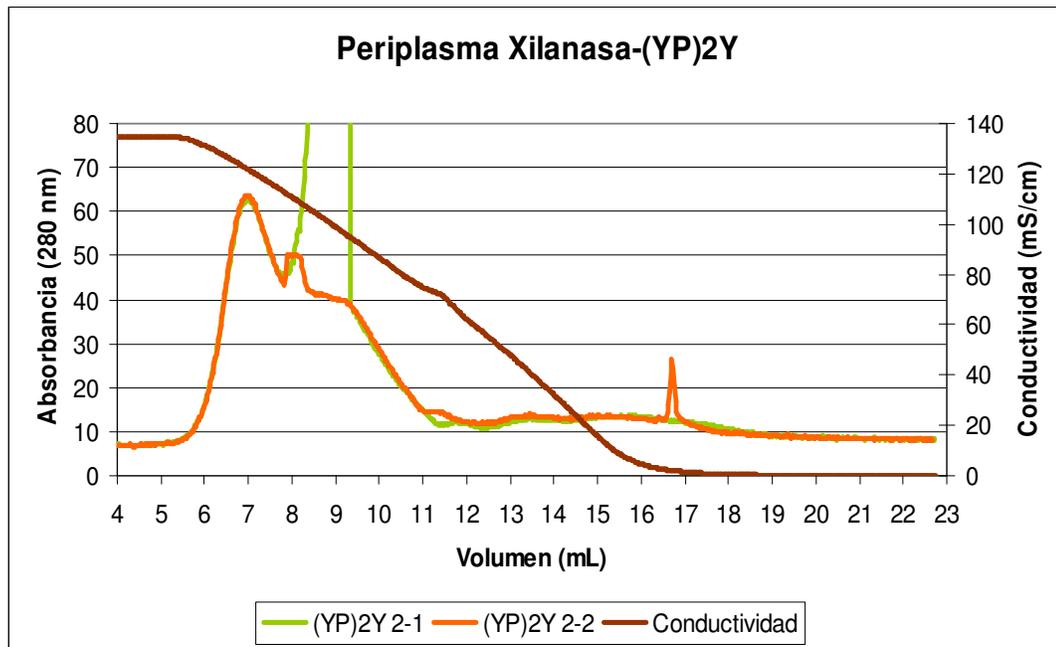


Gráfico 16: "Cromatograma cultivo 2 cepa xilanasa-(YP)2Y"

