



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

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS HIDROFÓBICOS EN LA EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

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

FELIPE JAVIER ZÚÑIGA FERRAND

PROFESORA GUÍA:
MARÍA ELENA LIENQUEO CONTRERAS

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:
ORIANA SALAZAR AGUIRRE
ZIOMARA P. GERDTZEN H.

SANTIAGO DE CHILE
2013

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA OPTAR AL

TITULO DE: Ingeniero Civil en Biotecnología

POR: Felipe Javier Zúñiga Ferrand

FECHA: 05/06/2013

PROFESORA GUIA: María Elena Lienqueo

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo realizar la adición del extremo polipeptídico WP4, de alta hidrofobicidad a tres enzimas recombinantes xilanasa, cutinasa y celulasa, bajo la hipótesis de aumentar su tiempo de adsorción en Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, para optimizar su purificación utilizando dicha técnica. Para luego, estudiar el efecto de la adición de este extremo en su producción, recuperación, actividad y comparar estos parámetros con los obtenidos en las enzimas recombinantes con distintos extremos polipeptídicos adicionados en trabajos anteriores (Xil-(YP)2Y, Xil-Y3 y Xil-(YP)3; Cut-(WP)2, Cut-(YP)3 y Cut-Y3 y Cel-(WP)2, Cel-(WP)2, Cel-(YP)2Y, Cel-(YP)3 y Cel-Y3).

Utilizando como templado el gen wt en cada una de las enzimas, se obtuvieron resultados positivos para cutinasa y celulasa, quedando las enzimas recombinantes Cut-wp4 y Cel-WP4. En el caso de xilanasa, no se obtuvo amplificación a ninguna temperatura en la reacción de PCR, por lo cual, no se logró sintetizar la enzima con el extremo polipeptídico WP4, posiblemente por la formación de "hairpin" y autoalineamiento de los partidores *sense* y *antisense* para la síntesis de xilanasa-WP4.

Para el caso de la enzima celulasa se realizaron los análisis de actividad y cantidad de proteína producida para todas las variantes y se comparó estos resultados con la enzima nativa. Se observa que las enzimas mutadas, con excepción de la variable cel-YP2Y, presentaron el mismo comportamiento que la endoglucanasa nativa, donde la mayor actividad celulolítica, se obtiene en el medio extracelular. En el caso de cel-YP2Y, se sospecha que la baja actividad presentada en el medio extracelular se debió a la baja producción de enzima. Pero no se puede descartar que el extremo YP2Y afecta negativamente la migración de la misma al medio extracelular ya que es en este caso donde se encontró más actividad en el medio periplasmático y en el lavado con TES.

Del estudio se concluyó que las endoglucanasas modificadas con extremos hidrofóbicos son activas. Los extremos polipeptídicos Cel-Y3, Cel-YP2Y, Cel-YP3, Cel-WP4 presentan valores superiores al 87% de actividad específica residual con respecto a la nativa. En el caso de cel-WP4 la actividad específica en el medio extracelular es un 74% de la enzima nativa.

A partir de lo anterior se puede decir que el criterio cuantitativo de que el extremo de una hidrofobicidad mayor a 500 afecta de mayor manera la actividad de la enzima, resultó ser correcto en este estudio, ya que para el caso de Cel-WP4 que posee una hidrofobicidad de 878, la actividad específica fue solo de un 74% respecto a la enzima nativa. Y como criterio cualitativo se comprobó que no es necesaria la presencia del aminoácido Prolina (P) en el extremo, para que la enzima se active.

TABLA DE CONTENIDO

1

1 INTRODUCCIÓN.....	9
1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	8
1.1 Descripción del proyecto y justificación.....	9
1.2 Características de enzimas.....	9
1.2.1 Cutinasa.....	9
1.2.1.1 Estructura y clasificación de la cutinasa.....	10
1.2.1.2 Función de la cutinasa.....	11
1.2.1.3 Aplicaciones industriales de cutinasas.....	12
1.2.1.3 Aplicaciones industriales de xilanasas.....	20
1.2.2 Celulasa.....	12
1.2.2.1 Estructura y clasificación de celulosas.....	13
1.2.2.2 Función de la celulasa.....	14
1.2.2.3 Aplicaciones industriales de celulosas.....	15
1.2.3 Xilanasa.....	17
1.2.3.1 Estructura y clasificación de la Xilanasa.....	17
1.2.3.2 Función de la xilanasa.....	18
1.3 Antecedentes generales.....	21
1.3.1 Interacciones Hidrofóbicas.....	22
1.3.2 Adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos.....	22
1.3.3 Técnicas de purificación de proteínas.....	23
1.3.4 Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC).....	23
1.3.5 Determinación de los tiempos de retención en HIC.....	26
1.3.6 Características de aminoácidos hidrofóbicos.....	27
1.4 Antecedentes Específicos.....	30
1.4.1 Antecedentes Específicos en cutinasa.....	30
1.4.2 Antecedentes Específicos en celulasa.....	31
1.4.3 Antecedentes Específicos en xilanasa.....	31

2

2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Materiales.....	35
2.1 Objetivo general.....	32
2.1.1 Cepa Bacteriana y Variantes.....	35
2.1.1.1 Variantes de Cutinasa.....	35
2.1.1.1 Variantes de Xilansa.....	36
2.1.1.2 Variantes de Celulasa.....	35
2.1.2 Reactivos y medios de cultivo (Anexo B).....	37
2.1.3 Equipos (Anexo C).....	38
2.1.4 Vectores de clonamiento y expresión.....	38
2.1.5 Enzimas de Restricción.....	41
2.1.6 Medios de cultivo líquidos y sólidos.....	41
2.1.7 Soluciones stock.....	41
2.1.8 Síntesis de oligonucleótidos.....	42

2.2 Métodos.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	32
2.2.1 Metodología general.....	43
2.2.10.1 Electroforesis en gel de agarosa.....	48
2.2.11 Purificación de DNA a partir de geles de agarosa.....	48
2.2.12 Inducción de la síntesis de proteínas recombinantes.....	48
2.2.12.1 Inducción de la síntesis de cutinasas.....	48
2.2.12.1 Inducción de la síntesis de xilanasas.....	49
2.2.12.2 Inducción de la síntesis de celulasas.....	49
2.2.13 Extracción de proteínas del medio de cultivo.....	49
2.2.13.1 Extracción de proteínas de proteínas periplasmáticas (cutinasa y xilanasas).....	49
2.2.13.2 Extracción de proteínas de proteínas extracelulares (celulasa).....	50
2.2.14 Determinación de la concentración de proteína.....	50
2.2.15 Medición de la actividad enzimática.....	50
2.2.15.1 Ensayo de actividad de cutinasa.....	50
2.2.15.2 Ensayo de actividad de celulasa.....	51
2.2.15.3 Ensayo de actividad, xilanasas.....	51
2.2.2 Diseño de oligonucleótidos.....	43
2.2.3 Purificación de DNA plasmidial.....	44
2.2.4 Síntesis de los genes modificados con extremo hidrofóbico WP4.....	45
2.2.5 Clonamiento de los genes de celulasa modificados.....	46
2.2.5.1 Clonamiento en el vector pGem-TEasy.....	46
2.2.5.2 Clonamiento en el vector de expresión pET22-b(+).....	46
2.2.5.3 Clonamiento en el vector de expresión pET11a.....	46
2.2.6 Preparación de bacterias electrocompetentes.....	46
2.2.7 Transformación de bacterias electrocompetentes.....	47
2.2.8 PCR de colonias.....	47
2.2.9 Digestión de DNA plasmidial.....	47

3

3 RESULTADOS Y DICUSIÓN.....	53
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.1 Estrategia de síntesis de gen de celulasa con extremo polipeptídico WP4 a partir del gen de celulasa-WP2.....	54
3.1.1 Adición de extremo polipeptídico WP4 a Celulasa-WP2.....	55
3.1.2 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De Clonamiento Pgem-T-Easy..	57
3.1.3 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De expresión pET22-b.....	58
3.1.4 Secuenciamiento de plasmidio obtenido.....	59
3.2 Estrategia de síntesis de genes de enzimas hidrolíticas con extremo polipeptídico WP4 a partir del gen wild type.....	60
3.2.1 Adición de extremo polipeptídico WP4 a Cutinasa-WT.....	63
3.2.2 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De Clonamiento Pgem-T-Easy..	64
3.2.3 Clonamiento del Gen de cutinasa-WP4 Modificado En El Vector De expresión pET11a.....	66
3.2.4 Adición de extremo polipeptídico WP4 a Celulasa-WT.....	67
3.2.5 Clonamiento del Gen de celulasa-WP4 en El Vector De Clonamiento Pgem-T-Easy.....	67
3.2.6 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De expresión pET22-b (+).....	68
3.2.7 Adición de extremo polipeptídico WP4 a xilanasas-WT.....	69

