



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

VALIDACIÓN DE CRITERIOS PARA SELECCIÓN DE EXTREMOS HIDROFÓBICOS PARA PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

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

PABLO ANDRÉS BECERRA BARRA

**PROFESOR GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS**

**MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
JOSÉ CRISTIAN SALGADO HERRERA**

**SANTIAGO DE CHILE
JULIO 2012**

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo estudiar la validez de los criterios de selección que se han establecido para la adición de extremos hidrofóbicos a proteínas para mejorar su purificación mediante Cromatografía de Interacción Hidrofóbica (HIC).

Para esto se utilizó una enzima celulasa Cel5A de *Bacillus Agaradherans* y tres combinaciones de aminoácidos prolina (P), tirosina (Y) y triptófano (W): YYY (Y3), WPWP (WP2) y WPWPWPWP (WP4). Las secuencias fueron añadidas en el extremo carboxilo terminar de la enzima nativa mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se obtuvieron de forma exitosa las variantes recombinantes Celulasa-Y3, Celulasa-WP2 y Celulasa-WP4.

Las variantes obtenidas fueron cultivadas e inducidas bajo las mismas condiciones preestablecidas, extrayéndose las fracciones extracelular y periplasmática a las cuales se les realizaron ensayos de actividad celulolítica y proteína total, para posteriormente calcular su actividad específica.

La proteína total producida por las variantes mutantes fue similar a la obtenida por la cepa nativa, obteniéndose un nivel de proteína total con respecto a la cepa nativa de un 98% para la variante Cel-Y3, 88% para la variante Cel-WP2 y de un 75% para la variante Cel-WP4. En todos los casos se obtuvo una mayor parte de la proteína en la fracción extracelular con valores superiores al 56% del total de proteína producida.

La variante Cel-WP2, mantuvo un 97% de la actividad celulolítica total de la enzima nativa, a diferencia de las variantes Cel-Y3 y Cel-WP4 que mantuvieron sólo un 18 y 14% respectivamente. Sin embargo, se obtuvo que todas las variantes presentaron una distribución similar de la actividad entre las distintas fracciones con aproximadamente un 87% de la actividad en la fracción extracelular, un 5% en la fracción de lavado con TES y un 8% en la fracción periplasmática.

Fue posible evaluar la validez del criterio señala que: “es recomendable la incorporación de prolina en los extremos a fin de evitar la formación de estructuras secundarias y asegurar la exposición del extremo”, así como también de que: “el valor de la hidrofobicidad del extremo debe ser menor a 500 para mantener la actividad de la enzima”. Por el contrario se descartó el criterio de que: “no es necesaria la presencia de prolina para mantener la actividad en enzima extracelulares”, debido a que sólo la variante con prolina mantuvo una actividad específica alta.

Por otra parte, se realizaron HIC para todas las variantes, pero no fue posible la determinación de los valores del tiempo de retención, debido que la enzima precipitaba al introducirla en un medio con alta concentración de sulfato de amonio, lo cual imposibilitaba la realización de ensayos de actividad en las fracciones, por lo cual se recomienda evaluar otras condiciones de operación para determinar estos tiempos de retención.

ÍNDICE

Resumen.....	ii
Índice	iii
Índice de figuras	v
Índice de tablas.....	vii
Lista de abreviaturas	viii
1 Introducción	1
1.1 Descripción del proyecto y justificación.....	2
1.2 Celulosa	2
1.3 Celulasas	2
1.3.1 Endoglucanasa 5A	3
1.4 Características de los aminoácidos.....	4
1.4.1 Prolina.....	4
1.4.2 Tirosina	5
1.4.3 Triptófano.....	5
1.5 Técnicas de purificación de proteínas.....	5
1.5.1 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC)	6
1.6 Tiempo de retención	8
1.7 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos	8
1.8 Determinación de la hidrofobicidad de los extremos	9
1.9 Criterios de selección	9
1.10 Objetivos.....	11
1.10.1 Objetivo General	11
1.10.2 Objetivos Específicos	11
2 Materiales y métodos	12
2.1 Materiales.....	12
2.1.1 Cepas bacterianas.....	12
2.1.2 Reactivos	12
2.1.3 Vectores de clonamiento y expresión	12
2.1.4 Enzimas de restricción	14
2.1.5 Equipos.....	14
2.1.6 Herramientas computacionales.....	14
2.1.7 Medios de cultivo.....	15
2.1.8 Soluciones stock.....	15
2.1.9 Partidores	16
2.2 Métodos	18
2.2.1 Metodología general.....	18
2.2.2 Purificación del ADN plasmidial	19
2.2.3 Síntesis del gen de celulasa modificado.....	19
2.2.4 Clonamiento en Vector pGem®-T Easy.....	19
2.2.5 Clonamiento en el vector de expresión pET22-b(+).....	19
2.2.6 Preparación de bacterias electrocompetentes	20
2.2.7 Transformación de bacterias electrocompetentes.....	20
2.2.8 PCR de colonias.....	20

2.2.9	Digestión de ADN plasmidial.....	21
2.2.10	Electroforesis en gel de agarosa.....	21
2.2.11	Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	21
2.2.12	Inducción de la síntesis de celulasas.....	21
2.2.13	Recuperación de proteína.....	21
2.2.14	Determinación de la concentración de proteína.....	22
2.2.15	Medición de la actividad celulolítica en medio líquido.....	22
2.2.16	Determinación de la hidrofobicidad de los extremos.....	22
2.2.17	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	23
3	Resultados y Discusión.....	24
3.1	Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a celulasa.....	24
3.1.1	Generación del gen de la celulasa modificada por PCR.....	24
3.1.2	Clonamiento del gen modificado en el vector pGem®-T Easy.....	26
3.1.3	Clonamiento del gen modificado en el vector de expresión pet22-b(+)......	28
3.2	Secuenciamiento de los vectores obtenidos.....	28
3.3	Producción de la celulasas modificadas.....	29
3.3.1	Análisis de actividad.....	30
3.3.2	Análisis de proteína.....	31
3.4	Hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos.....	33
3.5	Purificación de la celulasa.....	35
4	Conclusiones.....	36
5	Bibliografía.....	38
6	Anexos.....	40
6.1	Anexo A: Curvas de calibración.....	40
6.1.1	Curva de calibración para ensayos de actividad.....	40
6.1.2	Curva de calibración para ensayos de cantidad de proteína.....	40
6.2	Anexo B: Secuencia de las celulasas modificadas.....	41
6.2.1	Celulasa-Y3.....	41
6.2.2	Celulasa-WP2.....	42
6.2.3	Celulasa-WP4.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura de la celulosa.	2
Figura 1.2: Modelo tridimensional de la proteína endoglucanasa 5A de <i>B. Agaradherans</i> , código pdb: 1A3H.	3
Figura 1.3: Estructura general de un aminoácido.	4
Figura 1.4: Estructura del aminoácido Prolina.	4
Figura 1.5: Estructura del aminoácido Tirosina.	5
Figura 1.6: Estructura del aminoácido Triptofano.	5
Figura 1.7: Primera etapa en HIC. Ambientación.	6
Figura 1.8: Segunda etapa en HIC. Inyección de la muestra.	7
Figura 1.9: Tercera etapa en HIC. Elución de proteínas.	7
Figura 1.10: Esquema de un cromatograma y parámetros del DRT.	8
Figura 2.1: Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia.	13
Figura 2.2: Vector pET-22b(+) y sus puntos de referencia.	13
Figura 2.3: Esquema de alineamiento de los partidores con el gen de celulasa nativo.	16
Figura 2.4: Diagrama de flujos de la metodología general.	18
Figura 3.1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 1-Y3.	24
Figura 3.2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 1-WP2.	24
Figura 3.3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 2-WP4.	25
Figura 3.4: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a temperatura óptima.	25
Figura 3.5: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con gen Celulasa-Y3 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy.	26
Figura 3.6: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con gen Celulasa-WP2 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy.	26
Figura 3.7: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias <i>E. coli</i> DH5 α transformadas con gen Celulasa-WP4 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy.	27
Figura 3.8: Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del ADN plasmidial.	27
Figura 3.9: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias de <i>E. coli</i> BL21(DE3) transformadas con los genes de celulasa modificados ligados al vector de expresión pET22b(+).	28
Figura 3.10: Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).	30
Figura 3.11: Distribución porcentual de la actividad celulolítica total entre las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).	31
Figura 3.12: Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).	31

Figura 3.13: Distribución porcentual de cantidad de proteína entre las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).....	32
Figura 3.14: Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).....	33
Figura 3.15: Porcentaje de actividad extracelular específica residual versus hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos.....	34
Figura 6.1: Curva de calibración del método de DNS para la detección de azúcares reductores.....	40
Figura 6.2: Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Reactivos y proveedores.....	12
Tabla 2.2: Enzimas de restricción.....	14
Tabla 2.3: Equipos a utilizar.....	14
Tabla 2.4: Herramientas computacionales.....	14
Tabla 2.5: Valores de hidrofobicidad y área superficial para los aminoácidos utilizados.....	22
Tabla 3.1: Temperaturas óptimas de alineamiento.....	25
Tabla 3.2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la Endoglucanasa 5A de <i>B. Agaradherans</i> y las variantes Celulasa-Y3, Celulasa-WP2 y Celulasa-WP4.....	29
Tabla 3.3: Valores teóricos de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
Amp	ampicilina
BSA	seroalbúmina de bovino
CMC	carboximetil celulosa
D.O.	densidad óptica
DNS	ácido dinitrosalicílico
DRT	tiempo de retención adimensional
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfato
EDTA	ácido etilen-diamino-tetra-acético
HEPES	ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
HIC	cromatografía de interacción hidrofóbica
IEX	cromatografía de intercambio iónico
IPTG	isopropil tio-b-D-galactósido
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Luria Broth
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de polimerasa
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TES	Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; 20% Sacarosa
T _m	temperatura de alineamiento
Tris (TRISMA)	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
U	unidad de actividad enzimática
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galactopiranosido
μF	microfaraday

1 INTRODUCCIÓN

La biotecnología ha permitido hoy en día la existencia de una gran cantidad de compuestos que de otra forma sería casi imposible de obtener en grandes cantidades, estos productos son obtenidos a partir de plantas, tejido animal, microorganismos o cultivos de células animales. El producto deseado en general, se presenta con una gran cantidad de contaminantes, por lo cual son requeridas varias etapas de purificación, para alcanzar niveles de pureza aceptables. La mayor parte de estos productos corresponde a proteínas, lo cual añade una dificultad adicional, ya que éstas son las moléculas más abundantes en una célula (Kalyanpur, 2002).

El proceso de producción de una proteína se puede dividir en 3 etapas fundamentales: fermentación, recuperación y purificación, siendo las etapas de recuperación y en especial de purificación las que tendrán una mayor repercusión en el rendimiento total y pureza final de la proteína de interés. Por otra parte, la purificación representa el mayor costo en la implementación de una producción a gran escala (Degerman *et al.*, 2008), por lo tanto existe un gran interés en el desarrollo de estrategias que conduzcan a la obtención de mejores resultados.

La cromatografía es una técnica muy apreciada en el proceso de purificación de proteínas debido a su alta versatilidad y selectividad. Una de las más utilizadas, junto con la cromatografía de intercambio iónico (IEX), es la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), la cual separa las moléculas aprovechando las interacciones que se producen entre las regiones hidrofóbicas en la superficie de la proteína y una fase estacionaria apolar. La retención de las moléculas en la columna será mayor mientras mayor sea su hidrofobicidad. La elución diferenciada se controla, entre otras formas, modificando la concentración de sal en el medio (Gooding, 2010).

Estudios recientes muestran que es posible modificar la hidrofobicidad superficial de las proteínas añadiendo extremos polipeptídicos hidrofóbicos, de forma de alterar el perfil de elución original obteniendo mejores resultados en la purificación (Robinson, 2008) (Montecinos, 2009) (Delpiano, 2009). A partir de estos resultados ha sido posible establecer ciertos criterios de selección para tales extremos hidrofóbicos. El presente trabajo de memoria de título busca determinar la validez de tales criterios, mediante la modificación de una celulosa y su posterior recuperación.

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO Y JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo de título se enmarca dentro del proyecto de investigación Fondecyt N°1080143 denominado “Effects of hydrophobic polypeptide tag fusion on protein purification by Hydrophobic Interaction Chromatography”, cuyo objetivo es determinar el efecto de la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos en el proceso de purificación de una proteína recombinante por cromatografía de interacción hidrofóbica y establecer los criterios de selección de los extremos hidrofóbicos.

Se establece como hipótesis de estudio que es posible establecer criterios de selección de extremos hidrofóbicos de forma de mejorar la purificación de proteínas recombinantes mediante HIC.

Para la validación de los criterios de selección de extremos hidrofóbicos, se utilizará una enzima endoglucanasa 5A proveniente de la bacteria *Bacillus Agaradherans* a la cual se añadirán los extremos: (WP)2, (WP)4 e Y3¹, para luego establecer si se cumplen los criterios señalados.

1.2 CELULOSA

La celulosa es un biopolímero insoluble y lineal compuesto de subunidades del disacárido celobiosa (Figura 1.1). Este polímero está compuesto por entre 200 y 25.000 unidades de glucosa (Desvaux, 2001), las cuales se encuentran unidas por enlaces glucosídicos β -1,4. Las cadenas de celulosa interactúan entre ellas mediante puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals, formando estructuras de gran rigidez y resistencia.

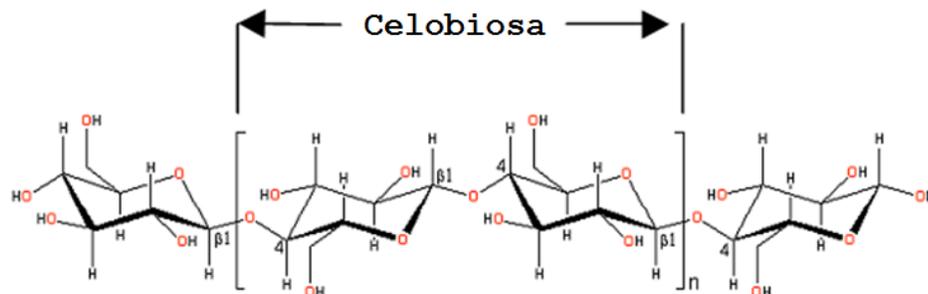


Figura 1.1: Estructura de la celulosa.

1.3 CELULASAS

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que catalizan el rompimiento de los enlaces glucosídicos β -1,4, existen tres tipos de celulasas (Boisset *et al.*, 2000):

- **Endoglucanasas** o 1,4- β -D-glucán-4-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.4): Las cuales hidrolizan aleatoriamente los enlaces β -1,4 glucosídicos situados al interior de las cadenas amorfas de celulosa.

¹ P: Prolina, Y: Tirosina, W: Triptófano.

- **Exoglucanasas** que se subdividen en Celodextrinasas o 1,4- β -D-glucán-glucanohidrolasas (EC 3.2.1.74) y las Celobiohidrolasas o 1,4- β -D-glucán-celobiohidrolasas (EC 3.2.1.91): Las cuales degradan celulosa a partir de los extremos reductores y no reductores de la celulosa, liberando glucosa o celobiosa.
- **β -glucosidasas** o β -glucósido glucohidrolasas (EC 3.2.1.21): Las cuales hidrolizan las unidades de celobiosa en monómeros de glucosa.

Un mecanismo propuesto para la degradación de la celulosa indica que esta se lleva a cabo mediante la acción combinada de estos tres tipos de celulasa, así las endoglucanasa realizaran cortes en forma aleatoria al interior de la cadena, dejando extremos libres donde actuarán las exoglucanasas, liberando glucosa y celobiosa, la cual será degradada a su vez por la β -glucosidasas.