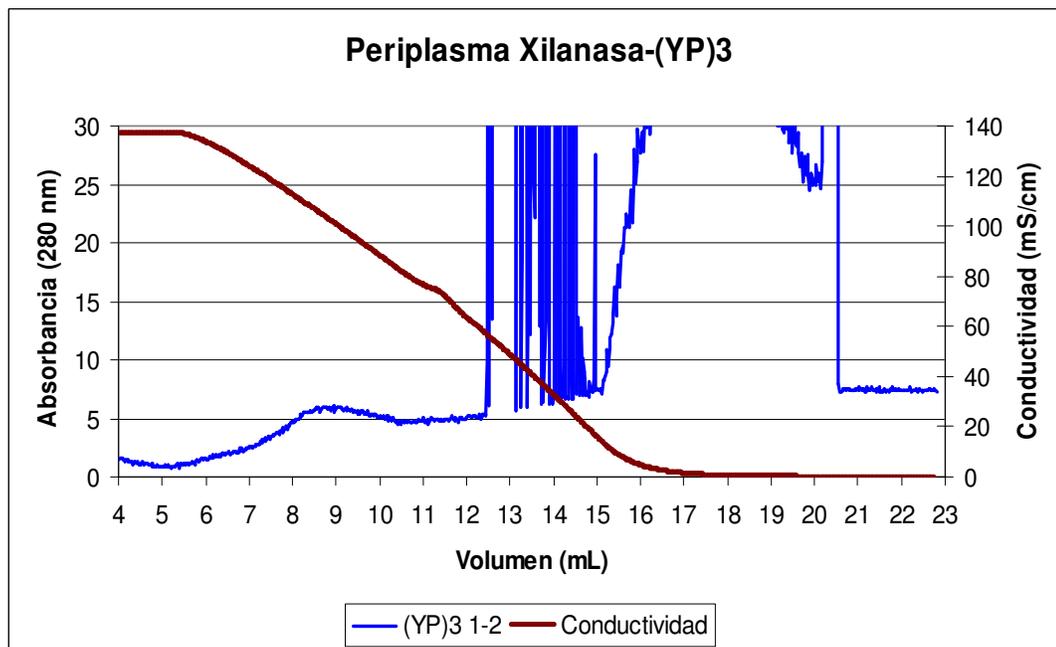
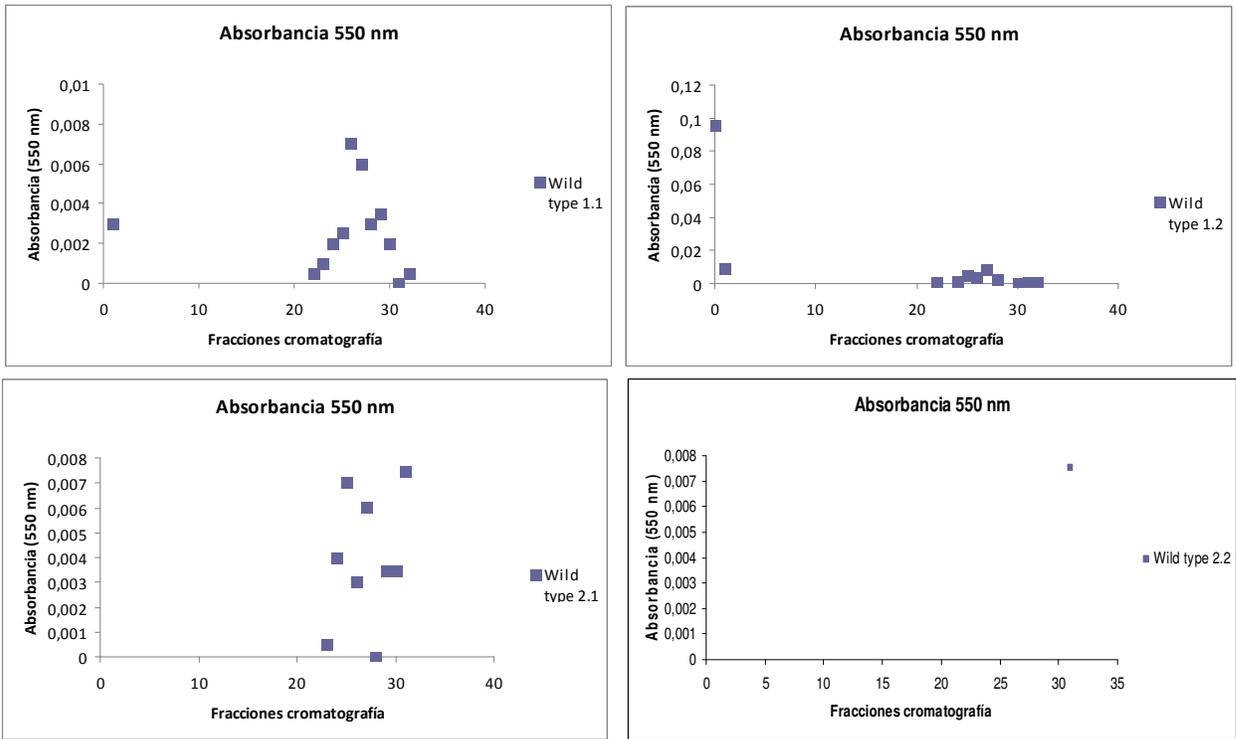
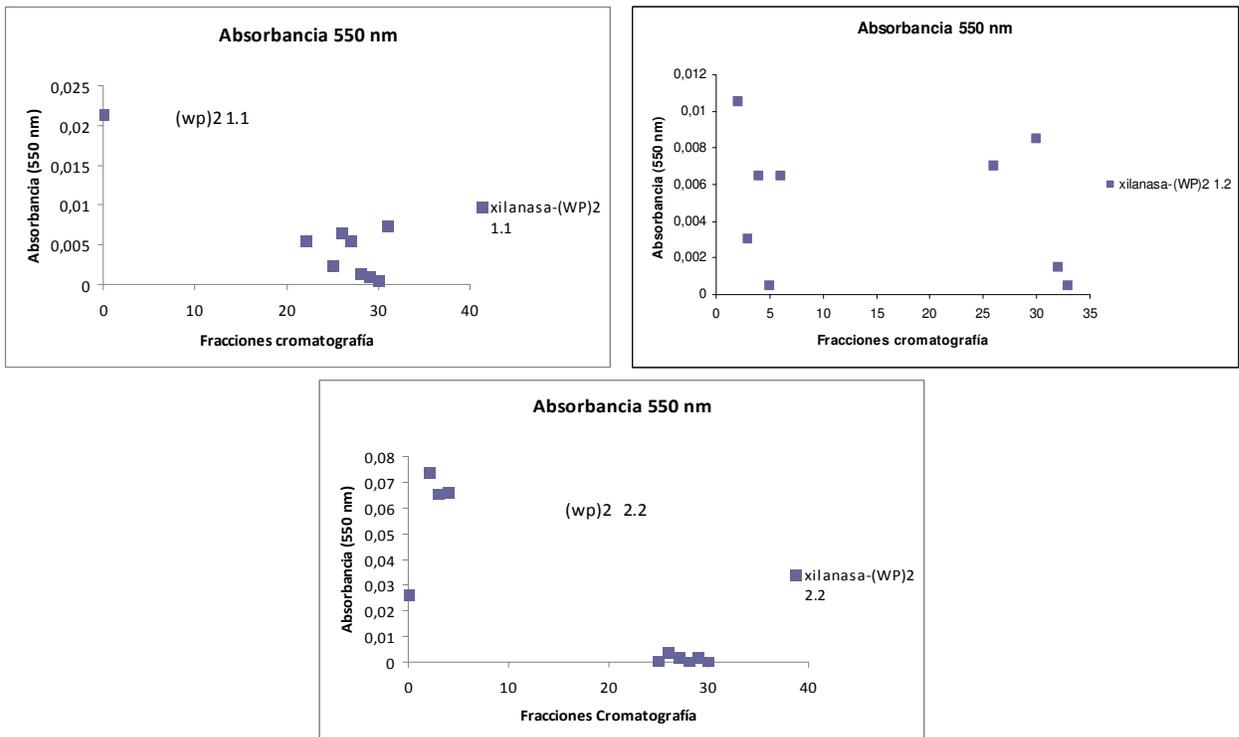


Gráfico 17: "Cromatograma duplicado cultivo 1 cepa xilanasa-(YP)3"