3.2.8 Secuenciamiento de los plasmidios obtenidos	72
3.3 Caracterización de proteínas	74
3.3.4 Análisis de actividad en celulasa.....	74
3.3.5 Análisis de proteína y actividad específica en celulasa	78
4	
4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	83
5	
5 BIBLIOGRAFÍA	86
5.1 Referencias.....	87
6	
6 ANEXOS.....	93
6.1 Anexo A: Aminoácidos	94
6.2 Anexo B:	96
6.2.1 Anexo B: Medios de cultivo líquidos.....	96
6.2.2 Anexo B: Medios de cultivo sólidos	97
6.3 Anexo C: Equipos	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura Tridimensional de cutinasa proveniente de <i>Fusarium solani pisi</i> . Cuyo código pdb es 1CEX (http://pdbeta.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1CEX)	15
Figura 10: Esquema de un Cromatograma de HIC y parámetros a considerar. V0: volumen inicial donde comienza el gradiente decreciente de sal, Vf: volumen final correspondiente a donde termina el gradiente decreciente de sal, Vr: volumen de elución de la proteína de interés.	31
Figura 10: Estructura básica de un aminoácido.	32
Figura 11: Estructura del aminoácido Prolina (P)	33
Figura 12: Estructura del aminoácido Tirosina (Y)	33
Figura 13: Estructura del aminoácido Triptofano (W)	33
Figura 2.1. Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia. Las regiones codificadas de utilidad para este trabajo corresponden a la resistencia a ampicilina Ampr y el gen <i>lacZ</i> 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.....	43
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 NcoI y XhoI en este vector.	44
Figura 2.3. Vector pET-11a 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 BamHI en este vector.	44
Figura 2: Estructura tridimensional del dominio catalítico de cel5G proveniente de <i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i> . Cuyo código pdb es 1TVN (http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1TVN).....	18
Figura 3.1: Representación del alineamiento de los partidores <i>sense</i> y <i>antisense</i> en la reacción de PCR. Dominio Catalítico (DC): En azul se representa el gen de celulasa WT, en rojo los aminoácidos agregados en el extremo carboxilo, Cel-WP2. Primers: negro se presenta la región del partidor que se alinea con el dominio catalítico, en rojo el extremo agregado al gen mediante PCR.	58
Figura 3.12: PCR colonias cutinasa-(WP)4, vector de expresión pET11a. Carril 1, 2 y 3 con resultados positivos.....	70
Figura 3.15: PCR colonias celulasa-(WP)4, vector de expresión pET22-b(+). Carril 1, 2 y 3 con resultados positivos.	73
Figura 3.16 Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.....	77
Figura 3.17. Distribución subcelular de celulasa-WT y modificadas en <i>E.coli</i> BL21. Las fracciones corresponden a medio extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).....	80
Figura 3.18. Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.	81

Figura 3.19. Porcentaje proteína total presente en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).	82
Figura 3.2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para Cel-WP4. Marcador de peso molecular 1 kb, Carriles 1-10: Temperaturas de alineamiento: 56,7°C; 57,8°C; 58,7°C; 59,6°C; 60,3°C; 61,2°C; 63,1°C; 63,9°C	60
Figura 3.20. Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden al valor más alto y más bajo de las desviaciones estándar de los tres cultivos para cada variante.	83
Figura 3.3: Celulasa Modificada mediante PCR Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Control Negativo; Carril (2) Celulasa-WP4	61
Figura 3.4: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy Carril 1 al 4 presentan Colonias con gen de celulasa-WP4	61
Figura 3.5: Digestión del DNA plasmidial de los clones de celulasa modificada en pGEM-T-easy(A): Carril (1): Celulasa con extremo WP4 (930 pb)(B): Carril (1): Vector de clonamiento digerido (3054 pb)	62
Figura 3.6: PCR colonias celulasa-(WP)4, vector de expresión pET22-b(+). Carril 2 y 3 con resultados positivos.....	63
Figura 3.7: Representación del alineamiento de los partidores <i>sense</i> y <i>antisense</i> en la reacción de PCR. Dominio Catalítico (DC): En azul se representa el gen de celulasa WT. Primers: En negro se presenta la	64
Figura 3: Modelo de degradación de celulosa por un complejo enzimático multicomponente de celulasa. http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase-spanish.asp	19
Figura 4: Estructura tridimensional familias 10 y 11 glicosil hidrolasas	22
Figura 5: Estructura tridimensional xilanasa, familia 10 glicosil hidrolasas	23
Figura 6.1. Estructura química aminoácidos apolares alifáticos.	98
Figura 6.2. Estructura química aminoácidos aromáticos.	98
Figura 6.3. Estructura química aminoácidos polares sin carga.	99
Figura 6.4. Estructura química aminoácidos cargados positivamente.	99
Figura 6.5 Estructura química aminoácidos cargados negativamente.....	100
Figura 6: Enzimas que degradan el xilano	23
Figura 7: Etapa I de HIC, ambientación en la columna.	29
Figura 7: Mecanismo de acción xilanasa.	24
Figura 8: Etapa II de HIC, Inyección de la muestra.	29
Figura 9: Etapa III de HIC, elución de las proteínas	30
Imagen 3.10: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy Carril 1 al 9 exceptuando la 7, presentan Colonias con gen de cutinasa-WP4	69
Imagen 3.11: Digestión del DNA plasmidial de los clones de cutinasa modificada en pGEM-T-easy(A): Carril (1): Cutinasa con extremo WP4 (730 pb)(B): Carril (1): Vector de clonamiento digerido (3054 pb)	69
Imagen 3.13: Celulasa Modificada mediante PCR a 63°C Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Celulasa-WP4.....	71
Imagen 3.14: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy Carril 5 y 6 presentan Colonias positivas con gen de celulasa-WP4	72
Imagen 3.8: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para Cut-WP4. Marcador de peso molecular 1 kb, Carriles 1- 8: Temperaturas primeros ciclos: 55,9°C; 56,7°C; 58,5°C; 59,2°C; 60,1°C; 61,9°C; 62,8°C; 63,7°C . 67	

Imagen 3.9: Celulasa Modificada mediante PCR
Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Muestra de reacción de PRC a 60°C ... 68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Reactivos y Proveedores.....	43
Tabla 2.3: Vectores de clonamiento y expresión usados para cada mutante estudiada.....	44
Tabla 2.4: Enzimas de restricción utilizadas y características.....	47
Tabla 3.2: Porcentaje de actividad total con respecto a enzima WT y comparación a los medidos en los trabajos de Delpiano (2010).....	81
Tabla 3.3: Porcentaje de actividad total con respecto a enzima WT: Se presentan los valores observados en el presente estudio y los medidos en los trabajos de Delpiano (2010).....	87

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
Amp	ampicilina
BSA	seroalbúmina de bovino
cm	centímetro
μ F	microfaraday
μ g	microgramo
μ L	microlitro
CMC	carboximetil celulosa
D.O.	densidad óptica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNS	ácido dinitrosalicílico
dNTPs	desoxiribonucleótidos trifosfato
HEPES	ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2'-Etanesulfónico
EDTA	etilendiaminotetraacetato
g	fuerza de gravedad
IPTG	isopropil tio-b-D-galactósido
KDa	kilodalton
Kb	kilobase

LB

Luria Bertani

1 INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1 INTRODUCCIÓN

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 particular la memoria se orienta a estudiar el efecto de la adición de diferentes extremos hidrofóbicos ((WP)2, Y3, (YP)3, (YP)2Y, (WP)4) en enzimas recombinantes (cutinasas, celulasas y xilanasas) sobre la expresión, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, HIC.

Como hipótesis del presente trabajo, en teoría, se tiene que mediante la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a proteínas recombinantes es posible mejorar el proceso de purificación de proteínas, sin pérdidas significativas en los niveles de expresión ni recuperación. Lo anterior se debe a que la presencia de estos extremos polipeptídicos aumenta la hidrofobicidad superficial global de la proteína, lo que tiene como consecuencia el aumento del tiempo de retención de la proteína en HIC, generando una elución diferenciada de la proteína de interés respecto a las proteínas contaminantes, pero por otra parte pueden generar una mayor afinidad por la membrana celular o por la formación de agregaciones u otro tipo de interacciones en la proteína. Por esta razón se busca aplicar esta tecnología al área industrial y con ello aumentar la producción y optimizar procesos de purificación actualmente aplicados.