1.3.1 ENDOGLUCANASA 5A

La celulasa que se utilizará en este estudio corresponde a una endoglucanasa 5A (EC 3.2.1.4), la cual es extracelular y pertenece a la bacteria *Bacillus agaradherans*. A partir de su secuencia aminoacídica y utilizando la herramienta *Compute pI/Mw*² se determinó que su peso molecular es de 44,7 kDa y su punto isoeléctrico de 4,20.

El código “pdb” correspondiente a esta proteína es 1A3H³, con este es posible obtener un modelo tridimensional que se presenta en la Figura 1.2.

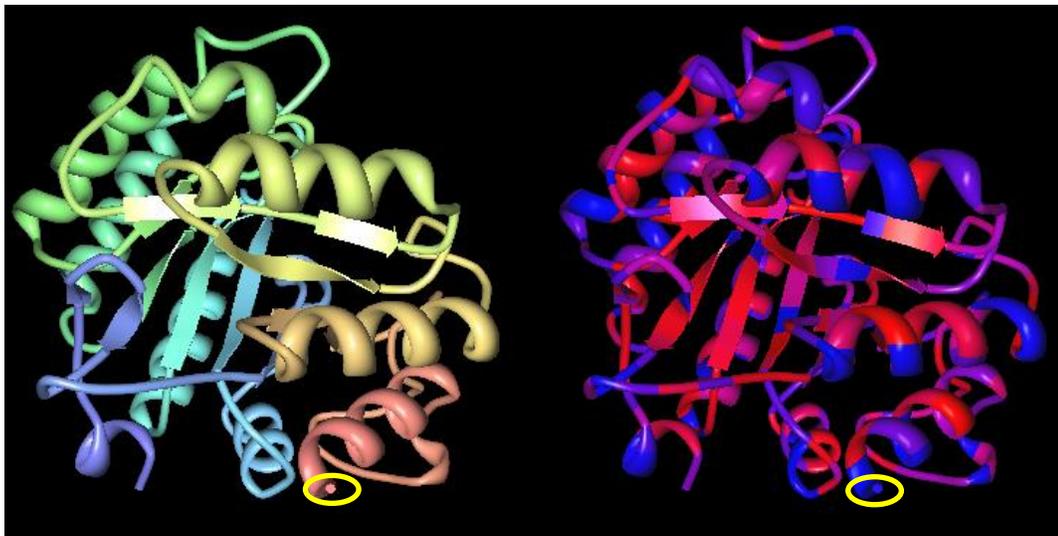


Figura 1.2: Modelo tridimensional de la proteína endoglucanasa 5A de *B. Agaradherans*, código pdb: 1A3H. A la izquierda se muestra una representación tipo arcoiris (inicio ■ ■ ■ ■ final). A la derecha se muestra una representación por hidrofobicidad, azul corresponden a aminoácidos hidrofílicos y rojo a aminoácidos hidrofóbicos. En amarillo se destaca la zona de adición de los extremos polipeptídicos.

² http://web.expasy.org/compute_pi/

³ <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1A3H>

1.4 CARACTERÍSTICAS DE LOS AMINOÁCIDOS

Los aminoácidos son las unidades estructurales que conforman una proteína, están compuestos, de al menos, un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH). Todos los aminoácidos que componen las proteínas son alfa aminoácidos (grupo amino unido a carbono α) y presentan la estructura observada en la Figura 1.3 (Naik, 2012).

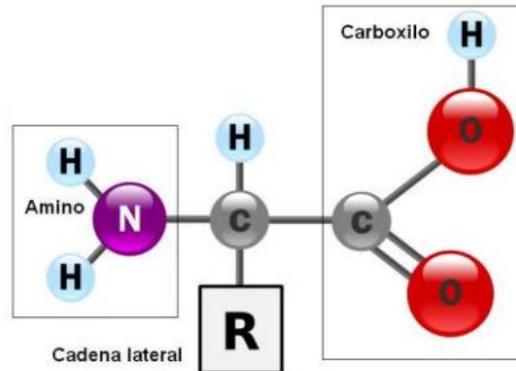


Figura 1.3: Estructura general de un aminoácido.

Los aminoácidos difieren entre sí por la cadena lateral R, la cual puede ser desde un protón, para el aminoácido más sencillo, la glicina, o poseer cadenas más largas o anillos aromáticos. Por lo tanto, los aminoácidos son clasificados dependiendo del tipo de cadena lateral que poseen. Una de las clasificaciones más utilizada se basa en la polaridad y divide a los aminoácidos en 5 clases principales: apolares alifáticos, apolares aromáticos, polares sin carga, cargados positivamente y cargados negativamente (Naik, 2012).

En este trabajo se utilizaron 3 aminoácidos diferentes para generar los extremos hidrofóbicos deseados: Prolina, Tirosina, Triptófano.

1.4.1 PROLINA

El aminoácido Prolina pertenece al grupo de los aminoácidos apolares alifáticos, se diferencia del resto del grupo debido a que su cadena forma un anillo (Figura 1.4), lo cual le otorga una gran rigidez a la molécula. Se suele incluir en la adición de extremos polipeptídicos a proteínas, como una forma de asegurar la exposición de los extremos y evitar la formación de estructuras secundarias.

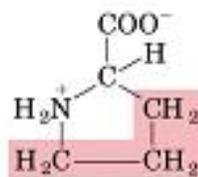


Figura 1.4: Estructura del aminoácido Prolina.

1.4.2 TIROSINA

El aminoácido Tirosina (Figura 1.5) pertenece al grupo de los aminoácidos apolares aromáticos, posee una cadena lateral de fenol, lo cual le permite interactuar más fácilmente con el medio, pero presenta la menor hidrofobicidad dentro del grupo (Miyazawa *et al.*, 1985).

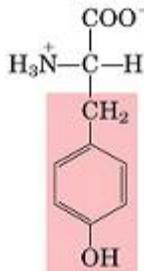


Figura 1.5: Estructura del aminoácido Tirosina.

1.4.3 TRIPTÓFANO

El aminoácido Triptófano (Figura 1.6) pertenece al grupo de los aminoácidos apolares aromáticos, posee un grupo lateral indol, que al ser de gran tamaño facilita la interacción hidrofóbica con el medio.

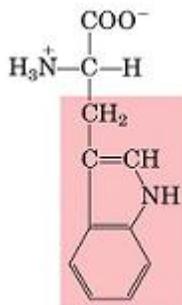


Figura 1.6: Estructura del aminoácido Triptofano.

1.5 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La separación de proteínas mediante cromatografía se basa en la utilización de propiedades fisicoquímicas de estas tales como: el tamaño (cromatografía de exclusión o filtración por gel), carga (cromatografía de intercambio iónico o cromatofocusing), afinidad a un ligando (cromatografía de afinidad) o hidrofobicidad (cromatografía de fase reversa o de interacción hidrofóbica) (Hagel *et al.*, 2008).

La cromatografía en lecho fijo es uno de los métodos de purificación de proteínas más utilizados a nivel industrial. En este tipo de cromatografías se cuenta con una columna rellena con un material sólido (fase estacionaria) y una solución que contendrá a la

proteína que se desea purificar, la cual se moverá a través de la columna (fase móvil). La solución que contiene la proteína es aplicada en la parte superior de la columna y en su migración a través de ésta se producirán interacciones entre las moléculas de la fase móvil y la fase estacionaria que dependerán de la matriz utilizada en la columna. De esta forma se producirá una migración diferencial de cada uno de los componentes presentes en la solución (Hagel *et al.*, 2008).

1.5.1 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HIC)

La cromatografía de interacción hidrofóbica es una cromatografía de adsorción en la cual se utiliza una matriz con sitios hidrofóbicos que interactúan con los grupos hidrofóbicos superficiales de las proteínas.

Las proteínas tienen una cantidad variable de aminoácidos con cadena lateral hidrofóbica, la mayor parte de estos aminoácidos se encuentran orientados hacia el interior de la proteína cuando ésta se encuentra en solución acuosa. Sin embargo, existe una proporción de ellos que puede estar presente en la superficie de la proteína, estos aminoácidos expuestos interactúan con la matriz debido a razones termodinámicas, produciendo así una elución diferenciada de las proteínas según su hidrofobicidad superficial (Eriksson *et al.*, 2011).

Generalmente, la muestra es aplicada bajo condiciones de alta concentración de sal, debido a que esto favorece la interacción de las zonas hidrofóbicas de la matriz y la proteína. La elución es producida variando las condiciones del medio tales como: incremento del pH, reducción de la temperatura, adición de detergentes o disminución de la concentración de sal (Hagel *et al.*, 2008).

Las etapas de una HIC son las siguientes (Lienqueo, 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.

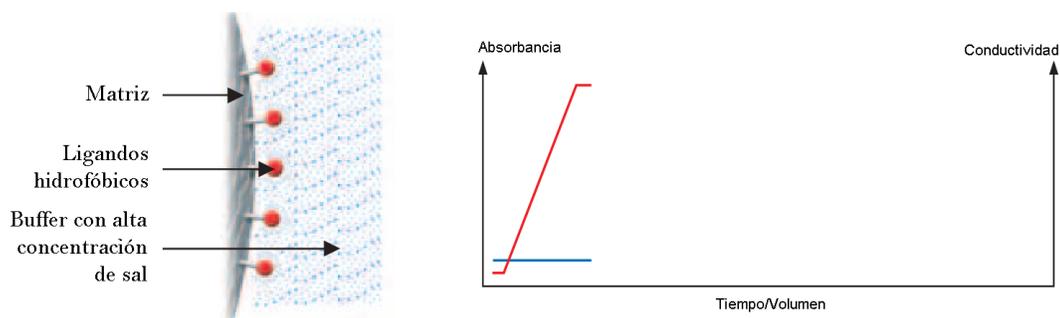


Figura 1.7: Primera etapa en HIC. Ambientación.

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.

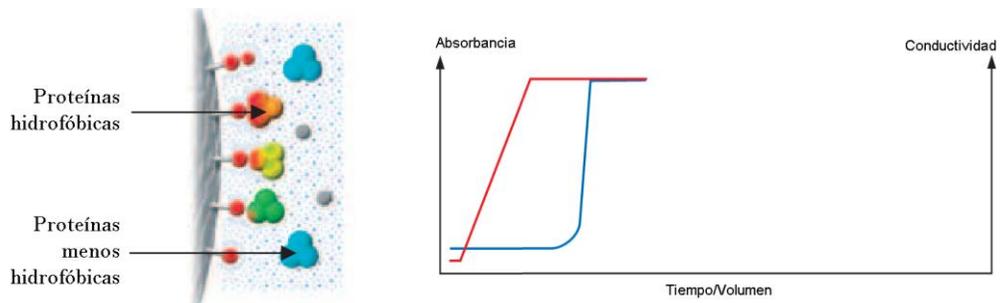


Figura 1.8: Segunda etapa en HIC. Inyección de la muestra.

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 1.9 se muestra un ejemplo de una mezcla de proteínas con distintos niveles de hidrofobicidad.

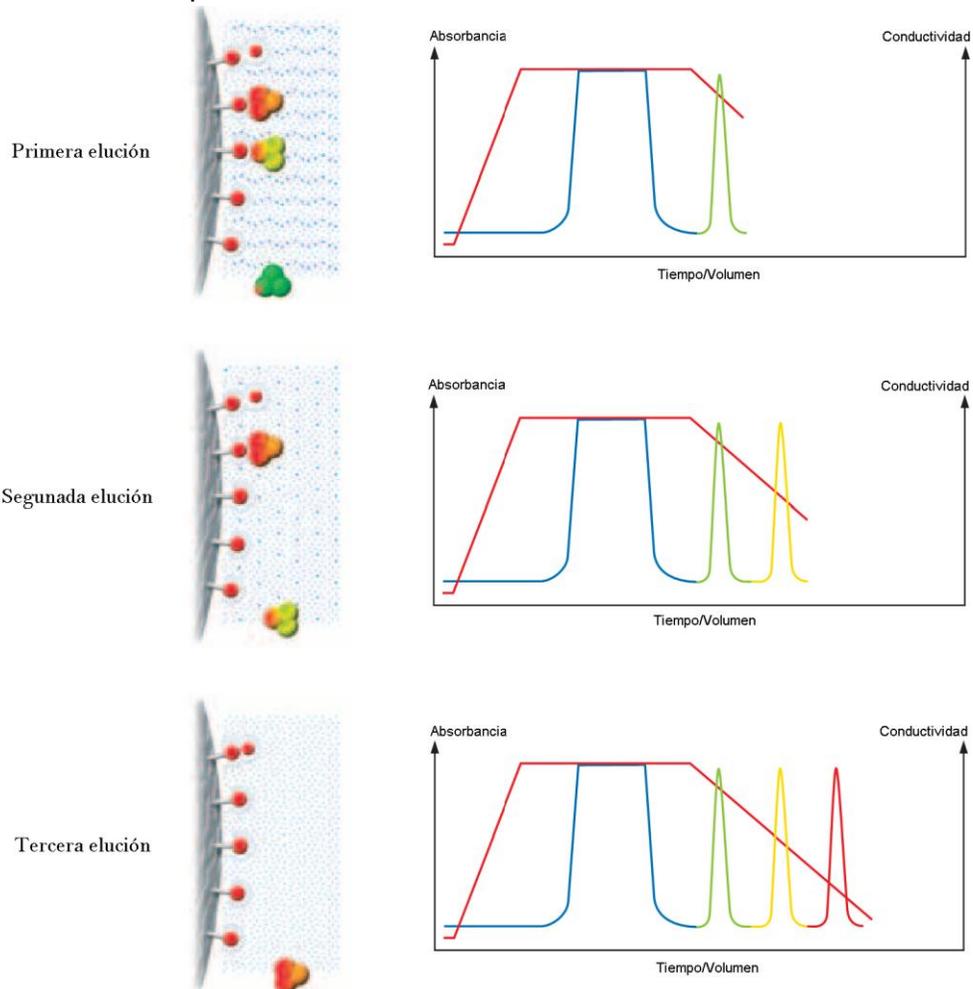


Figura 1.9: Tercera etapa en HIC. Elución de proteínas.

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

1.6 TIEMPO DE RETENCIÓN

El Tiempo de Retención Adimensional (DRT) es un parámetro que se utiliza para caracterizar la elución de una proteína, se calcula a partir de los tiempos o volúmenes a los cuales se inicia (t_0, V_0) y finaliza (t_f, V_f) el gradiente de elución, y del tiempo o volumen al cual eluye la proteína de interés (t_r, V_r), según la ecuación 1.1 (Lienqueo *et al.*, 2002)

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

Ecuación 1.1: Cálculo del DRT.

El DRT tomará valores entre 0 y 1. Para el caso de una HIC los valores cercanos a cero corresponderán a las proteínas más hidrofílicas y los valores cercanos a uno a las proteínas más hidrofóbicas.

La Figura 1.10 representa esquemáticamente los parámetros que definen el DRT en un cromatograma.

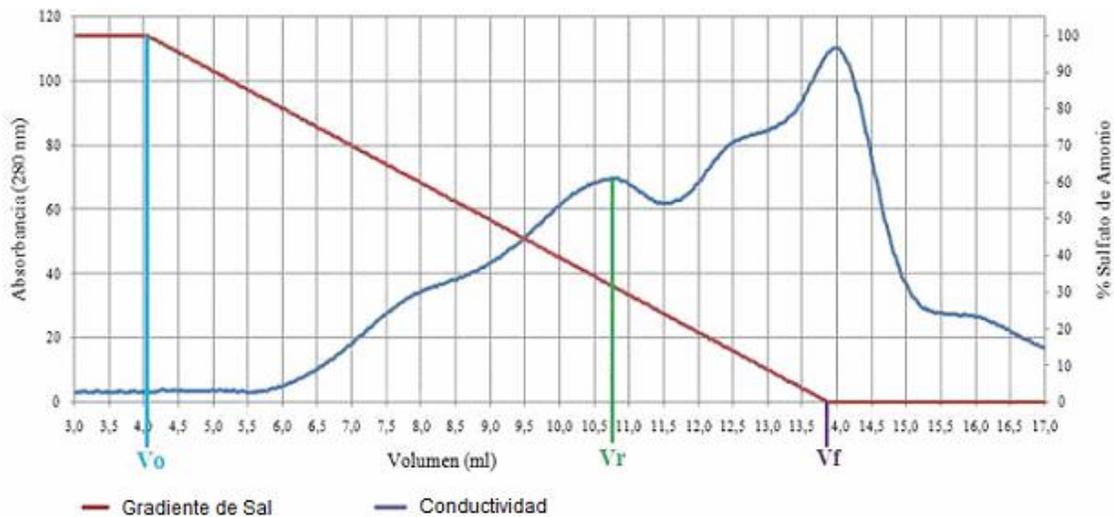


Figura 1.10: Esquema de un cromatograma y parámetros del DRT.

