



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

**EFFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS HIDROFÓBICOS EN  
LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN POR HIC DE CUTINASAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO CIVILQUÍMICO E  
INGENIERO CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA**

**MARÍA DEL CARMEN ROBINSON ROBINSON**

**PROFESORA GUÍA**  
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN**  
ORIANA SALAZAR AGUIRRE  
JOSE CRISTIAN SALGADO HERRERA

SANTIAGO DE CHILE  
OCTUBRE 2008

## RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar el efecto de la adición de un extremo polipeptídico hidrofóbico a una enzima, en particular una cutinasa, en la producción, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC).

Para realizar este estudio, se escogieron 3 combinaciones de los aminoácidos tirosina (Y), triptófano (W) y prolina (P), y se realizaron mutaciones en la enzima, mediante la técnica de “*Polymerase Chain Reaction*” (PCR). Se obtuvieron satisfactoriamente las mutantes Cutinasa-WPWP y Cutinasa-YYY, y en el caso de la combinación YPYPYP se obtuvo una secuencia más larga en 32 aminoácidos que la diseñada, denominada YPY\*.

Como resultado se obtuvo que dichos extremos aumentaron la hidrofobicidad superficial global teórica de la proteína en un 12,4% en el caso de la Cutinasa-YYY, en un 16,6% en el caso de la Cutinasa-WPWP y en el caso de una correcta construcción de la Cutinasa-YPYPYP, se hubiera incrementado en un 14,1%. En el caso de la Cutinasa-YPY\* se estima que la hidrofobicidad superficial teórica es mayor a este último valor, aunque no pudo ser calculado, debido a que no fue posible aplicar los supuestos que permitían determinarla.

Las cepas recombinantes de *E. coli* que expresan estas proteínas se crecieron e indujeron bajo condiciones definidas, y se les extrajo desde la región periplasmática de la célula, obteniéndose una gran variabilidad (> 50 % en algunos casos) en los resultados en cuanto a actividad y proteína total presentes en las muestras.

En el caso de la cutinasa mutada con la secuencia YYY se observó una disminución drástica de la concentración de proteína, en comparación con la cepa nativa, al igual que escasa actividad cutinasa. Esto tendría relación con la ausencia de prolina en el extremo adicionado, ya que este aminoácido, más que otorgar hidrofobicidad a la secuencia, le otorgaría estabilidad, debido a que permite la total exposición del extremo al medio y evita que interactúe con otras regiones de la proteína. Se descartó esta mutante durante el proceso de purificación, debido a la casi nula recuperación de proteína.

Las muestras periplasmáticas de la cepa nativa y las 2 modificadas fueron purificadas por HIC utilizando como matriz Butil Sefarosa. Se calcularon los tiempos de retención adimensional (DRT) y se estimó la pureza de las fracciones donde eluyó la proteína, en cada caso.

Mientras que la pureza de las fracciones colectadas no varió significativamente de una cepa recombinante a otra, los DRT presentaron un aumento porcentual promedio, respecto a la cutinasa nativa, de un 1,25% para la Cutinasa-WPWP y de un 4,18% para la Cutinasa-YPY\*.

Finalmente, es posible concluir que el aumento de la hidrofobicidad superficial de la proteína, debida a la adición de la secuencia hidrofóbica WPWP, permite elevar levemente el DRT de la enzima mutada, y al parecer, la combinación de aminoácidos hidrofóbicos aromáticos, sin la presencia de prolina en ella (secuencia YYY), produciría una disminución drástica en la expresión de la proteína.

A mi madre...  
la luz que guía mi vida...

## **AGRADECIMIENTOS**

Al finalizar esta etapa de mi vida, agradezco infinitamente a mi madre, Rosa, por su esfuerzo y tenacidad, por su amor y entrega y por ser mi ejemplo de mujer y madre a seguir. Te amo con todo mi corazón. A mi melliza Macarena y a mi sobrinito Bruno por ser las chispitas de energía y amor que me alegran la vida. Los amo.

Gracias a Pedro Veas, por ser mi compañero al final de este camino, por su gran amor y comprensión. A Marjorie y José por ser grandes amigos y por ayudarme en los primeros años de estudio.

Agradezco a aquellos que un día encontré en la universidad y que ahora son mis amigos de siempre, gracias Iris, Evelyn, Claudia, Pame, Edu, Pedro y Manuel por acompañarme en este camino. A todos mis amigos de Acción Social de Ingeniería, en especial a JP, Marce y Ricardo, por un día mostrarme la realidad de Chile y “reventar” la burbuja en la que vivía, gracias a ustedes por hacerme una mejor persona y más humana.

Agradezco, también, a mis amigos y compañeros del DIQBT por estos años de compartir clases, trabajos, penas, alegrías y sacrificios. En especial a Claudia Quilodrán por ser mi partner de siempre, por su paciencia y dedicación.

Agradezco inmensamente a mi profesora guía, Dra. María Elena Lienqueo, por su preocupación, gran disposición, ayuda y ánimo en el desarrollo de mi trabajo. También agradezco a mi profesora co-guía, Dra. Oriana Salazar, por su apoyo, colaboración y sus comentarios constructivos, asertivos y optimistas.

Dar gracias al Dr. Juan Asenjo y a las grandes personas y docentes que conocí en el CIByB. A Nancy por su buena disposición y ayuda.

Finalmente, agradezco al Instituto Milenio de Dinámica Celular y Biotecnología (ICDB) y al proyecto Fondecyt 1080143, por hacer posible el desarrollo de este trabajo.

# ÍNDICE DEL CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	<b>ii</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>iv</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>v</b>
<b>ÍNDICE DEL CONTENIDO</b>	<b>vi</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Descripción del proyecto y justificación	1
1.2 Enzimas hidrolíticas: cutinasas	2
1.2.1 Estructura de la cutinasa	3
1.2.2 Función de la cutinasa	4
1.2.3 Aplicaciones biocatalíticas de la cutinasa	4
1.3 Características de los aminoácidos	4
1.4 Interacciones hidrofóbicas	6
1.5 Técnicas de purificación de proteínas	6
1.5.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica	7
1.6 Predicción de los tiempos de retención en HIC	9
1.7 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos	10
1.8 Limitaciones del uso de las colas hidrofóbicas	11
1.9 Objetivos	13
1.9.1 Objetivo general	13
1.9.2 Objetivos específicos	13
<b>2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>14</b>
2.1 Materiales	14
2.1.1 Cepas bacterianas electrocompetentes	14
2.1.2 Reactivos	14
2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión	14
2.1.4 Medios de cultivos líquidos y sólidos	15
2.1.5 Soluciones stock	15
2.1.6 Síntesis de oligonucleótidos	15
2.1.7 Software	15
2.2 Métodos	16
2.2.1 Diseño de oligonucleótidos	16
2.2.2 Purificación de DNA plasmidial	18
2.2.3 Síntesis del gen de cutinasa modificado	18
2.2.4 Ligación de fragmento de DNA en vectores de clonamiento y expresión	18

2.2.4.1	Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy	18
2.2.4.2	Ligación en el vector de expresión pET11a	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)	22
2.2.10	Purificación de DNA a partir de geles de agarosa	23
2.2.11	Inducción de la Síntesis de proteínas recombinantes.	23
2.2.12	Extracción de cutinasa desde la fracción periplasmática	24
2.2.13	Extracción de cutinasa desde la fracción soluble	25
2.2.14	Extracción de cutinasa de la fracción insoluble	25
2.2.15	Caracterización	25
2.2.15.1	Ensayo de actividad cutinasa	25
2.2.15.2	Determinación de la concentración de proteína	26
2.2.15.3	Estimación de la pureza de las muestras	27
2.2.16	Cromatografía de interacción hidrofóbica	27
<b>3</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>29</b>
3.1	Condiciones de Crecimiento e Inducción de la Cepa Nativa	29
3.2	Adición de extremos polipeptídicos a cutinasa	31
3.2.1	Generación del gen de cutinasa modificada	31
3.2.2	Clonamiento del gen modificado en el vector de clonamiento pGEM-T-easy	31
3.2.3	Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pET11a	33
3.3	Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos	34
3.4	Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica	34
3.5	Producción de enzimas modificadas	35
3.6	Purificación de las fracciones periplasmáticas	40
3.7	Estimación del tiempo de retención adimensional (DRT)	46
3.8	Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT	48
<b>4</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>49</b>
<b>5</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>52</b>
5.1	Referencias	52

<b>ANEXOS</b>	<b>56</b>
Anexo A: Aminoácidos	56
Anexo B: Medios de cultivo líquidos y sólidos.	58
Anexo C: Curva de calibración SigmaScan Pro 5.0	59
Anexo D: Hidrofobicidad superficial	60
Anexo E: Tablas de datos obtenidos	61
Anexo F: Gráficos de las fracciones restantes obtenidas	65
Anexo G: Fotografías de geles SDS	69
Anexo H: Tablas de datos fracciones colectadas en la HIC a Periplasma 4	71
Anexo I: Estimación de los DRT para Periplasma 2 y 3.	72

# 1 INTRODUCCIÓN

Los procesos de producción de proteínas involucran etapas de fermentación, recuperación y purificación. El proceso de recuperación de proteínas varía dependiendo de la localización del producto, ya sea intracelular o extracelular (Belter *et al*, 1988).

Una opción para lograr los niveles de proteínas requeridos en dichos procesos, es producirlas artificialmente utilizando procesos biotecnológicos, que permiten que sus genes sean insertados en bacterias y/o levaduras para ser producidas. Los niveles de pureza logrados de cada proteína son muy variables, llegando a ser bastante altos, en el caso de su utilización en la fabricación de productos con fines terapéuticos (99,9%) como también pueden ser de un nivel inferior de pureza, como ocurre en el caso de insumos industriales (> 40%)

Para lograr altos niveles de pureza, es necesario realizar varias etapas de purificación. Dentro de las más utilizadas se encuentran los distintos tipos de cromatografías, debido a que poseen una alta eficiencia y alta resolución.

El presente tema de memoria se orienta a estudiar el efecto de la adición de un extremo polipeptídico hidrofóbico a una proteína en el proceso de purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica.

## 1.1 Descripción del proyecto y justificación

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

En la purificación de proteínas a nivel industrial es ampliamente utilizada la técnica de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC). Esta técnica se basa en la fuerza de interacción hidrofóbica de cada proteína con el ligando de la matriz, la que depende principalmente de la

hidrofobicidad superficial de la proteína. El tiempo de retención de las proteínas en la matriz de la columna aumenta proporcionalmente con la hidrofobicidad superficial de la proteína.

Se tiene como hipótesis que es posible mejorar los procesos de purificación de proteínas en HIC mediante la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a la proteína de interés. La presencia de estos extremos aumentaría su hidrofobicidad superficial global, permitiendo con ello aumentar el tiempo de retención hasta generar una elución diferenciada de la proteína de interés respecto a las proteínas contaminantes.

Existe una amplia aplicación de proteínas modificadas por adición de extremos polipeptídicos que se han realizado hasta el momento, teniendo por objetivo mejorar la purificación, aumentar la expresión, mejorar la detección, aumentar la secreción y aumentar la solubilidad de proteínas (Stevens, 2000). Por esta razón se busca aplicar esta tecnología al área industrial y con ello aumentar la producción y optimizar procesos actualmente aplicados.

Se proponen distintas combinaciones de aminoácidos hidrofóbicos para la construcción de los extremos polipeptídicos a adicionar a la enzima cutinasa, y en base a eso, esta memoria se orienta a evaluar que combinación proporcionaría mejoras en la purificación por HIC, estudiando también los posibles efectos sobre la expresión, recuperación y actividad de dicha enzima modificada.

## **1.2 Enzimas hidrolíticas: cutinasas**

Las cutinasas son las enzimas hidrolíticas que degradan la cutina, polímero cuticular de plantas más altas, el cual es un poliéster compuesto de hidroxi y epoxi ácidos grasos (Purdy y Kolattukudy, 1975). Los ácidos grasos de la cutina son generalmente cadenas de 16 o 18 átomos de carbono y contienen de uno a tres grupos hidroxilo. Los enlaces éster predominan en las cutinas, aunque también presentan puentes de peróxido y uniones éter.

La producción de la cutinasa parece ser regulada altamente por las condiciones de crecimiento. Es reprimida por la glucosa e inducida por la cutina hidrolizada o sus principales constituyentes tales como el ácido 16-hidroxihexadecanoico, el ácido 10,16-

dihidroxihexadecanoico y el ácido 9,10,18-trihidroxipalmitico (Dantzig *et al.*, 1986; Murphy *et al.*, 1996).

La cutina desempeña un papel clave en la protección contra la entrada de patógenos en las plantas, y su degradación enzimática ha demostrado ser uno de los primeros pasos en el proceso de infección.

### 1.2.1 Estructura de la cutinasa

La estructura tridimensional de la cutinasa de *Fusarium solani f. pisi* clonada y expresada en *E. coli* fue resuelta a una resolución de 1,6 Å (Martínez *et al.*, 1992) y posteriormente fue extendida a 1,0 Å (Longhi *et al.*, 1997b, Jelsch *et al.*, 1998). Se encuentra registrada en las bases de datos del Protein Data Bank (pdb) bajo el código 1CEX. La Figura 1 muestra dicha estructura tridimensional que puede ser visualizada con el programa Swiss PDB View.

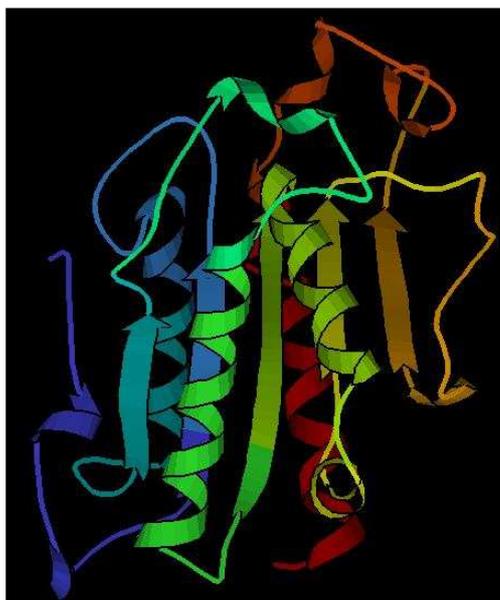


Figura 1: “Estructura Tridimensional de la cutinasa de *Fusarium solani pisi*”.

La cutinasa de *Fusarium solani f. pisi* es una proteína de 235 residuos en una molécula compacta de un dominio y de  $45 \times 30 \times 30 \text{ \AA}^3$  de tamaño. Tiene un peso molecular de alrededor de 24 kDa, con tramos altamente conservados, que incluyen cuatro cisteínas invariables, formando dos puentes disulfuro. Además tiene un punto isoeléctrico de 7.6 (Egmond *et al.*, 1996; Petersen *et al.*, 1997).

## **1.2.2 Función de la cutinasa**

La definición de la estructura de la cutinasa de *Fusarium solani f. pisi* por métodos cristalográficos e ingeniería de proteínas, ha dado la oportunidad de clarificar su mecanismo de acción, y de mejorar la comprensión de las relaciones estructura-función de la cutinasa (Martínez *et al.*, Longhi 1993 *et al.*, 1996; Jelsch *et al.*, 1998), y ampliar la gama de los usos potenciales (Unilever, 1994a, b; Genencor, 1989; Okkels, 1997a; Okkels, 1997b).

Algunos estudios apuntaron hacia aclarar si la cutinasa se puede considerar como miembro de la familia de lipasas o de las esterases (Egmond y van Bommel, 1997). Se utilizó “Time-resolved fluorescence” para observar directamente la formación de los agregados enzima-lípido, conduciendo a la conclusión que la cutinasa se comporta más bien como una lipasa que como una esterasa. (Rogalska *et al.*, 1997).

## **1.2.3 Aplicaciones biocatalíticas de la cutinasa**

Como enzima lipolítica, la cutinasa de *Fusarium solani f. pisi* se ha presentado como enzima versátil que demuestra varias características interesantes para los usos en productos industriales y procesos. Las reacciones hidrolíticas y sintéticas catalizadas por la cutinasa tienen uso potencial en el sector lechero para la hidrólisis de la grasa de leche, en detergentes para lavado en casa, en la industria de productos oleoquímicos, en la síntesis de triglicéridos, polímeros y surfactantes estructurados, en la síntesis de los ingredientes para los productos de cuidado personal, y la síntesis de los productos farmacéuticos y agroquímicos que contienen unos o más centros quirales. Algunos de estos procesos se aplican ya en la industria, mientras que otros todavía están bajo evaluación a nivel de investigación (Unilever, 1994a, b; Genencor, 1989; Okkels, 1997b).

## **1.3 Características de los aminoácidos**

Los aminoácidos son las unidades fundamentales de las proteínas. Están formados por uno o más grupos aminos ( $\text{NH}_2$ ) y uno o más grupos carboxilos ( $\text{COOH}$ ). Todos los aminoácidos naturales son alfa aminoácidos (el grupo amino en la posición alfa) y se pueden clasificar de diversas formas, debido a las diferencias en su cadena lateral (R), , lo que genera diferencia de tamaño, estructura, carga eléctrica o hidrofobicidad.

La principal propiedad que se considera para clasificar los aminoácidos corresponde a la polaridad del grupo R, ya que éste tiene directa incidencia en la interacción con agua al pH biológico. Se clasifican en 5 grupos: apolares alifáticos, apolares aromáticos, polares sin carga, cargados positivamente y cargados negativamente.

El trabajo desarrollado se centró en los aminoácidos pertenecientes a los grupos apolares alifáticos y aromáticos. Para encontrar detalles del resto de los aminoácidos ver Anexo A.

**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, leucina e isoleucina. Glicina, debido a su pequeño tamaño, genera un mínimo impedimento estérico permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. **Prolina**, por el contrario, al poseer un segundo grupo amino mantiene una conformación rígida, reduciendo la flexibilidad de la cadena polipeptídica (Figura 2).

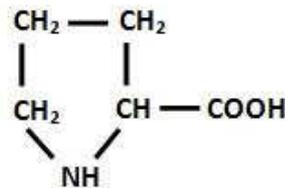


Figura 2: "Estructura Química del Aminoácido Prolina (P)"

**Grupo R aromáticos:** conforman la cadena lateral de fenilalanina (benceno), **tirosina** (fenol) (Figura 3) y **triptófano** (indol) (Figura 4), son relativamente apolares. Pueden participar en interacciones hidrofóbicas, especialmente fuertes cuando los grupos aromáticos se concentran.

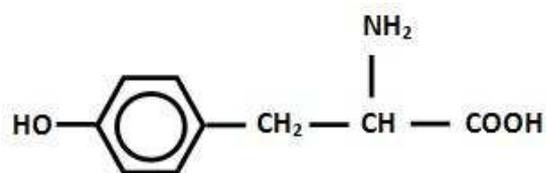


Figura 3: "Estructura Química del Aminoácido Tirosina (Y)"

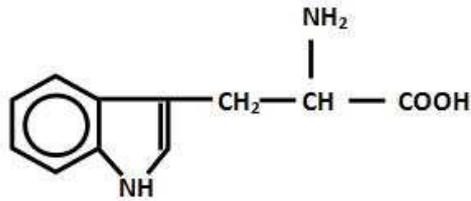


Figura 4: "Estructura Química del Aminoácido Triptofano (W)"

## 1.4 Interacciones hidrofóbicas

Se entiende por hidrofobicidad la repulsión entre un compuesto no polar y un ambiente polar tal como el agua. Este término ha sido empleado para referirse a ciertos modelos moleculares, que generalmente involucran el ordenamiento de moléculas de agua alrededor de solutos no polares (Dill, 1990).

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

## 1.5 Técnicas de purificación de proteínas

Las separaciones cromatográficas se basan en las diferencias de carga (Cromatografía de Intercambio Iónico), tamaño (Cromatografía de Exclusión Molecular o Filtración en Gel), afinidad (Cromatografía de Afinidad) o hidrofobicidad (Cromatografía de Interacción Hidrofóbica) de las diferentes proteínas. Uno de los métodos más habitualmente utilizados para la separación de proteínas a escala industrial es la cromatografía en lecho fijo.

La columna está rellena con un material sólido con las características químicas adecuadas (fase estacionaria), y una solución tamponada se hace pasar a través de la columna (fase móvil). El extracto crudo se aplica en la parte superior de la columna y va poco a poco entrando en la columna con la fase móvil. Cada proteína migrará a distinta velocidad según su grado de afinidad por la fase estacionaria.

### 1.5.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica

La Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (Hydrophobic Interaction Chromatography, HIC) es una cromatografía de adsorción, lo cual implica una interacción entre los grupos hidrofóbicos superficiales o expuestos de las proteínas y los sitios hidrofóbicos de la matriz cromatográfica. En solución acuosa, las proteínas localizan la mayoría de sus sitios hidrofóbicos en su interior, pero algunos grupos hidrofóbicos quedan expuestos. Son estos últimos grupos los que por razones termodinámicas interactúan con una matriz hidrofóbica (Eriksson, 1998).

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

El proceso cromatográfico HIC consta de las siguientes etapas (Lienqueo *et al*, 1999):

1. Ambientación de la columna con un buffer de elevada fuerza iónica, utilizando usualmente Sulfato de Amonio 1.5 - 2.0 M o Cloruro de Sodio 2.0 - 4.0 M.

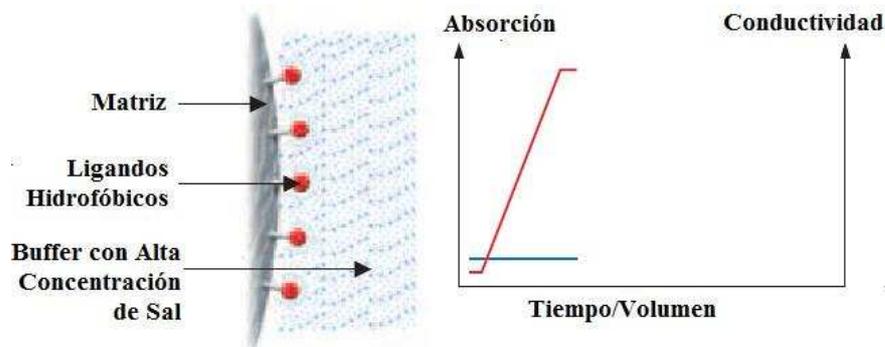


Figura 5: “Primera etapa en HIC: Ambientación de la Columna”.