Se propone la combinación de los aminoácidos hidrofóbicos, Triptofano (W) y Prolina (P) para la construcción de extremos polipeptídicos de secuencia (WP)4, para adicionar a las enzimas hidrolíticas cutinasa, xilanasa y celulasa, evaluando el efecto en la expresión, recuperación, actividad, estabilidad y purificación por HIC, de dichas enzimas modificadas. Según estos resultados se buscará que combinación de aminoácidos ((WP)2, (YP)2Y, Y3, (YP)3, (WP)4), adicionados a las enzimas de interés, proporcionaría mejoras en la purificación por HIC, minimizando pérdidas.

1.2 CARACTERÍSTICAS DE ENZIMAS

1.2.1 CUTINASA

Las cutinasas son las enzimas hidrolíticas que catalizan la hidrólisis del polímero lipídico cutina, un componente de la estructura cuticular de las plantas, estructura multicapa que cubre las paredes celulares externas de la epidermis en los órganos aéreos de las plantas, cuya función es brindar protección contra la pérdida de agua y el ataque de microorganismos. La cutina es un polímero que consta de ácidos grasos de cadena larga que están unidos entre sí por enlaces tipo éster creando una red tridimensional rígida (Taiz y Zeiger. 2002). Está formada principalmente por ácidos grasos 16:0 y 18:1 con grupos hidroxilo o epóxidos situados en la parte media de la cadena o

al final, en el lado opuesto al grupo carboxilo (Purdy y Kolattukudy, 1975). 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.

Las cutinasas son enzimas producidas por microorganismos capaces de degradar la pared celular de las plantas. Catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de la misma (Lin y Kolattukudy, 1978). Las cutinasas han sido encontradas en diversas fuentes. Muchos hongos (principalmente patógenos) han sido reportados como productores de cutinasas, las cuales pueden asistir en la penetración de la cutícula de la planta. A partir de los trabajos pioneros de la actividad de la cutinasa del hongo fitopatógeno *Fusarium solani* f. sp. *Pisi* (Purdy y Kolattukudy, 1975) y, de la demostración de la actividad cutinasa en otros hongos también patógenos, ha habido un especial interés en el papel de las cutinasas como determinantes de patogenicidad o virulencia en estos microorganismos.

Estas enzimas muestran propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, debido a que pueden hidrolizar ésteres solubles y triacilglicerol. Esta versatilidad, ha promovido su aplicación en áreas de la industria de alimentos, detergentes, producción de biodiesel, degradación enzimática de sustancias tóxicas y polímeros sintéticos (Carvalho y cols. 1999).

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 y cols. 1986; Murphy y cols. 1996).

1.2.1.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LA CUTINASA

Las enzimas suelen clasificarse con base en la especificidad de sustrato o reacción química que catalizan. De acuerdo con la nomenclatura de La Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular, las cutinasas se identifican como hidrolasas que actúan sobre enlaces ésteres de ácidos carboxílicos del polímero cutina, aunque algunos estudios apuntaron hacia aclarar si la cutinasa se puede considerar como miembro de la familia de lipasas o de las esterasas (Egmond y van Bommel, 1997).

En 1992 se determinó experimentalmente la primera estructura de una cutinasa del hongo *Fusarium solani* f. *pisi*. (Martínez y cols. 1992). La estructura de la cutinasa de *F. solani* ha sido la más estudiada y sobre ésta se han centrado las bases del estudio de la relación estructura-función de las cutinasas en general.

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, C. col 1992) y posteriormente fue extendida a 1,0 Å (Longhi y cols. 1997b; Jelsch y cols., 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.

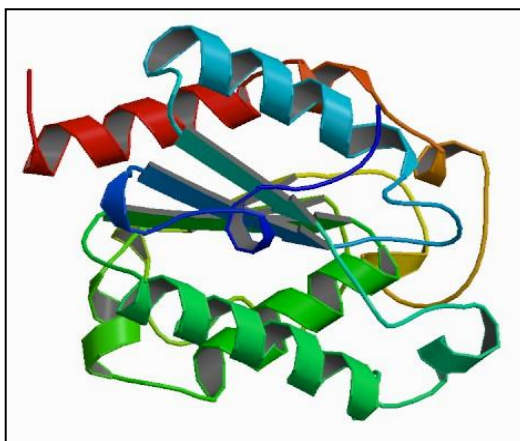


Figura 1: Estructura Tridimensional de cutinasa proveniente de *Fusarium solani pisi*. Cuyo código pdb es 1CEX (<http://pd-beta.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1CEX>)

La cutinasa de *Fusarium solani f. pisi* es una proteína de 235 residuos en una molécula compacta de un dominio y de 45x30x30 Å³ 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 y cols. 1996; Petersen y cols. 1997).

1.2.1.2 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 y cols. 1992; Jelsch y cols., 1998), y ampliar la gama de los usos potenciales ya que se ha demostrado que estas enzimas muestran propiedades catalíticas de esterasas y lipasas, debido a que pueden hidrolizar ésteres solubles y triacilgliceroles.

La cutinasa, caracterizada como esterasa, catalizan la ruptura del enlace éster de la cutina originando la liberación de monómeros de la misma (Lin y Kolattukudy. 1978).

Se utilizó “Timeresolved 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 y cols. 1997).

1.2.1.3 APLICACIONES INDUSTRIALES DE CUTINASAS

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 la industria de alimentos, en la de lácteos para la hidrólisis de grasa de leche, en la industria de

detergentes y oleoquímica, en la síntesis de triglicéridos estructurales, polímeros y surfactantes, en la síntesis de productos para el cuidado personal, degradación de insecticidas, sustancias tóxicas y polímeros sintéticos, y en la producción de biodiesel, entre otras aplicaciones (Badenes y cols, 2010).

La estructura básica de grasas y aceites puede ser modificada de diferentes maneras: modificación química del ácido graso (hidrogenación), ruptura del enlace éster (hidrólisis), y reorganización de ácidos grasos en la cadena principal del triglicérido (interestificación) (Carvalho y cols, 1997). De esta manera, un lípido poco deseable y de bajo costo puede ser modificado en un producto con aplicaciones importantes con un alto valor. Así la transesterificación de grasas y aceites, así como la esterificación selectiva de alcoholes, se puede obtener empleando cutinasa en bajas actividades de agua (Carvalho y cols, 1999).

La fabricación de detergentes biológicos es una tecnología en rápido crecimiento. Las lipasas, proteasas, amilasas y celulasas son enzimas que se añaden a las formulaciones de detergentes para la remoción de grasas, proteínas, carbohidratos, etc. (Sharma y cols, 2001). El uso de cutinasas en formulaciones de detergentes para lavandería y lavaplatos ha sido evaluado. La cutinasa presentó algunas ventajas en comparación con la lipasa comercial (LipolaseTM) en la remoción de triacilgliceroles en un solo proceso de lavado, así como en la hidrólisis de grasas en ausencia de calcio (Flipsen y cols, 1998).

Desde otra perspectiva, el biodiesel se ha convertido en un combustible alternativo en lo referente a los recursos energéticos tradicionales basados en combustibles fósiles, debido a la disminución de las reservas y aumento en el precio del petróleo, así como su contribución a la conservación del medio. Si bien es cierto que a nivel industrial se emplea la catálisis alcalina para la producción de biodiesel, hoy en día la catálisis enzimática ha ganado mucha atención (Vasudevan y Briggs, 2008). La cutinasa de *F. solani pisi* fue usada para catalizar la reacción de transesterificación entre una mezcla de triacilglicéridos y metanol en micelas reversas de bis(2-etilhexil) sulfosuccinato de sodio (AOT) en isooctanato con el propósito de producir biodiesel. Los estudios se realizaron por lotes en pequeña escala, se estudió la influencia de la concentración inicial de enzima y alcohol, y la relación molar del sustrato. Conversiones de 75 % fueron obtenidas con tiempos de reacción de 24 horas, lo cual hace el proceso enzimático altamente competitivo cuando se compara con reacciones similares catalizadas por lipasas para la producción de biodiesel empleando metanol (Badenes y cols, 2010).