1.7 ADICIÓN DE EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS HIDROFÓBICOS

Una de las técnicas utilizadas en la modificación de proteínas es la adición de pequeños fragmentos de aminoácidos a la secuencia original. Esta adición puede ser realizada en el interior o en los extremos de la proteína.

La adición de extremos polipeptídicos (tags), que modifiquen las propiedades nativas de una proteína, ha sido señalada como una potente herramienta para mejorar el proceso de purificación de proteínas (Flaschel *et al.*, 1993), reduciendo el número de etapas requeridas y aumentando su recuperación (Simeonidis *et al.*, 2005). Existen diversos modelos para la selección de las colas más apropiadas en un proceso de purificación estos se basan en las propiedades de la mezcla de proteínas a purificar, en las propiedades de los aminoácidos del extremo polipeptídicos y en la proteína objetivo (Simeonidis *et al.*, 2005) (Lienqueo *et al.*, 2009).

Debido a la magnitud de las fuerzas de interacción hidrofóbicas, la adición de extremos polipeptídicos altamente hidrofóbicos se perfila como una herramienta de utilidad en la purificación de proteínas. Se ha mostrado que es posible aumentar los tiempos de retención de las proteínas añadiendo extremos hidrofóbicos, debido al aumento de la hidrofobicidad superficial de la proteína (Robinson, 2008; Montecinos, 2009; Delpiano, 2009).

Para aumentar la hidrofobicidad de una proteína, los aminoácidos aromáticos surgen como los principales candidatos, debido a su mayor tamaño, lo cual aumenta el área de exposición. Así los extremos más ampliamente usados para aumentar la hidrofobicidad relativa de una proteína corresponden a cadenas de triptófano, fenilalanina, tirosina e isoleucina (Fexby *et al.*, 2004).

Los aminoácidos más utilizados en la generación de colas hidrofóbicas, son prolina, tirosina y triptófano (Robinson, 2008) (Montecinos, 2009) (Delpiano, 2009). Los residuos de prolina buscan producir una mayor exposición de los extremos gracias a la estructura rígida del anillo que la compone.

1.8 DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE LOS EXTREMOS

La hidrofobicidad de los extremos utilizados se calculará utilizando la ecuación 1.2

$$\Phi_{Tag} = \sum_{k=1}^{20} \phi_k \cdot S_{tag_k} \cdot n_k$$

Ecuación 1.2: Cálculo de la hidrofobicidad extremos.

Donde ϕ_i es la hidrofobicidad del aminoácido tipo i según la escala de Miyazawa y Jernigan (Miyazawa *et al.*, 1985), S_{tag_k} es el área superficial expuesta del aminoácido tipo k en el extremo, asumiendo una exposición total de los aminoácidos añadidos (Simeonidis *et al.*, 2005) y n_k el número de aminoácidos tipo k en el extremo.

1.9 CRITERIOS DE SELECCIÓN

A partir de los trabajos previos se han podido definir los siguientes criterios de selección para los extremos hidrofóbicos que pueden ser adicionados a una proteína para ser purificada mediante HIC:

- Los extremos compuestos de aminoácidos altamente hidrofóbicos mejoran el desempeño de HIC (Fexby *et al.*, 2004).
- Son preferibles los aminoácidos aromáticos, en especial tirosina y triptófano, debido a su mayor tamaño (Fexby *et al.*, 2004).
- Incorporar prolina para asegurar la exposición del extremo y evitar formación de estructuras secundarias. (Robinson, 2008) (Montecinos, 2009)
- El aminoácido triptófano tiene el mayor efecto en el aumento de la hidrofobicidad y el tiempo de retención (Montecinos, 2009)

- El valor de la hidrofobicidad del extremo debe ser menor que 500 para mantener actividad de la enzima. (Delpiano, 2009).
- El aminoácido prolina no es necesario para mantener la actividad en proteínas extracelulares (Delpiano, 2009).
- El tiempo de retención es proporcional al aumento de hidrofobicidad de la proteína modificada (Delpiano, 2009).

1.10 OBJETIVOS

1.10.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar la validez de los criterios de selección establecidos para la adición de extremos hidrofóbicos en la celulasa recombinantes Cel 5A de *B. Agaradherans* para mejorar el proceso de purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).

1.10.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener clones con el gen de celulasa modificada con los extremos hidrofóbicos (WP)4, (WP)2 e Y3.
- Estudiar el nivel de expresión de proteína y actividad de la celulasa en función de los extremos hidrofóbicos adicionados.
- Analizar el efecto que produce la adición de los distintos extremos hidrofóbicos en la recuperación de la proteína mediante cromatografía de interacción hidrofóbica.
- Validar los criterios de selección señalados en función de los datos obtenidos.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 CEPAS BACTERIANAS

- *E. coli* DH5 α
- *E. coli* BL21 (DE3)

2.1.2 REACTIVOS

Tabla 2.1: Reactivos y proveedores.

Proveedor	Reactivos
Novagen (WI-USA)	Vector de expresión pET11a Vector de expresión pET22a Cepa <i>E. coli</i> BL21(DE3)
Promega (WI-USA)	Kit GoTaq® Flexi DNA Polymerase kit pGEM®-T Easy
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas IPTG (Isopropil- β -D-tiogalacto-piranosido) Enzimas de restricción: <i>NdeI</i> y <i>XhoI</i>
Qiagen	Sistemas de purificación de ADN plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep) Extracción de ADN desde geles de agarosa (Kit QIAEX II).
Merck	Ampicilina Cloruro de Sodio Sacarosa
Becton Dickinson	Triptona (Extracto de Caseína) Extracto de Levadura
Winkler	Glicerol Tris
IDT	Partidores
Sigma	X-Gal DNS CMC HEPES

2.1.3 VECTORES DE CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN

Para la transformación bacteriana se utilizarán 2 vectores: el vector de clonamiento pGem®-T Easy (Figura 2.1) y el vector de expresión pET22b(+) (Figura 2.2). A continuación se presentan los vectores y sus principales puntos de referencia.

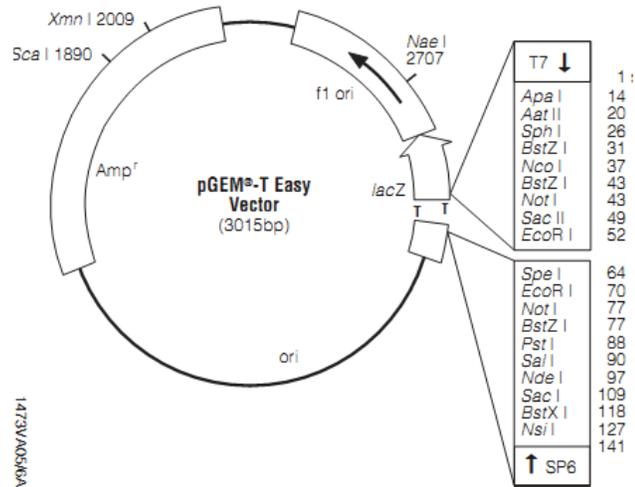


Figura 2.1: Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia. Las regiones codificantes de utilidad para este trabajo corresponden al gen de resistencia a ampicilina *Amp^r* y al gen *lacZ*, región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento múltiple. En el recuadro a la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de clonamiento múltiple.

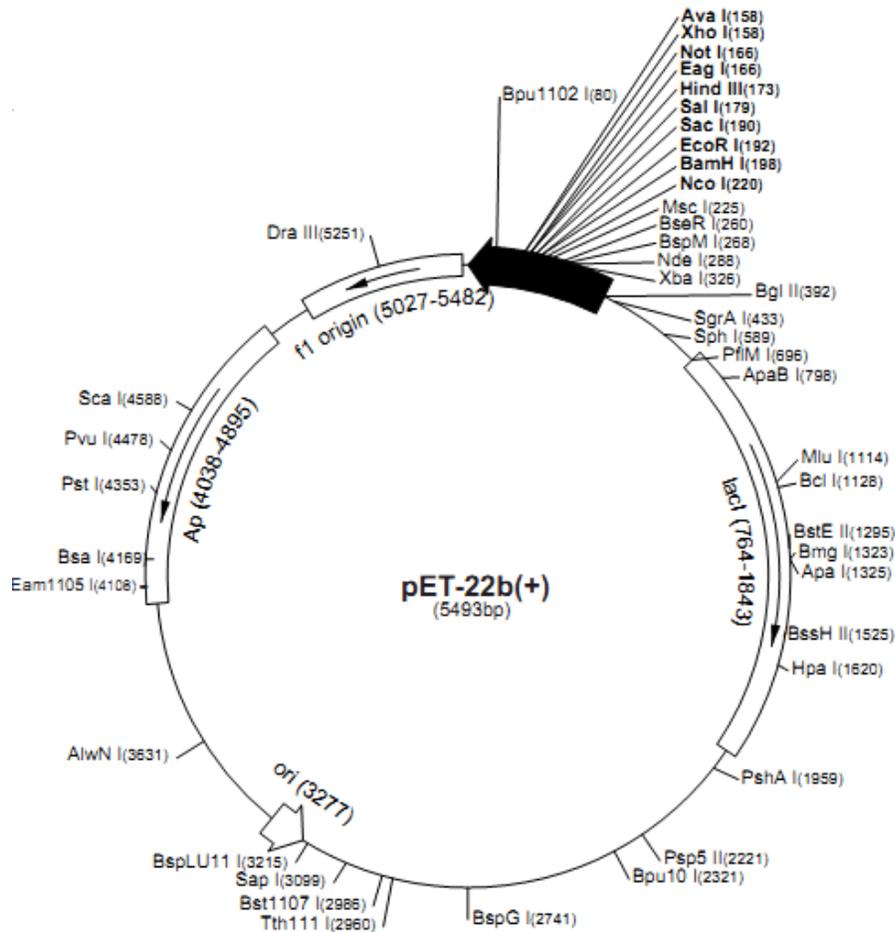


Figura 2.2: Vector pET-22b(+) y sus puntos de referencia. Arriba a la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento, serán usadas las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* en este vector.

2.1.4 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

En la Tabla 2.2 se muestran las enzimas de restricción utilizadas y sus puntos de corte.

Tabla 2.2: Enzimas de restricción.

Enzima	Sitio de Corte
NdeI	5'...C A/T A T G...3' 3'...G T A T/A C...5'
XhoI	5'...C/T C G A G...3' 3'...G A G C T/C...5'

2.1.5 EQUIPOS

Tabla 2.3: Equipos a utilizar.

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

2.1.6 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

En el desarrollo de esta memoria se utilizar las siguientes herramientas computacionales:

Tabla 2.4: Herramientas computacionales.

Herramienta	Fuente	Sitio Web
Compute pl/Mw tool	ExpPASy	http://web.expasy.org/compute_pi/
Oligo Calc	Basic Sciences at the Northwestern University Medical School	http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html
Protein Data Bank	RCSB PDB	http://www.pdb.org/
Stride Web interface	Lehrstuhl für Genomorientierte Bioinformatik der TU München	http://webclu.bio.wzw.tum.de/cgi-bin/stride/stridecgi.py

2.1.7 MEDIOS DE CULTIVO

2.1.7.1 Medios de cultivo líquidos

- **Medio Luria-Broth (LB):** Por cada 1000 mL de solución, el medio LB contiene: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de cloruro de sodio. Ajustar volumen a 1000 mL con agua Milli-Q. Esterilización en autoclave.
- **Medio LB más ampicilina:** medio LB estéril, añadir ampicilina estéril a una concentración final de 100 µg/mL.
- **Medio SOB:** Por cada 1000 mL de solución, el medio SOB contiene: 20 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 0,5 g de cloruro de sodio. Ajustar volumen a 1000 mL con agua Milli-Q. Ajustar pH a 7,0. Esterilización en autoclave.
- **Medio Terrific Broth (TB):** Por cada 1000 mL de solución, el medio TB contiene: 900 mL de agua Milli-Q, 12 g de triptona, 24 g de extracto de levadura, 4 mL de glicerol. Preparar separadamente 100 mL de una solución 0,17 M de KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 , la cual contiene: 2,31 g de KH_2PO_4 , 12,54 g K_2HPO_4 . Ajustar volumen a 100 mL con agua Milli-Q. Esterilizar medio TB y las sales por separado utilizando autoclave. Previo uso del medio TB se agrega la solución de sales.

2.1.7.2 Medios de cultivo sólidos

- **Placas LB-agar con Amp:** Añadir 1,5 g de agar a 100 mL de medio LB y esterilizar en autoclave. Llevar hasta una temperatura de 50°C y añadir ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL. Distribuir la solución en 4 placas Petri estériles. Dejar gelificar y sellar con parafilm. Almacenar a 4°C.
- **Placas Lb-agar con Amp/IPTG/X-Gal:** Añadir 1,5 g de agar a 100 mL de medio LB y esterilizar en autoclave. Llevar hasta una temperatura de 50°C, añadir ampicilina para obtener una concentración final de 100 µg/mL, añadir IPTG para obtener una concentración final de 0,5 mM y añadir X-Gal para una concentración final de 50 µg/mL. Dejar gelificar y sellar con parafilm. Almacenar a 4°C.

2.1.8 SOLUCIONES STOCK

- **IPTG 0,5 [M]:** Se requieren 5 mL de solución de IPTG a una concentración de 0,5 M en agua Milli-Q estéril. Esterilización por filtración con un tamaño de poro de 0,2 µm (Sartorius, Hannover-Alemania). Separar en volúmenes de 1 mL y almacenar a 4°C.
- **Ampicilina 100 [mg/mL]:** Se requiere una solución stock de 5 mL en agua Milli-Q estéril. Esterilización por filtración con un tamaño de poro de 0,2 µm. Separar en volúmenes de 1 mL y almacenar a -20°C.

- **X-Gal 50 [mg/mL]:** Se requiere una solución stock de X-Gal en dimetilformamida. Almacenar a -20°C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

2.1.9 PARTIDORES

Para modificar el gen de celulasa nativa se utilizan 3 extremos distintos (YYY, WPWP y WPWPWP). Para esto se diseñaron 3 partidores *sense* y 2 partidores *antisense*, los cuales fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT).