2. Inyección de la muestra, la que contiene igual concentración de sal que el buffer de equilibrio. Las proteínas son absorbidas según su grado de interacción con la matriz.

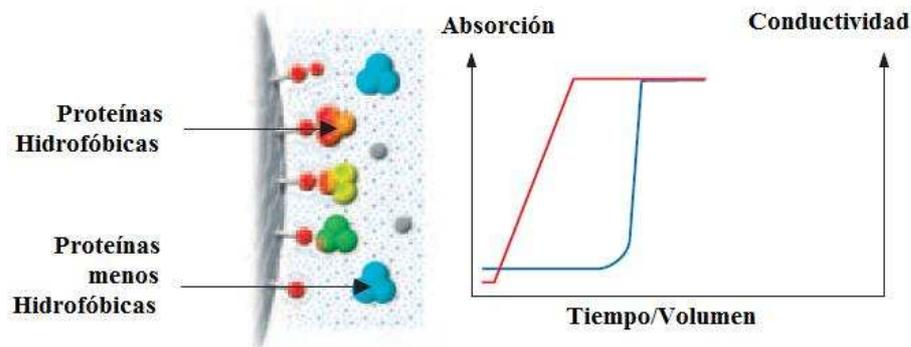


Figura 6: "Segunda etapa en HIC: Inyección de la muestra".

3. Formación de un gradiente decreciente de sal. En esta etapa se produce la elución o desorción de las proteínas. Las proteínas más hidrofílicas eluyen en primer lugar, y las más hidrofóbicas lo hacen al final, ya que son retenidas con más fuerza por la matriz hidrofóbica. En la Figura 7 se muestra un ejemplo de una mezcla de proteínas con distintos niveles de hidrofobicidades.

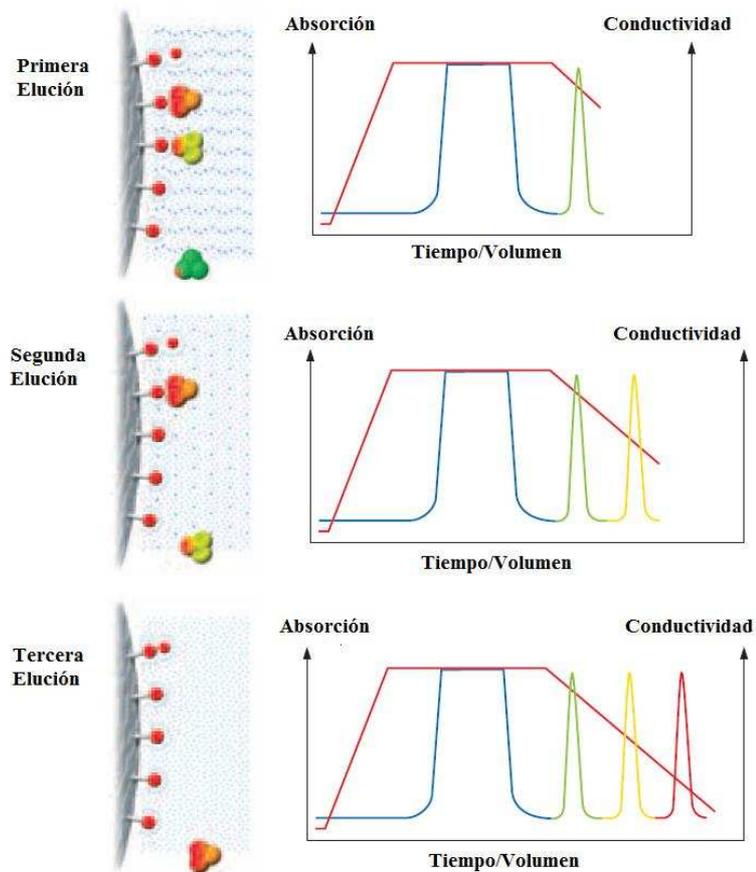


Figura 7: "Tercera etapa en HIC: Elución de las proteínas".

4. Regeneración de la matriz. Se equilibra la columna con el buffer inicial (elevada concentración de sal).

HIC es aplicable a la mayoría de las proteínas a pesar de que el grado de resolución es a menudo más bajo que los obtenidos por Cromatografía de Afinidad o Intercambio Iónico. Esta situación se produce debido a que se establecen interacciones especialmente del tipo hidrofóbico, entre las proteínas adsorbidas en la matriz cromatográfica, lo cual provoca una retención adicional en las proteínas de menor hidrofobicidad, lo que conlleva a disminución en la resolución de la cromatografía.

A continuación se muestra una representación gráfica de un equipo cromatográfico con una columna de HIC y sus componentes básicos.

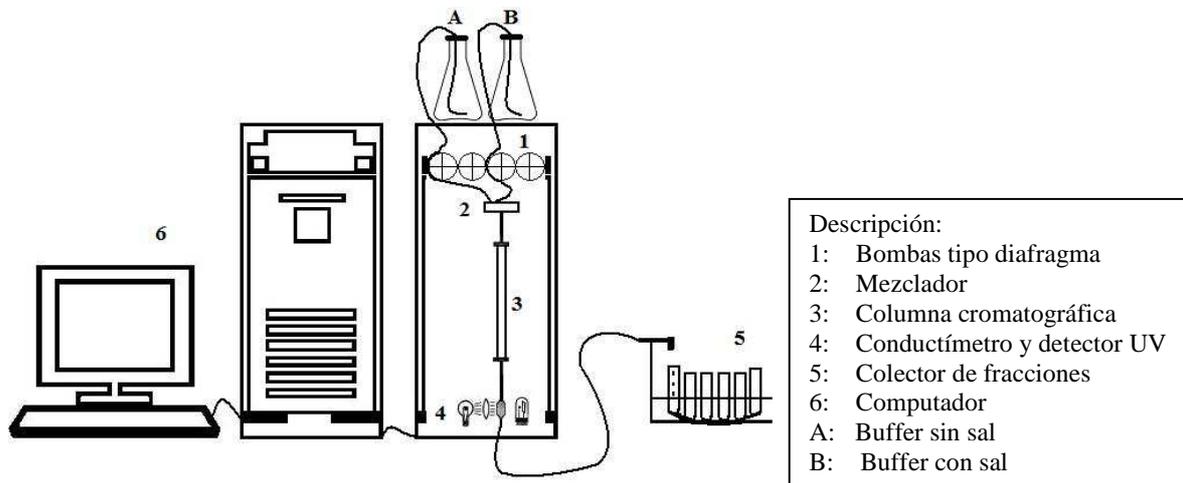


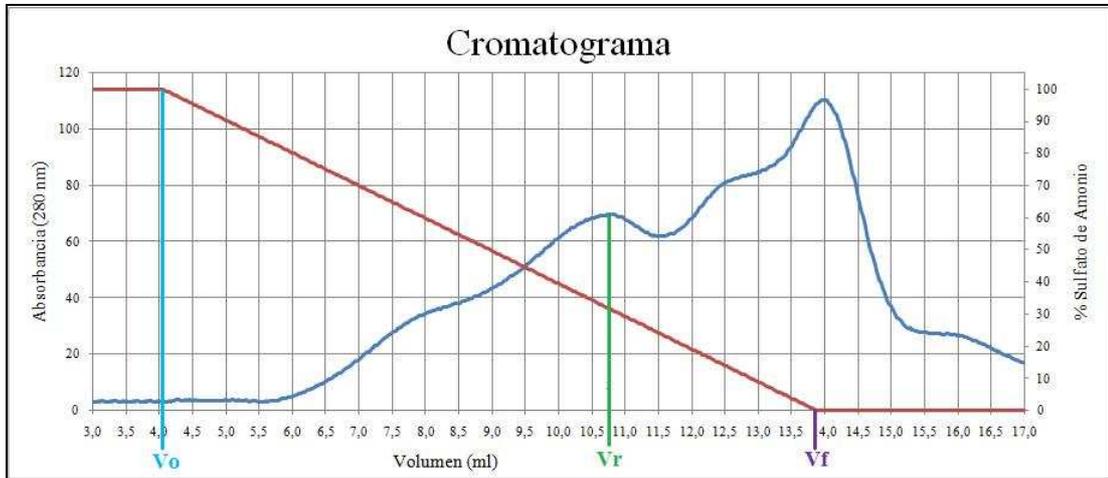
Figura 8: "Representación gráfica de un Cromatógrafo general con una columna de HIC".

## 1.6 Predicción de los tiempos de retención en HIC

En procesos cromatográficos, 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 el tiempo o volumen al cual eluye la proteína de interés ( $t_r, V_r$ ), como se muestra en la Ecuación 1. Los parámetros utilizados para calcular DRT se muestran esquemáticamente en la Figura 9.

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

**Ecuación 1: "Cálculo del DRT".**



**Figura 9: "Esquema de un Cromatograma y parámetros a considerar".**

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

## 1.7 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos

Es posible modificar proteínas 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.

Dada las propiedades de los distintos aminoácidos, con esta adición es posible modificar propiedades específicas de la proteína, alterando características físicas o biológicas de éstas, tales como aumentar su tamaño, aumentar su hidrofobicidad, modificar su estructura tridimensional generando una modificación de su sitio activo (o viceversa) y con ello afectar su función, etc.

Una de las más recientes técnicas utilizadas para modificar proteínas, consiste en la inserción de colas de polipéptidos que potencian o añaden alguna propiedad a la proteína con el fin de reducir el número de etapas para su purificación y minimizar pérdidas durante el proceso (Simeonidis *et al.*, 2004). Estas colas o “tags” pueden ser biomoléculas grandes que presenten

una afinidad específica hacia otra molécula, o bien pueden ser pequeñas y modificar propiedades físicas de una proteína (Steffens *et al.*, 1998).

Para diseñar colas más apropiadas se han postulado distintos modelos, que se basan en las propiedades de la mezcla de proteínas a purificar, en las propiedades de los aminoácidos de la cola y en la proteína objetivo (Simeonidis, 2004).

Dada la fuerza de las interacciones hidrofóbicas, se postula que colas compuestas por aminoácidos altamente hidrofóbicos pueden ser una herramienta útil en los procesos de purificación de proteínas. Por esta razón se han generado proteínas con cola (“tagged proteins”), cuyas colas se componen de residuos hidrofóbicos, dado que generan un alto efecto sobre la hidrofobicidad superficial relativa de la proteína.

En el caso de desear aumentar la hidrofobicidad global de la proteína, se consideran a los aminoácidos hidrofóbicos aromáticos como candidatos para conformar el péptido a unirse, dado su mayor tamaño. Por lo tanto, las colas más utilizadas corresponden en primer lugar a cadenas de politriptófanos, seguido de polifenilalaninas, politirosinas y también se utilizan frecuentemente colas de polisoleucinas (Fexby *et al.*, 2004).

Los aminoácidos más utilizados en colas de alto valor hidrofóbico corresponden a repeticiones de prolina, tirosina y triptófano. Los residuos de prolina se introducen frecuentemente debido a que la estructura rígida de su anillo previene que se forme una estructura secundaria al ser intercalados entre aminoácidos hidrofóbicos y de esta forma se espera que la superficie de las colas se encuentre mayormente expuesta al medio.

## **1.8 Limitaciones del uso de las colas hidrofóbicas**

Si bien las ventajas mencionadas son evidentes al momento de la bioseparación, este sistema presenta las desventajas de potenciales efectos negativos sobre la expresión y estabilidad de la proteína con cola. Se ha encontrado que estas colas 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 incremento en la hidrofobicidad puede generar la asociación de multímeros, grandes agregados o la disociación en pequeños fragmentos (Fexby *et al.*, 2004).

Por otro lado, se encontró que cutinasas que contienen péptidos hidrofóbicos resultaron con cambios en las propiedades físicas, además de generar aglomerados debido a la interacción hidrofóbica entre proteínas, disminuyendo el crecimiento de la célula utilizada para su producción, afectando la secreción de proteínas y produciendo una disminución de la estabilidad del plasmidio (Calado *et al.*, 2002).

Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se estudiará el efecto de la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos (Prolina, Triptófano, Tirosina) al extremo carboxilo terminal de la enzima cutinasa y su consecuente efecto sobre la expresión (en sistema procarionte), recuperación y purificación mediante la técnica cromatográfica de interacción hidrofóbica.

## 1.9 Objetivos

### 1.9.1 Objetivo general

Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a cutinasas en su expresión, recuperación y purificación por HIC, de tal manera de poder definir criterios que permitirían seleccionar el extremo que reporte mayores niveles de purificación.

### 1.9.2 Objetivos específicos

1. Cultivar una cepa de *E.coli* modificada con la cutinasa nativa de *Fusarium solani f. pisi* a distintas temperaturas.
2. Inducir la cepa de *E. coli* modificada con la cutinasa nativa de *Fusarium solani f. pisi* a distintas temperaturas.
3. Incorporar las colas hidrofóbicas a la cutinasa nativa de *Fusarium solani f. pisi* mediante diversas técnicas moleculares.
4. Estudiar el efecto de la adición de colas hidrofóbicas en la expresión de cutinasa en *E. coli*.
5. Estudiar el efecto de la adición de colas hidrofóbicas en la recuperación de cutinasa.
6. Estudiar el efecto de la adición de colas hidrofóbicas en la purificación de cutinasa por HIC.
7. Evaluar que combinación de aminoácidos es la mejor dentro de las alternativas propuestas.
8. Establecer reglas cualitativas para predecir posibles pérdidas de recuperación de proteínas a causa del extremo adicionado.

## 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 laboratorio proveedor se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 1: "Reactivos utilizados durante el trabajo de título".**

Proveedor	Reactivos
Promega (WI-USA)	Enzimas de restricción BamHI, 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.
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, enzima de restricción NdeI.
Difco (DT-USA)	Peptona, extracto de levadura, medio LB, agar.
Novagen (WI-USA)	pET11a, <i>E. coli</i> BL21(DE3)
Qiagen	Los sistemas de purificación de DNA plasmidial y de 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

Para las distintas transformaciones de las cepas bacterianas se utilizaron dos vectores, el plasmidio de clonamiento pGEM-T-easy y el plasmidio de expresión pET11a. El vector de expresión fue donado por la Dra. Evamaría Pertersen (University of Aalborg, Dept. of Physics

and Nanotechnology, Dinamarca) el cual posee la señal PhoA que dirige la proteína al espacio periplasmático de la célula.

#### **2.1.4 Medios de cultivos líquidos y sólidos**

Los medios de cultivos 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 alicuotó 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 un 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 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.

#### **2.1.6 Síntesis de oligonucleótidos**

Los partidores diseñados para la modificación de Cutinasa se mandaron a sintetizar a Macrogen.

#### **2.1.7 Software**

**GRASP (Graphical Representation and Analysis of Surface Properties, Nicholls A., 1991, <http://trantor.bioc.columbia.edu/grasp>):** programa de visualización molecular y análisis. Se utilizó para calcular las áreas superficiales de los aminoácidos que componen las proteínas y el

área superficial total de la proteína. Estos datos son esenciales en el cálculo de la hidrofobicidad de las proteínas.

Swiss PDB View (**SpdbV, Guex N., 1997, <http://www.expasy.ch/spdbv>**): Este programa se utilizó para visualizar la estructura 3D de las proteínas y presenta herramientas de visualización molecular que se utilizan para colorear las zonas hidrofóbicas de las proteínas y observar de esta manera su distribución en la superficie de la proteína.

Sigma Scan Pro 5.0 (**Systat Software Inc. (SSI), 2002, <http://www.systat.com/downloads/?sec=d0010>**): Programa capaz de transformar intensidad de bandas en distintos geles y generar con ellos un valor numérico proporcional permitiendo así medir cantidad de proteínas en geles de poliacrilamida.

## 2.2 Métodos

### 2.2.1 Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron tres partidores antisense para que mediante la técnica de PCR se adicionará una cola polipeptídica hidrofóbica en el extremo carboxilo terminal de la cutinasa y además un partidior sense igual para los tres casos.

Para este diseño de partidores se tomó en cuenta la secuencia de nucleótidos del gen de la cutinasa, para que los partidores tengan una secuencia complementaria de 9 nucleótidos aproximadamente. Se agregó un sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI* en el partidior sense (región 5` de la secuencia codificante) y un sitio de corte para la enzima de restricción *BamHI* en el partidior antisense (secuencia 3` de la secuencia codificante). El partidior antisense además contiene una secuencia codificante para una cola hidrofóbica, de entre 3 a 6 aminoácidos, al final de la proteína, y un codón de término de la traducción. Además se agregan 3 nucleótidos en el extremo 3' de cada partidior que termine en C o G, para fortalecer el alineamiento en la región que la DNA polimerasa usa para extender el DNA.

Luego, el orden de las secuencias en el partidior antisense es:

3`-sec cutinasa (9 nuc)-cola hidrofóbica (9 – 18 nuc) – codón de término (3 nuc) –sitio para *BamHI* (6 nuc)- 3 nuc adicionales.

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 de hairpin internos en un partidor por autoalineamiento.

Se diseñaron tres colas hidrofóbicas: WPWP, YPYYP e YYY, donde W es el aminoácido triptófano, Y es tirosina y P es prolina. Las secuencias de los partidores se detallan a continuación y se denomina Cut-F al partidor sense y Cut-WP, Cut-YP y Cut-YY a los partidores antisense (y se mantiene esta nomenclatura a lo largo de este trabajo).

- **Partidor sense**

Denominación : CutF  
Tamaño : 36 pb; 11,02 kDa.  
 $T_m$  : 61 °C  
Secuencia en la dirección 5' → 3':  
ATA CAT ATG AAA CAA AGT ACT ATT GCA CTG GCA CTC

- **Partidor antisense para WPWP**

Denominación : CutWP  
Tamaño : 33 pb; 10,07 kDa  
 $T_m$  : 69 °C  
Secuencia en la dirección 5' → 3':  
TAT GGA TCC TCA CGG CCA CGG CCA AGC AGA ACC

- **Partidor antisense para YPYYP**

Denominación: CutYP  
Tamaño: 37 pb; 11,4 kDa  
 $T_m$ : 68 °C  
Secuencia en la dirección 5' → 3':  
TGG ATC CTC ACG GAT ACG GAT ACG GAT AAG CAG AAC C

- **Partidor antisense para YYY**

Denominación: CutYY  
Tamaño: 33 pb; 10,15 kDa  
 $T_m$ : 62 °C  
Secuencia en la dirección 5' → 3':  
TAT GGA TCC TCA ATA GTA ATA AGC AGA ACC GCG

## **2.2.2 Purificación de DNA plasmidial**

El DNA plasmidial se extrajo a partir de un cultivo de 4 mL de medio LB-ampicilina incubado 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 min en un tubo Eppendorf de 1,5 mL previamente esterilizado por autoclave. Se hizo sucesivas centrifugaciones hasta completar los 4 mL para obtener un pellet de bacterias. Se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN. La extracción se realizó según las indicaciones del fabricante.

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

Una vez obtenido el DNA plasmidial se realizó PCR (Polymerase Chain Reaction) para cada uno de los partidores antisense diseñados y el partidore sense común, obteniendo así el gen amplificado de la cutinasa con la respectiva cola hidrofóbica.

Se prepararon 100 µl de mezcla PCR para cada una de las reacciones, la cual contiene: 20 µl de Buffer 5X, 10 µl de Mg, 2 µl de dNTPs, 5 µl de Partidor Sense, 5 µl de Partidor Antisense, 5 µl de DNA, 1 µl Taq polimerasa, completando el volumen final deseado con 52 µl de agua estéril.

Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 60°C por 30 seg y 72°C por 45 seg, y finalmente un ciclo adicional de 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 Ligación de fragmento de DNA en vectores de clonamiento y expresión**

### **2.2.4.1 Ligación en el vector de clonamiento pGEM-T Easy**

Para la reacción de ligación se utilizó como inserto los productos PCR purificados desde geles de agarosa. La mezcla de reacción se hizo en un volumen final de 10 µL y contenía tampón

de ligación 2X (Tris-HCl 60 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, DTT 20 mM, ATP 2mM, PEG 10%), 0,5 µL de vector pGEM-T Easy, 3,5 µL de inserto y 1 µL de enzima T4-DNA ligasa. Se dejó ligando toda la noche a 4 °C.

El producto de ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5α electrocompetentes.

#### **2.2.4.2 Ligación en el vector de expresión pET11a**

La reacción de ligación se realizó en un volumen final de 10 µL en una mezcla que contenía 0,5 µl de vector digerido, 3,5 µL de inserto digerido con las mismas enzimas de restricción (NdeI y BamHI), tampón T4 DNA ligasa 5X (Tris-HCl 250 mM pH7,6, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, ATP 5 mM, polietilenglicol-8000 25% p/v) y 1 µL de T4 DNA ligasa. La mezcla se dejó a 4°C toda la noche.

#### **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 estéril (Anexo B) con una colonia de la cepa requerida y se creció con agitación de 200 rpm a 37°C toda la noche.

Se midió la densidad óptica O.D del cultivo a 620 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 500 mL de medio estéril a una O.D<sub>620</sub> final de 0,05.

Luego de 2 a 4 hrs se midió la O.D<sub>620</sub> hasta alcanzar un valor entre 0,6 y 0,8. El cultivo se enfrió en hielo durante 10 min y se centrifugó a 5.000 x g y a 4°C durante 10 min (centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, DuPont, CT, USA).

El pellet se lavó 2 veces con glicerol 10% v/v estéril. Luego del último lavado, el pellet se resuspendió en el residuo de glicerol, para finalmente ser alicuotado en volúmenes precisos para su utilización (entre 25 y 100 µL). Las células electrocompetentes fueron mantenidas a -80 °C.

## **2.2.6 Transformación de células electrocompetentes**

A 20  $\mu\text{L}$  de células electrocompetentes *E. coli* BL21(DE3) o DH5 $\alpha$  se agregó 1  $\mu\text{L}$  de mezcla de ligación.

La electroporación se realizó en un equipo Cell-Porator® Electroporation System (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MD-USA) en las siguientes condiciones: 420 V, 330  $\mu\text{F}$ , baja impedancia, una tasa de carga rápida y un tiempo máximo de 2,5 mseg.

Las células transformadas se mezclaron con 1 mL de medio LB y se incubaron a 37 °C durante 1 h y con agitación de 200 rpm. Luego se centrifugó a 13.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5403 de Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) durante 1 min y se descartaron 900  $\mu\text{L}$  del sobrenadante.