**Anexo G: Datos actividad en medio líquido fracciones cromatografía**



**Gráfico 18: "Datos Absorbancia azúcares reductores fracciones HIC de xilanas wild type cultivos 1 y 2"**



**Gráfico 19: " Datos Absorbancia azúcares reductores fracciones HIC de xilanas-(WP)2 cultivos 1 y 2"**

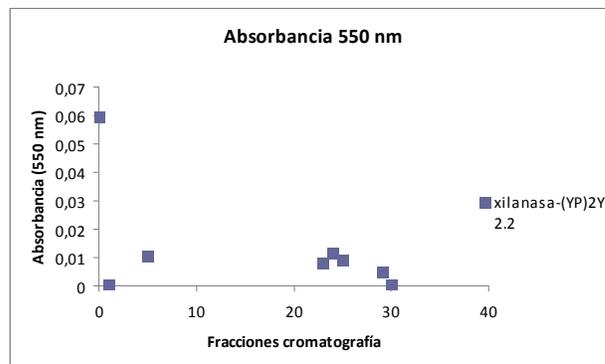
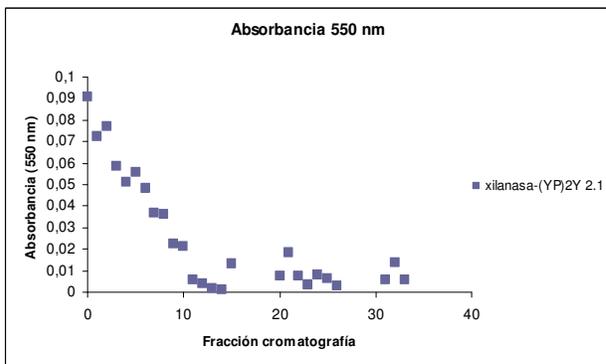
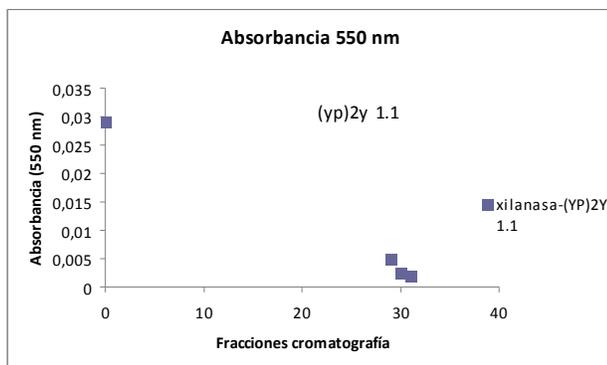


Gráfico 20: "Datos Absorbancia azúcares reductores fracciones HIC de xilanasa-(YP)2Y cultivos 1 y 2"

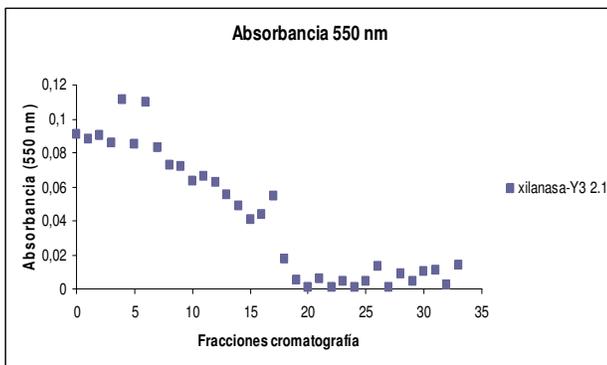
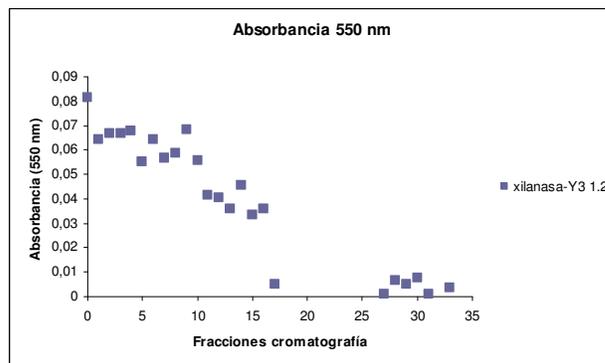
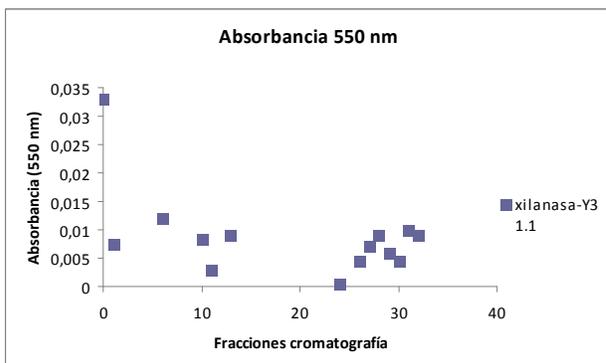
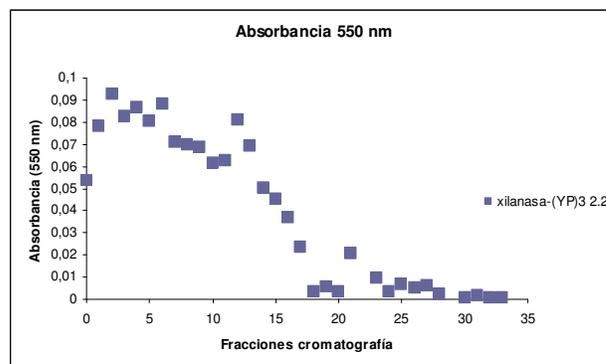
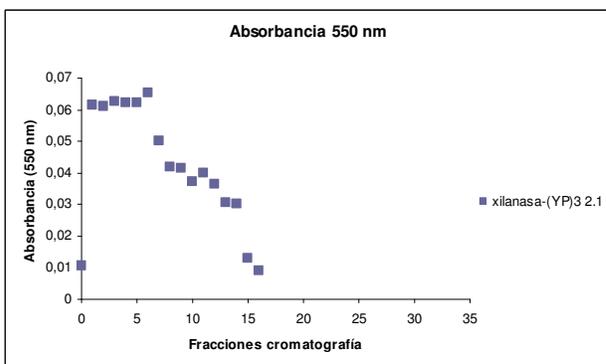
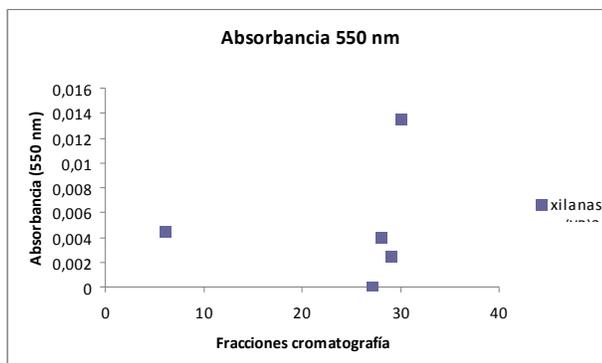