1.2.2 CELULASA

Las celulasas son enzimas hidrolíticas que participan en el rompimiento de los enlaces glucosídicos β -1,4 de la celulosa, polisacárido formado por unidades de anhidro glucosa que es el principal componente estructural de los vegetales. La celulosa forma una estructura supramolecular cristalina y organizada, resistente a la hidrólisis (Chou y cols. 1981; Fan y cols, 1982) por lo que funciona como un secuestrador o barrera estructural que limita la liberación de componentes de sabor o de interés para la industria alimentaria, textil, de papel, entre otras (Rastogi y cols. 1998; Sarker y cols. 1999; Lee y cols. 2005).

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

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

1.2.2.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE CELULASAS

Las celulasas han sido clasificadas según su actividad en: endoglucanasas, las cuales hidrolizan los enlaces 1,4- β -glucosídicos en forma aleatoria en el interior de la cadena; celobiohidrolasas o exoglucanasas, encargadas de hidrolizar los enlaces 1,4- β - glucosídicos, liberando celobiosa desde los extremos no reducidos de la cadena; y β -glucosidasas, que catalizan la hidrólisis de la celobiosa liberando β -D-glucosa.

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

La celulasa en estudio corresponde a una endoglucanasa extracelular de la bacteria antártica *Pseudoalteromonas* sp. Su punto isoeléctrico es 4,57 y su peso molecular es 32 kDa.

Dado que no se cuenta con la estructura tridimensional de esta enzima, lo cual es trascendental para determinar su área superficial y con esto su hidrofobicidad, se utilizó la enzima que poseía una mayor identidad (88,4%) con la misma, cel5G de *Pseudoalteromonas haloplanktis*, cuyo código pdb es 1TVN. Ésta resulta ser un buen modelo puesto que ambas son endoglucanasas extracelulares que provienen de microorganismos antárticos. La Figura 2 muestra la estructura tridimensional de la enzima a utilizar como modelo.

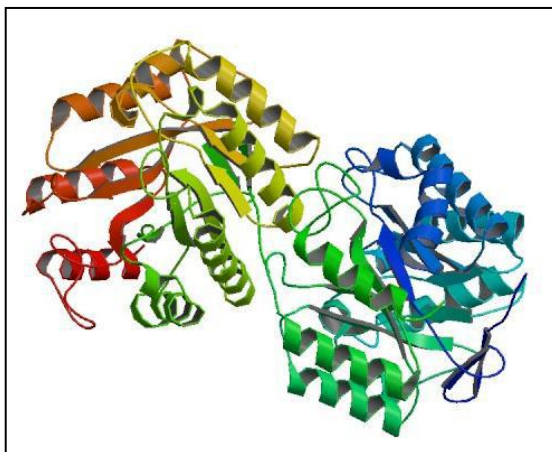


Figura 2: Estructura tridimensional del dominio catalítico de cel5G proveniente de *Pseudoalteromonas haloplanktis*. Cuyo código pdb es 1TVN (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/images.do?structureId=1TVN>)

1.2.2.2 FUNCIÓN DE LA CELULASA

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

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

Una vez degradada las zonas amorfas de la celulosa, tiene lugar la tercera etapa de la hidrólisis, en donde la región cristalina comienza a ser hidrolizada, como resultado de la acción sinérgica de la endoglucanasa y la exoglucanasa (Beldman y cols., 1988). Finalmente, una etapa que limita la degradación de la celulosa es la hidrólisis de la celobiosa a glucosa mediante la acción de la β -1,4-glucosidasa (Ladisch y cols., 1983; Philippidis y Smith, 1995; Lee, 1997). A continuación se presenta la Figura 3, donde se resume el mecanismo recién expuesto.

Este mecanismo se puede ver afectado por la adición de los extremos hidrofóbicos, ya que la interacción de estos aminoácidos con la enzima, puede afectar su estructura. Es por esto que es de suma importancia analizar la actividad final que se obtendrá en la enzima mutada para comprobar el verdadero efecto del extremo polipeptídico en la actividad enzimática.

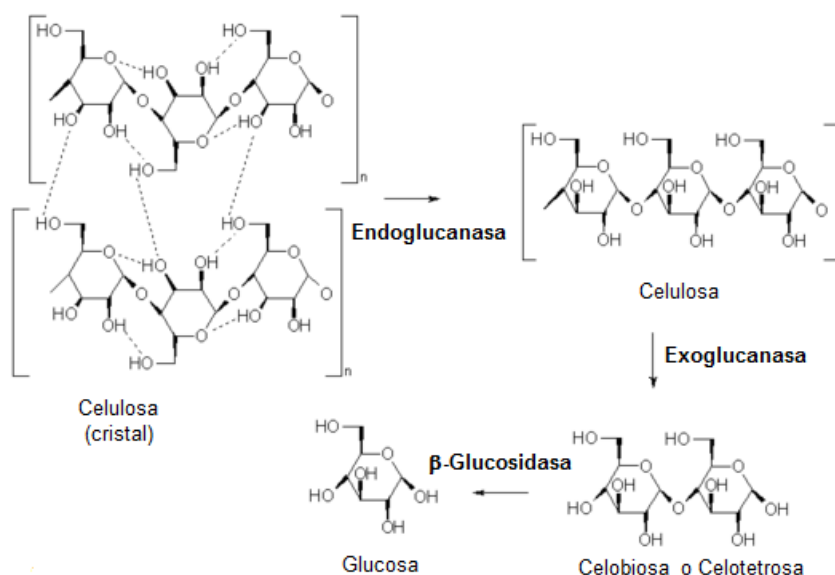


Figura 3: Modelo de degradación de celulosa por un complejo enzimático multicomponente de celulasa. <http://www.enzymeindia.com/enzymes/cellulase-spanish.asp>

1.2.2.3 APLICACIONES INDUSTRIALES DE CELULASAS

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

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

Por otro lado, la industria del textil se ha convertido en los últimos 14 años en una de las principales áreas para las aplicaciones industriales de enzimas. Las celulasas, del tipo endoglucanasas, representan el mayor grupo de enzimas en esta industria, considerando el hecho que cerca del 70 % de las fibras procesadas por esta industria son de celulosa. Las aplicaciones más relevantes en esta área son: distinción de prendas para dar apariencia de gastado, tratamiento de las

telas para eliminar imperfecciones de las fibras, preparación de la tela previa a tinciones o impresiones para obtener mayor afinidad con los pigmentos y desfibrilación realizada antes y después del teñido (Galante y Formantici, 2003).

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

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

La producción de bioetanol proveniente de biomasa lignocelulósica, y por ende, mediante el uso de celulasas, emerge como una de las más importantes tecnologías para la producción sostenida de combustibles renovables utilizados en el transporte. El etanol posee más alto índice de octanaje que la gasolina y produce menos emisiones, por lo tanto, ha sido reconocido como un sustituto y/o aditivo para la gasolina (Wyman, 1999).

La producción de etanol proveniente de biomasa lignocelulósica, involucra los diversos pasos de pre-tratamiento, hidrólisis, (sacarificación) y la recuperación del etanol (van Zessen, 2003). La hidrólisis de la biomasa, es esencial para la generación de azúcares fermentables que son luego convertidos en etanol, mediante la acción microbiana. La hidrólisis ácida o hidrólisis enzimática son, principalmente, empleadas para la hidrólisis de biomasa con diferentes eficiencias dependiendo de las condiciones del tratamiento, tipo de biomasa y propiedades del agente hidrolítico. La primera es una tecnología madura pero con las desventajas de generar desechos ácidos peligrosos y las dificultades técnicas de recuperar el azúcar desde el ácido. El método enzimático, por su parte, es más eficiente y ocurre bajo condiciones ambientales sin generar ningún desecho tóxico, además de tener mucho más potencial para ser mejorado en costo y eficiencia. (Mishima y *col*)

1.2.3 XILANASA

Las xilanasas son enzimas hidrolíticas que actúan como biocatalizadores en la degradación del xilano, el cual es un polisacárido que está presente de forma abundante en la pared celular vegetal (Gallardo y *cols.*, 2007). El xilano es el componente polimérico que se encuentra en mayor cantidad en la hemicelulosa, la cual corresponde al 30-40% de los carbohidratos presentes en la pared celular de las plantas (Sipat y *cols.*, 1986).

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

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

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

1.2.3.1 ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LA XILANASA

Las xilanasas son generalmente clasificadas en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas y tienen una relación inversa entre su punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (Collins y cols., 2002). Las xilanasas de la familia 10 tienen un dominio catalítico de 250 a 450 aminoácidos con un plegamiento tipo barril, mientras que las de la familia 11 poseen un único dominio catalítico de 180 a 200 aminoácidos que se pliegan en una conformación de lámina R curvada sobre sí misma (Gallardo y cols., 2007).