El pellet se resuspendió en sobrenadante remanente y se plaqueó sobre placas LB agar estériles que contenían ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , X-Gal 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e IPTG 1mM para el caso de células electroporadas con el vector de clonamiento pGEM-T Easy.

Para las células electroporadas con el vector de expresión pET11a se utilizaron placas LB agar estériles sólo con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Las placas de transformación se incubaron a 37°C durante toda la noche y posteriormente se mantuvieron a 4 °C.

## **2.2.7 PCR de colonias**

El PCR de colonias se realizó para corroborar la presencia de inserto en las colonias blancas seleccionadas como clones positivos.

Dichas colonias se transfirieron mediante una punta estéril de desde la placa de transformación a tubos Eppendorf con 100  $\mu\text{L}$  de agua Milli-Q estéril.

Los tubos se incubaron a 100 °C durante 10 min, se tomaron 5 µL y se agregaron sobre 15 µL de mezcla de PCR.

La presencia de inserto se confirmó utilizando los partidores respectivos del fragmento clonado utilizando el protocolo de PCR descrito en la sección 2.2.3.

Los productos de PCR de colonias se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

## **2.2.8 Digestión de DNA plasmidial**

Las enzimas *Bam*HI y *Nde*I se utilizaron para digerir los vectores pGEM-T Easy y pET11a, ya sea solo una para linealizar los vectores o ambas para escindir y recuperar los insertos ligados en ellos.

La reacción de digestión doble se utilizó 2 µL de tampón 5X Multicore recomendado por Promega, 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.

Se deja reaccionando durante 2 horas a 37 °C y el resultado se visualiza mediante un gel de agarosa.

## **2.2.9 Electroforesis**

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

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % tanto para determinar la exitosa transformación de las cepas como el tamaño del inserto.

Se utilizó una cámara horizontal Horizon-58 (Gibco-BRL Life Technologies, Inc., MA-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 fue preparado en tampón TAE 1X: Tris-Acetato-EDTA (Tris 40 mM, acetato 20 mM y EDTA 1 mM) y bromuro de etidio 0,2 µg/mL. Se utilizó un estándar de peso molecular 1 kb DNA ladder y tampón de corrida TAE 1X. La electroforesis se realizó bajo voltaje constante de 100 V (fuente de poder Model 500 de BRL Life Technologies, Inc., MD-USA).

Una vez terminada la electroforesis se observó el gel sobre un transiluminador UV y se fotografió.

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

Las separaciones electroforéticas en condiciones denaturantes se realizaron con el fin de determinar la presencia de la proteína en cada una de las muestras analizadas.

Para realizar las electroforesis se utilizó una cámara vertical MiniProtean II (Bio-Rad Laboratories Inc., CA-USA) y el gel se preparó según las siguientes tablas:

**Tabla 2: “Volúmenes de los reactivos para la preparación de 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 3: “Volúmenes de los reactivos para la preparación de 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) y posteriormente se cargaron en gel de acrilamida.

Las electroforesis se realizaron bajo voltaje constante de 200 V (fuentes de poder Power Pac 1000 de Bio-Rad Laboratories 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.

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

Con el fin de purificar fragmentos de DNA desde geles de agarosa, se cortó la banda de DNA desde el gel y se colocó en un tubo Eppendorf de 1,5 mL esterilizado por autoclave.

Luego 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 y previamente calentada a 50°C.

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

Para inducir la expresión del gen de la cutinasa modificada, en un tubo con 8 ml de medio LB más ampicilina se colocó una colonia de las células BL21(DE3) de *E. coli* transformadas con el gen de la cutinasa modificada en pET11a y se dejó toda la noche creciendo a 30°C y a 200 rpm.

Se midió la densidad óptica O.D del inóculo a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 250 mL de medio LB estéril a una O.D<sub>600</sub> final de 0,05. El cultivo se creció con agitación 200 rpm a 25 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> ideal de 1,5 (aproximadamente en 8 horas).

La inducción se efectuó agregando IPTG estéril a 0,2 mM final y se dejó toda la noche a una temperatura de 18 °C o 25°C y con agitación de 200 rpm por 15 u 8 horas, respectivamente.

Finalmente, los cultivos se dejaron en hielo durante 10 min y posteriormente se centrifugaron a 5.000 x g durante 5 min (Centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, Kendro Laboratory Prod., NC-USA). Se guardaron los pellets resultantes.

### 2.2.12 Extracción de cutinasa desde la fracción periplasmática

Para extraer las proteínas periplasmáticas se realizó choque osmótico a los pellets de la sección anterior, los cuales se resuspendieron en buffer TES frío (Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; 20% sacarosa) usando las proporciones descritas en la Tabla 4. A las células en suspensión se les agregó EDTA frío a una concentración final de 1 mM.

**Tabla 4: “Volúmenes de TES o Agua Fría a adicionar según absorbancia de la muestra”.**

Volumen de Cultivo (ml)	Absorbancia a 600 nm * Dilución	Volumen de TES (o Agua) Frío (ml)
250	3 o menor	12
250	4	15
250	5	20
250	6	25

Se agitó suavemente en hielo durante 10 minutos. Luego se centrifugó por 7 min a 4 °C y 7.000 x g (Centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, Kendro Laboratory Prod., NC-USA). Se guardaron los sobrenadantes, rotulados como WP\_TES, YP\_TES y YY\_TES para estimar la pérdida de proteína en este paso.

Se resuspendió cada pellet en agua fría estéril en volúmenes según la Tabla# 4 y se agitó manualmente manteniéndolo a baja temperatura. Durante este paso las proteínas periplasmáticas son liberadas al agua.

Se centrifugó a 4 °C por 20 minutos a 7.000 x g (Centrífuga Sorvall® RC-28S y rotor GS-3 Sorvall®, Kendro Laboratory Prod., NC-USA).

Se analizaron los sobrenadantes, rotulados como Periplasma\_WP, Periplasma\_YP y Periplasma\_YY, mediante los correspondientes ensayos de actividad y cuantificación, y se guardó el pellet obtenido.

### **2.2.13 Extracción de cutinasa desde la fracción soluble**

Con el fin de estimar la cantidad de proteína que queda en la fracción citoplasmática de los cultivos, se resuspendió el pellet de la sección anterior en 15 mL de Tris HCl 20 mM, pH 7,5, frío.

La lisis celular de 1 ml de cada muestra se realizó por sonicación (Microson Ultrasonic Cell Disruptor, USA) a un nivel de intensidad entre 9 y 10, mediante pulsos de 20 segs., con intervalos de descanso de un minuto. En todo momento las muestras se mantuvieron en hielo para evitar la denaturación de las proteínas.

Finalmente la muestra se centrifugó a 4 °C por 10 min a 13.000 x g (Centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5804R, AG Hamburg, Alemania). Se guardó tanto el sobrenadante como el pellet obtenido.

### **2.2.14 Extracción de cutinasa de la fracción insoluble**

Se resuspendió el pellet de la sección anterior en 1 ml de agua y se agregó buffer de carga 5X (Tris-HCl 60 mM, glicerol 25 % v/v, SDS 2 % p/v, 2-mercaptoetanol 14,4 mM y azul de bromofenol 0,1 % p/v pH 6,8) a 20 µL de la muestra.

Se calentó por 10 min a 100 °C, luego se centrifugó por 10 minutos a 13.000 x g (Centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5804R, AG Hamburg, Alemania). Se guardó el sobrenadante y se descartó el pellet.

### **2.2.15 Caracterización**

#### **2.2.15.1 Ensayo de actividad cutinasa**

Este ensayo tiene como finalidad determinar la presencia de cutinasa en cada uno de los sobrenadantes de las secciones anteriores.

El sustrato es p-nitrofenilbutirato (p-NPB) y posee un enlace éster en su cadena que es hidrolizado por la actividad esterasa de la cutinasa. Los productos de esta reacción corresponden a ácido butírico y p-nitrofenol (pNP), siendo este último cuantificado al medir absorbancia a 400 nm (Genesys 6, Thermo Scientific, USA.).

Para realizar el ensayo de actividad se efectuó un estudio cinético y se consideraron las variaciones de absorbancia a intervalos de 10 segundos.

Se preparó la mezcla compuesta por 5 mL de solución A (0,5 g de colato de Sodio en 100 mL de buffer Fosfato de Potasio 50 mM, pH 7,0 almacenado a 4 °C) con 125 µL de solución de reacción B (40 µL de p-nitrofenilbutirato en 10 mL de tetrahidrofurano, almacenado herméticamente cubierto con parafilm, a -20 °C).

Para la medición de absorbancia se agregaron 980 µL de la mezcla antes mencionada en una cubeta de vidrio (Starna, UK) más 20 µL de muestra. La medición se realiza a temperatura ambiente (25 °C aprox.). La muestra es diluída en buffer fosfato de potasio 50 mM, pH 7,0 en los casos en que se requirió. El blanco correspondió a 980 µL de mezcla de reacción y 20 µL de solución de reacción A. Para determinar las unidades de actividad se utiliza la siguiente ecuación (Henríquez *et al*, 2004):

$$U \text{ cutinasa (U/ml)} = 16.32 * (dAbs_{400}/dt) * D$$

Donde D es la dilución y (d Abs<sub>200</sub>/dt) es la pendiente del estudio cinético; este valor no puede ser superior a 0.6, en caso contrario se debe diluir la muestra.

#### **2.2.15.2 Determinación de la concentración de proteína**

La concentración de proteína para las diferentes muestras se determinó mediante el ensayo modificado de Bradford, para lo cual se mezcló: 1,2 mL de agua destilada, 0,5 mL de Coomassie 1 g/L 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 (a una concentración de 0,5 mg/ml) como solución patrón para la construcción de una curva de calibración en concentraciones entre

0,03125 y 0,5 mg/mL. 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 blanco se preparó sustituyendo la muestra por agua destilada.

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

### **2.2.15.3 Estimación de la pureza de las muestras**

La pureza de las muestras se estimó gráficamente mediante el software SigmaScan Pro 5.0, el cual mide la intensidad de una región seleccionada de una fotografía.

El criterio de análisis se basó en seleccionar una región de 80 píxeles de largo por 30 píxeles de largo en la banda correspondiente al peso de la cutinasa, y además, en las bandas correspondientes a los pesos de los dos contaminantes más significativos. Adicionalmente, se estimó la intensidad de un área del gel sin proteína, el cual fue restado a los valores obtenidos, con el fin de eliminar el background de la medición.

Se realizó una curva de calibración para relacionar el valor de intensidad total obtenido con la concentración de proteína, utilizando diluciones en serie de una muestra de cutinasa conocida. Dicha curva de calibración se encuentra disponible en el Anexo C.

### **2.2.16 Cromatografía de interacción hidrofóbica**

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

La columna utilizada contenía Butil Sefarosa Fast Flow 6FF (Amersham Pharmacia) como resina, empacada en una columna de 1 mL.

Los buffers utilizados en los experimentos fueron Buffer A (Tris-HCl 20 mM a pH 7,0) y Buffer B (Tris-HCl 20 mM, 2 M de sulfato de amonio a pH 7,0), ambos filtrados con filtros Millipore de 0,22 µm (Sartorius, Hannover-Alemania) y desgasificados por burbujeo con helio durante 5 minutos.

Se programó iniciar la cromatografía con una concentración de sal equivalente al 100 % (sólo con Buffer B) y paulatinamente se mezcló con Buffer A, generando un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna, hasta llegar a 0 % de concentración de sal.

El flujo se mantuvo constante durante todo el proceso e igual a 0,5 mL/min.

Se inyectaron 2 mL de muestra diluída al 50 % en Buffer B, utilizando un loop de 2 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 4 volúmenes de columna.

### **3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **3.1 Condiciones de crecimiento e inducción de la cepa nativa**

Una vez que se ha conseguido obtener el gen modificado con las colas hidrofóbicas es necesario insertarlo en un vector de expresión el cual asegura la expresión del gen clonado en la célula hospedante. Dicho vector (o plásmido) deberá poseer un gen que permita que la célula crezca en determinadas condiciones, tal como un gen de resistencia a un antibiótico como la ampicilina. Solo aquellas células que hayan sido transformadas por el plásmido recombinante podrán crecer en presencia de ampicilina. Además, el gen deberá ser insertado en un sitio de clonamiento asociado a un operón lac, cuya expresión es inducible por IPTG (isopropil- $\beta$ -D-tiogalactósido), regulando así la expresión del gen de interés.

La primera etapa en la obtención de enzima de interés consiste en crecer las células recombinantes en presencia de ampicilina hasta una cierta densidad celular. Dicha etapa se le denomina de crecimiento. Posteriormente se adiciona el inductor de la expresión, permitiendo que comience la producción de proteína, y dado que el plásmido utilizado en este trabajo posee la señal de transporte phoA, la cutinasa se dirige al espacio periplasmático de la célula.

Con el fin de optimizar el crecimiento, se estudió el efecto de la temperatura tanto en la etapa de crecimiento como de inducción de la cepa nativa. Se ha reportado que una inducción prolongada de la enzima provoca un debilitamiento de la pared celular, lo que conlleva a encontrar la mayor parte de la proteína en el medio de cultivo<sup>1</sup>. Por otro lado, la inducción a bajas temperaturas permite evitar agregaciones de las proteínas secretadas o que éstas se unan a la membrana celular<sup>1</sup>.

Las temperaturas evaluadas fueron entre 18°C y 30°C, tanto para el crecimiento como para la inducción. En algunos casos hubo que dejar en hielo el cultivo durante varias horas (tiempo de reposo), ya que debido al tiempo no se podía analizar los cultivos inmediatamente finalizada la inducción. Se realizaron cultivos de 250 ml con medio LB-ampicilina.

---

<sup>1</sup> Comunicación Personal: Dra. E. Petersen (University of Aalborg, Denmark)

La recuperación de proteína se estimó en base a las unidades enzimáticas que corresponden a la proteína recuperada en la fracción de interés (periplasma) dividida en el total de unidades enzimáticas de las fracciones extracelular, en buffer TES y periplasma.

A continuación se muestran los resultados (promedios) obtenidos para las diferentes condiciones de crecimiento (25°C y 30°C) e inducción (18°C, 25°C y 30°C), y los correspondientes análisis de proteína total y actividad total presente en el periplasma de los cultivos, como también la biomasa total alcanzada y el porcentaje de recuperación en la fracción de interés.

**Tabla 5: "Efecto de las condiciones de crecimiento e inducción en la producción de cutinasa nativa recombinante."**

Tiempo Crecimiento (hrs)	Temperatura Crecimiento (°C)	Tiempo Inducción (hrs)	Temperatura Inducción (°C)	Biomasa (grs)	Proteína (mg)	Actividad Total en Periplasma (U)	Actividad Total en otras fracciones (U)	% Recuperación en Periplasma
7	25	15	18	0,41	37	340	137	71
7	25	7*	25	0,32	28	735	2602	22
7	25	15	30	0,28	0,19	220	21780	1
5	30	15	18	0,31	1,11	220	108	67
5	30	15	30	0,38	1,23	5	495	1

(\* Indica un tiempo de reposo de 11 horas luego de la inducción.)

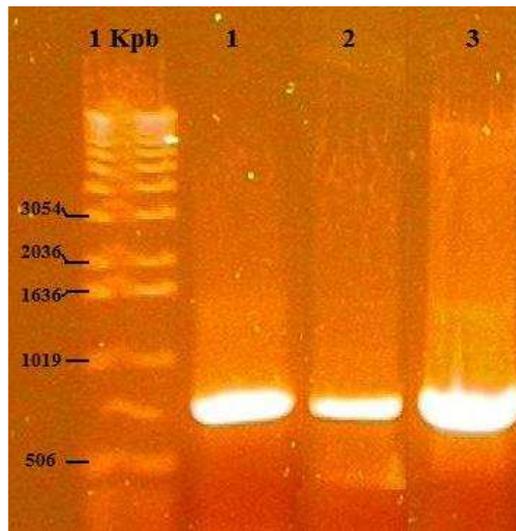
De la tabla 5 se puede apreciar que la inducción a altas temperaturas y/o por tiempos muy prolongados provoca que la proteína se libere al sobrenadante del cultivo o quede en el paso intermedio de la extracción desde la fracción periplasmática (recuperaciones < 30%). Se observa, además, que una inducción a bajas temperaturas (18 °C) conllevaría a una menor producción de esta enzima durante dicha etapa.

Es claro que la pérdida de proteína, en la inducción a 25°C, se ve compensada por una mayor producción de enzima, obteniéndose una mayor cantidad de unidades enzimáticas, y por esto sería la opción más recomendable, pero razones de tiempo se optó por inducir la proteína a 18°C. No se descarta en futuras experiencias utilizar dicha temperatura para la etapa de inducción.

## 3.2 Adición de extremos polipeptídicos a cutinasa

### 3.2.1 Generación del gen de cutinasa modificada

Los resultados de la amplificación del gen de cutinasa modificada con las colas hidrofóbicas se muestra en la Figura 10. El templado para la amplificación se obtuvo de la purificación de DNA plasmidial de un cultivo de la cepa recombinante que produce cutinasa nativa. Ambos métodos se describen en las secciones 2.2.2 y 2.2.3.



**Figura 10: "Cutinasa modificada mediante PCR".**

Carril (1): Cutinasa-WP. Carril (2): Cutinasa-YP. Carril (3): Cutinasa-YY

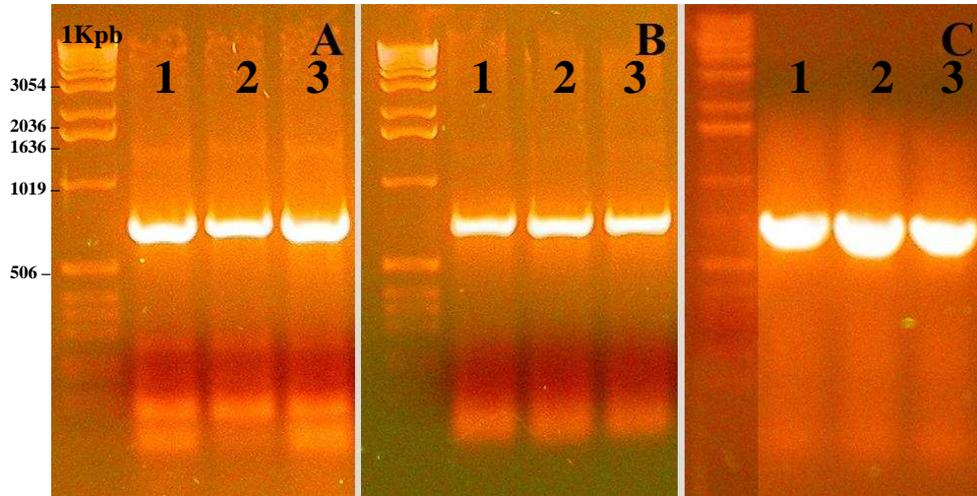
Se observa, a priori, que la síntesis del gen de la cutinasa modificada se logró exitosamente para los tres tipos de colas hidrofóbicas, pues es posible observar una sola banda para cada caso, que correspondería al peso molecular de esta proteína mas la secuencia polipeptídica adicionada (aprox. 730 pb).

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

Luego de generar los insertos codificantes para la cutinasa modificada, se procedió a ligarlos al vector de clonamiento pGEM-T-easy como se describe en la sección 2.2.4.1. Esto con el fin de seleccionar aquellas colonias que incorporen correctamente el inserto.

Posteriormente se electroporaron células DH5 $\alpha$  electrocompetentes para introducir el producto de ligación. Se crecieron en placas LB-Ampicilina-XGal-IPTG y luego se realizó PCR a

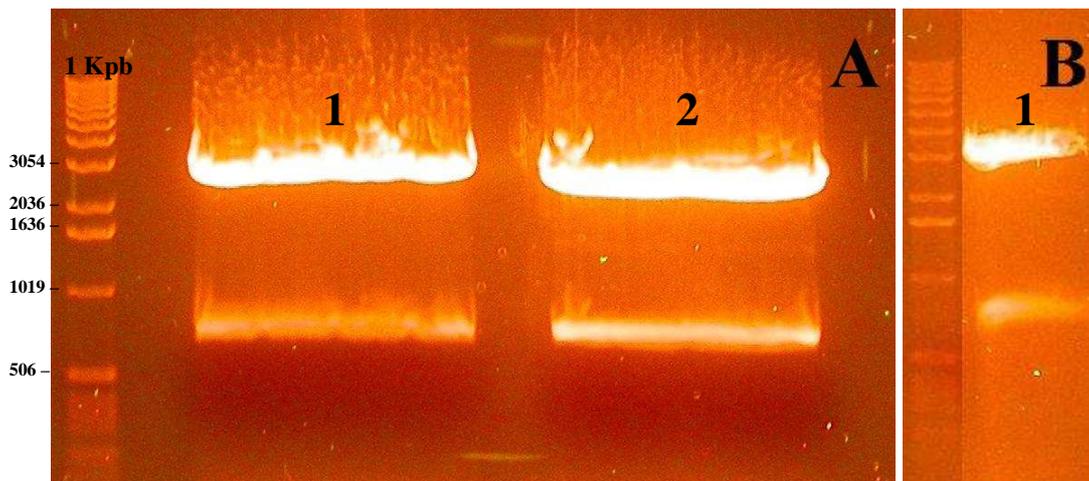
las colonias positivas para verificar la ligación. En la Figura 11 se muestran los resultados para 3 colonias distintas de cada ligación.



**Figura 11: "PCR de colonias realizado a las ligaciones al vector de clonamiento"**

(A): Carriles (1) a (3): Colonias Cutinasa-WP, (B): Carriles (1) a (3): Colonias Cutinasa-YP, (C) Carriles (1) a (3): Colonias Cutinasa-YY.

Se crecieron las colonias seleccionadas y se les extrajo el DNA plasmidial que fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, las cuales flanquean la secuencia de la cutinasa con el fin verificar los tamaños tanto de insertos como de vector. En la Figura 12 se muestra solo una de las digestiones realizadas para cada caso, el resto de las muestras dieron igual tamaño de fragmentos.