Gráfico 21: "Datos Absorbancia azúcares reductores fracciones HIC de xilanasa-Y3 cultivo 1 y 2"



**Gráfico 22: “Datos Absorbancia azúcares reductores fracciones HIC de xilanasa-(YP)3 cultivos 1 y 2”**

## Anexo H: Hidrofobicidad superficial teórica xilanasa nativa

Tabla 9: "Hidrofobicidad y áreas superficiales aminoácidos xilanasa nativa."

Aminoácido		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 $S_{tag aai}$
S	SER	1531,6	0,188	0,115	0,022	115
P	PRO	858,7	0,151	0,065	0,010	145
G	GLY	776,6	0,252	0,058	0,015	75
L	LEU	289,2	0,908	0,022	0,020	170
A	ALA	1085	0,391	0,082	0,032	115
D	ASP	1067,3	0,105	0,080	0,008	150
F	PHE	229,9	1	0,017	0,017	210
I	ILE	113,5	0,967	0,009	0,008	175
V	VAL	264,1	0,77	0,020	0,015	155
T	THR	733,7	0,253	0,055	0,014	140
R	ARG	1285,1	0,202	0,097	0,020	225
Q	GLN	1172,3	0,151	0,088	0,013	180
N	ASN	1929,8	0,125	0,145	0,018	160
E	GLU	509,7	0,115	0,038	0,004	190
M	MET	13,5	0,987	0,001	0,001	185
K	LYS	378,5	0	0,028	0,000	200
Y	TYR	671,5	0,484	0,050	0,024	230
W	TRP	235,5	0,775	0,018	0,014	255
H	HIS	139,7	0,354	0,011	0,004	195
C	CYS	19,1	0,819	0,001	0,001	135
<b>Área superficial total xilanasa nativa <math>S_p</math></b>		<b>13304,3</b>			<b>0,260</b>	

## Anexo I: Secuencias de las Xilanasas modificadas

### ○ Xilanasas-(WP)2

#### Secuencia Xilanasas-(WP)2

atgaaatacctgctgccgaccgctgctgctggtctgctgctcctcgctgcccag  
M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q  
ccggcgatggccatggcgtgcgggggaataataaagatacaccggtgcctgaa  
P A M A M A C G G N N K D T P V P E  
ccataccggaagtagtagcccctgatacaccagagcctgaagcgccaatagca  
P I P E V V A P D T P E P E A P I A  
gctgaaataacaaatggcgggtttgaagaagacacagcagggcaaacacacc  
A E I T N G G F E E D T A G Q T T P  
gtcggaaattgggtatattaggccaacacaagaatcaagcgcgacttctactata  
V G N W V F R P T Q E S S A T S T I  
gaagtaatagaatccgaagaaggcgtaataacttaccaggcacaanaagcagtt  
E V I E S E E G V N T Y Q G T K A V  
gaggttaacgtaatacactgggtgacaaccgctgggggtattgaaatagcttat  
E V N V N T L G D N P W G I E I A Y  
gaagaccttcctatcaccggtggtaaaaattatgagtttagcgtttgggcca  
E D L P I T G G K N Y E F S V W A K  
ggtgaagaggggaaccagtgccgatttttggattcaaacacctgcgccagattac  
G E E G T S A D F W I Q T P A P D Y  
ggtcaacttagtctagtaaaagaacactcacaggcgagtggaanaaataaca  
G Q L S L V K E T L T G E W Q K I T  
ttaacagccgcaacggccgaagctgactcttttagtaaggctggcaattcacttt  
L T A A T A E A D S L V R L A I H F  
tcaanaagagagaacattaacaagtctatatacctagacgaattttcaggcttt  
S K E E N I N K S I Y L D E F S G F  
attttagacgatgtaccagcacaagaaatacctgatgttcaatacagtgaa  
I L D D V P A Q E I P D V Q Y S E V  
acagcgcaaggtttaaagcattagcacctaattttaatattgggtgtggctgtg  
T A Q S L K A L A P N F N I G V A V  
ccagtggggtgggttttggg