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

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

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

En la Figura 4 se muestra la estructura tridimensional de las xilanasas pertenecientes a las principales clasificaciones de éstas: las de las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas (Zhou y cols. 2007).

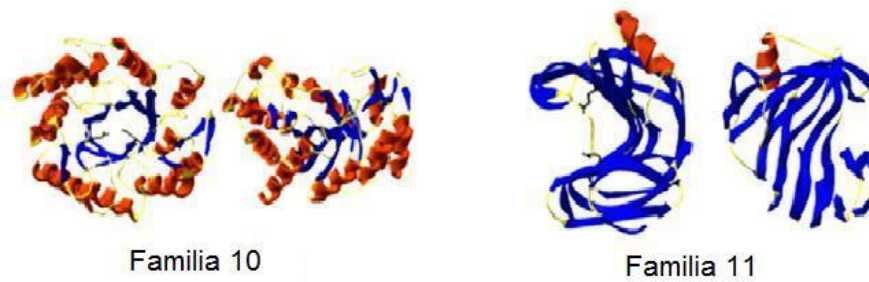


Figura 4: Estructura tridimensional familias 10 y 11 glicosil hidrolasas

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

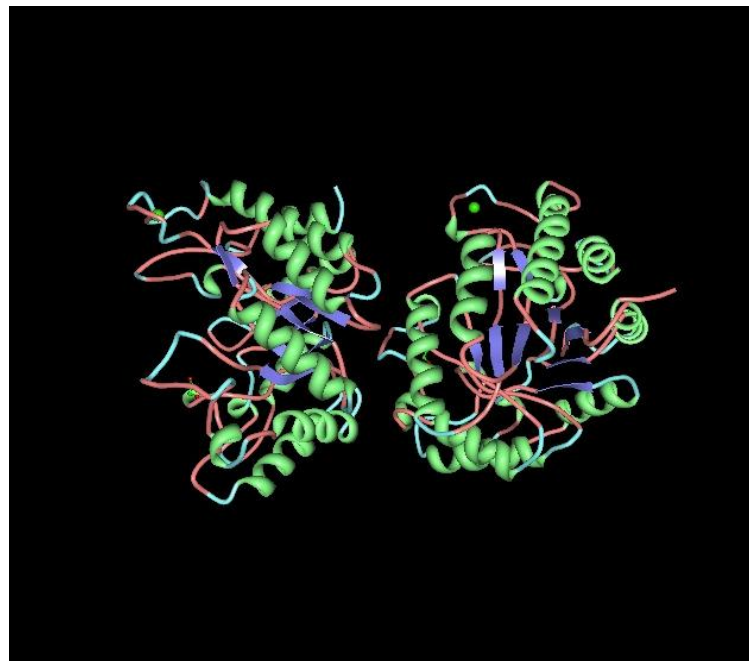


Figura 5: Estructura tridimensional xilanasa, familia 10 glicosil hidrolasas

1.2.3.2 FUNCIÓN DE LA XILANASA

Las endoxilanasas o xilanasas (endo-R-1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal del xilano hidrolizando los enlaces internos R (1S4) entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaños (Biely, 1985). También pueden hidrolizar xilooligómeros, siendo más efectiva cuando es mayor el grado de polimerización de éstos. Sin embargo no hidrolizan xilobiosa, lo que permite distinguirlas claramente de las R-xilosidasas.

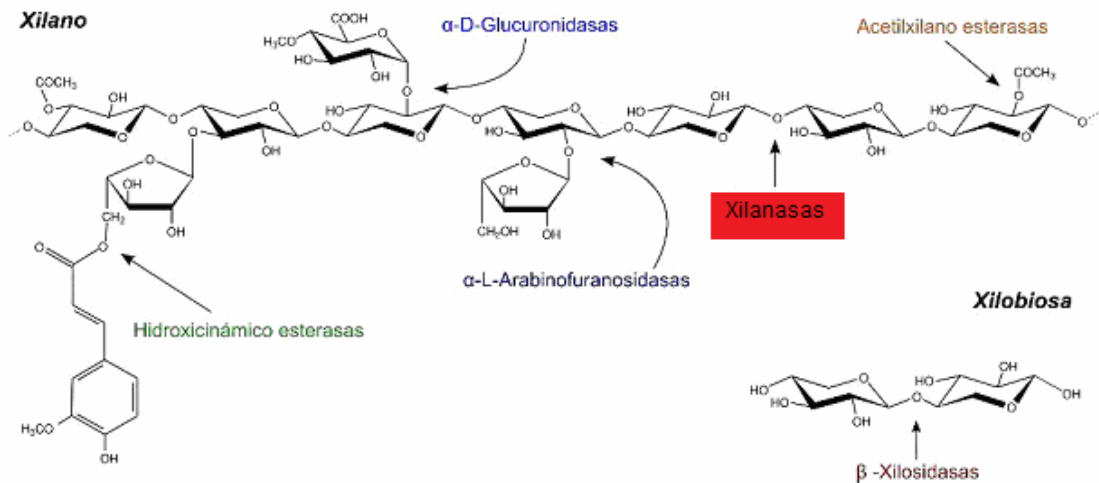


Figura 6: Enzimas que degradan el xilano

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

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

Como se mencionó anteriormente, las xilanasas pueden ser clasificadas en su gran mayoría en las familias 10 y 11 de las glicosil hidrolasas, por lo que su mecanismo catabólico corresponde al de estas enzimas. Así, el mecanismo utilizado para la hidrólisis del sustrato corresponde a un doble desplazamiento con retención anomérica (RSR) como se muestra en la Figura 7.

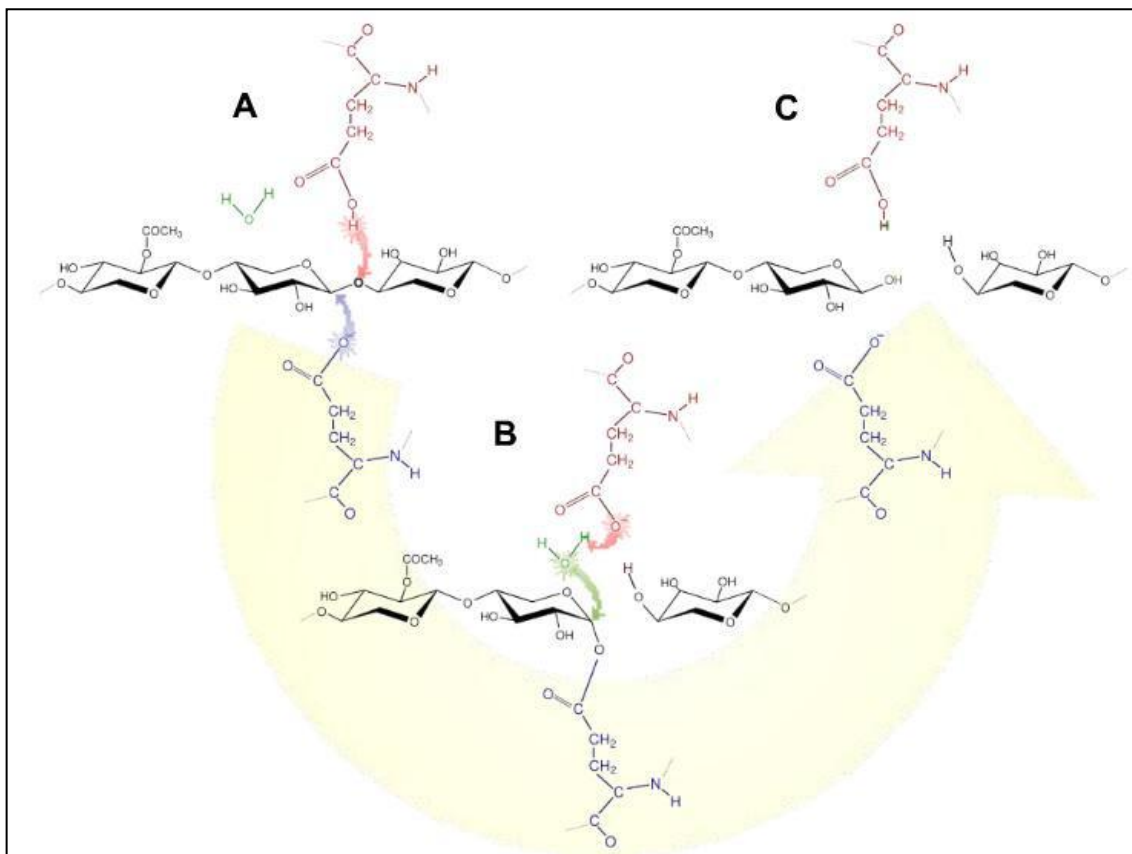


Figura 7: Mecanismo de acción xilanasa.