Los partidores *antisense* poseen la siguiente estructura:

3'-secuencia celulasa (12 nuc) - extremo hidrofóbico (9-24 nuc) - codones de término (3-6 nuc) - sitio de corte *Xho*I (6 nuc) - nucleótidos adicionales (0-3 nuc)-5'

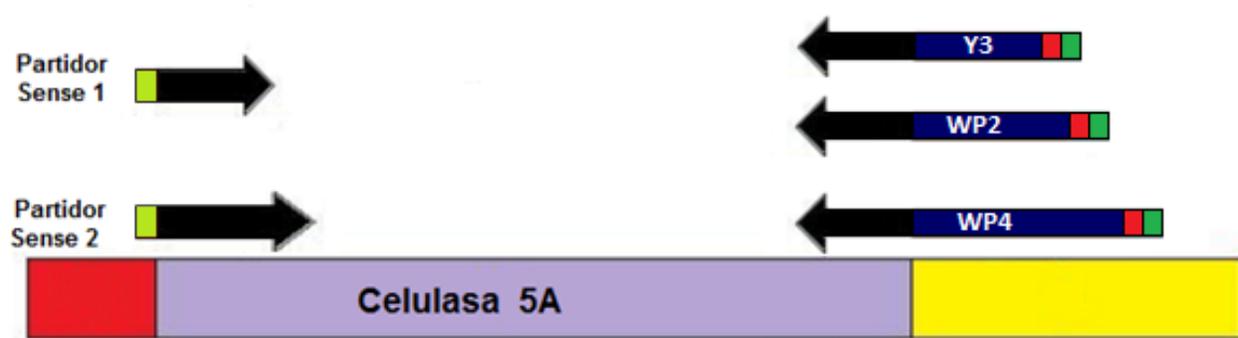


Figura 2.3: Esquema de alineamiento de los partidores con el gen de celulasa nativo. Donde negro: nucleótidos de celulasa, azul: nucleótidos extremos polipeptídicos, rojo: codones de término y verde: sitios de corte enzimas de restricción.

Las secuencias de los partidores sense y antisense, así como su tamaño y temperatura de alineamiento (T_m) se detallan a continuación:

- Partidor sense 1

Secuencia: 5'-CAT ATG GTT GTA GAA GAA CAT GGG CAA TTA AG-3'

T_m : 57,8 °C

Tamaño: 32 pb

- Partidor sense 2

Secuencia: 5'-GGT CAC GTC GGT CAT ATG GTT GTA GAA GAA CAT GGG CAA TTA AGT-3'

T_m : 66,1 °C

Tamaño: 45 pb

- Partidor antisense YYY

Secuencia: 5'-CTC GAG TTA TCA GTA ATA GTA TGA TTC TCT TAT-3'

T_m : 54,1 °C

Tamaño: 33 pb

- Partidor antisense WPWP

Secuencia: 5'- **CTC GAG** CTT **TTA TTA** **CGG CCA CGG CCA** TGA TTC TCT TAT-3'

Tm: 64,9 °C

Tamaño: 39 pb

- Partidor antisense WPWPWPWP

Secuencia: 5'-**CTC GAG** **TTA** **AGG CCA** **AGG CCA** **TGG CCA** **TGG CCA** TGA TTC TCT **TAT-3'**

Tm: 66,1 °C

Tamaño: 45 pb

2.2 MÉTODOS

2.2.1 METODOLOGÍA GENERAL

El trabajo realizado se dividió en tres etapas consecutivas, con actividades y objetivos específicos. La primera etapa fue la síntesis de los genes modificados, donde se buscó obtener el gen de la celulasa con los respectivos extremos hidrofóbicos ((WP)2, (WP)4 e Y3). Luego, se continuó con la etapa de expresión de los genes recombinantes de celulasa. Finalmente, se llegó a la etapa de purificación de proteínas, donde la enzima fue purificada mediante HIC y caracterizada. La Figura 2.4 muestra un diagrama de flujos del proceso.

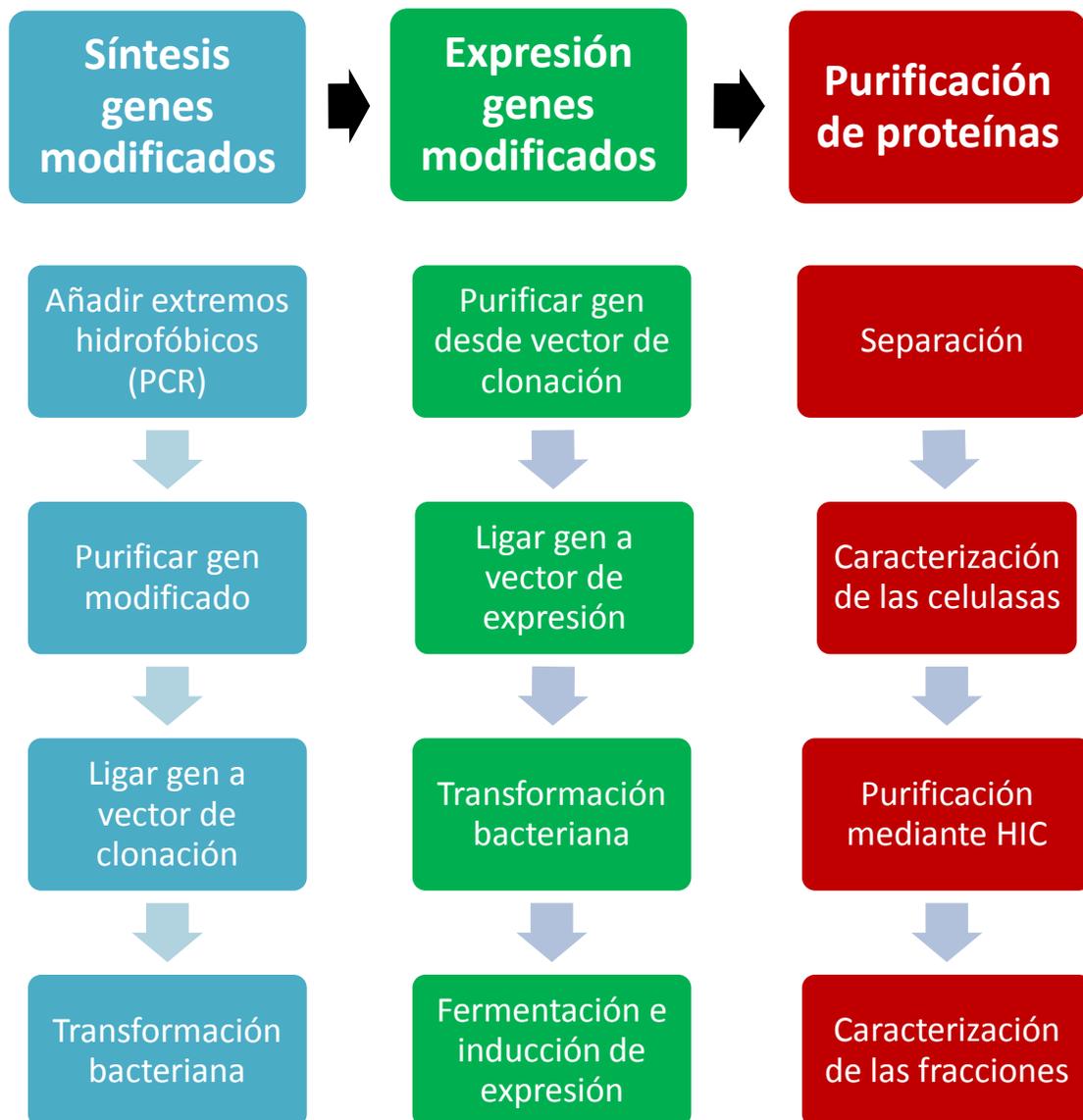


Figura 2.4: Diagrama de flujos de la metodología general. En azul se presenta la etapa de síntesis de los genes modificados, en verde la etapa de expresión de las celulasas modificadas y en rojo la etapa de purificación de las proteínas.

2.2.2 PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMIDIAL

El ADN Plasmidial fue extraído a partir de un cultivo en 4 mL de LB suplementado con ampicilina, el cual fue incubado toda una noche a 37°C y 200 rpm. El cultivo fue inoculado previamente con la cepa *E. coli* BL21(DE3) que contenía el plásmido con el gen de la endoglucanasa 5A nativa.

El cultivo fue centrifugado a 15.600 g durante 1 min en un tubo previamente esterilizado por autoclave. Al finalizar la centrifugación se obtuvo un sedimento de bacterias. Para la extracción del ADN se utilizó el sistema QIAprep Spin Miniprep Kit de QIAGEN, siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.2.3 SÍNTESIS DEL GEN DE CELULASA MODIFICADO

Luego de obtener el gen de celulasa nativo, se realizó PCR (Polymerase Chain Reaction) para cada uno de los partidores *antisense* y su respectivo partidador *sense*. De esta forma, se obtuvieron los genes de celulasa modificados con los extremos hidrofóbicos deseados.

Para la realización del procedimiento, se prepararon 50 µL de mezcla de PCR para cada partidador *antisense*, esta mezcla estaba compuesta de: 10 µL de Buffer 5X, 2,8 µL de MgCl₂, 0,4 µL de dNTPs, 0,25 µL de partidador *sense* (100 µM), 0,25 µL de partidador *antisense* (100 µM), 2,5 µL de ADN Plasmidial, 0,4 µL de GoTaq Flexi DNA Polymerase, completando el volumen final con 33,4 µL de H₂O estéril.

Las temperaturas óptimas (T_{op}) de alineamiento fueron determinadas realizando PCR en un gradiente de temperaturas para cada par de partidadores.

Los ciclos térmicos utilizados fueron los siguientes: 1 ciclo a 95°C por 2 min; 30 ciclos a 95°C por 30 s, T_{op} por 40 s, 72°C por 72 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.

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

2.2.4 CLONAMIENTO EN VECTOR pGEM®-T EASY

El producto de PCR fue ligado al vector pGem®-T Easy, utilizando la siguiente mezcla: 5 µL de Buffer de ligación 2X, 0,5 µL de vector de clonamiento pGem®-T Easy, 3,5 µL de inserto y 1 µL de enzima T4-DNA ligasa, con lo cual se obtuvo un volumen final 10 µL. La mezcla se incubó a 4 °C durante una noche. El producto de ligación fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* DH5α competentes

2.2.5 CLONAMIENTO EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PET22-B(+)

La ligación fue realizada en un volumen final de 10 µL, utilizando la siguiente mezcla: 2,5 µL del vector digerido, 4,5 µL de inserto digerido con las mismas enzimas de

restricción (*NdeI* y *XhoI*), 1 μ L de T4 DNA ligasa y 2 μ L de tampón T4 DNA ligasa 5X. . La mezcla fue dejada a una temperatura de 4 °C durante una noche. El producto de esta ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) competentes.

2.2.6 PREPARACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Para la preparación de bacterias *E. coli* DH5 α y BL21(DE3) electrocompetentes, se inocularon 10 mL de medio SOB con una colonia de la cepa bacteriana correspondiente y se cultivó a 37°C y 200 rpm durante una noche. Luego, se midió la absorbancia a 620 nm, utilizando como blanco medio SOB estéril, y se determinó el volumen necesario para inocular 500 mL de medio estéril a una absorbancia final de 0,05. Los cultivos fueron mantenidos a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una absorbancia entre 0,6 y 0,8 (2 a 4 horas.). Una vez alcanzada la absorbancia deseada los cultivos fueron enfriados en hielo por 10 min y centrifugados a 5.000 g y 4°C por 10 min. El sedimento celular obtenido fue lavado con glicerol estéril al 10% v/v, 2 veces. Luego del segundo lavado el sedimento fue resuspendido en el glicerol residual y alicuotado. Las bacterias obtenidas fueron almacenadas a una temperatura de -80°C.

2.2.7 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Se añadió 1 μ L de mezcla de ligación a 40 μ L de bacterias electrocompetentes. Las condiciones del electroporador fueron: 420 V, 330 μ F, baja impedancia, tasa de carga rápida y tiempo máximo de 2,5 ms. Las bacterias obtenidas fueron transferidas a 1 mL de medio LB estéril e incubadas a 37°C y a 200 rpm durante 1 h. Luego fueron centrifugadas 13.000 rpm durante 1 min y se descartaron 900 μ L del sobrenadante obtenido. El sedimento fue resuspendido en el sobrenadante restante y se transfirió a placas LB-Agar con Ampicilina (100 μ g/mL). Para el caso del vector pGem®-T Easy, la placas contenían además X-Gal (50 μ g/mL) e IPTG (0,5 mM). Las placas fueron incubadas a 37°C durante una noche y posteriormente conservadas a 4°C.

2.2.8 PCR DE COLONIAS

Este método fue utilizado para corroborar la presencia del inserto en las colonias seleccionadas como clones positivos. Para el caso de los clones con el vector pGem®-T Easy, se escogieron las colonias de color blanco, mientras que para el vector pET22b(+) se seleccionaron las colonias que lograron crecer en la placa. Estas colonias fueron transferidas a tubos Eppendorf con 100 μ L de agua Milli-Q estériles e incubadas a 100°C durante 10 min. Se tomó una muestra de 5 μ L, la cual fue añadida a 15 μ L de mezcla de PCR, con los partidores correspondientes al fragmento clonado. Luego, se realizó el protocolo de PCR correspondiente para cada enzima. Finalmente, los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v.

2.2.9 DIGESTIÓN DE ADN PLASMIDIAL

Los vectores de clonamiento y expresión, fueron digeridos utilizando las enzimas de restricción (*NdeI* y *XhoI*) para obtener así un vector linealizado o liberar el inserto. La reacción de digestión contenía: 10 µL del vector, 2 µL de Buffer D, 2 µL de BSA, 1 µL de cada enzima de restricción y 4 µL de agua Milli-Q estéril, obteniéndose un volumen final de 20 µL. La mezcla fue incubada a 37°C durante 2 h. El resultado fue visualizado en un gel de agarosa al 1% p/v.

2.2.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

La electroforesis en gel de agarosa fue utilizada para determinar el tamaño de los insertos, visualizar resultados de digestión plasmidial y corroborar las transformaciones bacterianas. Se mezclaron muestras en proporción 5:1 con tampón de carga 6X (glicerol 30% p/v y azul de bromofenol 0,25% p/v), luego estas fueron cargadas en el gel de agarosa al 1% p/v. Se utilizó un estándar de peso molecular 1 Kpb DNA ladder y tampón de corrida TAE 1X. La electroforesis fue llevada a cabo a un voltaje de 80 V.

2.2.11 PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

Para purificar los fragmentos de ADN desde un gel de agarosa, se extrajo la banda de ADN desde el gel de agarosa con la ayuda de un bisturí, cuidando de que el fragmento de agarosa fuera lo más pequeño posible y la exposición a la luz UV mínima. El fragmento se introdujo en un tubo Eppendorf de 1,5 mL estéril y luego se utilizó el sistema QIAEX II Gel Extraction, siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.2.12 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE CELULASAS

Para inducir la expresión del gen de endoglucanasa modificado, se añadió una colonia de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el gen de la enzima mutante en pET-22b(+) a un tubo Falcon estéril con 8 mL de LB más Amp (100 mg/mL), cultivándose una noche a 37°C y 200 rpm. Se midió la absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp (100 mg/mL), a una absorbancia final de 0,05. El cultivo fue mantenido a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una absorbancia de 0,6. Luego se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó 4 horas a 18°C y 200 rpm.

2.2.13 RECUPERACIÓN DE PROTEÍNA

La fracción extracelular fue recuperada a partir del sobrenadante luego de centrifugar el cultivo 7 min a 4°C y 3.400 g.

Las proteínas de la fracción periplasmática fueron recuperadas mediante choque osmótico a los sedimentos celulares del paso anterior. Estos fueron resuspendidos en 5

mL de Buffer TES frío (Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; sacarosa 20%). Luego se añadió EDTA frío a una concentración final de 1 mM.

El pellet resuspendido fue agitado en hielo durante 10 min y luego centrifugado a 3.400 g y 4°C por 10 min. El sobrenadante fue recuperado para cuantificar la actividad y determinar la pérdida de proteínas en esta etapa.

El sedimento obtenido fue resuspendido en 5 mL de agua fría estéril, agitándose en hielo durante 10 min y luego se centrifugado a 4°C y 3.400 g por 10 min. El sobrenadante obtenido corresponde a la fracción periplasmática.

2.2.14 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteína total fue determinada utilizando el ensayo de Bradford modificado. La mezcla contiene: 1,2 mL de agua destilada, 500 µL de reactivo de Bradford (1 gr/L Coomasi preparado en HCl 2,2% v/v) y 50 µL de muestra. Se midió la absorbancia a 595 nm y 465 nm y se calculó la razón entre ellas.