P V G G F G - - - - -  
- - - - -  
- - - - -  
- - - - -

gtttggcactcgcaatttgcgccttggatgcaagt  
V W H S Q I A P W M Q S  
tttcaagggtgataaagccgcgtggataaccatgatggaaaatcacattactcaa  
F Q G D K A A W I T M M E N H I T Q  
gtggccactcattttgaagaagaaggcgataacgataccgctcgtagctgggat  
V A T H F E E E G D N D T V V S W D  
gtagttaacgaagcgtttatggaaaatggtaaataccggtggtaaaaaaccact  
V V N E A F M E N G K Y R G E K T T  
gacgacagcgccgacgaatctgtatggtttggaaaatagggagccgaattttta  
D D S A D E S V W F E N I G A E F L

ccattagcctataaagcagcaagagcggccgaccccgatgccgacttatactac  
P L A Y K A A R A A D P D A D L Y Y  
aatgattacaacctgatttggaatgccgataaattagatgctggtatagctatg  
N D Y N L I W N A D K L D A V I A M  
gttaacgattttcacaacaacggcgtgcctattgatggcataggttttcaatct  
V N D F H N N G V P I D G I G F Q S  
catatttcacttaacagccctgatatttcaaccattcaggcacatcttcaaaa  
H I S L N S P D I S T I Q A H L Q K  
gtggctgatattcgccctaaaattaaagtaaaaattaccgagctagatgttcgt  
V V D I R P K I K V K I T E L D V R  
atgaacaacgaaggcggcattcctctcacttacttaaccagtgaagagcggat  
M N N E G G I P L T Y L T S E R A D  
gaacaaaagcagtactactacgatattgtaaaacatacctagaaactgtacct  
E Q K Q Y Y Y D I V K T Y L E T V P  
gaagatcaacgcggtggcataactatttggggcgtaattgatgaggatagctgg  
E D Q R G G I T I W G V I D E D S W  
ttgcaaaactggccagagccgaaaacagaatggccgctggtattttttaatgac  
L Q N W P E P K T E W P L L F F N D  
ttactgcaaagcctgccttacaaggatttgctaatgcattatggccgtagccg  
F T A K P A L Q G F A N A L W P W P

**Xilanasa-(WP)2 alineada con la Xilanasa nativa**

Xil-wild MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
Xil-wp2 MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
Xil-wp2 GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
Xil-wp2 GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
\*\*\*\*\*

Xil-wild LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
Xil-wp2 LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
\*\*\*\*\*

Xil-wild ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD  
Xil-wp2 ALAPNFNIGVAVPVGFG-----  
\*\*\*\*\*.

Xil-wild SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
Xil-wp2 -----VWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
\*\*\*\*\*

Xil-wild NDTVVSVDVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
Xil-wp2 NDTVVSVDVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
\*\*\*\*\*

```

Xil-wild YYNDYNLIWNADKLDAMIAMVNDFFHNGVPIIDGIGFQSHISLNSPDIISTIQAHLQKVVDI
Xil-wp2  YYNDYNLIWNADKLDAMIAMVNDFFHNGVPIIDGIGFQSHISLNSPDIISTIQAHLQKVVDI
*****

Xil-wild RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLTSERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW
Xil-wp2  RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLTSERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW
*****

Xil-wild GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDFTAKPALQGFANAL
Xil-wp2  GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDFTAKPALQGFANALWPWP
*****

```

○ **Xilanasa-(YP)2Y**

**Secuencia Xilanasa-(YP)2Y**

```

ggcgaattgggcccgcgctcgcatgctcccggccgcat
G E L G P T S H A P G R H
ggcgccgcggaattcgattctttccatggcgtgcgggggaataataaagatacaccg
G G R G N S I L S M A C G G N N K D T P
gtgcctgaaccataccggaagtagtagccctgatacaccagagcctgaagcgccaata
V P E P I P E V V A P D T P E P E A P I
gcagctgaaataacaaatggcggtttgaagaagacacagcagggcaacaacaccgctc
A A E I T N G G F E E D T A G Q T T P V
ggaaattgggtatttaggccaacacaagaatcaagcgcgacttctactatagaagtaata
G N W V F R P T Q E S S A T S T I E V I
gaatccgaagaaggcggttaataacttaccagcacaagaagcagttgaggttaacgtaata
E S E E G V N T Y Q G T K A V E V N V N
aactgggtgacaaccgctggggtattgaaatagcttatgaagaccttcctatcaccggt
T L G D N P W G I E I A Y E D L P I T G
ggtaaaaattatgagtttagcgtttgggcaaaaggtgaagaggaaccagtgccgatttt
G K N Y E F S V W A K G E E G T S A D F
tggattcaaacacctgcccagattacgggtcaacttagtctagtaaaagaaactcaca
W I Q T P A P D Y G Q L S L V K E T L T
ggcgagtggcaaaaaataacattaacagccgcaacggccgaagctgactcttagtaagg
G E W Q K I T L T A A T A E A D S L V R
ctggcaattcacttttcaaagaagagaacattaacaagtctatatacctagacgaattt
L A I H F S K E E N I N K S I Y L D E F
tcaggctttatttttagacgatgtaccagcacaagaaatacctgatgttcaatacagtgaa
S G F I L D D V P A Q E I P D V Q Y S E
gtaacagcgcaaagttttaaagcatttagcacctaattttaatattgggtgtggctgtgcca
V T A Q S L K A L A P N F N I G V A V P
gcggtgtgttttggtaacagcgtaatagacagaccagagattaaaacgattattgaacaa
A G G F G N S V I D R P E I K T I I E Q
cactttaatcagctctctgctgaaaatattatgaagcctacctatttacaaccaactcaa
H F N Q L S A E N I M K P T Y L Q P T Q
ggtgaatttttttacgatgattctgatgagctagtt
G E F F Y D D S D E L V - - - -
gacaactcactcacggtacatgggtcatgtttttggttggcactcgcaaattgcgcccttgg
D N S L T V H G H V F V W H S Q I A P W