En la hidrólisis del enlace glucosídico por este mecanismo intervienen 2 residuos glutamato conservados del centro activo de la xilanasa, actuando uno de ellos como catalizador ácido/base y el otro como residuo nucleofílico (Davis y Henrissat, 1995). Una vez el esqueleto de xilasas ha sido posicionado correctamente entre los dos ácidos glutámicos catalíticos, el que actúa como catalizador ácido/base realiza un ataque ácido sobre el enlace glucosídico, protonando el oxígeno de dicho enlace, mientras el otro glutamato realiza un ataque nucleofílico sobre el carbono anomérico del enlace (Figura 7.A). De este primer paso se libera uno de los productos de reacción y se forma un intermediario T-glicosilo-enzima.

Luego, el glutamato ácido/base actúa como base y capta un protón de una molécula de agua, lo que permite que ésta ataque el enlace entre el glutamato nucleófilo y el carbono anomérico (Figura 4.B), produciendo su hidrólisis, dando como resultado un producto cuyo carbono anomérico vuelve a la misma configuración que en el sustrato (RSR), liberándose la enzima de su unión al sustrato para poder iniciar un nuevo proceso de catálisis (Figura 7.C) (Davis y Henrissat, 1995; Collins y cols., 2005).

1.2.1.3 APLICACIONES INDUSTRIALES DE XILANASAS

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

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

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

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

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

1.3 ANTECEDENTES GENERALES

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 y cols. 1988). Si bien el proceso de fermentación es bastante estandarizado, los procesos de separación y purificación se vuelven difíciles y costosos, sobre todo por la gran cantidad de sustancias diferentes contenidas en la célula y los altos niveles de pureza requeridos para la proteína de interés, que van desde 40% para insumos industriales hasta 99,9% en productos de utilización terapéutica.

La cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) es una de las principales técnicas utilizadas para la purificación de proteínas en procesos biotecnológicos y a nivel industrial. En HIC, las proteínas se unen reversiblemente a ligandos hidrofóbicos que se encuentran inmovilizados en el soporte cromatográfico, debido a la presencia de una elevada concentración de sal. La elución se logra disminuyendo la fuerza iónica en la fase móvil, formando un gradiente decreciente (Fausnaugh y Regnier. 1986).

Para favorecer la obtención de la proteína de interés en los procesos productivos, se pueden utilizar métodos biotecnológicos para aumentar la pureza, la producción, disminuir los costos y/o el número de etapas de purificación. Así es posible insertar el gen de una proteína determinada en microorganismos (bacterias y/o levaduras) que luego producen la proteína de manera recombinante.

1.3.1 INTERACCIONES HIDROFÓBICAS

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

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

1.3.2 ADICIÓN DE EXTREMOS POLIPEPTÍDICOS HIDROFÓBICOS

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

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

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

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

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

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

Los extremos más utilizados de alto valor hidrofóbico corresponden a repeticiones de triptófano y prolina. Si bien la prolina no clasifica como aminoácido hidrofóbico, se introduce frecuentemente debido a que la estructura rígida del anillo previene la formación de estructuras

secundarias, y de esta forma se espera que la superficie del extremo se encuentre mayormente expuesta al medio.

1.3.3 TÉCNICAS DE PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

El objetivo de una purificación de proteínas es extraer desde una mezcla, de proteína de interés con los mínimos contaminantes y en concentraciones adecuadas.

Existen varias técnicas de purificación de proteínas donde las principales son las electroforéticas y las cromatográficas. Cada una de estas técnicas explota las diferencias en las propiedades fisicoquímicas y bioquímicas entre la proteína deseada y los contaminantes de la mezcla a ser purificada.

La única técnica cromatográfica donde no existe interacción entre la proteína y la matriz es la de filtración en gel, que está basada en diferencias de tamaño. Dentro de las de adsorción, la cromatografía de afinidad explota las interacciones bioquímicas específicas entre la proteína y el ligando de la matriz; cromatografía de intercambio aniónico explota las interacciones electrostáticas a diferentes pH; cromatografía de interacción hidrofóbica está basada en las interacciones hidrofóbicas (Lienqueo y cols. 2009).

1.3.4 CROMATOGRAFÍA DE INTERACCIÓN HIDROFÓBICA (HIC)

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

No existe una respuesta generalizada de cómo la superficie de la proteína interactúa con los ligandos hidrofóbicos, sin embargo, la más ampliamente aceptada es la que explica la interacción hidrofóbica como un mecanismo entropía-conductor (Porath y cols. 1973;).

Dicho mecanismo entropía-conductor explica que, sí compuestos no polares son puestos en un medio acuoso se asocian espontáneamente debido a las interacciones hidrofóbicas. Al ocurrir estas interacciones se observa un incremento de la entropía ($\Delta S > 0$) debido al desplazamiento de las moléculas de agua. Esto implica una disminución en la energía libre de Gibbs ($\Delta G < 0$) y, por lo tanto, un proceso termodinámicamente favorable. Relación que se visualiza en la ecuación termodinámica (Budini. 2003):

Ecuación 6:
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Donde ΔG es el cambio en la energía libre de Gibbs, ΔH es el cambio de entalpía o calor generado, T es la temperatura y ΔS es la variación de entropía del sistema.

1.3.4.1 ETAPAS EN HIC

Para el proceso de HIC se propone un mecanismo de múltiples etapas por el cual las proteínas se adsorben a la matriz. La primera etapa estaría determinada por el tipo de sal utilizada (especialmente caotrópicas) y la segunda etapa resulta ser una etapa de cinética más lenta que dependerá de la hidrofobicidad de la proteína y de matriz (Sofer y Hagel. 1998; Tomaz y *col.* 2002, Lienqueo y *cols.* 2002).

Las etapas del proceso de HIC son las siguientes (Lienqueo y *cols.* 1999)

I. Ambientación de la columna con un buffer de elevada fuerza iónica. Usualmente se utiliza Sulfato de Amonio 1.5 - 2.0 M o Cloruro de Sodio 2.0 - 4.0 M.

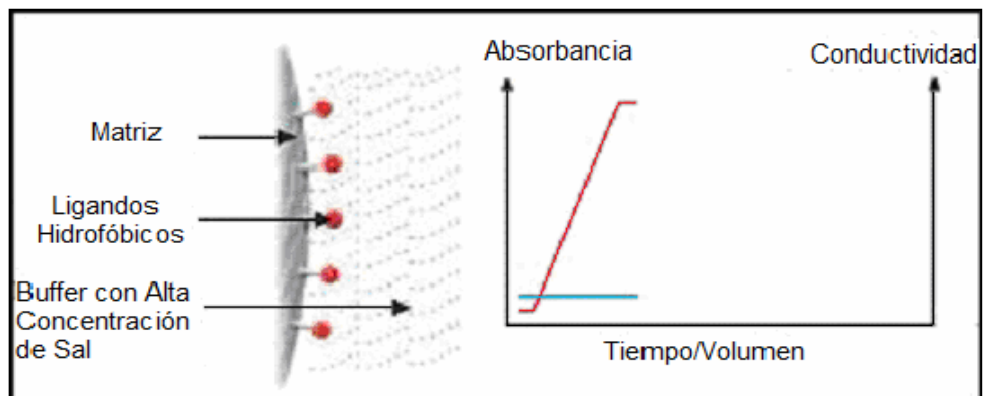


Figura 7: Etapa I de HIC, ambientación en la columna.

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

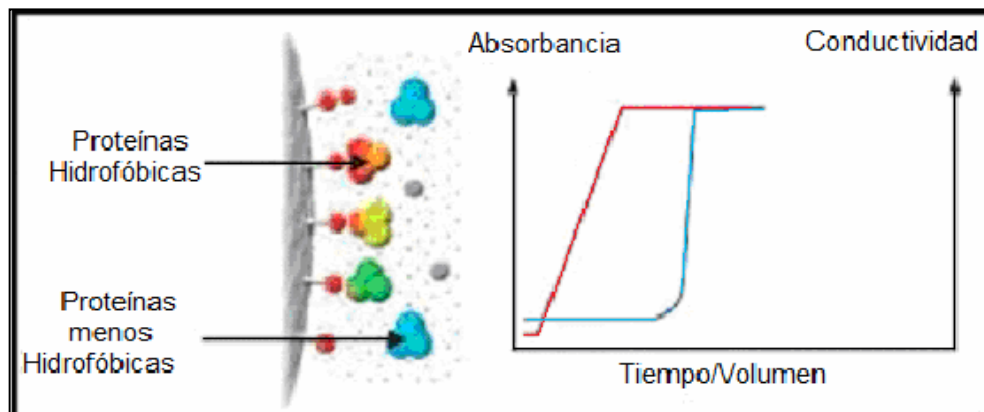


Figura 8: Etapa II de HIC, Inyección de la muestra.