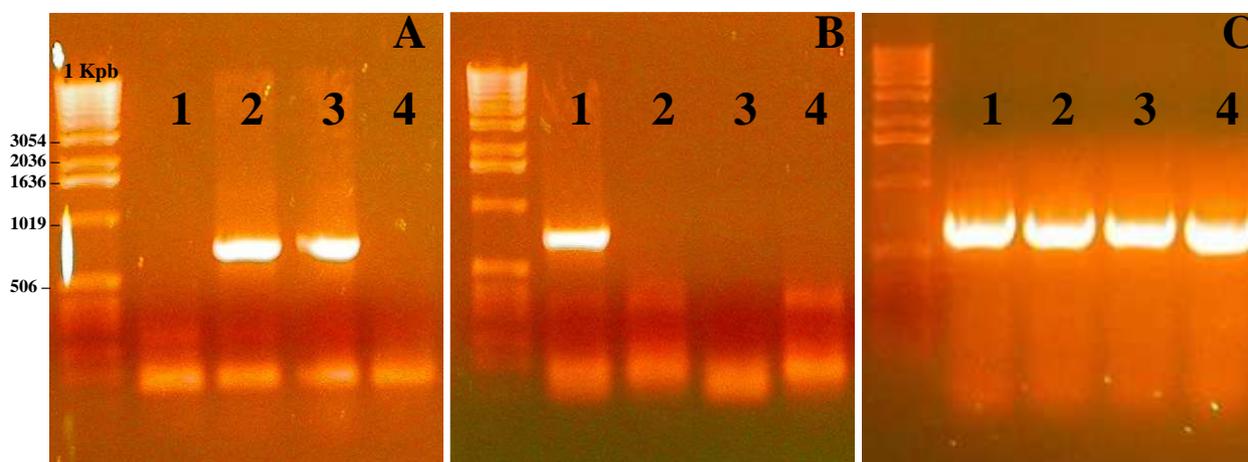
**Figura 12: "Digestión del DNA plasmidial."**

(A): Carril (1): Cutinasa-WP; Carril (2): Cutinasa-YP. (B): Carril (1): Cutinasa-YY.

Las bandas superiores muestran el correcto peso del vector de clonamiento (3015 pb) y las inferiores de los insertos (aprox. 730 pb).

### 3.2.3 Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pET11a

Se escogió una de las construcciones en pGEM-T-easy para cada variante hidrofóbica y se purificó la banda correspondiente al producto de restricción de los plásmidos pGEM-T-easy recombinantes, para luego ligarlas al vector de expresión pET11a. Una vez obtenidos los constructos, se electroporaron células BL21(DE3) electrocompetentes, y, una vez crecidas en placas LB-ampicilina, se les realizó PCR a 4 colonias escogidas. El resultado se muestra en la Figura 13.



**Figura 13: "PCR de colonias transformantes en pET11a".**

(A): Carril (1) a (4): Colonias Cutinasa-WP; (B): Carril (1) a (4): Colonias Cutinasa-YP; (C): Carril (1) a (4): Colonias Cutinasa-YY.

Se puede apreciar en la Figura 13 que los insertos tienen el peso esperado de aproximado de 730 pb.

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

Se escogieron los siguientes clones positivos (A.2): cutinasa modificada con la cola WPWP, (B.1): cutinasa modificada con la cola YPYYP y (C.1): cutinasa modificada con la cola YYY para proseguir con las etapas de producción y caracterización de las enzimas modificadas.

### 3.3 Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos

Los plasmidios obtenidos se mandaron a secuenciar a MacroGen para verificar la secuencia nucleotídica de los insertos clonados.

Los resultados indicaron que las secuencias de la cutinasa modificada con las colas WPWP e YYY estaban correctas, pero la cola YPYYP estaba incorrecta, al contar con la mitad de la cola y a partir de ahí 32 aminoácidos que no corresponden a la secuencia deseada.

### 3.4 Determinación de la hidrofobicidad superficial teórica

Las hidrofobicidad superficial se estimó como se describe en el trabajo realizado por Henríquez *et al.* (2004).

En el caso de una proteína modificada por la adición de una cola, Simeonidis (2004) propone considerar que la hidrofobicidad de la proteína permanece constante y que sólo se debe sumar la contribución relativa que ejerce cada aminoácido (según la escala de Miyasawa y Jernigan) de la cola en la hidrofobicidad superficial de la proteína.

Para el caso de la secuencia de la cutinasa con la cola YPYYP errónea, se estimó la hidrofobicidad de toda la cola obtenida (YPY\*), cuya secuencia aminoacídica es:

**N—YPYQSLVNSRPPAGRPYGRAPNAWMLAEFHSKCP—C**

Los incrementos de las hidrofobicidades superficiales teóricas debido solo a la cola hidrofóbica se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 6: "Hidrofobicidad superficial teórica de las colas hidrofóbicas"**

<b>Secuencia</b>	<b>Hidrofobicidad Superficial Teórica</b>
Extremo WPWP	0,048
Extremo YYY	0,036
Extremo YPY*	0,157

La hidrofobicidad superficial para la secuencia correcta YPYYP tendría un valor de 0,041.

De la Tabla 6 se deducen las hidrofobicidades de la cutinasa mutada con las distintas colas (datos de hidrofobicidad y área superficial para cada aminoácido está disponible en Anexo D), las cuales se muestran a continuación:

**Tabla 7: "Hidrofobicidad superficial teórica de las enzimas modificadas".**

<b>Secuencia</b>	<b>Hidrofobicidad</b>	<b>% Aumento c/r a Cutinasa Nativa</b>
Cutinasa	0,290	0
Cutinasa-WPWP	0,338	16,6
Cutinasa-YYY	0,326	12,4
Cutinasa-YPY*	0,447	54,1

El valor para la Cutinasa modificada con la cola correcta YPYYP tendría una hidrofobicidad de 0,331; siendo este valor un 14,1% mayor con respecto a la cepa nativa.

En el caso de la cutinasa mutada con la cola YPY\* la hidrofobicidad estimada ya no sería confiable, pues el supuesto de una total exposición de los aminoácidos que la componen se debilita al extenderse la longitud de la cola, debido a que ésta podría interactuar con otras regiones de la proteína. Es por esto que se asumiría que la cola mutada YPY\* tiene una hidrofobicidad superficial mayor a 0,331, esto con el fin de poder realizar comparaciones.

Se descartó analizar en mayor detalle la estructura terciaria de esta cutinasa mutada ya que se escapa de los objetivos propuestos, además de no encontrar una secuencia homóloga de estructura conocida para poder realizar una modelación de su estructura tridimensional.

### **3.5 Producción de enzimas modificadas**

Las cepas recombinantes obtenidas se cultivaron en cuadruplicado y se indujo la expresión como se indica en la sección 2.2.11. La nomenclatura utilizada hace referencia a la semana de experimentación, siendo por ejemplo Periplasma 1 la fracción periplasmática obtenida en el experimento 1, Periplasma 2 al obtenido en el experimento 2 y así sucesivamente.

El análisis de actividad y la cuantificación de proteína total, obtenidos de las fracciones periplasmáticas de los cultivos, se muestran en los gráficos de la figura a continuación:

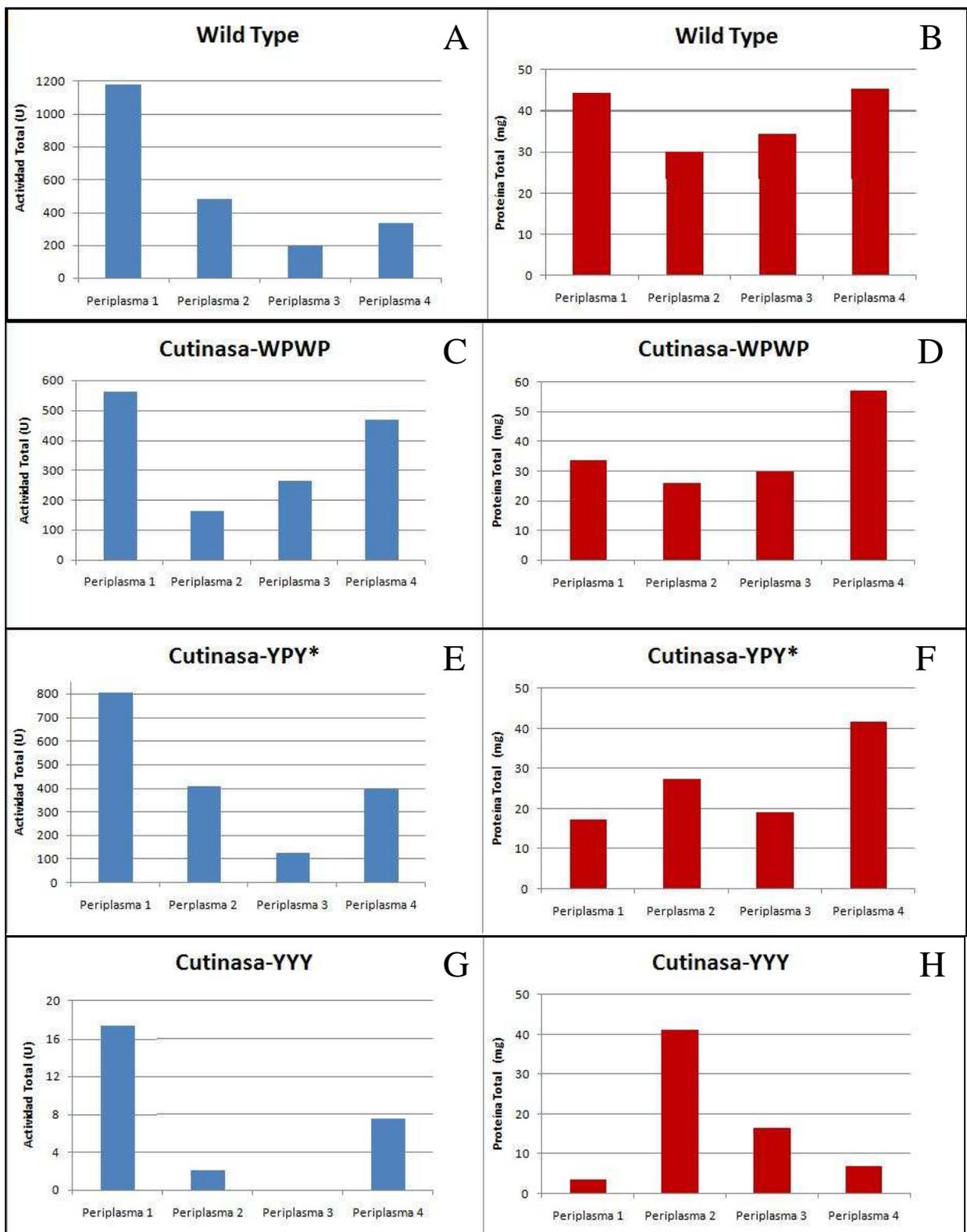


Figura 14: “Actividad Total y Proteína Total de la fracción periplasmática correspondiente a cada cutinasa modificada con las colas hidrofóbicas”.

En las fracciones periplasmáticas de la cepa nativa de cutinasa y de la cutinasas mutadas con las colas WPWP, YPY\* e YYY (Figura 14) se muestran resultados variables tanto en la proteína total obtenida como en la actividad total de éstas, a pesar de haber utilizado las mismas condiciones para el crecimiento e inducción de los cultivos, como también en el protocolo de extracción de esta fracción. A pesar de lo anterior la actividad específica para las enzimas con las colas WPWP e YPY\* no difieren en gran magnitud con respecto a la enzima nativa.

Se muestra a continuación la variabilidad antes mencionada, reflejada en el error positivo y negativo (valor absoluto del promedio de datos menos el máximo o mínimo valor) de la serie de datos y a continuación la tabla de datos correspondiente.

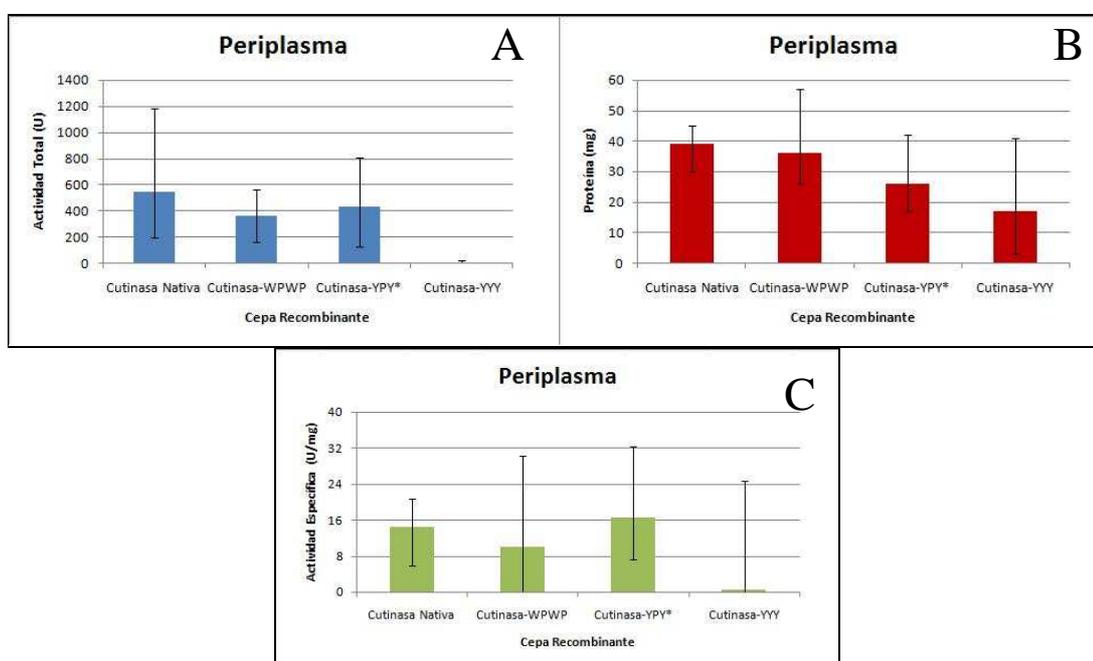


Figura 15: "Variabilidad de los datos obtenidos".

Tabla 8: "Promedio y desviación estándar de los resultados obtenidos".

Wild Type				WPWP			
Fracción	Actividad Total (U)	Proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Fracción	Actividad Total (U)	Proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg)
Periplasma 1	1183	44	26,89	Periplasma 1	563	34	16,56
Periplasma 2	486	30	16,20	Periplasma 2	163	26	6,27
Periplasma 3	200	35	5,71	Periplasma 3	265	30	8,83
Periplasma 4	335	45	7,44	Periplasma 4	469	57	8,23
<b>Promedio</b>	<b>551</b>	<b>39</b>	<b>14</b>	<b>Promedio</b>	<b>365</b>	<b>37</b>	<b>10</b>
Error +	632	7	13	Error +	198	20	7
Error -	351	9	9	Error -	202	11	4

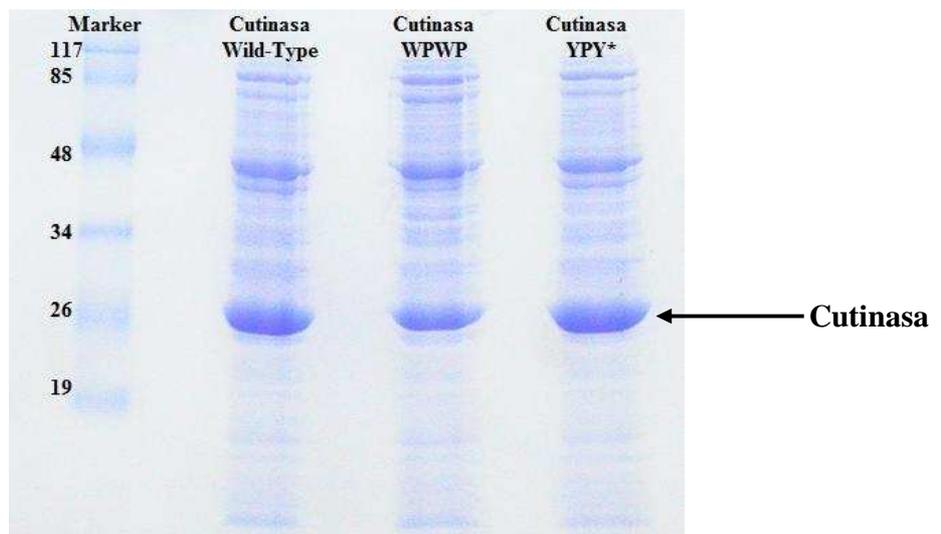
YPY*				YYY			
Fracción	Actividad Total (U)	Proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Fracción	Actividad Total (U)	Proteína (mg)	Actividad Específica (U/mg)
Periplasma 1	808	17	47,53	Periplasma 1	17	3	5,67
Periplasma 2	408	27	15,11	Periplasma 2	2	41	0,05
Periplasma 3	126	19	6,63	Periplasma 3	0	16	0,00
Periplasma 4	400	42	9,52	Periplasma 4	8	7	1,14
<b>Promedio</b>	<b>436</b>	<b>26</b>	<b>17</b>	<b>Promedio</b>	<b>7</b>	<b>17</b>	<b>0,40</b>
Error +	373	16	31	Error +	10	24	5
Error -	310	9	10	Error -	7	14	0

Dicha variabilidad podría deberse a que ante una mínima diferencia en la densidad de inoculación de los cultivos genera un crecimiento desigual y por ende una producción desigual de proteína. Es posible, también, que hubiese habido pequeños cambios en el tiempo de crecimiento o inducción que pudiesen afectar la producción de proteína o que durante las etapas de extracción de proteína desde las fracciones celulares se perdió mucha enzima, debido a errores en la manipulación de las muestras.

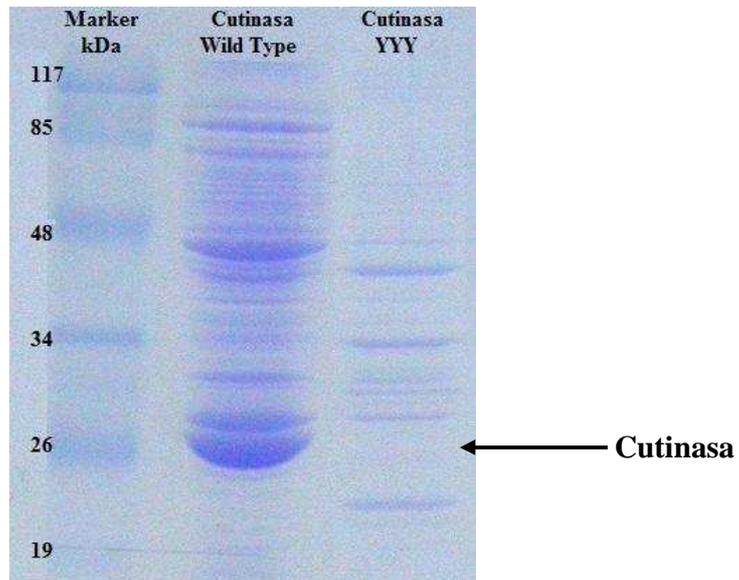
Por otro lado, la cepa mutada con la cola YYY muestra escasa actividad total, siendo interesante la relación que muestra con la proteína total en la muestra, ya que se aprecia que ante una menor cantidad de proteína hay una mayor actividad, indicio de que la enzima estaría formando agregados, interactuando con membranas u otras proteínas intracelulares o simplemente su expresión se vio afectada durante la inducción.

Tanto la tabla con los resultados obtenidos en los experimentos como los gráficos para las otras fracciones proteicas de los cultivos se muestran en el Anexo E y F respectivamente.

Se corroboraron los pesos moleculares de la proteína nativa y de las mutadas en la fracción periplasmática mediante geles SDS, que se muestran en las Figuras 16 y Figura 17.



**Figura 16:** "Gel de Poliacrilamida con las muestras periplasmáticas de la cepa nativa y las modificadas con las colas WPWP e YPY\* (Periplasma 2)".



**Figura 17:** "Gel de Poliacrilamida con la muestra periplasmática de la cepa modificada con la cola YYY (Periplasma 2)".

En la Figura 16 se puede apreciar que el tamaño de las proteínas mutadas es similar al de la cepa de cutinasa nativa (aprox. 24 kDa). No se aprecian bandas extrañas o ausencia de ellas en las mutadas respecto a la cepa nativa. La diferencia en la intensidad de las bandas se debería a que la concentración de proteínas en las muestras fue distinta entre ellas, ya que fueron tomadas directamente de la fracción extraída.

En el caso de la enzima mutada con la cola YYY (Figura 17) se ve claramente una ausencia casi total de la banda correspondiente a la cutinasa mutada, indicio de que la mutación afectó la expresión de esta enzima. Se realizó un gel para cada muestra obtenida, pero se omiten las otras fotografías por presentar el mismo resultado en todos los casos.

El resto de las fotografías correspondientes a las otras fracciones se muestran en el Anexo G.

### **3.6 Purificación de las fracciones periplasmáticas**

En esta sección se describen las cromatografías realizadas a las muestras correspondientes a las fracciones periplasmáticas de los 4 experimentos realizados.

Se decidió descartar el cromatograma correspondiente al primer experimento ya que durante la ejecución de los experimentos de HIC se detectaron problemas de alza de presión en la columna lo que fue indicio de que ésta quedó mal empacada. Se decidió empacar una nueva columna con resina fresca y se procedió a realizar el segundo HIC que no tuvo problemas de ningún tipo. Por otro lado, no fue posible analizar cromatográficamente las muestras correspondientes a cutinasa-YYY debido a la baja cantidad de enzima obtenida.

A continuación, se pueden observar los cromatogramas obtenidos correspondientes a las muestras de cutinasa nativa y a las 2 modificadas cutinasa-WPWP y cutinasa-YPY\*.