```

atgcaaagttttcaaggtgataaagccgcgtggataacatgatggaaaatcacattact  
M Q S F Q G D K A A W I T M M E N H I T  
caagtggccactcattttgaagaagaaggcgataacgataccgtcgtagctgggatgta  
Q V A T H F E E E G D N D T V V S W D V  
gttaacgaagcgtttatggaaaatggtaaataccgtggtgaaaaaccactgacgacagc  
V N E A F M E N G K Y R G E K T T D D S  
gccgacgaatctgtatggtttgaaaatataggagccgaatttttaccattagcctataaa  
A D E S V W F E N I G A E F L P L A Y K  
gcagcaagagcggccgaccccgatgccgacttataactacaatgattacaacctgatttgg  
A A R A A D P D A D L Y Y N D Y N L I W  
aatgccgataaattagatgctgttatagctatggttaacgattttcacaacaacggcgtg  
N A D K L D A V I A M V N D F H N N G V  
cctattgatggcataggttttcaatctcatatttcacttaacagccctgatatttcaacc  
P I D G I G F Q S H I S L N S P D I S T  
attcaggcacatcttcaaaaagtggtcgatattcgccctaaaattaaagtaaaaattacc  
I Q A H L Q K V V D I R P K I K V K I T  
gagctagatgttcgtatgaacaacgaaggcggcattcctctcacttacttaaccagtga  
E L D V R M N N E G G I P L T Y L T S E  
agagcggatgaacaaaagcagtactactacgatattgttaaacatacctagaaactgta  
R A D E Q K Q Y Y Y D I V K T Y L E T V  
cctgaagatcaacgcggtggcataactatggggcgtaattgacgaggatagctggttg  
P E D Q R G G I T I W G V I D E D S W L  
caaaactggccagagccgaaaacagaatggccgctgttatttttaatgactttactgca  
Q N W P E P K T E W P L L F F N D F T A  
aagcctgccttacaaggattttgctaatgcattatccgatatccgatat  
K P A L Q G F A N A L Y P Y P Y

**Xilanasa-(YP)2Y alineada con Xilanasa nativa**

Xil-wild MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
Xil-yp2y -GELGPTSHAPGRHGGRGNSILSACGGNNDTPVPEPIPEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
\* \*\*: \* . :: \*\*\*\*\*

Xil-wild GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
Xil-yp2y GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
Xil-yp2y GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
\*\*\*\*\*

Xil-wild LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
Xil-yp2y LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
\*\*\*\*\*

Xil-wild ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD  
Xil-yp2y ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD  
\*\*\*\*\*

Xil-wild SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWQMFSFGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
Xil-yp2y SDELV----DNSLTVHGHVFWHSQIAPWQMFSFGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
\*\*\*\*\*

Xil-wild NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
Xil-yp2y NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
\*\*\*\*\*

Xil-wild YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQAHLQKVVDI  
Xil-yp2y YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQAHLQKVVDI  
\*\*\*\*\*

Xil-wild RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW  
Xil-yp2y RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPL LFFNDFTAKPALQGFANAL  
Xil-yp2y GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPL LFFNDFTAKPALQGFANAL YPYPY  
\*\*\*\*\*

○ **Xilanasa-Y3**

**Secuencia Xilanasa-Y3**

ggcgaattgggcccgcacgtcgcacatgctccccggccgcat  
G E L G P T S H A P G R H  
ggcgccgcgggaattcgattctttccatggcgtgcggggggaataataaagatacaccg  
G G R G N S I L S M A C G G N N K D T P  
gtgcctgaaccataccggaagtagtagccctgatacaccagagcctgaagcgccaata  
V P E P I P E V V A P D T P E P E A P I  
gcagctgaaataacaaatggcggggttgaagaagacacagcagggcaaacacaccgctc  
A A E I T N G G F E E D T A G Q T T P V  
ggaaattgggtatttaggccaacacaagaatcaagcgcgacttctactatagaagtaata  
G N W V F R P T Q E S S A T S T I E V I  
gaatccgaagaaggcgtaataacttaccagcacaagaagcagttgaggttaacgttaat  
E S E E G V N T Y Q G T K A V E V N V N  
aactgggtgacaaccgctggggtattgaaatagcttatgaagaccttcctatcaccggt  
T L G D N P W G I E I A Y E D L P I T G  
ggtaaaaattatgagtttagcgtttgggcaaagggtgaagaggggaaccagtgccgatttt  
G K N Y E F S V W A K G E E G T S A D F  
tggattcaaacacctgcgccagattacgggtcaacttagtctagtaaaagaaactcaca  
W I Q T P A P D Y G Q L S L V K E T L T  
ggcgagtggcagaaaataacattaacagccgcaacggccgaagctgactctttagtaagg  
G E W Q K I T L T A A T A E A D S L V R  
ctggcaattcacttttcaaagaagagaaacattaacaagtctatatacctagacgaattt  
L A I H F S K E E N I N K S I Y L D E F  
tcaggctttattttaggcgatgtaccagcacaagaaatacctgatgttcaatacagtgaa  
S G F I L G D V P A Q E I P D V Q Y S E  
gtaacagcgcaaagtttaaagcatttagcacctaattttaatattgggtgtggctgtgcca  
V T A Q S L K A L A P N F N I G V A V P  
gcgggtgggttttgtaacagcgtaatagacagaccagagattaaaacgattattgaacaa  
A G G F G N S V I D R P E I K T I I E Q