III. Formación de un gradiente decreciente de sal. En esta etapa se produce la elución o desorción de las proteínas de la matriz. Las más hidrofílicas eluyen primero, y las más hidrofóbicas al final, ya que son retenidas con más fuerza por la matriz hidrofóbica.

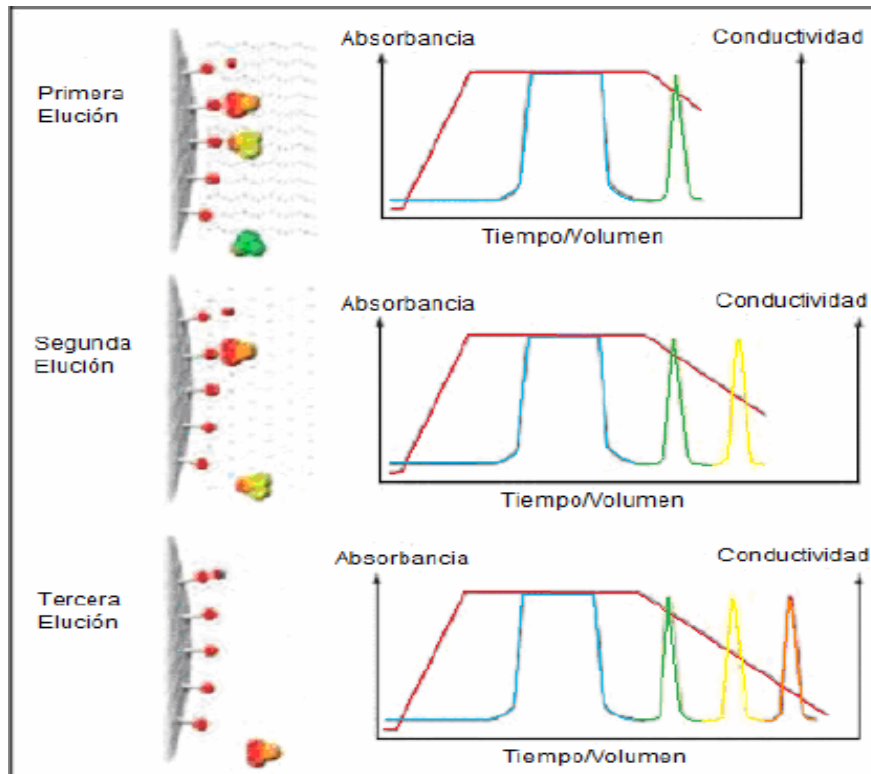


Figura 9: Etapa III de HIC, elución de las proteínas

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

1.3.5 DETERMINACIÓN DE LOS TIEMPOS DE RETENCIÓN EN HIC

Debido a la relevancia biotecnológica de HIC, se han hecho esfuerzos para determinar de qué forma las características de las proteínas y las condiciones de operación del sistema afectan el perfil de elución y el tiempo de retención de las proteínas (Hjerten et al., 1986; Melander et al., 1989; Mahn et al., 2005; Xia et al., 2005). Se ha logrado establecer que las principales variables de proceso son el tipo y la concentración máxima de sal utilizada para formar el gradiente de elución (Melander et al., 1989; Fausnaugh y Regnier, 1986) y el tipo de matriz cromatográfica (Machold et al., 2002), mientras que de las propiedades de las proteínas, la más importante sería la hidrofobicidad (Queiroz et al., 2001; Lienqueo et al., 2002).

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

Ecuación 7:

$$DTR = \frac{t_r - t_0}{t_f - t_0} \text{ o } DTR = \frac{V_r - V_0}{V_f - V_0}$$

En la Figura 10 se muestra un cromatograma típico y los parámetros a considerar para determinar los DRT.

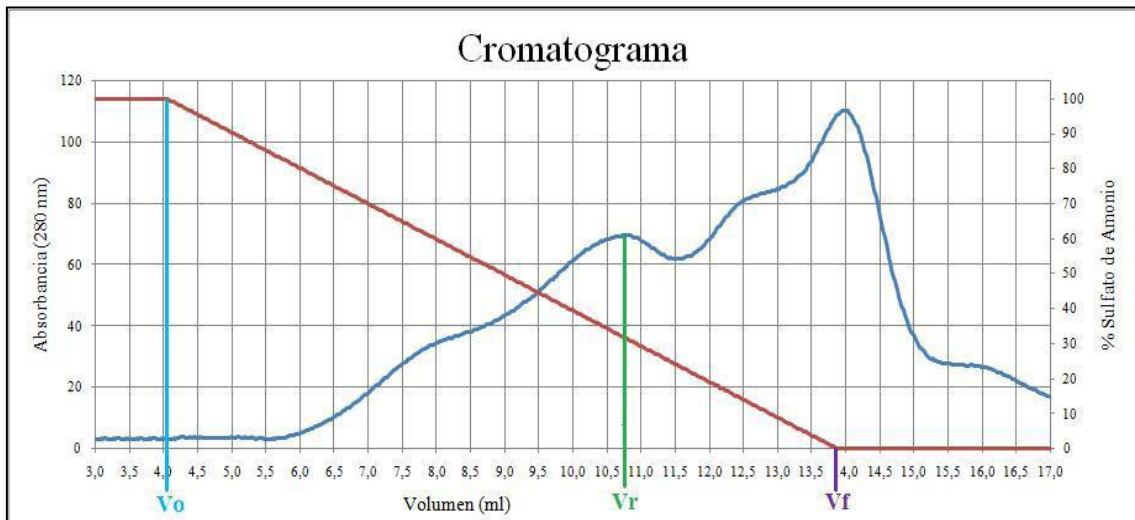


Figura 10: Esquema de un Cromatograma de HIC y parámetros a considerar. V0: volumen inicial donde comienza el gradiente decreciente de sal, Vf: volumen final correspondiente a donde termina el gradiente decreciente de sal, Vr: volumen de elución de la proteína de interés.

1.3.6 CARACTERÍSTICAS DE AMINOÁCIDOS HIDROFÓBICOS

Los aminoácidos son la unidad básica o monómero de las proteínas, cuya unión por medio de enlaces covalentes (enlace peptídico) en secuencias lineales conforman finalmente la cadena polipeptídica de cada proteína. Los aminoácidos están formados por un carbono unido a un grupo carboxilo (COOH), un grupo amino (NH₂), un hidrógeno y un grupo radical (R). Dependiendo del grupo radical de cada aminoácido, se genera diferencias de tamaño, estructura o carga eléctrica entre ellos.

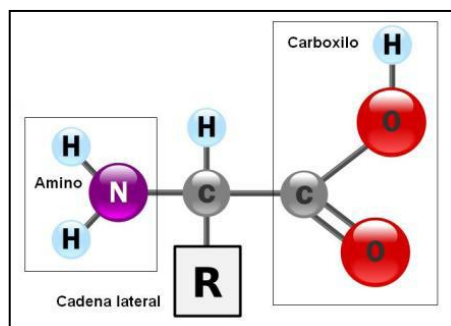


Figura 10: Estructura básica de un aminoácido.

Debido a estas diferencias, los aminoácidos se clasifican en 5 grupos: apolares alifáticos, apolares aromáticos, polares sin carga, cargados positivamente y cargados negativamente.