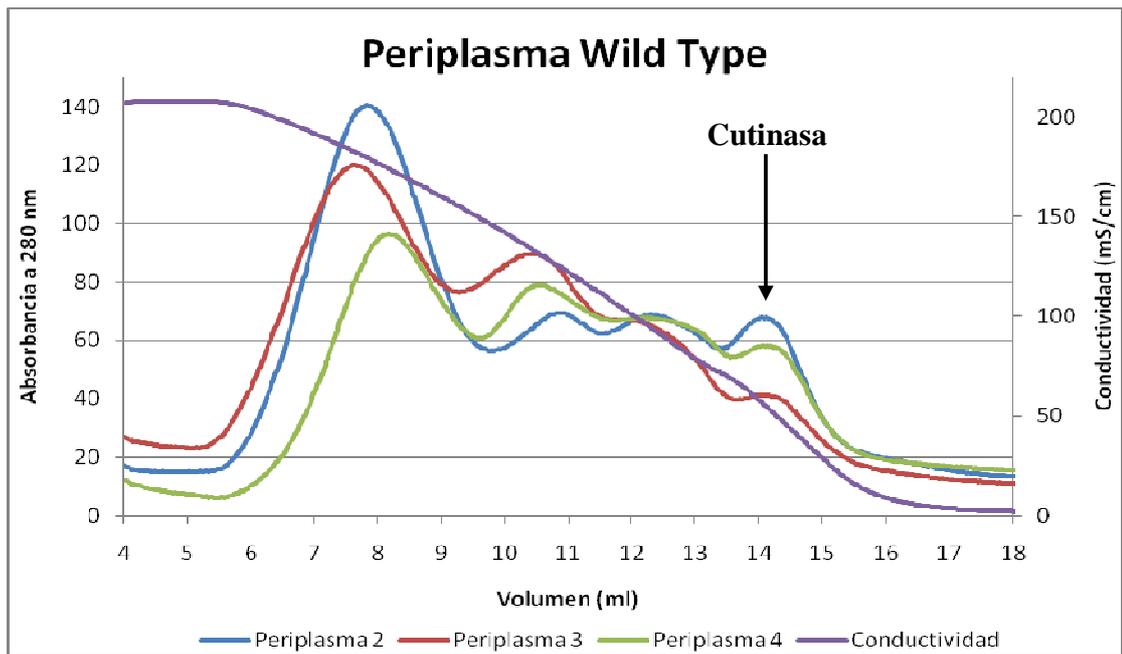


Gráfico 1: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de cutinasa Wild-Type".

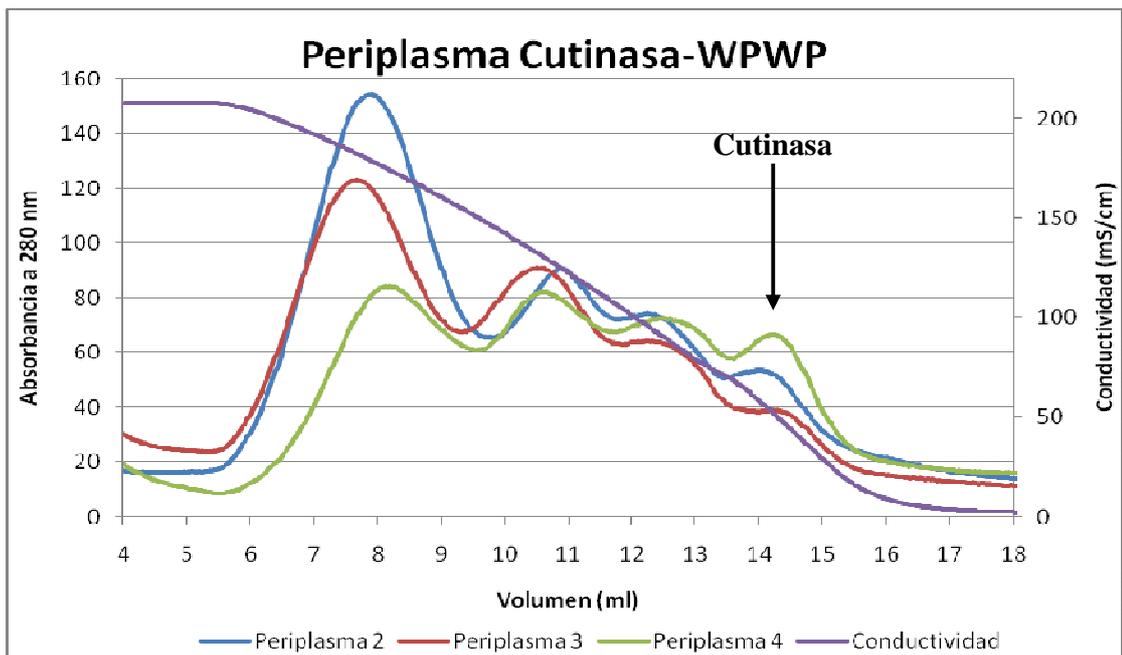


Gráfico 2: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de Cutinasa-WPWP".

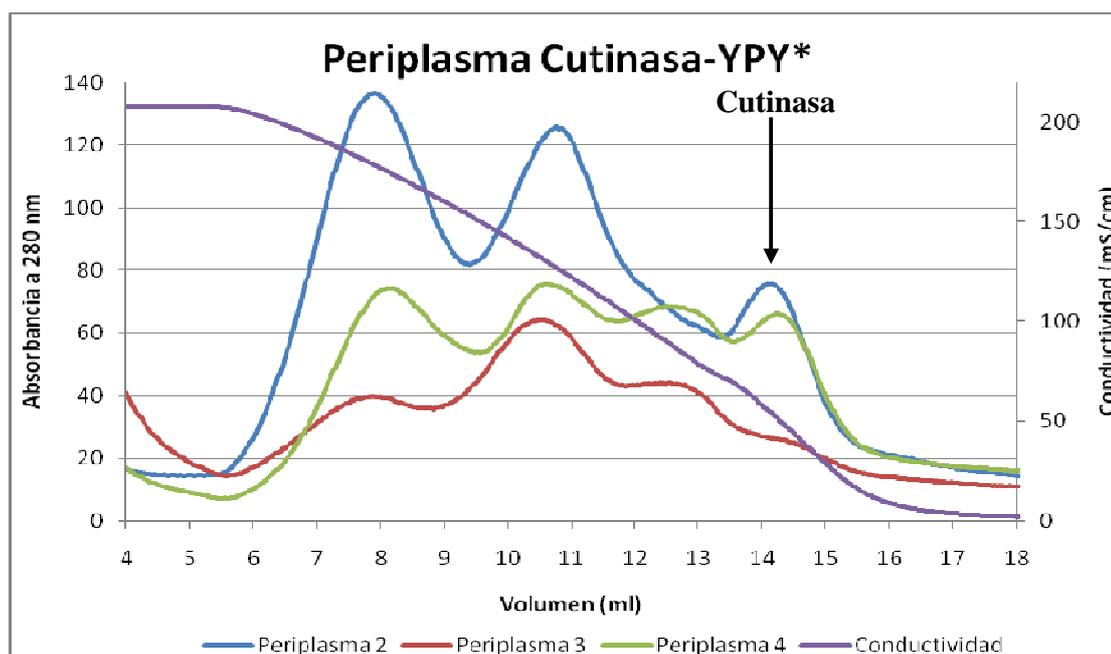


Gráfico 3: "Cromatogramas correspondientes a las HIC realizadas a las muestras de Cutinasa-YPY\*".

En los tres gráficos anteriores es posible observar una tendencia similar, pudiéndose identificar 4 peaks marcados de proteínas, siendo el ultimo el correspondiente a cutinasa nativa o modificadas. La diferencia de dichos peaks entre un experimento y otro se debería a las diferentes concentraciones de proteínas obtenidas luego de la extracción periplasmática.

La presencia de cutinasa en el último peak se corroboró mediante análisis de actividad de las fracciones obtenidas, además de separaciones electroforéticas. A continuación se muestra un gráfico con los datos y una fotografía de la electroforesis realizada con las fracciones obtenidas de la muestra del experimento 4 como ejemplo para cada caso, siendo omitidos los análisis realizados a las muestras de los otros experimentos por presentar iguales resultados. Las Tablas de datos de los gráficos a continuación pueden ser encontradas en el Anexo H.

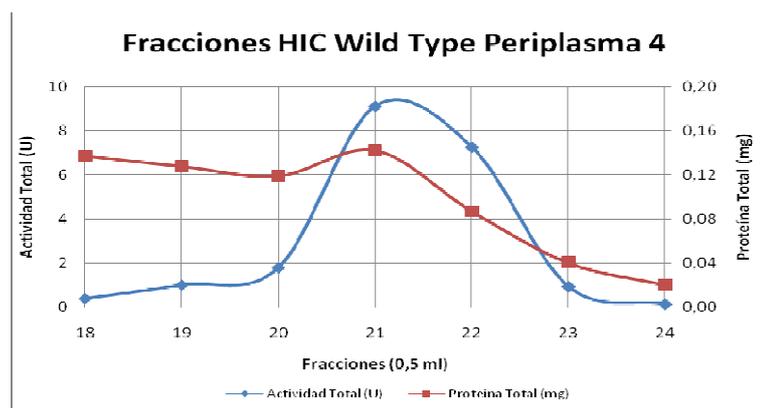


Gráfico 4: "Actividad y Proteína Total de las fracciones colectadas en la HIC de Cutinasa-Wild Type de Periplasma 4."

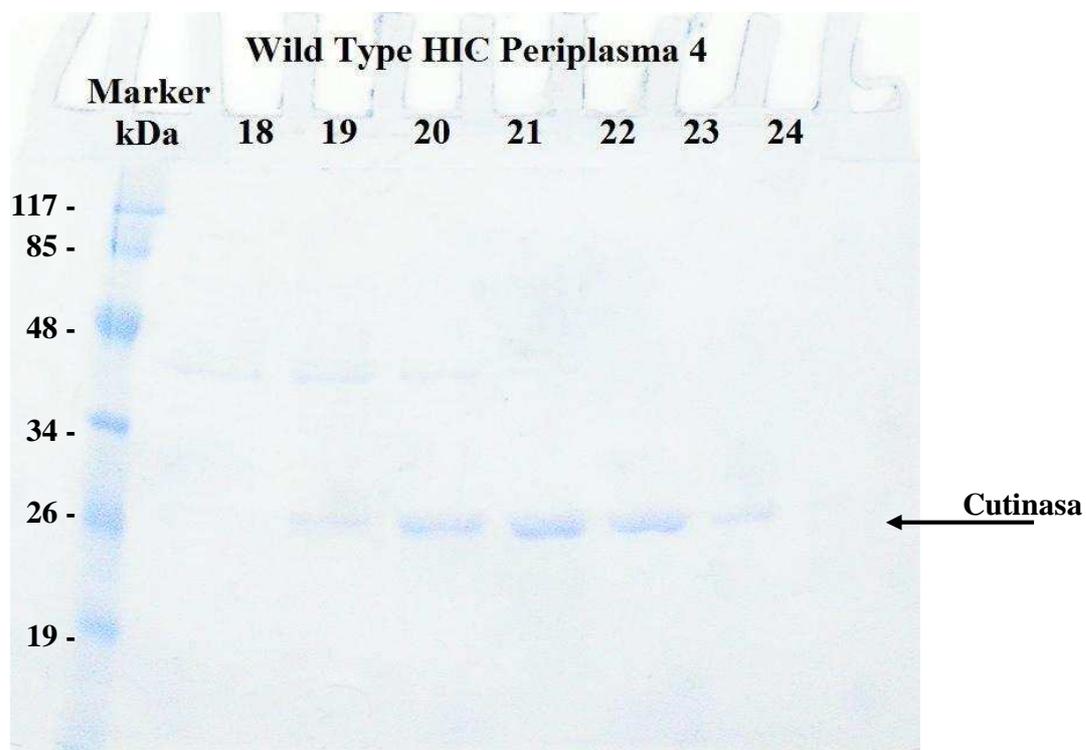


Figura 18: "Gel de poliacrilamida con las fracciones obtenidas en la HIC del periplasma de Cutinasa Wild-Type".

Se observa en la Gráfico 4 que las fracciones 20, 21 y 22 concentran el máximo peak de actividad y proteína total siendo esto corroborado en la Figura 18 al observarse bandas de intensidad considerable en dichas fracciones.

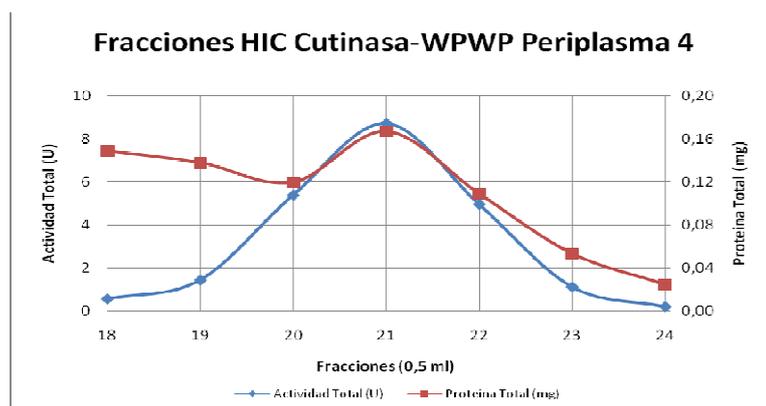


Gráfico 5: "Actividad y Proteína Total de las fracciones colectadas en la HIC de Cutinasa-WPWP de Periplasma 4."

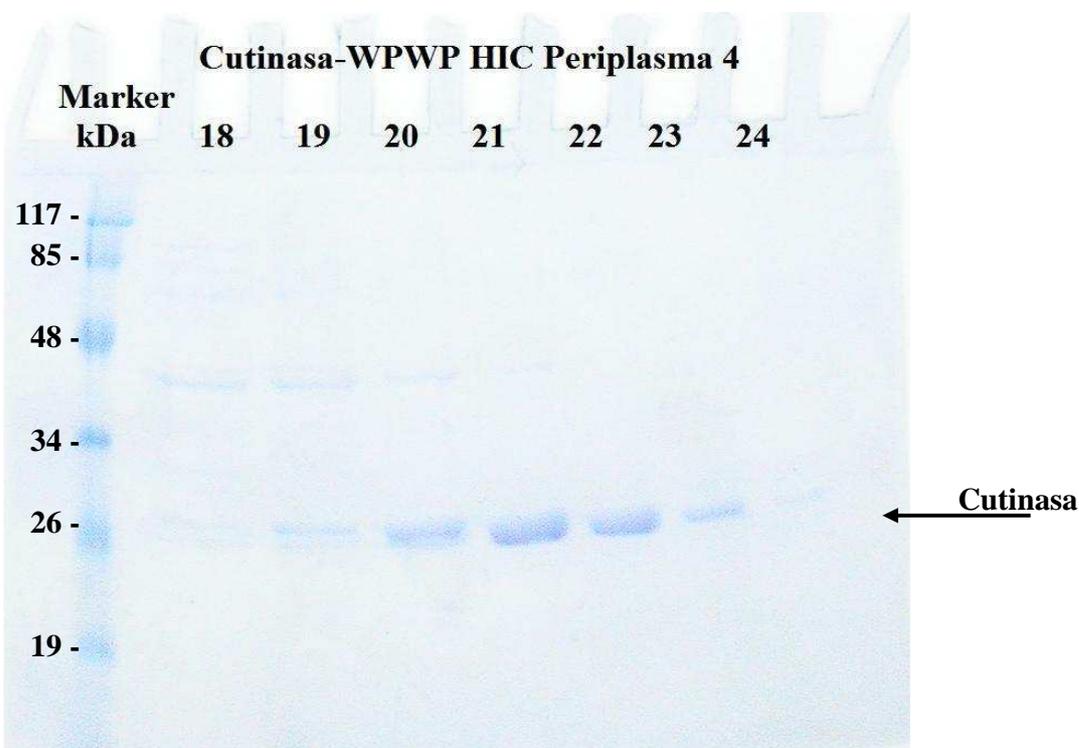


Figura 19: "Gel de poliacrilamida con las fracciones obtenidas en la HIC del periplasma de Cutinasa-WPWP"

En lo anterior también es posible observar que para el HIC realizado a la muestra de cutinasa-WPWP las mayores concentraciones de proteína total y actividad se concentran en las fracciones 20, 21 y 22.

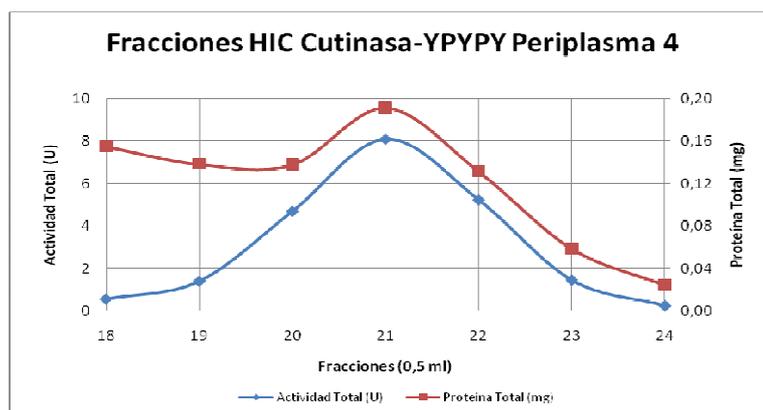


Gráfico 6: "Actividad y Proteína Total de las fracciones colectadas en la HIC de Cutinasa-YPY\* de Periplasma 4."

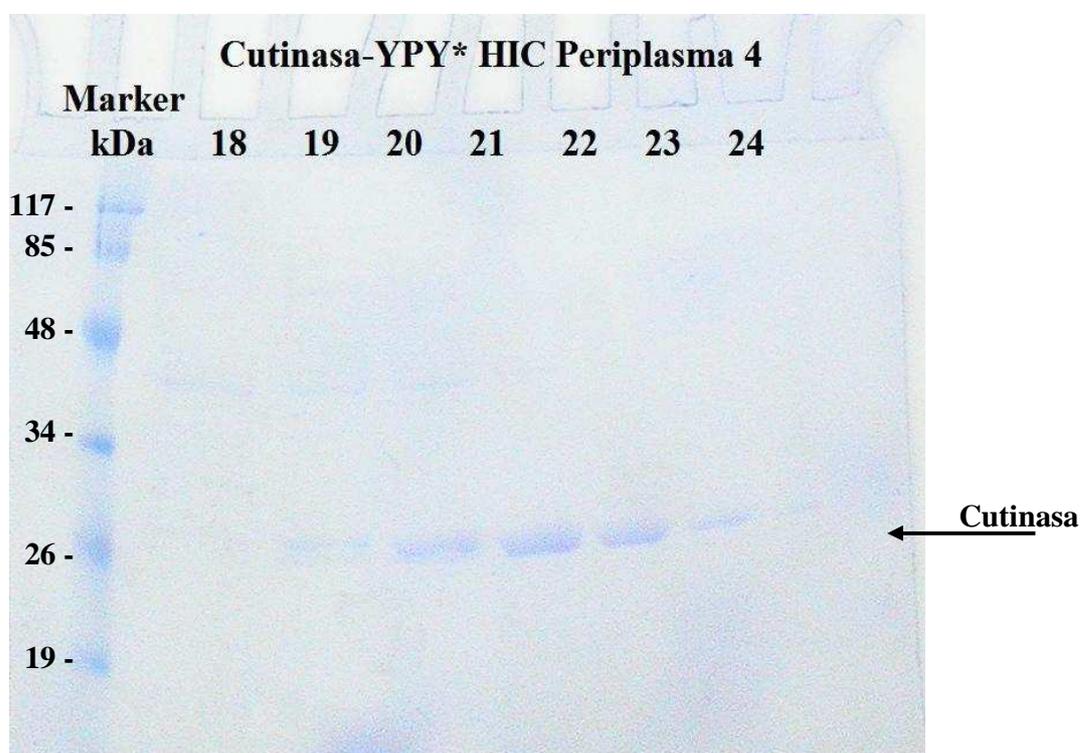


Figura 20: "Gel de poliacrilamida con las fracciones obtenidas en la HIC del periplasma de Cutinasa-YPY\*"

Para esta muestra, se mantiene la tendencia, y las fracciones 20, 21 y 22 concentran la mayor cantidad de cutinasa mutada.

Se calculó la pureza de las muestras, como se describe en la sección 2.2 15.3 siendo los resultados los que muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9: "Estimación de la Pureza de las Fracciones obtenidas en la HIC de Periplasma 4".**

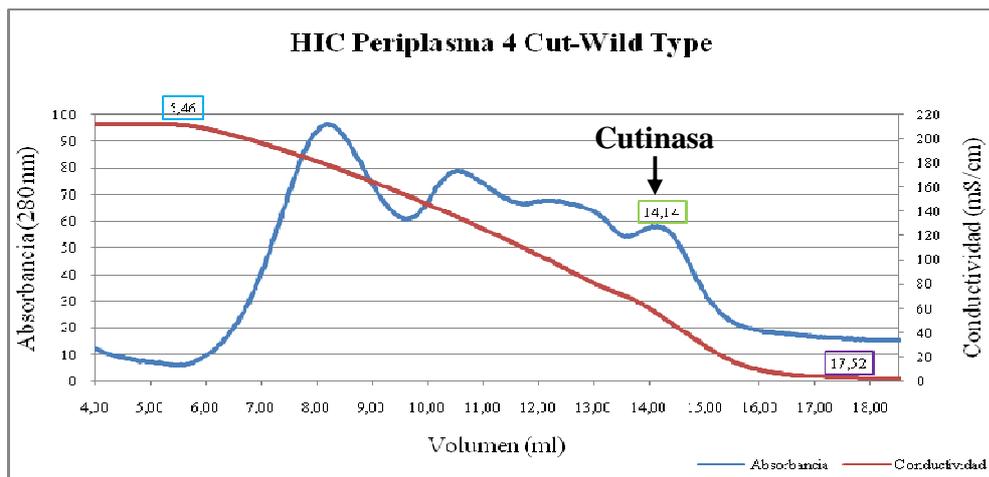
Variante	% Pureza						
	F18	F19	F20	F21	F22	F23	F24
Wild Type	37	49	80	98	99,9	99,9	99,9
Cut-WPWP	45	52	83	99,9	99,9	99,9	99,9
Cut-YPY*	42	55	84	99,9	99,9	99,9	99,9

Los datos correspondientes a las muestras de los Experimentos 2 y 3 se omiten por presentar la misma tendencia a los ya presentados.

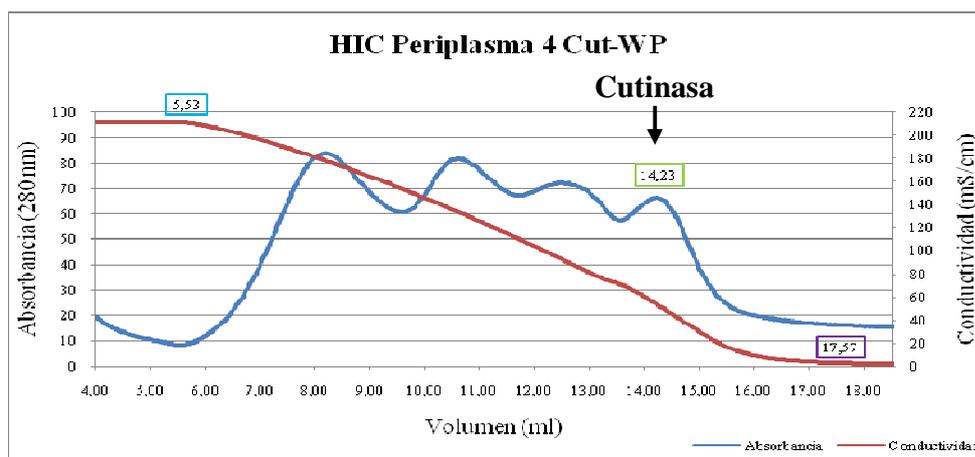
### 3.7 Estimación del tiempo de retención adimensional (DRT)

Se estimaron los tiempos de retención en HIC de la cutinasa nativas y modificadas. A continuación se muestra el análisis para la muestra Periplasma 4 y en el Anexo I es posible encontrar los resultados para las muestras Periplasma 2 y 3.