Se realizó una curva de calibración con BSA (ver Anexo A), utilizando como blanco agua destilada.

2.2.15 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD CELULOLÍTICA EN MEDIO LÍQUIDO

La actividad celulolítica de las enzimas se midió utilizando como sustrato CMC al 1% p/v en buffer HEPES 50 mM pH 7,5. Los azúcares reductores obtenidos de la hidrólisis se calcularon midiendo la absorbancia a 550 nm. Los valores de absorbancia se convirtieron a concentración de azúcares reductores mediante una curva de calibración construida con distintas concentraciones de glucosa (ver Anexo A). Calculándose la actividad como la cantidad de micromoles de glucosa liberados por minuto.

Para realizar este ensayo se incubaron 50 µL de muestra con 100 µL de CMC por 1 h a 37°C. Luego a 50 µL de la reacción se le adicionaron 50 µL de DNS y se incubaron durante 10 min a 100°C y por 5 min en hielo. Finalmente se traspasaron 50 µL a microplacas desechables de 96 pocillos y midió la absorbancia a 550 nm en un lector de placas.

2.2.16 DETERMINACIÓN DE LA HIDROFOBICIDAD DE LOS EXTREMOS

El valor de la hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos utilizados fue calculado utilizando la Ecuación 1.2 y los valores de la Tabla 2.5.

Tabla 2.5: Valores de hidrofobicidad y área superficial para los aminoácidos utilizados.

Aminoácido	Hidrofobicidad (ϕ_i) [-]	Área superficial (S_{tag-k}) [Å^2]
Prolina (P)	0,151	180
Tirosina (Y)	0,484	230
Triptófano (W)	0,775	255

2.2.17 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HIC)

Para realizar la cromatografía de interacción hidrofóbica se utilizó una columna empacada con 1 mL de resina Butil Sefarosa Fast Flow 6FF, cuyas dimensiones son 5 cm de altura y 5 mm de diámetro interno. El equipo utilizado fue el cromatógrafo ÄKTA Purifier 10, controlado por el software UNICORN 5.1.

Los buffers utilizados fueron, Buffer A: Tris-HCl 20 mM, pH 7,0 y Buffer B: Buffer A + 2M Sulfato de Amonio. Purificados mediante filtración con filtros Millipore de 0,22 μm y desgasificados con helio durante 5 min.

La cromatografía se inició con una concentración de sal equivalente al 100% del Buffer B, y se generó un gradiente lineal de 10 volúmenes de columna con el Buffer A, hasta obtenerse un 0% de concentración de sal. El flujo utilizado fue de 0,75 mL/min y se mantuvo constante durante todo el proceso. Se inyectaron 4 mL de muestra en solución 2M de sulfato de amonio, utilizando un loop de 2 mL. Se colectaron fracciones de 0,5 mL.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ADICIÓN DE EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS HIDROFÓBICOS A CELULASA

3.1.1 GENERACIÓN DEL GEN DE LA CELULASA MODIFICADA POR PCR

La generación de las celulasas modificadas con los distintos extremos polipeptídicos, se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, utilizando como templado el ADN plasmidial con el gen silvestre y los partidores *sense* y *antisense* correspondientes en cada caso los que se encuentran descritos en la sección 2.1.9.

Debido a que sólo se contaba con las temperaturas de alineamiento teóricas de los partidores, fue necesaria la realización de un gradiente de temperaturas de alineamiento de entre 10 y 15 °C en torno a esta, para obtener la que presentara el mejor resultado al ser observado en un gel de agarosa. Los resultados para las diferentes mutantes estudiadas se muestran en las Figuras 3.1 a 3.3.

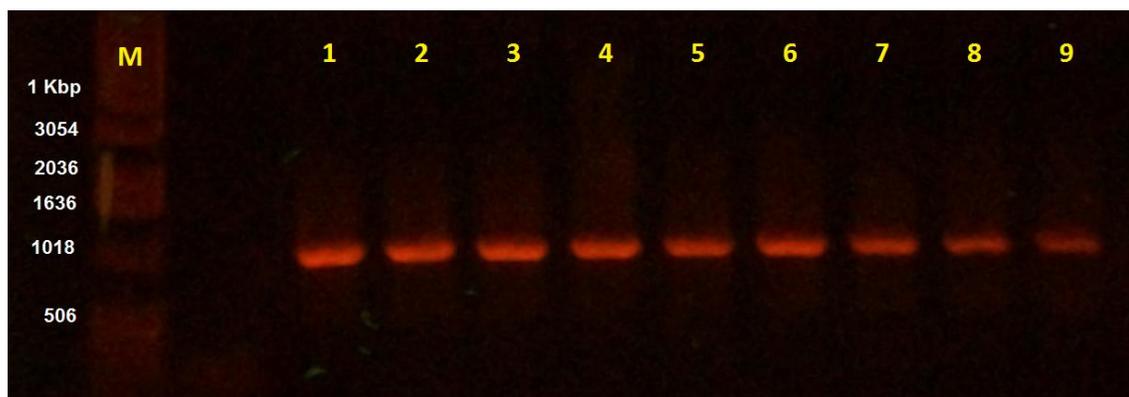


Figura 3.1: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 1-Y3. M: Marcador de pesos moleculares. Carriles 1-9 Temperaturas del gradiente, 1:54°C; 2:55,6°C; 3:56,8°C; 4:58,1°C; 5:59,5°C; 6:60,8°C; 7:62,1°C; 8:63,2°C; 9:64,4°C.

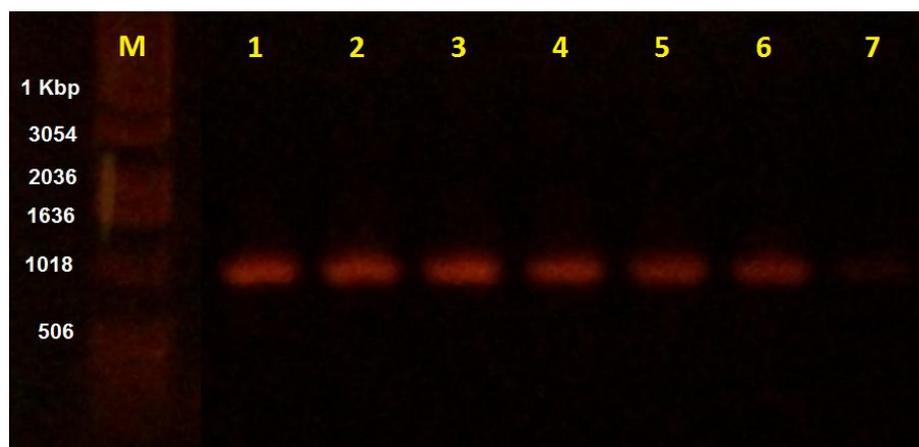


Figura 3.2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 1-WP2. M: Marcador de pesos moleculares. Carriles 1-7 Temperaturas del gradiente, 1:58,9°C; 2:60°C; 3:61,3°C; 4:62,9°C; 5:64,7°C; 6:66,7°C; 7:68,6°C.

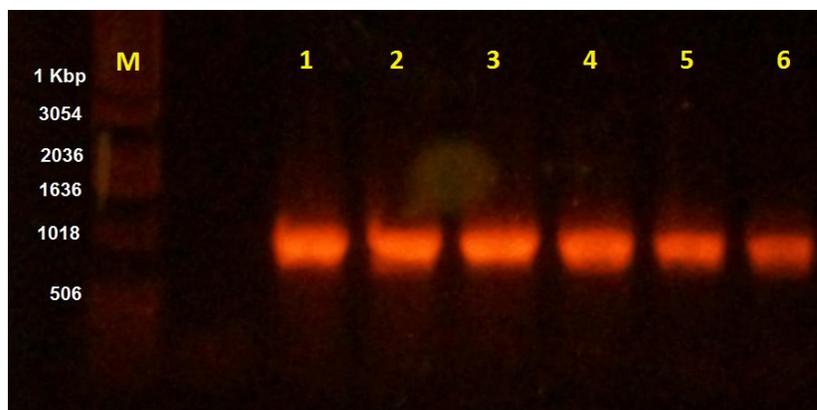


Figura 3.3: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperaturas de alineamiento para el par de partidores Sense 2-WP4. M: Marcador de pesos moleculares. Carriles 1-6 Temperaturas del gradiente: 1:58,9°C; 2:60,2°C; 3:62,9°C; 4:66,7°C; 5:70,3°C; 6:73,0°C.

A partir de los gradientes realizados (Figuras 3.1, 3.2 y 3.3) se obtuvieron las temperaturas óptimas de alineamiento, las cuales se presentan en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Temperaturas óptimas de alineamiento.

Par Partidores	Temperatura óptima [°C]
Sense 1 - Y3	57
Sense 1 - WP2	61
Sense 2 - WP4	63

Utilizando las temperaturas óptimas se realizaron nuevos PCRs para la obtención de las celulasas modificadas. En la Figura 3.4 se presentan los resultados obtenidos para cada uno de los extremos polipeptídicos.

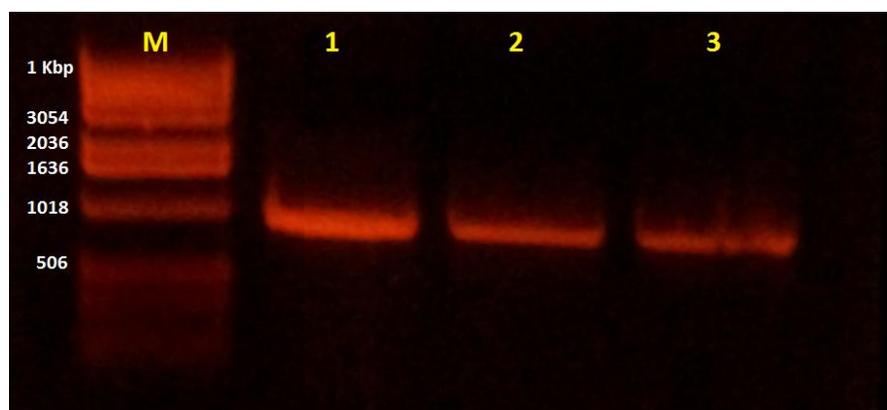


Figura 3.4: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR a temperatura óptima. . M: Marcador de pesos moleculares. Carril 1: Par Sense 1-Y3. Carril 2: Par Sense 1-WP2. Carril 3: Par Sense 2-WP4.

Es posible observar que la síntesis de los genes modificados fue exitosa para los tres extremos hidrofóbicos utilizados, debido a que se observa una sola banda de alrededor 920 pb en cada caso. Este tamaño corresponde al esperado para una amplificación por PCR utilizando los partidores señalados.

3.1.2 CLONAMIENTO DEL GEN MODIFICADO EN EL VECTOR pGEM®-T EASY

Luego de generar los genes modificados, los fragmentos fueron purificados a partir del gel de agarosa y posteriormente ligados al vector de clonamiento pGem®-T Easy según el procedimiento descrito en la sección 2.2.4. El producto de la ligación se utilizó para transformar bacterias *E. coli* DH5 α mediante electroporación. Las bacterias transformadas fueron cultivadas en placas LB-Agar con Amp, X-Gal e IPTG, seleccionándose las colonias positivas para realizar el PCR de colonia.

En las Figuras 3.5 a 3.7 se presentan los resultados de los PCR de colonias realizados a las distintas variantes.

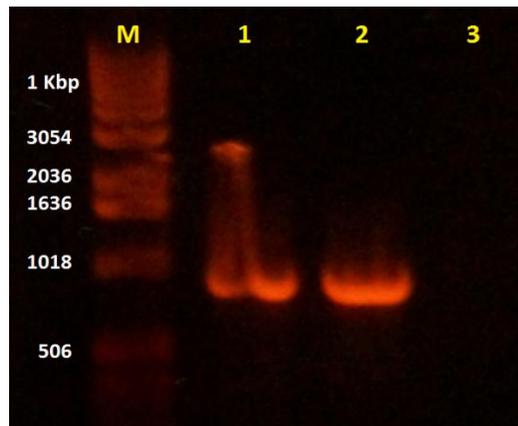


Figura 3.5: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias *E. coli* DH5 α transformadas con gen Celulasa-Y3 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy. M: marcador pesos moleculares. Carriles 1-3: Colonias 1-3 Celulasa-Y3.

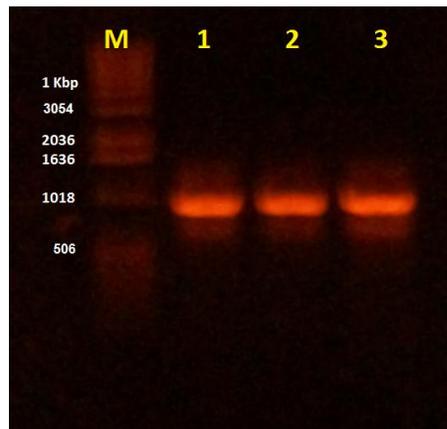


Figura 3.6: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias *E. coli* DH5 α transformadas con gen Celulasa-WP2 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy. M: marcador pesos moleculares. Carriles 1-3: Colonias 1-3 Celulasa-WP2.

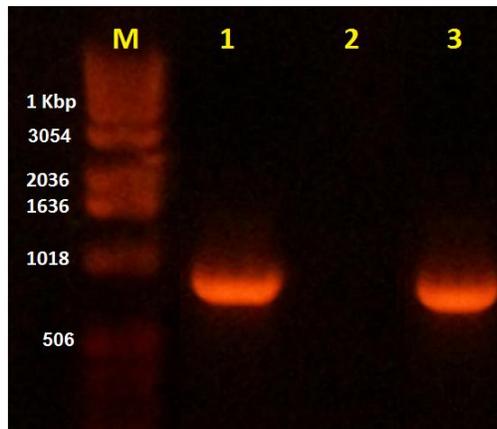


Figura 3.7: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias *E. coli* DH5α transformadas con gen Celulasa-WP4 ligado al vector de clonamiento pGem®-T Easy. M: marcador pesos moleculares. Carriles 1-3: Colonias 1-3 Celulasa-WP4.

En todos los casos es posible observar bandas alrededor de los 920 pb, que corresponden a colonias que poseen el inserto de celulasa modificado. Para la variante Celulasa-WP2, las 3 colonias seleccionadas presentaron el inserto, en cambio para las variante Celulasa-Y3 y Celulasa-WP4, se obtuvieron 2 colonias recombinantes. La ausencia del inserto deseado en algunas colonias se debe a que el gen recombinante no se unió con el vector de clonamiento pGem®-T Easy en la etapa de ligación.

Las colonias positivas para los insertos fueron cultivadas en medio LB líquido suplementado con ampicilina, para luego extraerles el ADN plasmidial, el cual fue sometido a una digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *NdeI* según el procedimiento descrito en la sección 2.2.9.