cactttaatcagctctctgctgaaatatta  
H F N Q L S A E I L - - - - -  
- - - - -  
- - - - -  
gcttggatgcaaagttttcaaggtgataaagccgcgtggataacccatgatggaaaatcac  
A W M Q S F Q G D K A A W I T M M E N H  
attactcaagtgccactcattttgaagaagaaggcgataacgataccgctcgtttagctgg  
I T Q V A T H F E E E G D N D T V V S W  
gatgtagttaacgaagcgtttatggaaaatggtaaataccggtggtaaaaaaccactgac  
D V V N E A F M E N G K Y R G E K T T D  
gacagcgccgacgaatctgtatggtttgaaaatataggggcccgaatttttaccattagcc  
D S A D E S V W F E N I G A E F L P L A  
tataaagcagcaagagcggccgaccccgatgccgacttataactacaatgattacaacctg  
Y K A A R A A D P D A D L Y Y N D Y N L  
atgtggaatgccgataaattagatgctggttatagctatggtaaacgattttcacaacaac  
I W N A D K L D A V I A M V N D F H N N  
ggcgtgcctattgatggcataggttttcaatctcatatttcacttaacagccctgatatt  
G V P I D G I G F Q S H I S L N S P D I  
tcaaccattcaggcacatcttcaaaaagtggctgatattcgccctaaaattaaagtaaaa  
S T I Q A H L Q K V V D I R P K I K V K  
attaccgagctagatggtcgtatgaacaacgaaggcggcattcctctcacttacttaacc  
I T E L D V R M N N E G G I P L T Y L T  
agtgaagagcggatgaacaaaagcagtactactacgatattgttaaacatacctagaa  
S E R A D E Q K Q Y Y Y D I V K T Y L E  
actgtacctgaagatcaacgcggtggcataactatttggggcgtaattgacgaggatagc  
T V P E D Q R G G I T I W G V I D E D S  
tggttgcaaaactggccagagccgaaaacagaatggccgctggtattttttaatgacttt  
W L Q N W P E P K T E W P L L F F N D F  
actgcaaagcctgccttacaaggatttgctaatgcattatattattat  
T A K P A L Q G F A N A L Y Y Y

**Secuencia Xilanas-Y3 alineada con Xilanas nativa**

Xil-wild MKYLLPTAAAGLLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
Xil-y3 GELGPTSHAPGRHGGRGNSILSMACGGNNKDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG  
: .. \*.\* ... :\*\*\*\*\*

Xil-wild GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
Xil-y3 GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
Xil-y3 GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFWIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT  
\*\*\*\*\*

Xil-wild LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
Xil-y3 LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILGDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK  
\*\*\*\*\*.

Xil-wild ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD  
Xil-y3 ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAEIL-----  
\*\*\*\*\* :

Xil-wild SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
Xil-y3 -----WMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD  
\*\*\*\*\*

Xil-wild NDTVVSWDVNVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADES SVWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
Xil-y3 NDTVVSWDVNVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADES SVWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL  
\*\*\*\*\*

Xil-wild YYNDYNLIWNADKLDAMIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQAHLQKVVDI  
Xil-y3 YYNDYNLIWNADKLDAMIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQAHLQKVVDI  
\*\*\*\*\*

Xil-wild RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQ RGGITIW  
Xil-y3 RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQ RGGITIW  
\*\*\*\*\*

Xil-wild GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDFTAKPALQGFANAL  
Xil-y3 GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDFTAKPALQGFANAL **YYY**  
\*\*\*\*\*

○ **Xilanasa-(YP)3**

**Secuencia Xilanasa-(YP)3**

ggcgaattgggcccgcgctcgcatgctcccggccgcat  
G E L G P T S H A P G R H  
ggcggccgcggaattcgattctttccatggcgtgcgggggaataataaagatacaccg  
G G R G N S I L S M A C G G N N K D T P  
gtgcctgaaccataccggaagtagtagcccctgatacaccagagcctgaagcgccaata  
V P E P I P E V V A P D T P E P E A P I  
gcagctgaaataacaaatggcgggtttgaagaagacacagcagggcaaacacccgctc  
A A E I T N G G F E E D T A G Q T T P V  
ggaaattgggtatttaggccaacgcaagaatcaagcgcgacttctactatagaagtaata  
G N W V F R P T Q E S S A T S T I E V I  
gaatccgaagaaggcggttaataacttaccagcacaagcaggttgaggttaacgtaata  
E S E E G V N T Y Q G T K A V E V N V N  
aactgggtgacaaccgctggggtattgaaatagcttatgaagaccttccatcaccggt  
T L G D N P W G I E I A Y E D L P I T G  
ggtaaaaattatgagtttagcgtttgggcaaaagggtgaagaggggaaccagtgccgatttt  
G K N Y E F S V W A K G E E G T S A D F  
tggattcaaacacctgcccagattacggtcaacttagtctagtaaaagaaactcaca  
W I Q T P A P D Y G Q L S L V K E T L T  
ggcgagtggcaaaaaataacattaacagccgcaacggccgaagctgactcttagtaagg  
G E W Q K I T L T A A T A E A D S L V R  
ctggcaattcacttttcaaagaagagaacattaacaagtctatatacctagacgaattt  
L A I H F S K E E N I N K S I Y L D E F  
tcaggctttatttttagacgatgtaccagcacaagaaatacctgatgttcaatacagtgaa  
S G F I L D D V P A Q E I P D V Q Y S E  
gtaacagcgcgaaagtttaaagcatttagcacctaattttaatattgggtgtggctgtgcca  
V T A Q S L K A L A P N F N I G V A V P