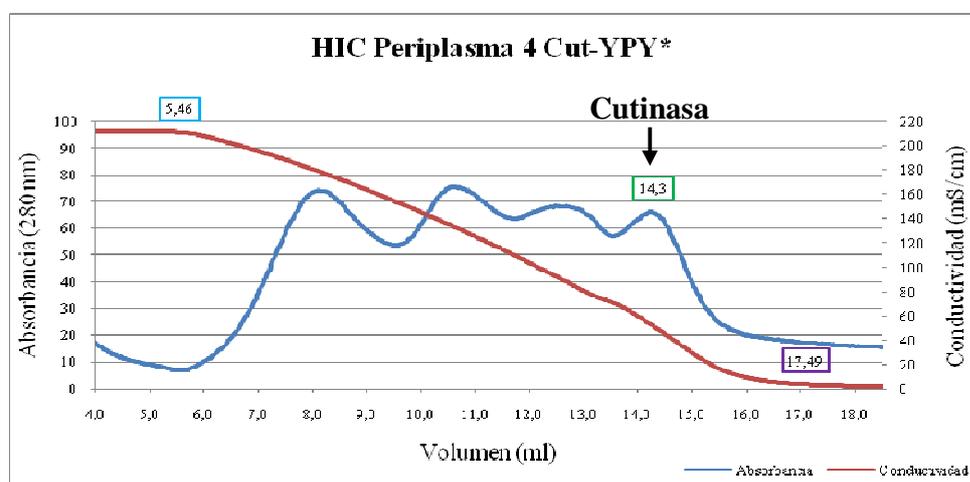
Se estimaron gráficamente los parámetros  $V_0$  (Volumen inicial donde comienza el gradiente decreciente de sal),  $V_f$  (Volumen final donde termina el gradiente decreciente de sal) y  $V_r$  (Volumen de elución del peak de la proteína que corresponde a Cutinasa nativa o modificada, como se muestra en los Gráficos 7,8 y 9.



**Gráfico 7: "Estimación de DRT para Periplasma 4 de Cutinasa Wild-Type".**



**Gráfico 8: "Estimación de DRT para Periplasma 4 de Cutinasa-WPWP".**



**Gráfico 9: "Estimación de DRT para Periplasma 4 de Cutinasa-YPY\*".**

Encontrados los parámetros, se procedió a estimar los DRT correspondientes a cada muestra, los cuales se muestran en la Tabla 10.

**Tabla 10: "DRT de las cutinasas nativa y modificadas de la muestra Periplasma 4".**

<b>Periplasma 4</b>			
	<b>Wild Type</b>	<b>WP</b>	<b>YPY*</b>
<b>Vo (ml)</b>	5,46	5,53	5,46
<b>Vf (ml)</b>	17,52	17,57	17,49
<b>Vr (ml)</b>	14,14	14,23	14,3
<b>DRT</b>	<b>0,720</b>	<b>0,723</b>	<b>0,735</b>
<b>% Diferencia con respecto a Wild Type</b>	<b>0</b>	<b>+ 0,4</b>	<b>+ 2,1</b>

También se calculó el porcentaje de incremento del DRT de las enzimas mutadas respecto de la nativa, siendo un 0,4% mayor la de la cutinasa-WPWP y un 2,1% la cutinasa-YPY\*, para este caso.

La tabla resumen, correspondiente a la estimación realizada para los 3 experimentos se muestra a continuación:

**Tabla 11: "DRT estimados para las muestras de cutinasa nativa y modificadas".**

Muestra	DRT		
	Wild Type	WPWP	YPY*
Periplasma 2	0,713	0,721	0,746
Periplasma 3	0,718	0,735	0,764
Periplasma 4	0,720	0,723	0,735
Promedio	0,717	0,726	0,748
Desviación estándar	0,004	0,008	0,015

### 3.8 Relación entre hidrofobicidad superficial y DRT

En la siguiente tabla, se procede a comparar los resultados obtenidos:

**Tabla 12: "Comparación Hidrofobicidad-Tiempos de Retención."**

Secuencia	Hidrofobicidad	DRT Promedio	% Variación DRT c/r a la cepa nativa	% Variación Hidrofobicidad c/r a la cepa nativa
Cutinasa Nativa	0,29	0,717	0	---
Cutinasa-WPWP	0,338	0,726	+ 1,25	+ 16,6
Cutinasa-YPY*	> 0,331	0,748	+ 4,18	> + 14,1
Cutinasa-YYY	0,326	No Determinado	No determinado	+ 12,4

Es posible observar que ante un aumento en la hidrofobicidad superficial de la enzima hay un aumento del Tiempo de Retención Adimensional, siendo de un 1,25% en promedio para la Cutinasa-WPWP y de un 4,18% para la Cutinasa-YPY\*. Para el caso de la Cutinasa-YYY no se pudo obtener una relación, ya que los cultivos no permitieron obtener una concentración significativa de enzima para poder realizar la correspondiente purificación mediante HIC.

## 4 CONCLUSIONES

Se encontró que las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa *E.coli* recombinante que expresa la cutinasa nativa de *Fusarium solani pisi* es a 25°C, mientras que la inducción a 18°C evita pérdidas considerables de proteína al sobrenadante pero se obtiene un menor nivel de actividad total, mientras que una inducción a 25°C otorga mayor producción de enzima pero una mayor pérdida en otras fracciones subcelulares.

Es posible modificar proteínas mediante la adición de pequeñas secuencias de aminoácidos hidrofóbicos. Esta modificación se logró exitosamente en 2 de los 3 casos planteados, ya que se obtuvo en uno de ellos una cola hidrofóbica más larga de lo esperado y con una combinación aleatoria de aminoácidos de todo tipo (YPY\*).

Se pudo observar una alta variabilidad (en algunos casos en más de un 50%) en los resultados obtenidos, en cuanto a cantidad de proteína y actividad total presente en las fracciones periplasmáticas de los cultivos, a pesar de utilizar iguales condiciones tanto durante las etapas de crecimiento e inducción, como durante los protocolos de extracción de las proteínas. Es posible que esto pueda deberse a errores en la inoculación de los cultivos durante la experimentación o pequeñas variaciones en los tiempos de crecimiento e inducción.

La expresión y recuperación en los casos en que se modificó la enzima con las colas WPWP e YPY\* no se vio afectada, pudiéndose recuperar enzima con una actividad específica muy similar a la nativa, aunque una afirmación concluyente debería estar apoyada en resultados con menor variabilidad.

Con respecto a la purificación de las enzimas nativa y de las modificadas WPWP e YPY\* se pudo comprobar experimentalmente que con la adición de las colas hidrofóbicas se incrementa la hidrofobicidad superficial de la cutinasa, pero sin embargo se logra una elución levemente diferenciada a la enzima nativa.

En el caso de la cepa de cutinasa mutada con el extremo YYY, se observó una escasa producción de enzima, y por ende, una banda casi nula en la correspondiente separación electroforética de éstas.

Dado que se corroboró que la secuencia estuviera correcta mediante el secuenciamiento del plasmidio, es posible decir que una combinación de aminoácidos totalmente hidrofóbicos provocaría, para este caso, la casi nula expresión de esta enzima o en el caso de que sí se expresara, estaría formando agregados o quedando como proteína de membrana, siendo prácticamente imposible recuperarla desde la fracción insoluble del cultivo. Cabe recordar que el aminoácido prolina (P) otorgaría una total exposición a la cola hidrofóbica más que incremento en la hidrofobicidad superficial. Se decidió descartar esta cepa mutada en las etapas siguientes de análisis.

Con respecto al proceso de purificación, es posible apreciar en los cromatogramas obtenidos una tendencia muy similar en todas las muestras, observándose 4 peaks marcados de proteínas, siendo el último peak el más hidrofóbico y correspondería a la cutinasa nativa o modificada. En los 3 casos estudiados se observa que la enzima eluye principalmente a los 14 ml de los HIC realizados, y su pureza no varió significativamente entre una cepa y otra.

Los tiempos DRT fueron calculados gráficamente, obteniéndose diferencias porcentuales (promedios) para la Cutinasa-WPWP de un 1,25 % y para la Cutinasa-YPY\* de un 4,18%, ambas respecto al DRT de la cepa nativa.

Es posible concluir que el aumento de la hidrofobicidad superficial de la proteína, debida a la adición de una secuencia corta de aminoácidos hidrofóbicos, permite elevar levemente el DRT de la enzima mutada.

Dentro de las alternativas propuestas no es posible definir que combinación de aminoácidos es la mejor, en cuanto a mejoras en la recuperación y purificación de esta enzima, ya que solo se tiene una enzima exitosamente mutada con las secuencias de interés y que es expresada por la cepa recombinante.

Una regla cualitativa muy preliminar para la elección de la secuencia hidrofóbica a adicionar contemplaría incorporar el aminoácido prolina con el fin de asegurar a priori la total exposición de la cola.

Dicho criterio, sin embargo, deberá ser apoyado realizando el mismo trabajo experimental teniendo como objetivo estudiar la enzima mutada únicamente con un mayor o menor número de tirosinas y corroborar que la ausencia prolina en la secuencia produciría una disminución drástica en la recuperación de la proteína.

Finalmente, con el fin de confirmar el criterio antes mencionado, se recomienda proseguir el estudio con otras secuencias para las mutaciones, variando tanto la longitud como la combinación de los aminoácidos W, P e Y, con el fin de corroborar la importancia de un aminoácido (P), que le de rigidez al extremo, en la recuperación de la proteína.

## 5 BIBLIOGRAFIA

### 5.1 Referencias

1. Belter P, Cussler E.L., Hu W. Processing for Biotechnology. John Wiley & Sons, New York, 1988, pp 368.
2. Calado, C.R.C., Ferreira, B.S., Da Fonseca, M.M.R., Cabral, J.M.S., Fonseca, L.P. Integration of the production and the purification processes of cutinase secreted by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* SU50 strain. Journal of Biotechnology. 2004. **109**: 147-158.
3. Dantzig, A.H., Zuckerman, S.H. and Andonov-Roland, M.M. Isolation of a *Fusarium* mutant reduced in cutinase activity and virulence. 1986. Journal of Bacteriology **168**: 911-916.
4. Dill, K.A. Dominant forces in protein folding. 1990. Biochemistry **29**: 7133-7155.
5. Egmond, M.R., Vlieg, J., Verheij, H.M. and de Haas, G.H. Strategies and design of mutations in lipases. In: Engineering of/with lipases, F.X. Malcata, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1996, 297-327.
6. Egmond, M.R. and van Bommel, C.J. Impact of structural information on understanding lipolytic function. In: Methods in Enzymology 284, B. Rubin and E.A. Dennis. New York, Academic Press, 1997, pp 119-129.
7. Eriksson, K. Hydrophobic Interaction Chromatography. Protein purification: Principles, High-Resolution Methods and Applications. New York. 1998. pp 283-309.

8. Fexby, S. Bullock, L. Hydrophobic peptide tags as tools in bioseparations, *S. Direct.* 2004, **22(10)**.
9. Genencor. Increasing pharmacological effect of agricultural chemicals. U.S. 1988. Patent 88-08945.
10. Genencor. Cutinase for use in detergent composition produced by culturing *Pseudomonas putida*. U.S. 1989. Patent 89-02922.
11. 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
12. Jelsch, C., Longhi, S. and Cambillau, C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. 1998. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **31**:320-333.
13. Lienqueo, M.E. Desarrollo de un sistema experto para la selección racional de procesos de purificación de proteínas: optimización de criterios de selección de secuencias. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería, Universidad de Chile, Santiago. 1999.
14. Lin, T. S. and Kolattukudy, P.E. Structural studies on cutinase, a glycoprotein containing novel amino acids and glucuronic acid amide at the N terminus. 1980. *European Journal of Biochemistry* **106**:341-351.
15. Longhi, S., Czjzek, M., Lamizin, V., Nicolas, A. and Cambillau, C. Atomic resolution (1.0 Å) crystal structure of *Fusarium solani* cutinase: stereochemical analysis. 1997b. *Journal of Molecular Biology* **268**:779-799.

16. Martinez, C., Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. and Cambillau, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. 1992. *Nature* **356**: 615-618.
17. Murphy, C.A., Cameron, J.A., Huang, S.J. and Vinopal, R.T. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. 1996. *Applied and Environmental Microbiology* **62**:456-460.
18. Neves-Petersen María Teresa, Petersen E., Fojan P., Noronha M., Madsen R., Petersen S. "Engineering the pH-optimum of a triglyceride lipase: from predictions based on electrostatic computations to experimental results". 2001
19. Okkels, J.S. Preparing polypeptide variants with improved functional properties. U.S. 1997a. Patent 97-09664.
20. Okkels, J.S. Preparing polypeptide variants with improved functional properties. U.S. 1997b. Patent 97-05736.
21. Petersen, M.T.N., Martel, P., Petersen, E.I., Drabløs, F. and Petersen, S.B. Surface and electrostatics of cutinases. In: *Methods in Enzymology* 284, B. Rubin and E.A. Dennis. New York, Academic Press, 1997, pp 130-154.
22. Purdy, R. E. and Kolattukudy, P.E. Hydrolysis of plant cutin by plant pathogens. Purification, amino acids composition, and molecular weight of two isoenzymes of cutinase and a nonspecific esterase from *Fusarium solani f. pisi.*. 1975. *Biochemistry* **14**:2824-2831.
23. Roe, S. Separation based on structure. *Protein purification methods: a practical approach.* Elv Harris and S. Angal, IRL press. Oxford. 1989. pp 221-232.

24. Rogalska, E., Nury, S., Douchet, I. and Verger, R. Lipase stereo- and regio-selectivity towards tri- and diacylglycerols. 1997. *Biochemical Society Transactions* **25**: 161-164.
25. Sebastian, J., Chandra, A.K. and Kolattukudy, P.E. Discovery of a cutinase-producing *Pseudomonas* sp. Cohabiting with an apparently nitrogen-fixing *Corynebacterium* sp. in phyllosphere. 1987. *Journal of Bacteriology* **169**:131-136.
26. Simeonidis E. Synthesis of optimal peptide tags and downstream protein processing, 2004. *Biotechnology Progress*, **21** (3), 875-884
27. 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.
28. Stevens R.C. Design of high-throughput methods of protein production for structural biology. *Structure*, 2000, **8**: R177-R185.
29. Soliday, C.L. and Kolattukudy, P.E. Primary structure of the active site region of fungal cutinase, an enzyme involved in phytopathogenesis. 1983. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **114**:1017-1022.
30. Unilever. Enzyme-containing surfactant compositions. U.S. 1994a. Patent 94-04771.

## 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**, **Leucina** e **Isoleucina**. **Glicina**, debido a su pequeño tamaño, genera un mínimo impedimento estérico permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. **Prolina**, por el contrario, al poseer un segundo grupo amino mantiene una conformación rígida.

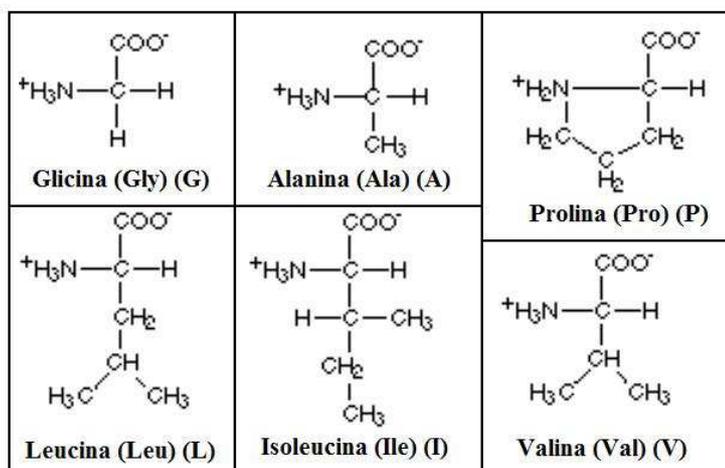


Figura 21: "Aminoácidos con Grupo R hidrofóbico (Alifáticos)".

**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.

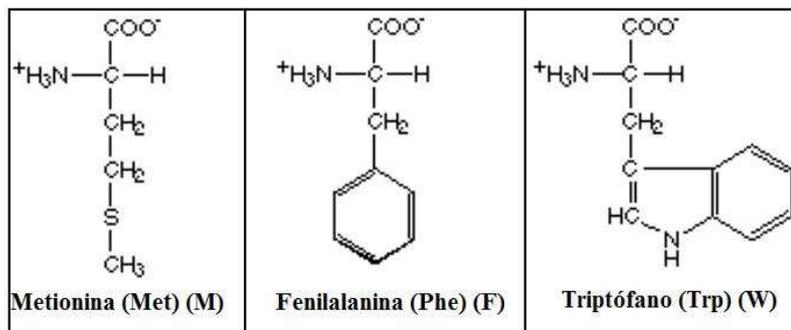


Figura 22: "Aminoácidos con Grupo R Hidrofóbico (Aromáticos)".

**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, Cisteína, Metionina, Asparagina y Glutamina.

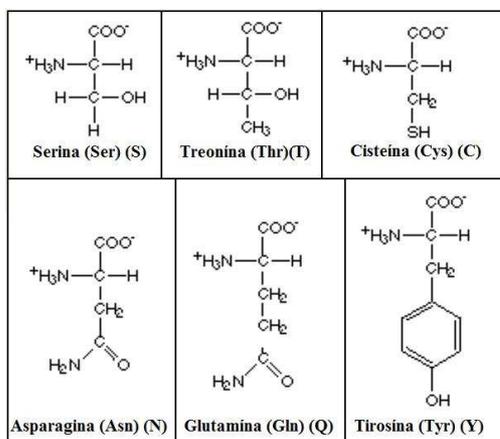


Figura 23: "Aminoácidos con Grupo R polar y sin carga".

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

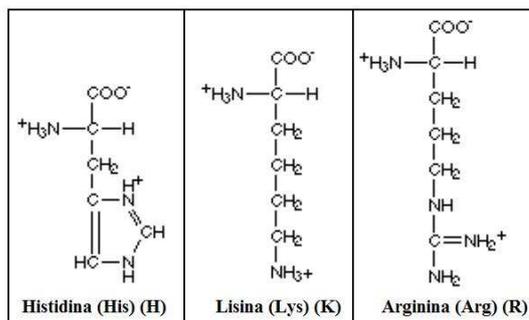


Figura 24: "Aminoácido con Grupo R cargado positivamente".

**Grupos R cargados 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 halla completamente ionizado y por tanto cargado negativamente a pH 6 y 7.

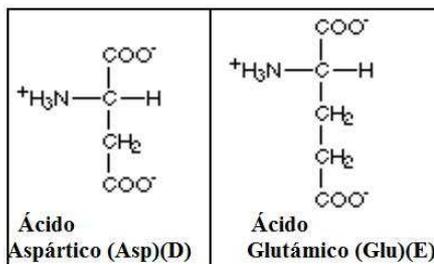


Figura 25: "Aminoácidos con Grupo R cargado negativamente".

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

### **Medios de Cultivo Líquidos**

**Medio Luria-Bertani (LB):** El medio LB contiene por cada 1.000 mL de solución: 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura y 10 gr de cloruro de sodio. El volumen se lleva a 1.000 mL con agua Milli-Q y el pH se ajusta a 7. Se esteriliza por autoclave.

**Medio SOB:** El medio SOB contiene por cada 1.000 mL: 20 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura y 0,5 gr de cloruro de sodio. El volumen se lleva a 985 mL con agua Milli-Q y se ajusta el pH a 7. Se esteriliza por autoclave.

**Medio LB más ampicilina:** Este medio por cada 1.000 mL contiene: 10 gr de triptona, 5 gr de extracto de levadura y 10 gr de cloruro de sodio. El volumen se lleva a 1.000 mL con agua Milli-Q y se esteriliza por autoclave. Previa a su utilización se le agrega ampicilina estéril a una concentración final de 100 µg/mL.

### **Medios de Cultivos Sólidos**

**Placas LB con Ampicilina:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 ml de medio LB, se autoclavó 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 de petri estériles. Se dejaron gelificar, se sellaron con parafilm (Pechiney, Chicago, IL-USA) y luego se guardaron a 4°C.

**Placas LB con Ampicilina/IPTG/X-Gal:** Se agregó 1,5 gr de agar a 100 ml de medio LB, se autoclavó 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 50 mg/ml). Luego se repartió el contenido en cuatro placas de petri estériles, se dejaron gelificar, se sellaron y luego se guardaron a 4°C.

## Anexo C: Curva de Calibración SigmaScan Pro 5.0

Tabla 13: "Datos Curva de Calibración Intensidad-Concentración de proteína."