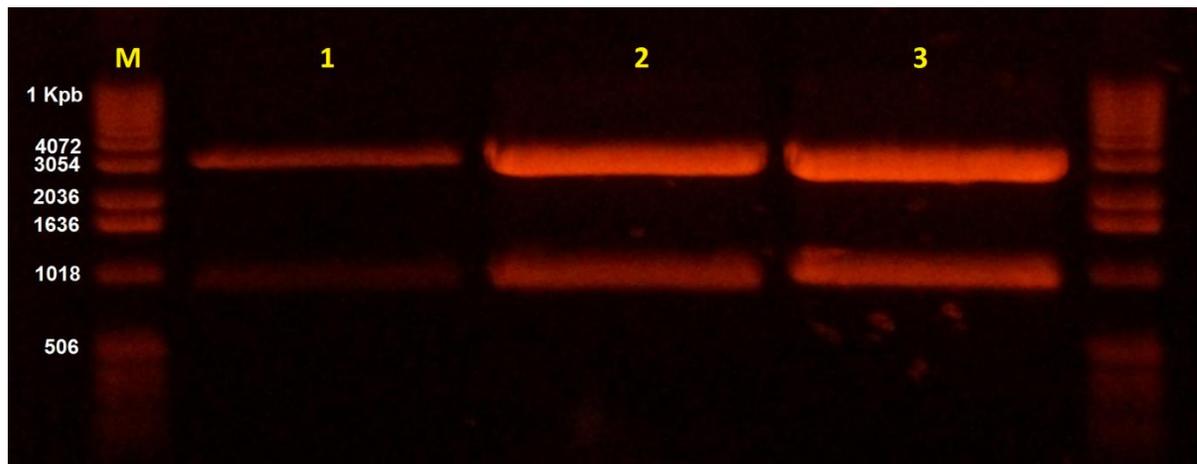


Figura 3.8: Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del ADN plasmidial. M: marcador pesos moleculares 1Kpb. Carril 1: Celulasa-Y3. Carril 2: Celulasa-WP2. Carril 3: Celulasa-WP4.

La Figura 3.8 muestra el resultado de las digestiones, las bandas superiores corresponde al vector de clonamiento (3015 pb) y las inferiores a los insertos (920 pb aprox.). Se puede observar que la digestión funcionó correctamente en los tres casos. A pesar de que el carril correspondiente a la Celulasa-Y3 presenta una banda más débil,

esto no fue impedimento para la recuperación del inserto deseado a partir del gel de agarosa.

3.1.3 CLONAMIENTO DEL GEN MODIFICADO EN EL VECTOR DE EXPRESIÓN PET22-B(+)

A partir de los geles de agarosa de la digestión de ADN plasmidial, se procedió a la purificación de los insertos correspondiente a cada extremo hidrofóbico. Estos insertos fueron ligados a vectores de expresión pET-22b(+) digeridos con el mismo par de enzimas de restricción. El producto de la ligación fue utilizado para transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) mediante electroporación. Las células electroporadas fueron cultivadas en placas de LB-agar suplementadas con ampicilina. Se seleccionaron 3 colonias de cada variante para confirmar la presencia del inserto mediante la realización de un PCR de colonia.

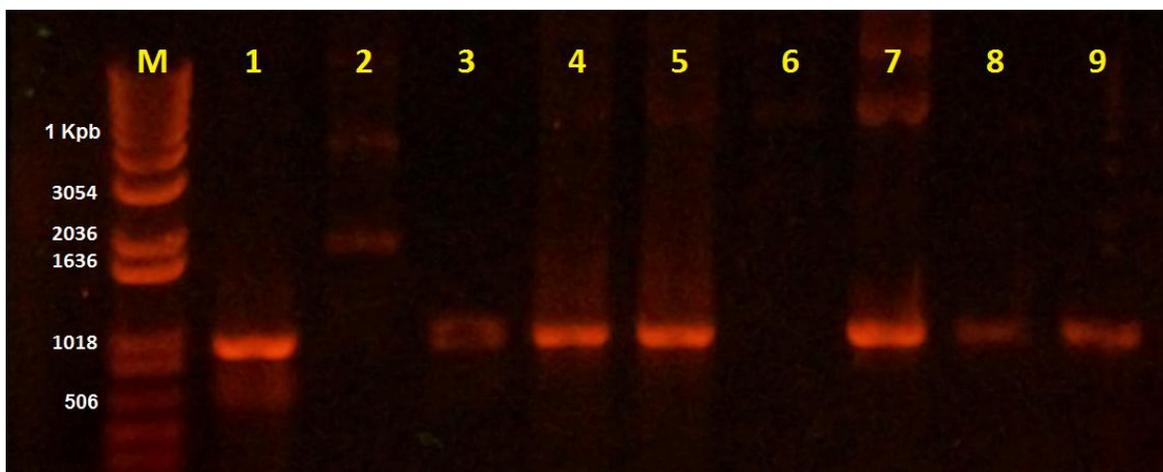


Figura 3.9: Electroforesis en gel de agarosa de los productos del PCR de colonias de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los genes de celulasa modificados ligados al vector de expresión pET22b(+).

M: Marcador pesos moleculares 1 kb. Carriles 1-3: Colonias Celulasa-Y3.
Carriles 4-6: Colonias Celulasa-WP2. Carriles 7-9: Colonias Celulasa-WP4.

En la Figura 3.9 se puede observar que 2 de las 3 colonias seleccionadas de las variantes Celulasa-Y3 y Celulasa-WP2, resultaron positivas para la presencia del inserto. Para la variante Celulasa-WP4, todas las colonias seleccionadas poseían el inserto. El tamaño de los fragmentos de ADN corresponde al esperado (920 pb aprox.) en todos los casos positivos.

3.2 SECUENCIAMIENTO DE LOS VECTORES OBTENIDOS

Los plasmidios obtenidos fueron enviados a *Macrogen Inc.* para su secuenciación. En la Tabla 3.2 se presenta el alineamiento de las secuencias aminoacídicas de todas las variantes, en el Anexo B se muestra el detalle de las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada una de las celulasas modificadas.

Se observa que existe muy poca variación en la secuencia de aminoácidos obtenida en cada caso, sólo la variante celulasa-WP2 presenta 2 aminoácidos distintos. Además las tres variantes mutantes presentan una modificación común, la cual hace suponer que ésta probablemente ya se encontraba en el templado silvestre utilizado en la generación de las mutantes.

Tabla 3.2: Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de la Endoglucanasa 5A de *B. Agaradherans* y las variantes Celulasa-Y3, Celulasa-WP2 y Celulasa-WP4. En amarillo se destacan los aminoácidos mutados.

Variante	Secuencia	
wildType	VVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMKWLRD	50
Ce1-Y3	VVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMKWLRD	50
Ce1-WP2	VVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMKWLRD	50
Ce1-WP4	VVEEHGQLSISNGELVNERGEQVQLKGMSSHGLQWYGQFVNYESMKWLRD	50
wildType	DWGINVFRAAMYTSSGGYIDDPVSVKEKVKVEAVEAAIDLDIYVIIDWHILS	100
Ce1-Y3	DWGINVFRAAMYTSSGGYIDDPVSVKEKVKVEAVEAAIDLDIYVIIDWHILS	100
Ce1-WP2	DWGINVFRAAMYTSSGGYIDDPVSVKEKVKVEAVEAAIDLDIYVIIDWHILS	100
Ce1-WP4	DWGINVFRAAMYTSSGGYIDDPVSVKEKVKVEAVEAAIDLDIYVIIDWHILS	100
wildType	DNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNVIYEIANEPNGSDVTWGNQIKPY	150
Ce1-Y3	DNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNVIYEIANEPNGSDVTWGNQIKPY	150
Ce1-WP2	DNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNVIYEIANEPNGSDVTWGNQIKPY	150
Ce1-WP4	DNDPNYKKEAKDFFDEMSELYGDYPNVIYEIANEPNGSDVTWGNQIKPY	150
wildType	AAEVIPIIRNNDPNNIIIVGTGTWSQDVHHAADNLADPNVMAFHFYAG	200
Ce1-Y3	AAEVIPIIRNNDPNNIIIVGTGTWSQDVHHAADNLADPNVMAFHFYAG	200
Ce1-WP2	AAEVIPIIRNNDPNNIIIVGTGTWSQDVHHAADNLADPNVMAFHFYAG	200
Ce1-WP4	AAEVIPIIRNNDPNNIIIVGTGTWSQDVHHAADNLADPNVMAFHFYAG	200
wildType	THGQNLRDQVDYALDQGAAIFVSEWGTSAAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDE	250
Ce1-Y3	THGQNLRDQVDYALDQGAAIFVSEWGTSAAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDE	250
Ce1-WP2	THGQNLRDQVDYALDQGAAIFVSEWGTSAAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDE	250
Ce1-WP4	THGQNLRDQVDYALDQGAAIFVSEWGTSAAATGDGGVFLDEAQVWIDFMDE	250
wildType	RNLWANWSLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIRESW	299
Ce1-Y3	RNLWANWSLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIRESW	300
Ce1-WP2	RNLWANWSLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIRESW	300
Ce1-WP4	RNLWANWSLTHKDESSAALMPGANPTGGWTEAELSPSGTFVREKIRESW	300
wildType	-----	
Ce1-Y3	YY-----	302
Ce1-WP2	PWP-----	303
Ce1-WP4	PWPWPWP	307

3.3 PRODUCCIÓN DE LA CELULASAS MODIFICADAS

Todas las variante obtenidas, así como también la cepa nativa fueron cultivadas en duplicado y se indujo la expresión de la proteína según las indicaciones descritas en la sección 2.2.12. Luego se recuperaron las fracciones periplasmática (PER), lavado con TES (TES) y extracelular (EXT) como se indica en la sección 2.2.13, a las cuales se les realizó un análisis de actividad endoglucanasa y se cuantificó la cantidad de proteína presente.

3.3.1 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD

A continuación se presenta los resultados del análisis de actividad celulolítica total de todas las fracciones recolectadas. Los resultados corresponden al promedio de las 2 mediciones realizadas para cada variante.

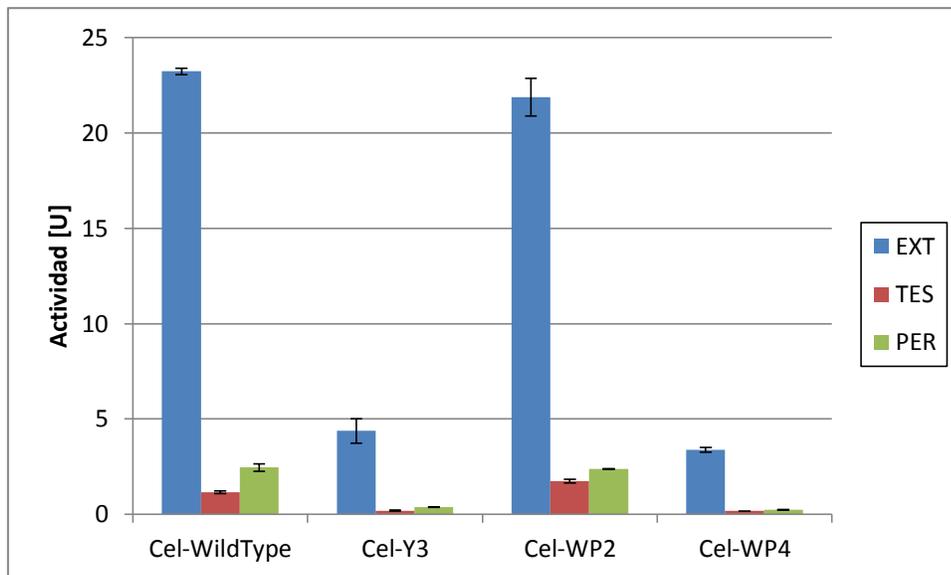


Figura 3.10: Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores obtenidos.

En la Figura 3.10, se observa que los datos poseen una baja dispersión, con errores que no superaran el 11%, lo cual indica que se cuenta con una buena reproducibilidad de los experimentos.

La variante que expresa la Celulasa-WP2 es la que presenta la mayor actividad entre las proteínas modificadas, conservando un 97% de la actividad de la cepa nativa, en cambio las variantes productoras de Celulasa-Y3 y de Celulasa-WP4 sufren una gran disminución de la actividad total, conservando el 18% y 14% de la actividad de la cepa nativa, respectivamente.

La Figura 3.11 muestra el porcentaje de la actividad total que está presente en cada una de las fracciones recolectas. Aquí se puede observar que todas las variantes tienen una distribución similar de la actividad, presentando aproximadamente un 87% de la actividad en la fracción extracelular, un 5% en la fracción de lavado con TES y un 8% en la fracción periplasmática. Por esto se concluye que a pesar de presentarse diferencias en cuanto a los niveles de actividad total obtenidos, la distribución de la enzima no varía entre las distintas fracciones.

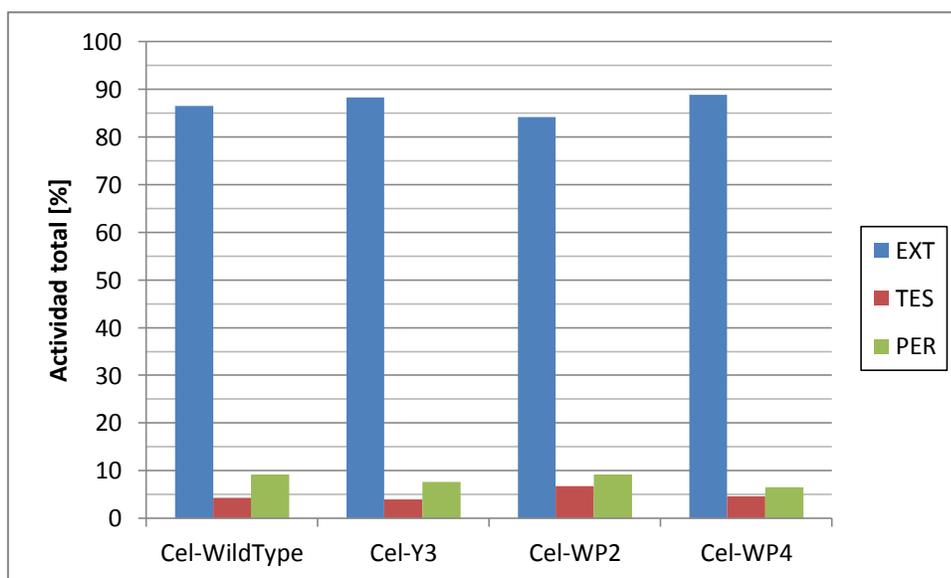


Figura 3.11: Distribución porcentual de la actividad celulolítica total entre las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).

3.3.2 ANÁLISIS DE PROTEÍNA

A continuación se presenta los resultados de la cuantificación de proteína total de todas las fracciones recolectadas. Los resultados corresponden al promedio de las mediciones realizadas para cada variante.

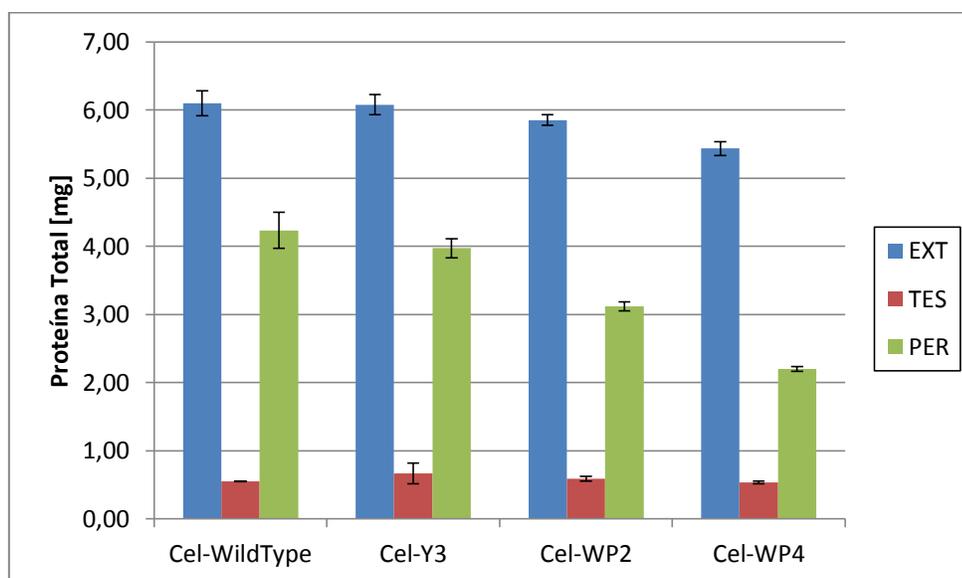


Figura 3.12: Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores obtenidos.