gcggggtggttttggtaacagcgtaatagacagaccagagattaaaacgattattggacaa  
 A G G F G N S V I D R P E I K T I I G Q  
 cactttaatcagctctctgctgaaaatattatgaagcctacctatttacaaccaactcaa  
 H F N Q L S A E N I M K P T Y L Q P T Q  
 ggtgaatttttttacgatgattctgatgagctagtt  
 G E F F Y D D S D E L V - - - - - - - -  
 - -

catggatcatggttttggcactcgcaaattgcgcccttggatg  
 H G H V F V W H S Q I A P W M  
 caaagttttcaaggtgataaagccgctggataaccatgatggaaaatcacattactcaa  
 Q S F Q G D K A A W I T M M E N H I T Q  
 gtggccactcattttgaagaaggagcgataacgataccgtcgtagctgggatgtagtt  
 V A T H F E E G G D N D T V V S W D V V  
 aacgaagcgtttatggaaaatggtaaataccgtggtaaaaaaccactgacgacagcgcc  
 N E A F M E N G K Y R G E K T T D D S A  
 gacgaatctgtatggtttgaaaatataggagccgaatttttaccattagcctataaagca  
 D E S V W F E N I G A E F L P L A Y K A  
 gcaagagcggccgaccccgatgccgacttatactacaatgattacaacctgatttggat  
 A R A A D P D A D L Y Y N D Y N L I W N  
 gccgataaattagatgctgttatagctatggttaacgattttcacaacaacggcgtgcct  
 A D K L D A V I A M V N D F H N N G V P  
 attgatggcataggttttcaatctcatatttcacttaacagccctgatatttcaaccatt  
 I D G I G F Q S H I S L N S P D I S T I  
 caggcacatcttcaaaaagtggtcgatattcgccctaaaattaaagtaaaaattaccgag  
 Q A H L Q K V V D I R P K I K V K I T E  
 ctagatgttcgtatgaacaacgaaggcggcattcctctcacttacttaaccagtgaaga  
 L D V R M N N E G G I P L T Y L T S E R  
 gcggatgaacaaaagcagtactactacgatattgttaaaacatacctagaaactgtacct  
 A D E Q K Q Y Y Y D I V K T Y L E T V P  
 gaagatcaacgcggtggcataactatttggggcgtaattgacgaggatagctggttgcaa  
 E D Q R G G I T I W G V I D E D S W L Q  
 aactggccagagccgaaaacagaatggccgctgttatttttaatgactttactgcaag  
 N W P E P K T E W P L L F F N D F T A K  
 cctgccttacaaggatttgcataatgcattatccgatatccgatatccg  
 P A L Q G F A N A L Y P Y P Y P

**Xilanasa-(YP)3 alineada con Xilanasa nativa**

Xil-wild	MKYLPTAAAGLLLLAAQPAMAMACGGNNKDTPVPEPILEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG
Xil-yp3	GELGPTSHAPGRHGGRGNSILSMACGGNNKDTPVPEPIPEVVPDTPPEPEAPIAAEITNG
	:    .: *. *            .: :*****
Xil-wild	GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW
Xil-yp3	GFEEDTAGQTPVGNWVFRPTQESSATSTIEVIESEEGVNTYQGTKAVEVNVNTLGDNPW
	*****
Xil-wild	GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFVIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT
Xil-yp3	GIEIAYEDLPITGGKNYEFVWAKGEEGTSADFVIQTPAPDYGQLSLVKETLTGEWQKIT
	*****

```

Xil-wild  LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK
Xil-yp3   LTAATAEADSLVRLAIHFSKEENINKSIYLDEFSGFILDDVPAQEIPDVQYSEVTAQSLK
*****

Xil-wild  ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD
Xil-yp3   ALAPNFNIGVAVPAGGFGNSVIDRPEIKTIIIEQHFNQLSAENIMKPTYLQPTQGEFFYDD
*****

Xil-wild  SDELVNYAKDNSLTVHGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD
Xil-yp3   SDELV-----HGHVFWHSQIAPWMQSFQGDKAAWITMMENHITQVATHFEEEGD
*****

Xil-wild  NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL
Xil-yp3   NDTVVSWDVVNEAFMENGKYRGEKTTDDSADESVMWFENIGAEFLPLAYKAARAADPDADL
*****

Xil-wild  YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQ AHLQKVVDI
Xil-yp3   YYNDYNLIWNADKLDAVIAMVNDFHNNGVPIDGIGFQSHISLNSPDI STIQ AHLQKVVDI
*****

Xil-wild  RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW
Xil-yp3   RPKIKVKITELDVRMNEGGIPLTYLT SERADEQKQYYYDIVKTYLETVPEDQRGGITIW
*****

Xil-wild  GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDF TAKPALQGFANAL
Xil-yp3   GVIDEDSWLQNWPEPKTEWPLLLFFNDF TAKPALQGFANAL YPYPYP
*****

```