Concentración de Proteína (mg/ml)	Intensidad (I)
0,2839	62696
0,0668	27159
0,0334	16527
0,0167	9673

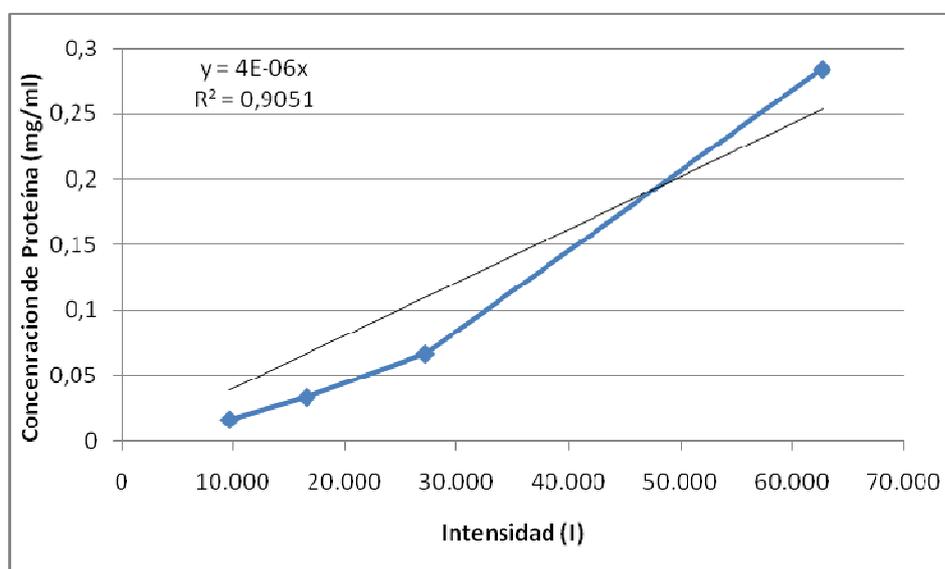


Figura 26: "Curva de calibración para determinar la relación intensidad-concentración de proteína mediante el programa SigmaScan Pro 5.0"

## Anexo D: Hidrofobicidad Superficial

Tabla 14: “Datos teóricos de hidrofobicidad superficial y área superficial totalmente expuesta.”

Aminoácido		Área Superficial	Hidrofobicidad superficial según la escala Miyazawa-Jernigan $\Phi_{aa}$ M-J	Área total expuesta de cada aminoácido Raai	Hidrofobicidad total para cada aminoácido $\Phi_i$ M-J	Área Superficial Totalmente Expuesta
<b>A</b>	<b>Ala</b>	710,6	0,39	0,084	0,033	115
<b>R</b>	<b>Arg</b>	1379,7	0,20	0,163	0,033	225
<b>N</b>	<b>Asn</b>	576,2	0,13	0,068	0,009	150
<b>D</b>	<b>Asp</b>	882,4	0,11	0,104	0,011	160
<b>C</b>	<b>Cys</b>	104,7	0,82	0,012	0,010	135
<b>Q</b>	<b>Gln</b>	237,4	0,15	0,028	0,004	190
<b>E</b>	<b>Glu</b>	406,6	0,12	0,048	0,006	180
<b>G</b>	<b>Gly</b>	418,8	0,25	0,049	0,012	75
<b>H</b>	<b>His</b>	6,3	0,35	0,001	0,000	195
<b>I</b>	<b>Ile</b>	231,0	0,97	0,027	0,026	175
<b>L</b>	<b>Leu</b>	566,9	0,91	0,067	0,061	170
<b>K</b>	<b>Lys</b>	399,2	0,00	0,047	0,000	200
<b>M</b>	<b>Met</b>	0,0	0,99	0,000	0,000	185
<b>F</b>	<b>Phe</b>	90,1	1,00	0,011	0,011	210
<b>P</b>	<b>Pro</b>	470,3	0,15	0,056	0,008	145
<b>S</b>	<b>Ser</b>	791,9	0,19	0,093	0,018	115
<b>T</b>	<b>Thr</b>	826,4	0,25	0,098	0,024	140
<b>W</b>	<b>Trp</b>	23,0	0,78	0,003	0,002	255
<b>Y</b>	<b>Tyr</b>	24,4	0,48	0,003	0,001	230
<b>V</b>	<b>Val</b>	221,9	0,77	0,026	0,020	155
<b>Área superficial total cutinasa nativa</b>		8472			0,290	

La hidrofobicidad de las colas se estimaron evaluando la contribución de cada aminoácido de la secuencia bajo el supuesto de exposición total de ellos.

## Anexo E: Tablas de datos obtenidos

<b>Wild Type</b>								
<b>Experimento 1</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,16	0,06	40,80	15,04	2,71	0,46	3436,95
Periplasma TES	15	2,75	0,18	41,21	2,72	15,16		
Periplasma Agua	15	78,88	2,96	1183,20	44,40	26,65		
Soluble	15	20,40	5,51	306,00	82,66	3,70		

<b>Experimento 2</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,19	0,03	48,28	8,02	6,02	0,47	1331,94
Periplasma TES	15	2,34	0,20	35,09	2,95	11,88		
Periplasma Agua	15	32,37	2,01	485,52	30,13	16,11		
Soluble	45	1,36	1,88	61,20	84,40	0,73		

<b>Experimento 3</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,29	0,04	72,08	11,22	6,43	0,42	1146,96
Periplasma TES	15	6,85	0,91	102,82	13,64	7,54		
Periplasma Agua	15	13,33	2,31	199,92	34,62	5,77		
Soluble	15	7,07	5,27	106,08	79,02	1,34		

<b>Experimento 4</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,25	0,00	62,02	0,51	120,93	0,34	1649,61
Periplasma TES	15	5,98	0,39	89,76	5,85	15,34		
Periplasma Agua	15	22,30	3,02	334,56	45,31	7,38		
Soluble	15	5,44	7,76	81,60	116,46	0,70		

**Cutinasa-  
WPWP**

<b>Experimento 1</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,13	0,05	33,32	11,30	2,95	0,41	2099,71
Buffer TES	15	9,28	0,23	139,13	3,49	39,89		
Periplasma Agua	15	37,54	2,24	563,04	33,60	16,76		
Soluble	15	8,70	5,39	130,56	80,87	1,61		

<b>Experimento 2</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,09	0,02	23,12	5,10	4,53	0,40	717,81
Buffer TES	15	2,72	0,53	40,80	7,99	5,10		
Periplasma Agua	15	10,88	1,72	163,20	25,79	6,33		
Soluble	45	1,28	1,10	57,53	49,39	1,16		

<b>Experimento 3</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,27	0,04	66,64	11,10	6,01	0,41	1366,40
Buffer TES	15	14,09	1,02	211,34	15,29	13,82		
Periplasma Agua	15	17,68	1,98	265,20	29,65	8,94		
Soluble	15	1,36	5,27	20,40	79,08	0,26		

<b>Experimento 4</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,39	0,00	96,56	0,12	784,81	0,32	2344,87
Buffer TES	15	9,63	0,79	144,43	11,80	12,25		
Periplasma Agua	15	31,28	3,79	469,20	56,79	8,26		
Soluble	15	2,45	7,40	36,72	111,02	0,33		

**Cutinasa-  
YPY\***

<b>Experimento 1</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,16	0,05	40,12	12,34	3,25	0,47	2577,84
Buffer TES	15	5,74	0,23	86,09	3,44	25,04		
Periplasma Agua	15	53,86	1,14	807,84	17,09	47,28		
Soluble	15	18,77	4,97	281,52	74,60	3,77		

<b>Experimento 2</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,11	0,02	27,88	6,22	4,48	0,41	1322,87
Buffer TES	15	1,93	0,20	28,97	3,03	9,55		
Periplasma Agua	15	27,20	1,83	408,00	27,39	14,89		
Soluble	45	1,80	2,29	80,78	103,07	0,78		

<b>Experimento 3</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,38	0,06	94,52	16,17	5,84	0,37	894,96
Buffer TES	15	5,71	0,73	85,68	10,96	7,82		
Periplasma Agua	15	8,43	1,26	126,48	18,93	6,68		
Soluble	15	1,90	5,59	28,56	83,88	0,34		

<b>Experimento 4</b>								
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,23	0,00	58,48	0,34	172,03	0,35	1700,47
Buffer TES	15	5,98	0,33	89,76	4,88	18,38		
Periplasma Agua	15	26,66	2,78	399,84	41,69	9,59		
Soluble	15	3,26	7,63	48,96	114,39	0,43		

<b>Cutinasa- YYY</b>
<b>Experimento 1</b>

Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,01	0,02	3,06	4,88	0,63	0,32	139,81
Buffer TES	15	1,02	0,04	15,30	0,56	27,20		
Periplasma Agua	15	1,16	0,02	17,34	3,45	5,03		
Soluble	15	0,61	0,16	9,18	24,38	0,38		

#### Experimento 2

Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,00	0,02	0,00	5,75	0,00	0,34	9,32
Buffer TES	15	0,00	0,10	0,00	1,50	0,00		
Periplasma Agua	15	0,14	2,75	2,10	41,25	0,05		
Soluble	15	0,07	5,30	1,05	79,50	0,01		

#### Experimento 3

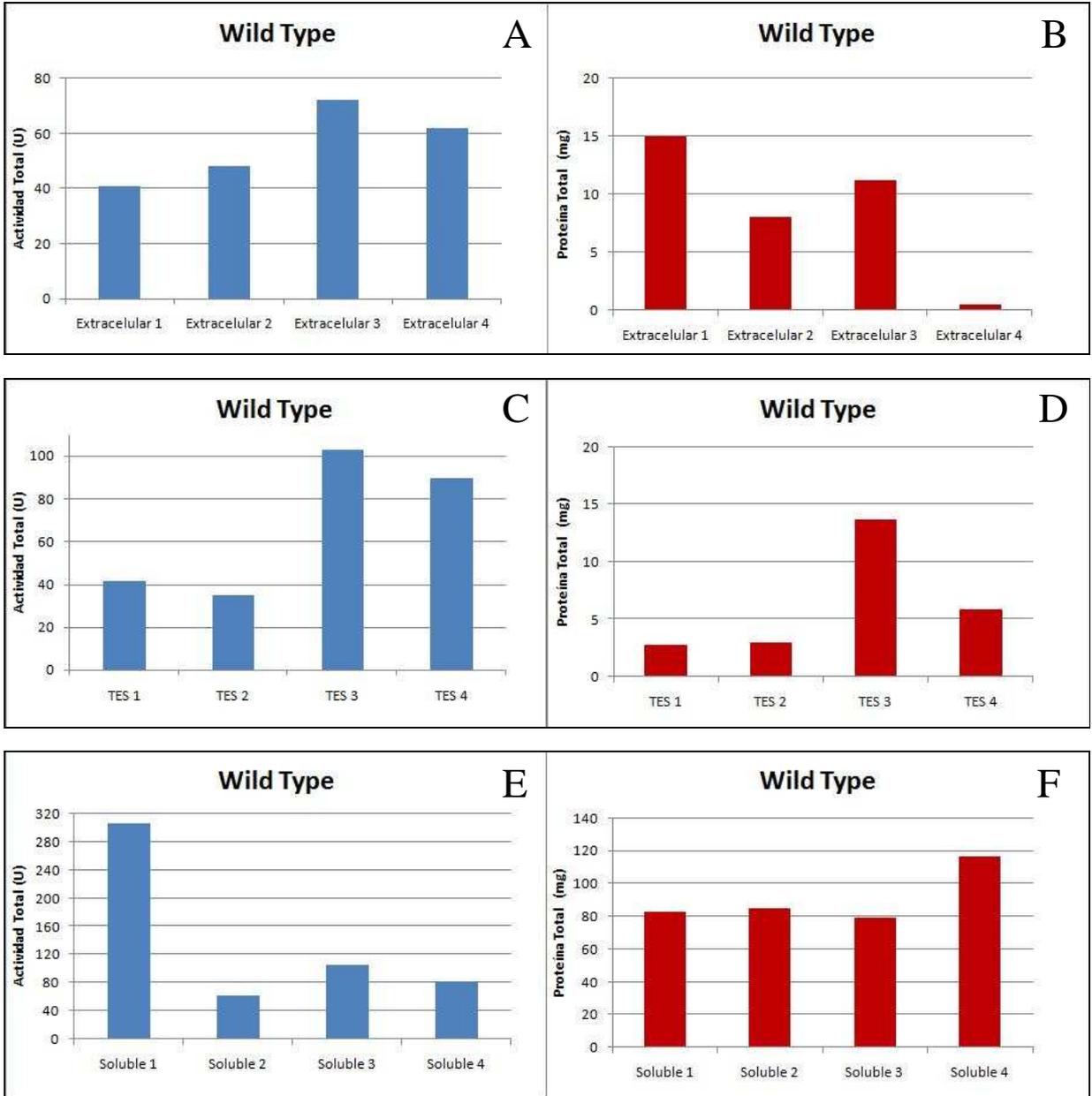
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,00	0,05	0,00	12,50	0,00	0,24	1,23
Buffer TES	15	0,00	0,13	0,00	1,97	0,00		
Periplasma Agua	15	0,00	1,09	0,00	16,35	0,00		
Soluble	15	0,02	6,05	0,30	90,75	0,00		

#### Experimento 4

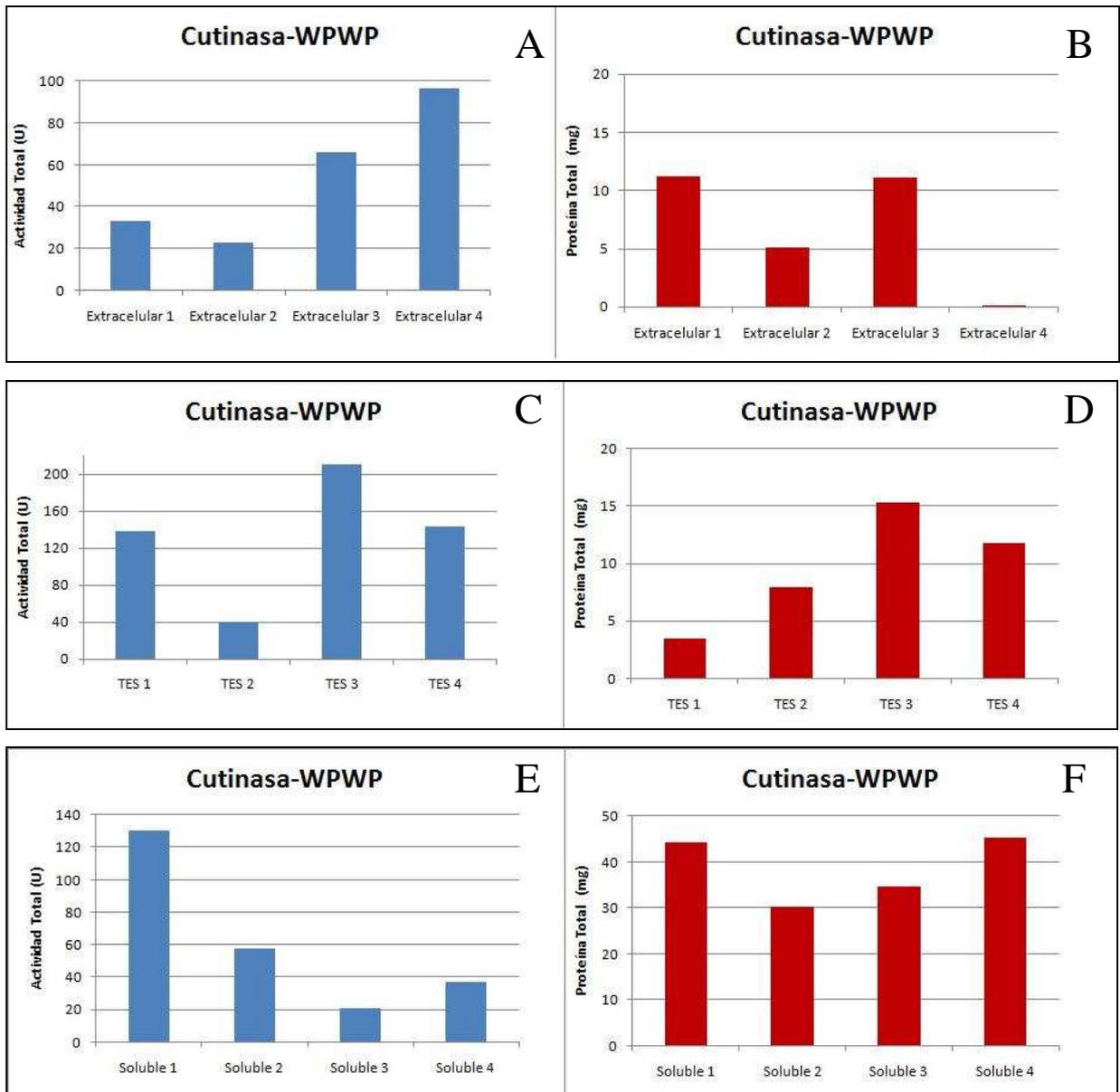
Fracción	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Conc de proteína (mg/ml)	Actividad Total (U)	Proteína Total (mg)	Actividad Específica (U/mg)	Biomasa Total (grs)	Actividad/Biomasa (U/gr células)
Extracelular	250	0,01	0,04	2,50	10,50	0,24	0,30	48,99
Buffer TES	15	0,04	0,08	0,60	1,20	0,50		
Periplasma Agua	15	0,50	0,46	7,50	6,90	1,09		
Soluble	15	0,26	2,91	3,90	43,65	0,09		

### Anexo F: Gráficos de las fracciones restantes obtenidas

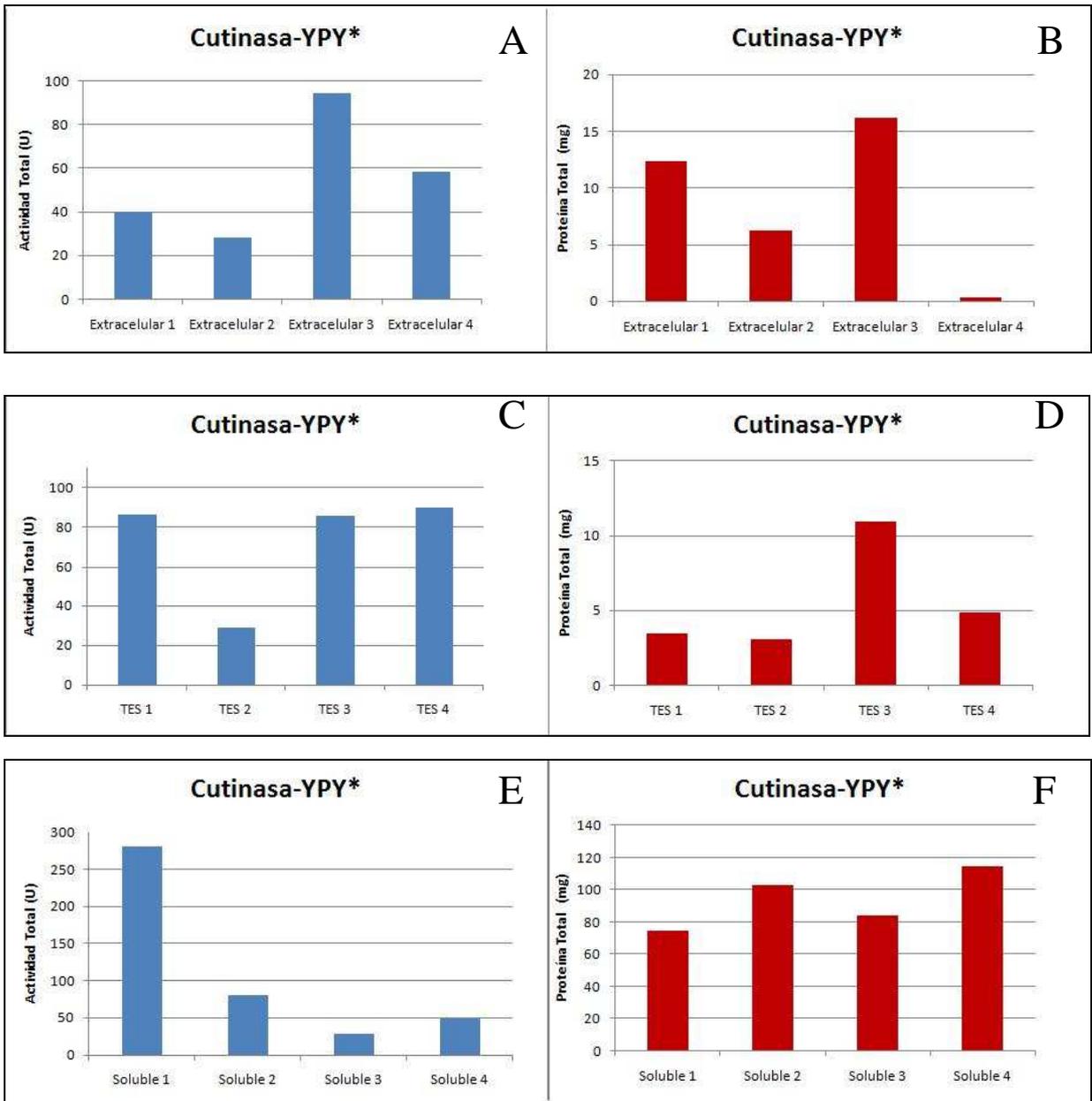
**Gráficos Fracciones Cutinasa Wild-Type:**



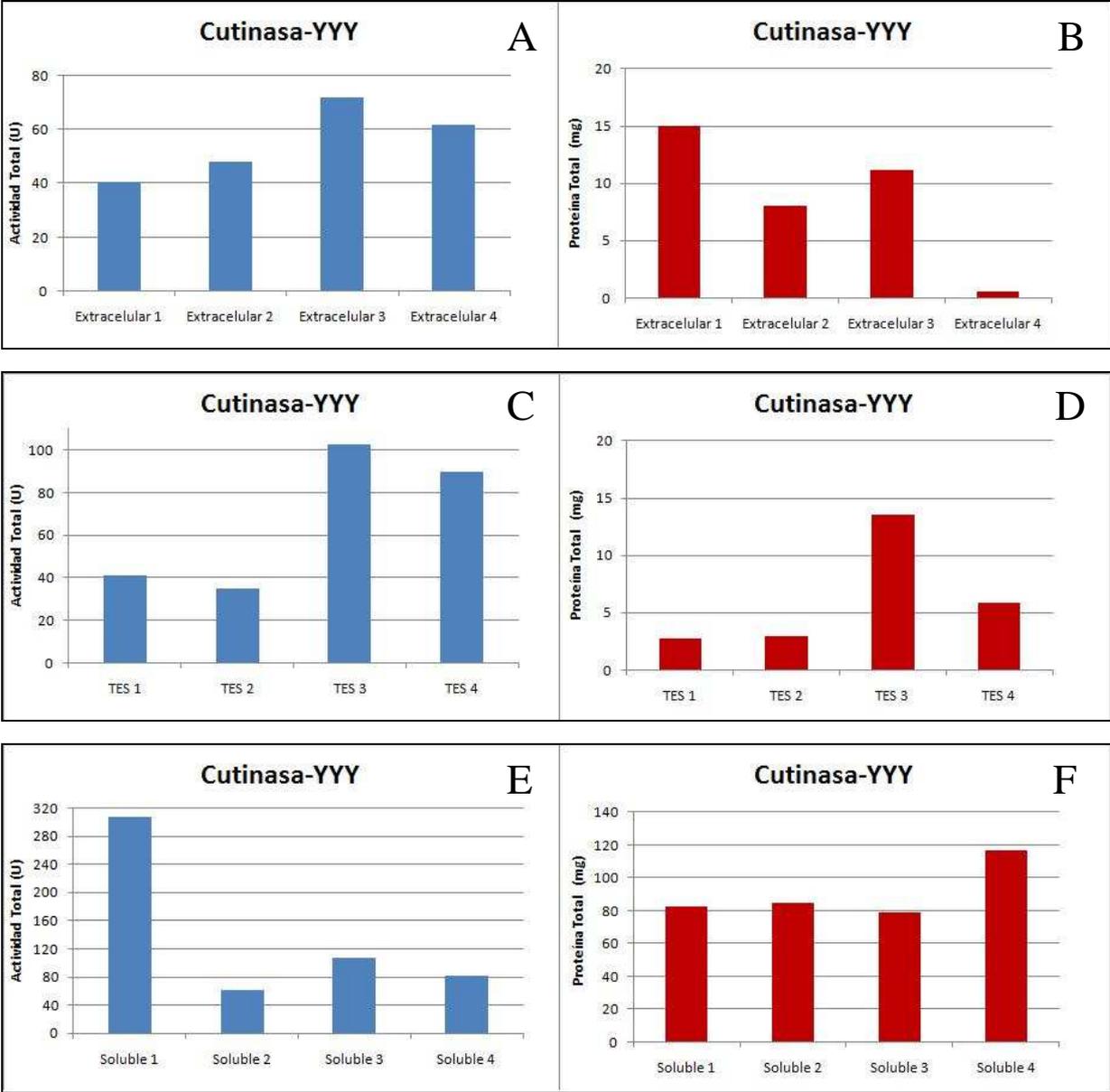
### Gráficos Fracciones Cutinasa-WPWP:



**Gráficos Fracciones Cutinasa-YPY\*:**



**Gráficos Fracciones Cutinasa-YYY**



## Anexo G: Fotografías de Geles SDS

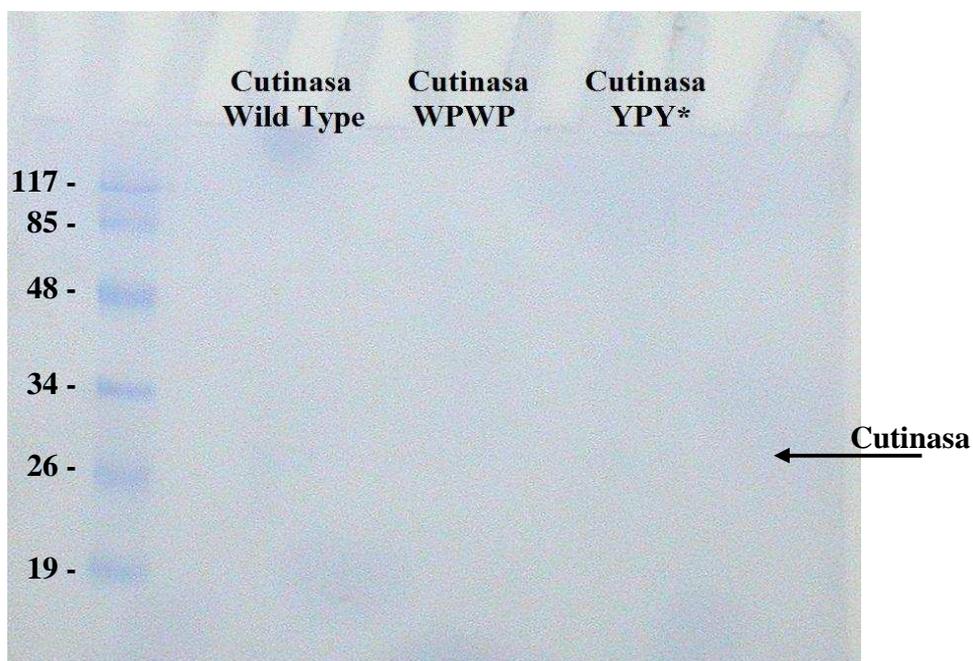


Figura 27: "Gel de poliacrilamida con las muestras correspondientes a la fracción extracelular de la cutinasa nativa y de las modificadas con las colas WPWP e YPY\*". (Periplasma 2)

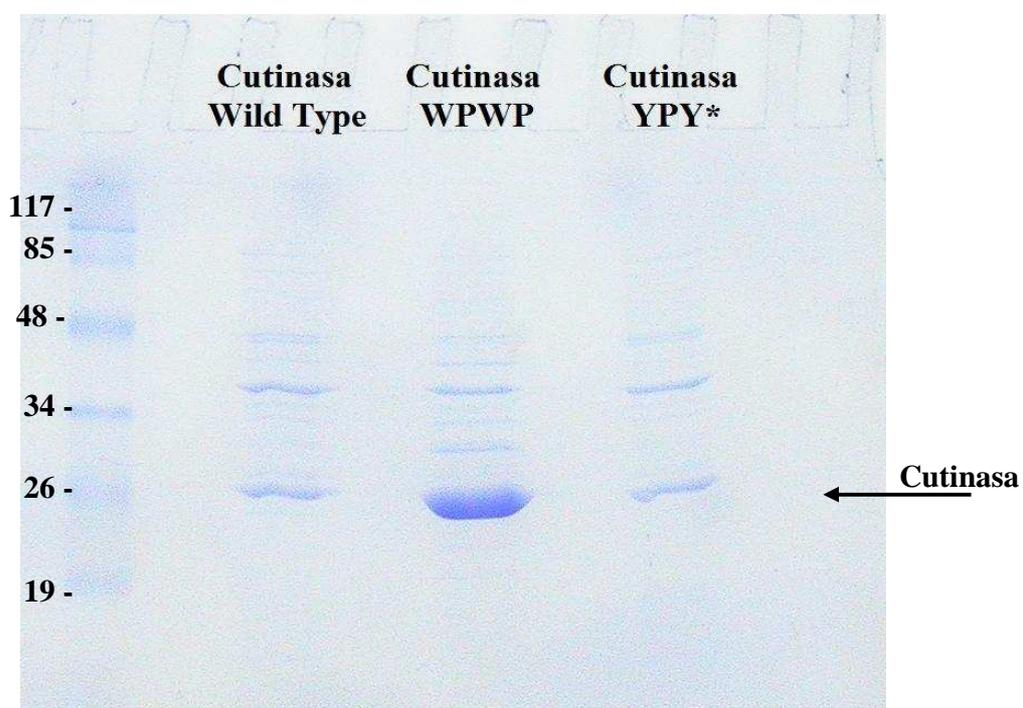


Figura 28: "Gel de poliacrilamida con las muestras correspondientes a la fracción en buffer TES de la cutinasa nativa y de las modificadas con las colas WPWP e YPY\*". (Periplasma 2)

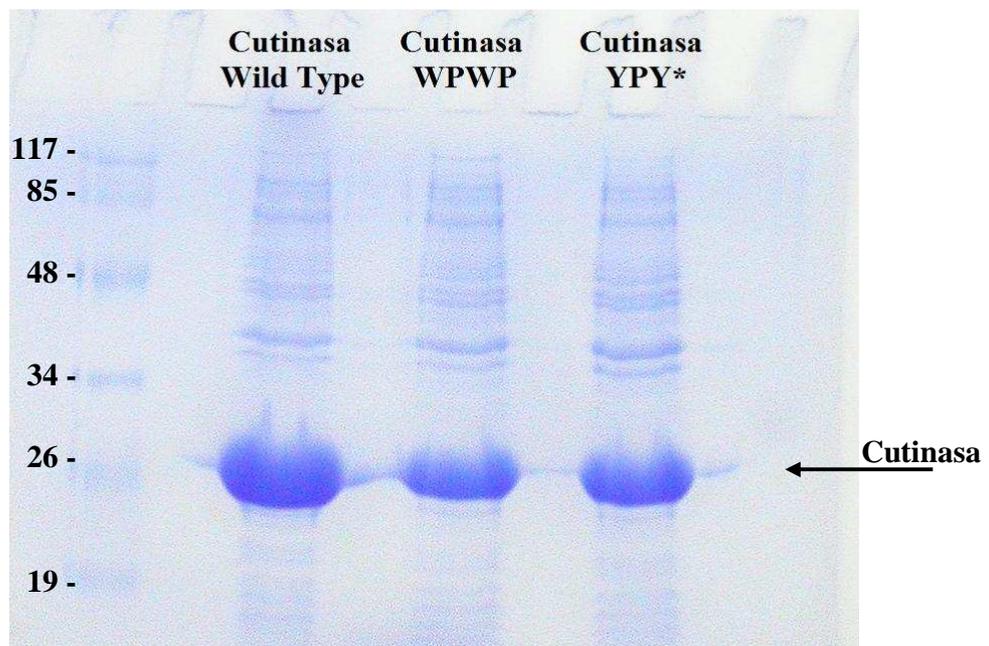


Figura 29: "Gel de poliacrilamida con las muestras correspondientes a la fracción soluble de la cutinasa nativa y de las modificadas con las colas WPWP e YPY\*" (Periplasma 2)

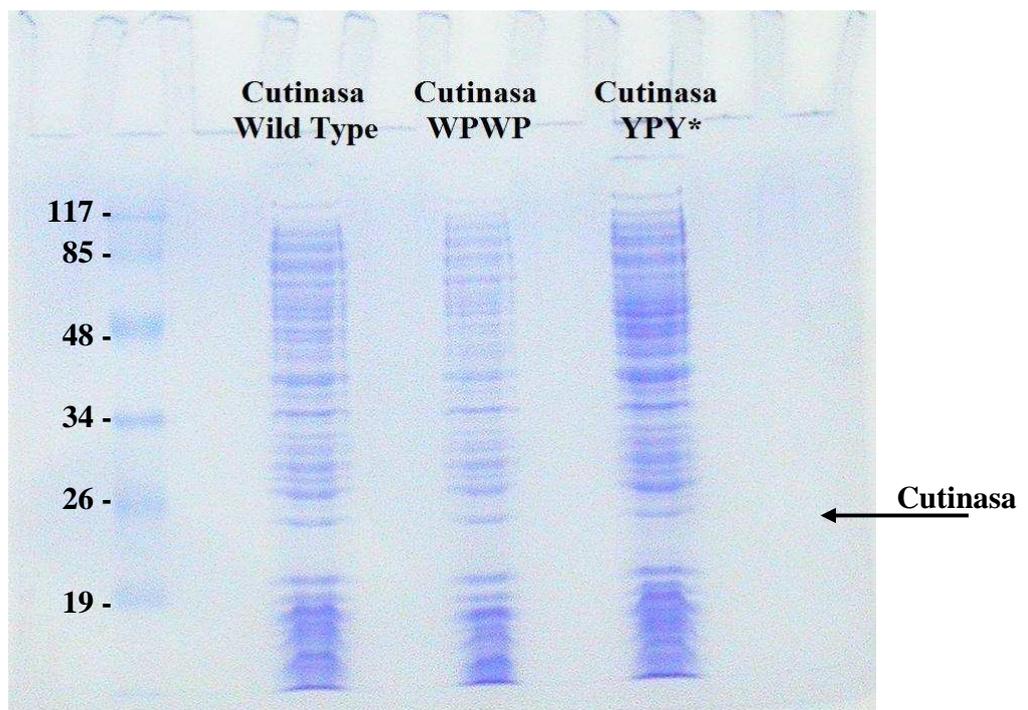


Figura 30: "Gel de poliacrilamida con las muestras correspondientes a la fracción insoluble de la cutinasa nativa y de las modificadas con las colas WPWP e YPY\*" (Periplasma 2)

## Anexo H: Tablas de Datos Fracciones colectadas en la HIC a Periplasma 4

**Tabla 15: "Actividad Total y Proteína Total de las fracciones obtenidas en la HIC realizada a Periplasma 4 muestra Wild-Type."**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
18	0,41	0,14	2,97
19	1,02	0,13	7,98
<b>20</b>	<b>1,81</b>	<b>0,12</b>	<b>15,16</b>
<b>21</b>	<b>9,11</b>	<b>0,14</b>	<b>64,01</b>
<b>22</b>	<b>7,26</b>	<b>0,09</b>	<b>83,25</b>
23	0,95	0,04	23,52
24	0,15	0,02	7,41

**Tabla 16: "Actividad Total y Proteína Total de las fracciones obtenidas en la HIC realizada a Periplasma 4 muestra Cutinasa-WPWP".**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
18	0,57	0,15	3,84
19	1,44	0,14	10,45
<b>20</b>	<b>5,37</b>	<b>0,12</b>	<b>44,93</b>
<b>21</b>	<b>8,7</b>	<b>0,17</b>	<b>52,14</b>
<b>22</b>	<b>4,96</b>	<b>0,11</b>	<b>45,49</b>
23	1,13	0,05	21,10
24	0,21	0,02	8,56

**Tabla 17: "Actividad Total y Proteína Total de las fracciones obtenidas en la HIC realizada a Periplasma 4 muestra Cutinasa-YPY\*"**

<b>Fracción</b>	<b>Actividad Total (U)</b>	<b>Proteína Total (mg)</b>	<b>Actividad específica (U/mg)</b>
18	0,56	0,15	3,61
19	1,40	0,14	10,15
<b>20</b>	<b>4,69</b>	<b>0,14</b>	<b>34,09</b>
<b>21</b>	<b>8,09</b>	<b>0,19</b>	<b>42,36</b>
<b>22</b>	<b>5,24</b>	<b>0,13</b>	<b>39,87</b>
23	1,46	0,06	24,83
24	0,25	0,02	10,19

**Anexo I: Estimación de los DRT para Periplasma 2 y 3.**

## **Periplasma 2**

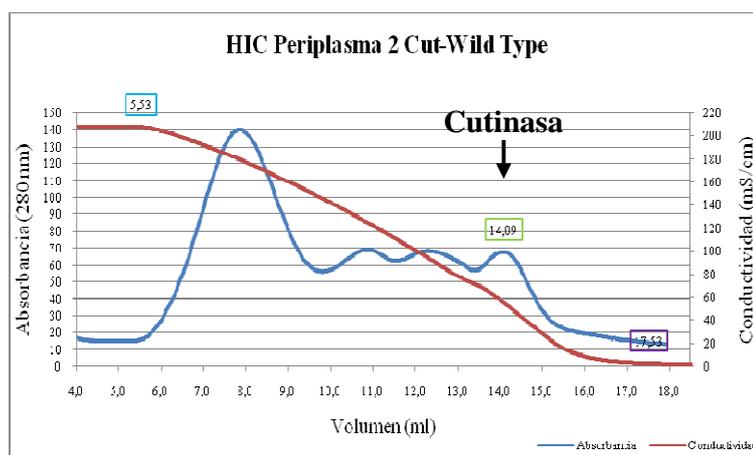


Gráfico 10: "Estimación de DRT para Periplasma 2 de Cutinasa Wild-Type"

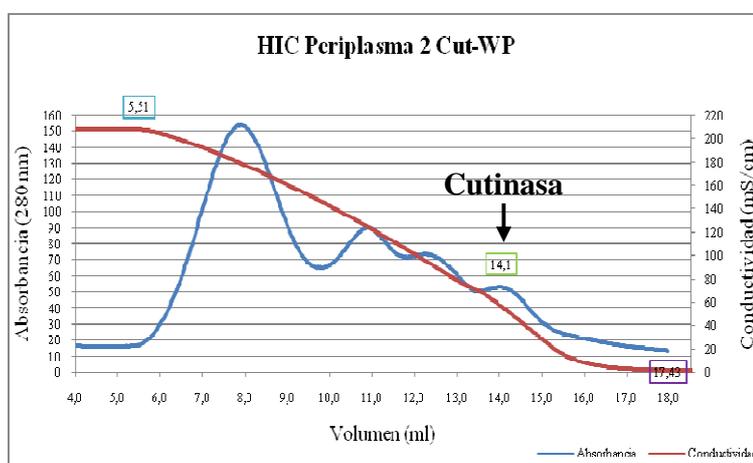


Gráfico 11: "Estimación de DRT para Periplasma 2 de Cutinasa-WPWP"

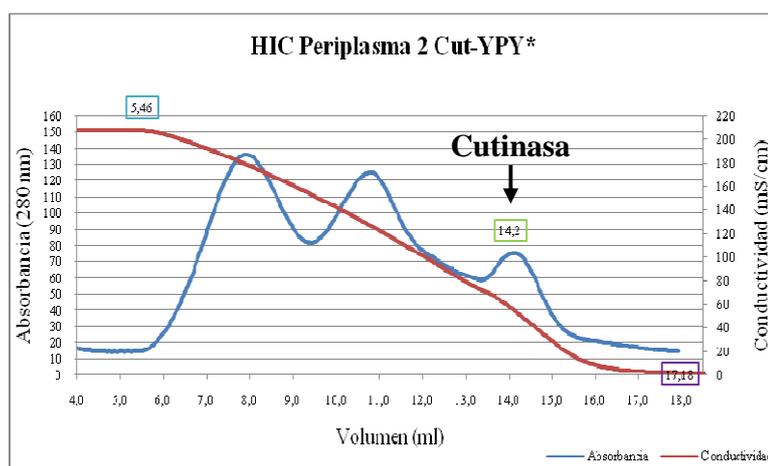


Gráfico 12: "Estimación de DRT para Periplasma 2 de Cutinasa-YPY\*"

Tabla 18: "DRT de las cutinasas nativa y modificadas de la muestra Periplasma 2"

**Periplasma 2**

	Wty	WP	YP
<b>Vo</b>	5,53	5,51	5,46
<b>Vf</b>	17,53	17,43	17,18
<b>Vr</b>	14,09	14,1	14,2
<b>DRT</b>	<b>0,713</b>	<b>0,721</b>	<b>0,746</b>
<b>% Dif c/r a Wty</b>	<b>0</b>	<b>+ 1,0</b>	<b>+ 4,3</b>

### Periplasma 3

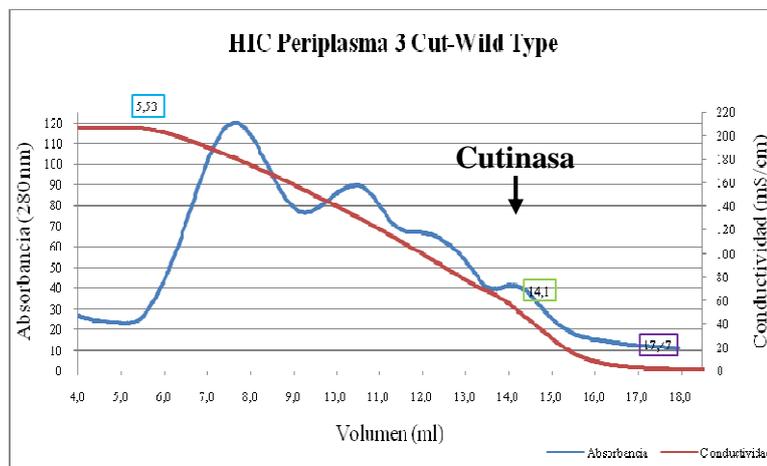


Gráfico 13: "Estimación de DRT para Periplasma 3 de Cutinasa Wild-Type"

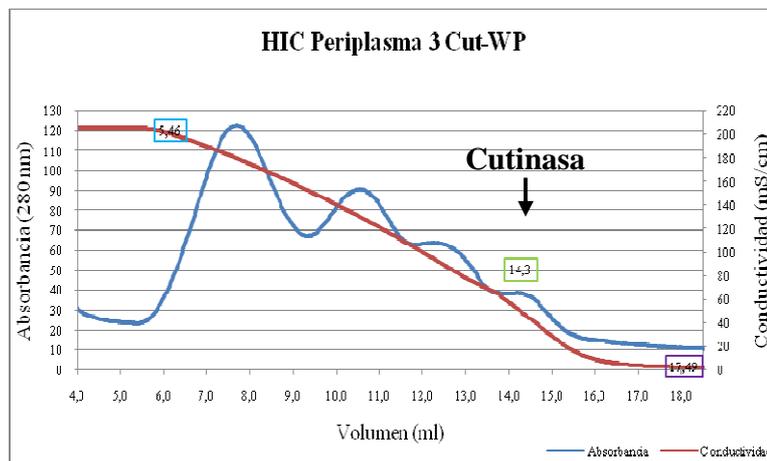
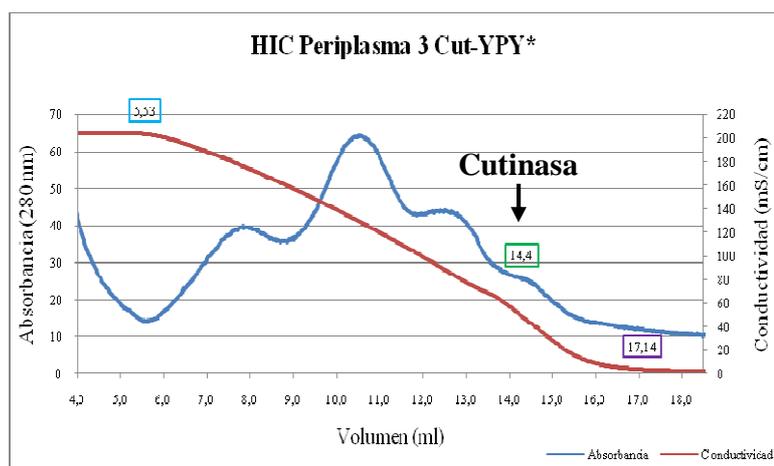


Gráfico 14: "Estimación de DRT para Periplasma 3 de Cutinasa WPWP"



**Gráfico 15: "Estimación de DRT para Periplasma 3 de Cutinasa YPY\*"**

**Tabla 19: "DRT de las cutinasas nativa y modificadas de la muestra Periplasma 3".**

<b>Periplasma 3</b>			
	<b>Wty</b>	<b>WP</b>	<b>YP</b>
<b>Vo</b>	5,53	5,46	5,53
<b>Vf</b>	17,47	17,49	17,14
<b>Vr</b>	14,10	14,3	14,4
<b>DRT</b>	<b>0,718</b>	<b>0,735</b>	<b>0,764</b>
<b>% Dif c/r a WTy</b>	<b>0</b>	<b>+ 2,3</b>	<b>+ 6,1</b>