En la Figura 3.12 se puede observar que todas las variantes utilizadas producen una mayor cantidad de proteína en la fracción extracelular en comparación con la fracción periplasmática; además, existe una baja pérdida en la fracción lavada con TES. La desviación estándar de los datos es bastante baja, por lo cual se tiene una buena reproducibilidad de los experimentos.

La proteína total producida, sumando las tres fracciones obtenidas, fue similar para las cepas nativa (10,89 mg) y la variante celulasa-Y3 (10,72 mg), siendo menor para las variantes celulasa-WP2 (9,57 mg) y celulasa-WP4 (8,17 mg).

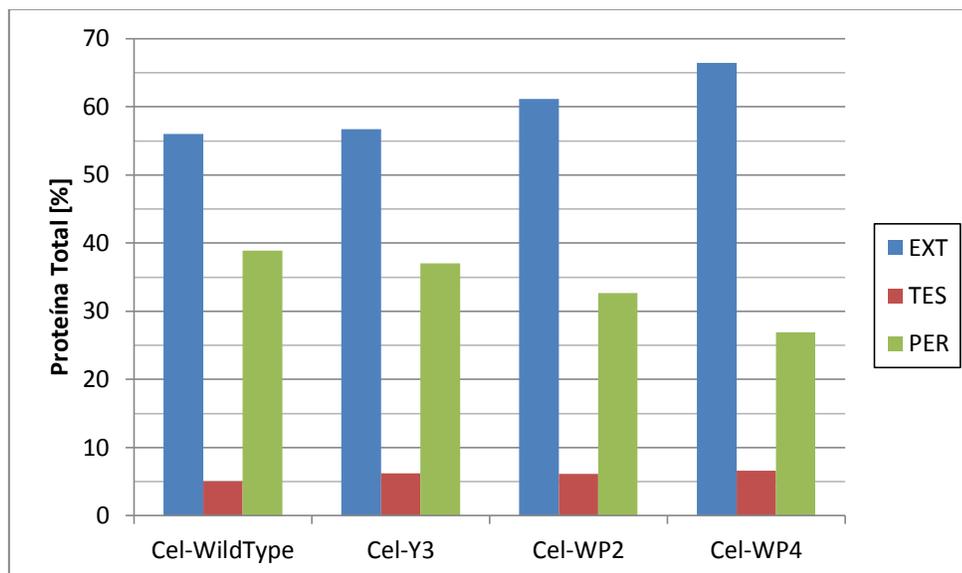


Figura 3.13: Distribución porcentual de cantidad de proteína entre las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER).

En la Figura 3.13 se puede observar que la celulasa nativa y la celulasa-Y3 distribuyen de forma similar la proteína producida, obteniéndose aproximadamente un 56% en la fracción extracelular y un 38% en la fracción periplasmática. Esta distribución varía para las variantes restantes, teniéndose un 61% en la fracción extracelular y un 33% en la fracción periplasmática para la celulasa-WP2 y un 67% en la fracción extracelular y un 27% en la fracción periplasmática para la celulasa-WP4. La fracción lavada con TES se mantiene con un valor de aproximadamente 6% para todos los casos.

A partir de los resultados de proteína total y actividad es posible obtener la actividad específica de cada fracción recolectada, resultados que se presentan a continuación:

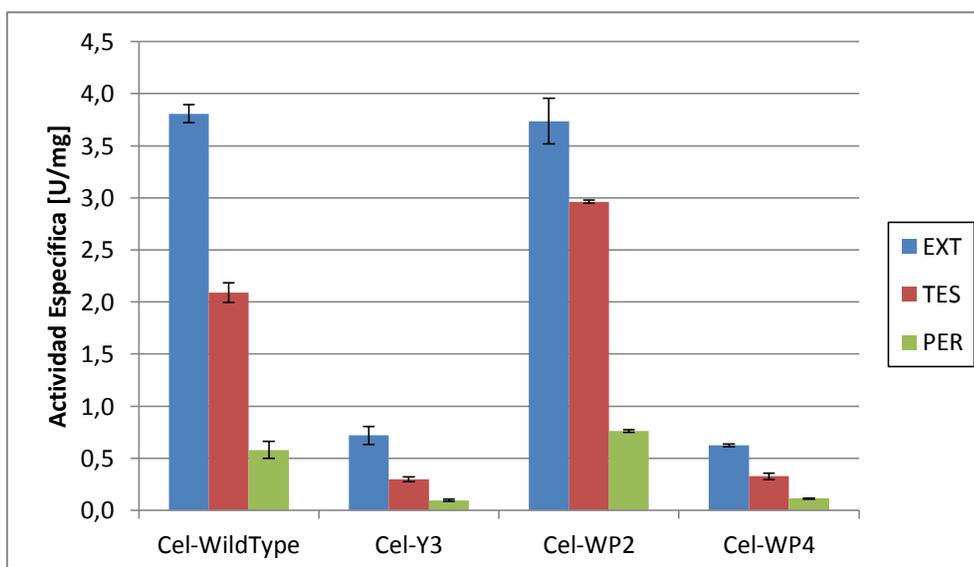


Figura 3.14: Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXT), lavado con TES (TES) y periplasmática (PER). Las barras de error corresponden a la desviación estándar de los valores obtenidos.

En la Figura 3.14 se observa que todas variantes expresan la mayor actividad específica en la fracción extracelular. Esto indica que la modificación del gen con los distintos extremos hidrofóbicos no afectó mayormente la capacidad de la proteína de ser exportada al medio extracelular.

La celulasa nativa y la celulasa-WP2 presentan un comportamiento similar en cuanto a actividad específica y distribución de ésta, la cual se ve bastante disminuida para las variantes celulasa-Y3 y células-WP4. Lo anterior hace suponer que la modificación del gen nativo con los extremos Y3 y WP4, produce una enzima mucho menos activa que la original, o tiene una producción menor. También es posible que las enzimas modificadas sean menos estables que la enzima original.

3.4 HIDROFOBICIDAD DE LOS EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS

La hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos fue calculada como se indica en la sección 2.2.16, obteniéndose los resultados de la Tabla 3.3.

Tabla 3.3: Valores teóricos de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos.

Extremo polipeptídico	Hidrofobicidad [-]
Y3	334
WP2	450
WP4	899

Los datos de la actividad extracelular específica y los valores de hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos se utilizaron para construir la Figura 3.15, donde se representa la actividad extracelular específica residual en función de la hidrofobicidad del extremo polipeptídico. Se presentan también a modo de comparación los resultados obtenidos en un trabajo anterior con una enzima celulasa de *Pseudoalteromonas sp.* (Delpiano, 2009)

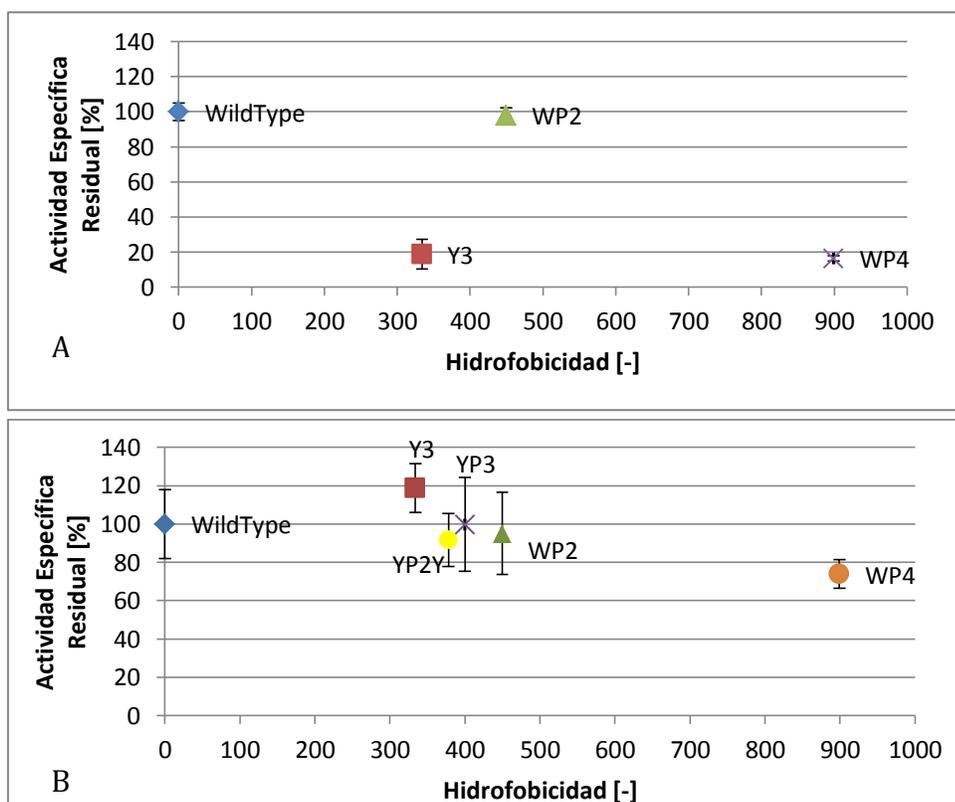


Figura 3.15: Porcentaje de actividad extracelular específica residual versus hidrofobicidad de los extremos polipeptídicos. A: Valores correspondientes a la enzima celulasa 5A de *B. Agaradherans*. B: Valores correspondientes a la enzima celulasa de bacteria *Pseudoalteromonas sp.* (Delpiano, 2009; Zuñiga, 2011). La hidrofobicidad de los extremos es calculada usando la Ecuación 1.2, mientras que el porcentaje de actividad específica residual se determinó tomando como 100% el valor de la celulasa nativa.

En la Figura 3.15 A se puede apreciar que no existe una correlación entre la hidrofobicidad del extremo y la actividad específica obtenida. En el trabajo anterior tampoco fue posible encontrar una correlación que relacionara la actividad específica y la hidrofobicidad del extremo utilizado, pero se obtuvieron actividades específicas residuales superiores al 70% para todas las variantes. Por lo que a pesar de que en ninguno de los casos fue posible establecer una correlación, los resultados difieren en que la celulasa utilizada en este estudio es más sensible a la introducción de modificaciones en su secuencia, ya que en dos de los tres casos analizados la actividad residual disminuyó considerablemente.

La variante celulasa-Y3, a pesar de presentar niveles de proteína total similar a la cepa nativa, presenta una actividad específica residual del 19%, la cual es mucho menor de la deseada. Esto estaría de acuerdo con el criterio que establece que: “es recomendable la incorporación de prolina en los extremos a fin de evitar la formación de estructuras secundarias y asegurar la exposición del extremo” (Robinson, 2008) (Montecinos, 2009). Por lo cual este podría ser considerado como un criterio válido en la selección de extremos hidrofóbicos. Sin embargo, dado que los ensayos de actividad son realizados sobre una muestra no purificada de la proteína, no es posible saber a

priori si la baja de la actividad específica residual es debida que se tiene una proteína recombinante menos activa o a que esta es producida en una menor cantidad relativa.

La utilización del extremo WP4 presentó el más bajo de los resultados conservando solamente un 16% de la actividad específica de la celulasa nativa, esto concuerda con el criterio que señalaba que: “el valor de la hidrofobicidad del extremo debía ser menor a 500 para mantener la actividad de la enzima” (Delpiano, 2009), ya que a pesar de no producirse una pérdida completa de actividad, ésta es suficiente para descartar la utilización de este tipo de extremos hidrofóbicos.

Por otra parte, la celulasa utilizada correspondía a una enzima extracelular y al observar la Figura 3.15 A, se aprecia que entre los extremos con hidrofobicidad menor a 500, solamente el extremo hidrofóbico con residuos de prolina (WP2) conservó una actividad similar a la celulasa nativa, lo cual estaría en desacuerdo con el criterio de que: “no es necesaria la presencia de prolina para mantener la actividad en enzima extracelulares” (Delpiano, 2009).

Si se consideran las mutaciones observadas en la sección 3.2, existe una mutación común en las tres variantes obtenidas y una específica de la variante celulasa-WP2. Esta última es la variante que conserva la mayor parte de la actividad específica residual por lo que se puede suponer, que las variaciones encontradas en las secuencias aminoacídicas de las proteínas no afecta mayormente a la enzima.

3.5 PURIFICACIÓN DE LA CELULASA

Se llevaron a cabo cromatografías de interacción hidrofóbica para cada una de las variantes (celulasa nativa, celulasa-Y3, celulasa-WP2 y celulasa-WP4), para luego realizar ensayos de actividad a las fracciones obtenidas. Al analizar la actividad de éstas fracciones, se obtuvo resultados negativos en todos los casos, por lo cual resultó imposible determinar en qué fracciones eluyó la proteína de interés. Debido a esto, se procedió a la realización de ensayos de actividad de las muestras base (extracelular, lavado con TES y periplasmática) mezcladas con sulfato de amonio a una concentración final de 2 M (resultados no mostrados) obteniéndose una pérdida de actividad en todas las variantes. Lo anterior, puede deberse a una precipitación de las proteínas debido a la alta concentración de sal en el medio. Lo que se traduciría en una alta hidrofobicidad de estas proteínas incluyendo la nativa. Por esto se recomienda la realización de una nueva cromatografía de interacción hidrofóbica en la cual se utilicen concentraciones de sulfato de amonio menores a las aquí señaladas o bien, la utilización de una sal diferente, además de la realización de ensayos para determinar a partir de qué concentración de sulfato de amonio se produce la pérdida de la actividad celulolítica o precipitación de la proteína, de forma de poder utilizar éste valor como base en una nueva cromatografía.

4 CONCLUSIONES

En base al estudio realizado se puede concluir que fue posible modificar la celulasa Cel 5A de *B. Agaradherans* mediante la adición de secuencias cortas de aminoácidos hidrofóbicos, utilizando la técnica de PCR. La modificación fue exitosa para los tres extremos propuestos: YYY, WPWP y WPWPWPWP, pudiéndose obtener clones con los plásmidos y secuencias deseados en cada caso.

Los resultados presentan una buena reproducibilidad, ya que los 2 cultivos de cada variante presentaron valores similares de actividad, proteína total y distribución porcentual de la proteína.

La cantidad de proteína total obtenida por la variante que expresa la enzima celulasa-Y3, fue similar a la obtenida por la cepa nativa (98%) y algo menor para las variantes que expresan la celulasa-WP2 (88%) y la celulasa-WP4 (75%), presentándose la mayor parte en la fracción extracelular.

La abundancia de actividad en las variantes que expresan las celulasa modificadas presentó grandes variaciones, obteniéndose valores de actividad específica residual con respecto a la cepa nativa de un 16% para la variante celulasa-WP4, 19% para la variante celulasa-Y3 y de un 98% para la variante celulasa-WP2. A pesar de esto la distribución de la actividad entre las distintas fracción resultó ser bastante similar, presentándose aproximadamente un 87% de la actividad en la fracción extracelular, un 5% en la fracción de lavado con TES y un 8% en la fracción periplasmática.

La producción de la proteína recombinante celulasa-Y3, a pesar de presentar niveles de proteína total similares a los obtenidos con la cepa nativa, presentó una actividad específica residual del 19%, en cambio, la recombinante celulasa-WP2 retuvo un 98% de la actividad específica residual. Lo anterior señala la importancia de la presencia del aminoácido prolina (P) en los extremos hidrofóbicos con que se desea trabajar, a fin de evitar la formación de estructuras secundarias y asegurar la exposición del extremo. Este criterio fue señalado anteriormente por Robinson (2008) y Montecinos (2009) y considerando lo anterior se puede considerar como un criterio válido.

El valor de la hidrofobicidad de los extremos utilizados mostró ser un factor a considerar en la elección de éstos debido a que los valores altos en la hidrofobicidad del extremo (899 para WP4) tuvieron como consecuencia una disminución apreciable de la actividad de la enzima con respecto a la cepa nativa, obteniéndose solamente un 16% de actividad específica residual, por lo anterior es posible considerar como válido el criterio que señala que: “el valor de la hidrofobicidad del extremo debía ser menor a 500 para mantener la actividad de la enzima”, establecido por Delpiano (2009).

Por otra parte los resultados señalan que el aminoácido prolina es necesario para la mantención de la actividad de esta proteína, ya que entre las variantes con extremos de hidrofobicidad menores a 500, solamente la variante celulasa-WP2 mantuvo una

actividad específica comparable a la actividad de la celulasa nativa, lo cual contradice el criterio que señala que este aminoácido no es necesario para la mantención de la actividad en proteínas extracelulares.

Finalmente, no fue posible establecer la validez de los criterios dependientes de la determinación de la DRT debido a los problemas señalados en el proceso de purificación mediante HIC, por lo cual se recomienda intentar una HIC utilizando concentraciones de sulfato de amonio menores a las aquí señaladas o utilizando una sal diferente. Se recomienda además la realización de ensayos para determinar la concentración de sal que puede soportar esta enzima sin perder su actividad celulolítica o precipitar.

5 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Boisset, C., Fraschini, C., Schulein, M., Henrissat, B., Chanzy, H. Imaging the Enzymatic Digestion of Bacterial Cellulose Ribbons Reveals the Endo Character of the Cellobiohydrolase Cel6a from *Humicola Insolens* and Its Mode of Synergy with Cellobiohydrolase Cel7a. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(4):1444-52. 2000.
- [2] Degerman, M., Jakobsson, N., Nilsson, B. Designing Robust Preparative Purification Processes with High Performance. *Chemical Engineering & Technology*. 31(6):875–882. 2008.
- [3] Delpiano, Maricelle. Estudio del efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación de celulasas recombinantes. Memoria de Título Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2009. 91pp.
- [4] Desvaux, Mickaël. La Fermentation de la Cellulose par *Clostridium cellulolyticum*: Métabolisme Modèle d'un *Clostridium Cellulolytique* Mésophile. Tesis (Doctor en Biología Estructural, Molecular y Celular). Nancy, Francia. Universidad Henri Poincaré, Facultad de Ciencias. 2001. 188 h.
- [5] Eriksson, K.-O., Belew, M. Hydrophobic Interaction Chromatography. En: *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications*, 3° Ed., John Wiley & Sons. 2011. pp. 165-181.
- [6] Fexby, S., Bülow, L. Hydrophobic peptide tags as tools in bioseparation. *Trends in Biotechnology*. 22:511-516. 2004
- [7] Flaschel, E., Friehs, K. Improvement of downstream processing of recombinant proteins by means of genetic engineering methods. *Biotechnology Advances*. 11:31-78. 1993.
- [8] Gooding, Karen. Hydrophobic Interaction. En: *Encyclopedia of Chromatography*, 3° Ed., 2010. pp. 1161-1164.
- [9] Hagel, L., Jagschies, G., Sofer, G. K. *Handbook of Process Chromatography: Development, Manufacturing, Validation and Economics*, 2° Ed. San Diego, Academic Press, 2008. 363p.
- [10] Kalyanpur, Manohar. Review: Downstream Processing in the Biotechnology Industry. *Molecular Biotechnology*. 22:87-98. 2002.

- [11] 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.
- [12] Lienqueo, M.E., Mahn, A., Asenjo, J.A. Mathematical correlations for predicting protein retention times in hydrophobic interaction chromatography. *Journal of Chromatography A*. 978:71–79. 2002.
- [13] Lienqueo, M.E., Salgado, J.C., Giaverini, O., Asenjo, J.A. Computer-aided design to select optimal polypeptide tags to assist the purification of recombinant proteins. *Separation and Purification Technology*. 65:86-94. 2009.
- [14] Miyazawa, S., Jernigan, R. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: quasi-chemical approximation. *Macromolecules*. 18(3):534–552. 1985.
- [15] Montecinos, Catalina. Estudio del efecto de la adición de extremos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de xilanasas recombinantes. Memoria de Título Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2009. 81pp.
- [16] Naik, Pankaja. *Essentials of Biochemistry*. Jaypee Brothers Medical Publishers. New Delhi. 2012. 464p.
- [17] Robinson, María del Carmen. Efecto de la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos en la expresión y purificación por HIC de cutinasas. Memoria de Título Ingeniero Civil Químico e Ingeniero Civil en Biotecnología. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. 2008. 74pp.
- [18] Simeonidis, E., Pinto, J. M., Lienqueo, M. E., Tsoka, S., Papageorgiou, L.G. MINLP models for the synthesis of optimal peptide tags and downstream processing. *Biotechnology Progress*. 21:875-884. 2005.
- [19] Zuñiga, Felipe. Comunicación Personal.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A: CURVAS DE CALIBRACIÓN

6.1.1 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ENSAYOS DE ACTIVIDAD

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron distintas disoluciones de una solución de glucosa de concentración 2 mg/mL. A 50 µl de cada disolución se añadieron 50 µl de DNS en una placa de 96 pocillos. La mezcla fue cultivada durante 10 min a 100°C y luego enfriada durante 5 min en hielo. Luego se leyó la absorbancia a 550 nm a 50 µl de la reacción.

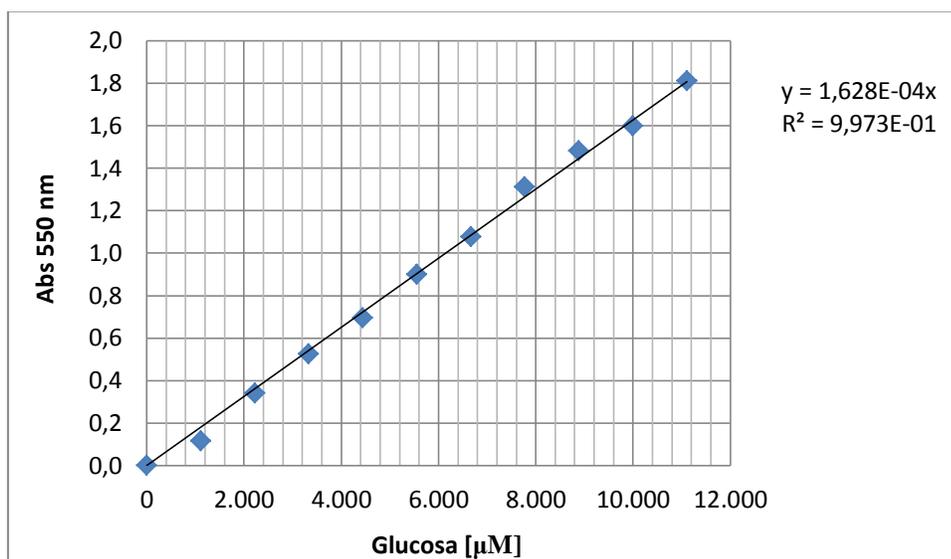


Figura 6.1: Curva de calibración del método de DNS para la detección de azúcares reductores.

6.1.2 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA ENSAYOS DE CANTIDAD DE PROTEÍNA

Para la realización de la curva de calibración se utilizaron disoluciones de BSA entres 0 y 0,5 mg/mL de concentración, utilizando las indicaciones para el método de Bradford modificado (sección 2.2.14)

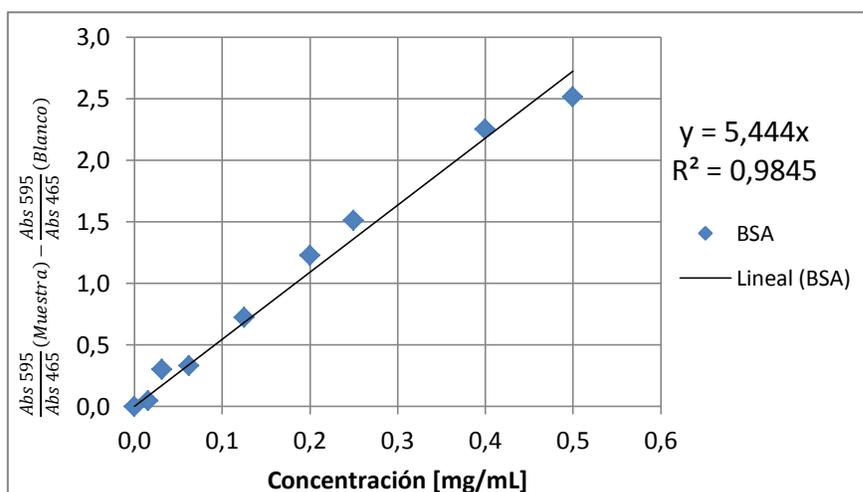


Figura 6.2: Curva de calibración para cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

6.2 ANEXO B: SECUENCIA DE LAS CELULASAS MODIFICADAS

6.2.1 CELULASA-Y3

```

gttgtagaagaacatgggcaattaagtattagtaacgggtgaattagtcaatgaacgaggc 60
V V E E H G Q L S I S N G E L V N E R G
gaacaagttcagttaaaagggatgagttcccatggtttgcaatggtacggtcaatttgta 120
E Q V Q L K G M S S H G L Q W Y G Q F V
aactatgaaagtatgaaatggcctaagagatgattggggaataaatgtattccgagcagca 180
N Y E S M K W L R D D W G I N V F R A A
atgtatacctcttcaggaggatataattgatgatccatcagtaaaggaaaagtaaaagag 240
M Y T S S G G Y T D D P S V K E K V K E
gctgttgaagctgcgatagaccttgatataatgtgatcattgattggcatatcctttca 300
A V E A A I D L D I Y V I I D W H I L S
gacaatgacccaatatataaagaagaagcgaaggatttctttgatgaaatgtcagag 360
D N D P N I Y K E E A K D F F D E M S E
ttgtatggagactatccgaatgtgatatacgaattgcaaatgaaccgaatggtagtgat 420
L Y G D Y P N V I Y E I A N E P N G S D
gttacgtgggacaatcaataaaaccgatatgcagaggaagtcattccggttattcgtaac 480
V T W D N Q I K P Y A E E V I P V I R N
aatgaccctaataacattattattgtaggtacaggtacatggagtcaggatgtccatcat 540
N D P N N I I I V G T G T W S Q D V H H
gcagctgataatcagcttgcagatcctaacgcatgatgcatttcatttttatgcaggg 600
A A D N Q L A D P N V M Y A F H F Y A G
acacatgggtcaaaatttacgagaccaagtagattatgcattagatcaaggagcagcgata 660
T H G Q N L R D Q V D Y A L D Q G A A I
tttgttagtgaatggggaacaagtgacgctacaggtgatgggtggcgtgttttttagatgaa 720
F V S E W G T S A A T G D G G V F L D E
gcacaagtgtggattgactttatggatgaaagaaatttaagctgggccaactgggtctcta 780
A Q V W I D F M D E R N L S W A N W S L
acgcataaagatgagtcattctgcagcgtaatgccaggtgcaaactcaactgggtggttgg 840
T H K D E S S A A L M P G A N P T G G W
acagaggctgaactatctccatctggtacatttgtgagggaaaaaataagagaatcat 900
T E A E L S P S G T F V R E K I R E S Y
tattac
Y Y

```

6.2.2 CELULASA-WP2

gttgtagaagaacatgggcaattaagtattagtaacgggtgaattagtagcaatgaacgagggc 60
V V E E H G Q L S I S N G E L V N E R G
gaacaagttcagttaaaagggatgagttcccatggtttgcaatgggtacgggtcaatttgta 120
E Q V Q L K G M S S H G L Q W Y G Q F V
aactatgaaagtatgaaatggcctaagagatgattggggaataaatgtattccgagcagca 180
N Y E S M K W L R D D W G I N V F R A A
atgtatacctcttcaggaggatatactgatgatccatcagtaaaggaaaaagtaaaagag 240
M Y T S S G G Y T D D P S V K E K V K E
gctgttgaagctgcatagaccttgatataatgtgatcattgattggcatatcctttca 300
A V E A A I D L D I Y V I I D W H I L S
gacaatgacccaaatataataaagaagaagcgaaggatttctttgatgaaatgtcagag 360
D N D P N I Y K E E A K D F F D E M S E
ttgtatggagactatccgaatgtgatatacgaattgcaaatgaaccgaatggtagtgat 420
L Y G D Y P N V I Y E I A N E P N G S D
gttacgtgggacaatcaataaaaccgtatgcagaggaagtcattccgggtatttcgtaac 480
V T W D N Q I K P Y A E E V I P V I R N
aatgaccctaataacattattattgttaggtacaggtacatggagtcaggatgtccatcat 540
N D P N N I I I V G T G T W S Q D V H H
gcagctgataatcagcttgcatcctaaccgtcatgtatgcatttctttttatgcaggg 600
A A D N Q L A D P N V M Y A F H F Y A G
acacatgggtcaaaatttacgagaccaagtagattatgcattagatcaaggagcagcgata 660
T H G Q N L R D Q V D Y A L D Q G A A I
tttgtagtgaatggggaacaagtgcagctacaggtgatgggtggcgtgtttttagatgaa 720
F V S E W G T S A A T G D G G V F L D E
gcacaagtgtggattgactttatggatgaaagaatttaagctgggccaactggctctta 780
A Q V W I D F M D E R N L S W A N W S L
acgcataaagatgagtcctgcagcgttaatgccaggtgcaaatccaactgggtggtgg 840
T H K D E S S A A L M P G A N P T G G W
acagaggctgaactatctccatctggtacatttgtgagggaaaaaataagagaatcatggg 900
T E A E L S P S G T F V R E K I R E S W
ccgtggccg
P W P

6.2.3 CELULASA-WP4

gttgtagaagaacatgggcaattaagtattagtaacgggtgaattagtagcaatgaacgagggc 60
V V E E H G Q L S I S N G E L V N E R G
gaacaagttcagttaaaagggatgagttcccatggtttgcaatgggtacgggtcaatttgta 120
E Q V Q L K G M S S H G L Q W Y G Q F V
aactatgaaagtatgaaatggcctaagagatgattggggaataaatgtattccgagcagca 180
N Y E S M K W L R D D W G I N V F R A A
atgtatacctcttcaggaggatatactgatgatccatcagtaaaggaaaaagtaaaagag 240
M Y T S S G G Y T D D P S V K E K V K E
gctgttgaagctgcatagaccttgatataatgtgatcattgattggcatatcctttca 300
A V E A A I D L D I Y V I I D W H I L S
gacaatgacccaaatataataaagaagaagcgaaggatttctttgatgaaatgtcagag 360
D N D P N I Y K E E A K D F F D E M S E
ttgtatggagactatccgaatgtgatatacgaattgcaaatgaaccgaatggtagtgat 420
L Y G D Y P N V I Y E I A N E P N G S D
gttacgtgggacaatcaataaaaccgtatgcagaggaagtcattccgggtatttcgtaac 480
V T W D N Q I K P Y A E E V I P V I R N
aatgaccctaataacattattattgttaggtacaggtacatggagtcaggatgtccatcat 540
N D P N N I I I V G T G T W S Q D V H H

gcagctgataatcagcttgcagatcctaacgtcatgtatgcatttcatttttatgcaggg 600
A A D N Q L A D P N V M Y A F H F Y A G
acacatgggtcaaaatttacgagaccaagtagattatgcattagatcaaggagcagcgata 660
T H G Q N L R D Q V D Y A L D Q G A A I
tttgttagtgaatggggaacaagtgcagctacaggtgatgggtggcgtgttttttagatgaa 720
F V S E W G T S A A T G D G G V F L D E
gcacaagtgtggattgactttatggatgaaagaaatttaagctgggccaactgggtctcta 780
A Q V W I D F M D E R N L S W A N W S L
acgcataaagatgagtcacatctgcagcgttaatgccaggtgcaaactccaactgggtggttg 840
T H K D E S S A A L M P G A N P T G G W
acagaggctgaactatctccatctggtacatttgtgagggaaaaaataagagaatcatgg 900
T E A E L S P S G T F V R E K I R E S W
ccatggccatggccttggcct
P W P W P W P