Dentro del trabajo desarrollado, la utilización de aminoácidos se centró en los pertenecientes a los grupos apolares alifáticos y aromáticos. En particular, se analizan extremos hidrofóbicos compuesto de Triptofano (W), Prolina (P) y Tirosina (Y) en las siguientes conformaciones peptídicas:

- WPWP, (WP)2
- YYY, Y3
- YPYP2Y, (YP)2Y
- YPYPYP, (YP)3
- WPWPWPWP, (WP)4

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

Grupo R apolares alifáticos: corresponden a aminoácidos con cadena lateral apolar o hidrofóbica. Dentro de este grupo se encuentran los de cadenas laterales alifáticas voluminosas, como la alanina, valina, leucina e isoleucina. La glicina posee un grupo R alifático de tamaño pequeño, lo que genera un mínimo impedimento estérico, permitiendo con ello una alta flexibilidad estructural. La prolina, aunque está dentro de esta clasificación y a diferencia del resto de los aminoácidos, posee un grupo amino secundario, formando un anillo alifático. Este anillo le da rigidez a la molécula, por lo que suele intercalarse entre aminoácidos hidrofóbicos de manera de impedir la formación de estructuras secundarias, reduciendo la flexibilidad del extremo polipeptídico.

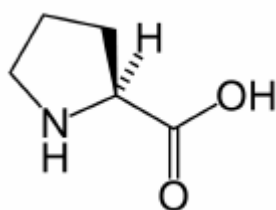


Figura 11: Estructura del aminoácido Prolina (P)

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

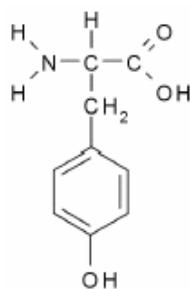


Figura 12: Estructura del aminoácido Tirosina (Y)

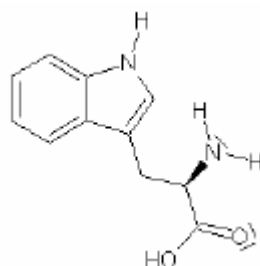


Figura 13: Estructura del aminoácido Triptofano (W)

1.4 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Como antecedentes al presente trabajo, se encuentran las memorias de título de Robinson (2008), Montecinos (2009) y Delpiano (2010) en los cuales se presenta información sobre la expresión, recuperación y purificación por Cromatografía de Interacción Hidrofóbica, en enzimas cutinasa, xilanasa y celulasa, respectivamente. Es por esto que es de suma importancia compilar los principales resultados y conclusiones de estos trabajos, con el fin de corroborar la información y comparar los resultados obtenidos con los resultados que generen las enzimas que poseen el extremo polipeptídico hidrofóbico WP4, las cuales serán sintetizadas en el presente trabajo.

Se presentan a continuación los principales alcances de los estudios antes nombrados.

1.4.1 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS EN CUTINASA

En el trabajo de Robinson (2008), se obtuvieron satisfactoriamente las mutantes Cutinasa-YYY y Cutinasa-WPWP, dichos extremos aumentaron la hidrofobicidad superficial global teórica de la proteína en un 12,4% y en un 16,6% respectivamente.

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.

1.4.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS EN CELULASA

En el trabajo de Delpiano (2010) se obtuvieron exitosamente las endoglucanasas mutadas Cel-WP2, Cel-YP2Y, Cel-(YP)3 y Cel-Y3.

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

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

Por otra parte, se calculó la hidrofobicidad superficial de la endoglucanasa nativa y el aporte de cada extremo polipeptídico, para esto se usó como modelo una endoglucanasa de código pdb 1TVN, que tenía un 88,4 % de identidad a nivel de aminoácidos con la enzima utilizada en este estudio. Las proteínas mutadas presentaron en los valores de DRT un aumento porcentual promedio respecto de la endoglucanasa nativa de 19,7 %, 15,0 %, 14,3 % y 10,9 % para el caso de Cel-(WP)2, Cel-(YP)2Y, Cel-(YP)3 y Cel-Y3 respectivamente, los cuales se relacionan con el porcentaje de aumento de la hidrofobicidad superficial total de la proteína (ϕ), según la recta: $DRT = 2,41\phi - 19,36$ con un $R^2 = 0,96$.

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

1.4.3 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS EN XILANASA

Al igual que en los trabajos para celulasa y cutinasa se usaron los aminoácidos tirosina (Y), triptófano (W) y prolina (P) para formar las secuencias mutantes Xilanasa-(WP)2, Xilanasa-(YP)2Y, Xilanasa- Y3 y Xilanasa-(YP)3. Las cepas de la proteína modificada con estos extremos se crecieron e indujeron bajo condiciones definidas, y se les extrajo de la fracción periplasmática de la célula, se midió actividad enzimática y proteína total, y actividad específica. Para la cepa nativa y las mutantes, se observó una baja producción de proteína, como se indica en los resultados de proteína y actividad total.

En el caso de la xilanasa mutada con la secuencia (YP)3, se observó que en la fracción periplasmática obtuvo la menor cantidad de proteína total, pero la mayor actividad xilanolítica total, mientras que para el resto de las mutantes, se obtuvo una mayor actividad total en la fracción extracelular.

Las fracción periplasmática de la cepa nativa y las 4 cepas mutadas se analizó por HIC utilizando como matriz hidrofóbica Butil Sefarosa y se calculó gráficamente los tiempos de retención adimensional (DRT) de acuerdo a la fracción en que eluyó la proteína en cada caso. Para la xilanasa nativa y las 4 mutadas se observó una tendencia similar en los cromatogramas, y los DRT presentaron un aumento porcentual promedio respecto de la xilanasa nativa de 46,17 % y 31,82% para las mutantes Xilanasa-(WP)2 y Xilanasa (YP)2Y respectivamente, mientras que para la Xilanasa-Y3 se observó una disminución de la hidrofobicidad en un 16,6 %. El aumento de los DRT coincide con la presencia de prolinas en el extremo adicionado, mientras que la disminución del mismo se observa en ausencia de este aminoácido.

En el trabajo, la Xilanasa-(YP)3 se excluyó del estudio de los DRT, debido a que no presentó actividad en medio sólido en las fracciones de la cromatografía, por lo que no se pudo determinar en qué fracción eluyó dicha proteína. Esto se debe probablemente a la baja cantidad de proteína presente en el periplasma de esta cepa. Se calculó la hidrofobicidad superficial de la xilanasa nativa, y el aporte de cada cola a ella. Sin embargo, para esto se utilizó un modelo de xilanasa cuya secuencia posee aproximadamente un 38% de parecido.

Dados los resultados se concluyó que el aumento de hidrofobicidad superficial de la proteína xilanasa debida a la adición de una secuencia corta de aminoácidos hidrofóbicos, permite un aumento del DRT de las proteínas para el caso de las extremos que contienen prolina como la (WP)2 e (YP)2Y. En el caso del extremo que no tiene prolina (Y3), se observa una disminución de los tiempos de retención adimensional.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto que tiene la adición de extremos polipeptídicos hidrofóbicos a proteínas recombinantes (celulasas, xilanasas y cutinasas) en aspectos tales como: su expresión, estabilidad, recuperación y purificación, de manera de poder definir criterios cualitativos y/o cuantitativos que permitirán seleccionar el extremo que reporte mayores mejoras en el proceso de purificación.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar una recopilación de antecedentes de tesis anteriores referidos a la adición de extremos hidrofóbicos, para comparar actividad, expresión y tiempos de retención en HIC de las enzimas recombinantes, con las enzimas nativas y los resultados obtenidos anteriormente.
- Estudiar el efecto que tiene la adición de los extremos hidrofóbicos a las distintas enzimas sobre la expresión, producción, actividad, estabilidad, y recuperación en *E. Coli*.
- Determinar cuál es el extremo polipeptídico, dentro de los propuestos, que tiene los mejores resultados de actividad enzimática según la hidrofobicidad agregada a la enzima por el extremo polipeptídico.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIALES

2.1.1 Cepa Bacteriana y Variantes

La cepa a utilizar en el presente Trabajo de Título corresponde a *Escherichia coli* BL21 (DE3) genotipo *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(rB⁻ mB⁻) *gal* λ (DE3) (Novagen). Cepa para expresión, lisógena del fago λ DE3, que incorpora el gen de T7-RNA polimerasa bajo el control del promotor *lacUV*. Inducible por Isopropil- β -D-tiogalacto-piranosido (IPTG). En esta cepa se indujo la síntesis enzimática para cada una de las variantes de Cutinasa, Celulasa y Xilanasa.

2.1.1.1 Variantes

Variante (WP)2: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET11a portador de la secuencia de cutinasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Triptófano(W)-Prolina(P)-Triptófano(W)-Prolina(P). Dicha variante fue usada para cutina, celulasa, xilanasa.

Variante (Y)3: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET11a portador de la secuencia de cutinasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Tirosina(Y)-Tirosina(Y)-Tirosina(Y). Dicha variante fue usada para cutina, celulasa, xilanasa.

Variante (YP)3: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET22a portador de la secuencia de celulasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Tirosina(Y)- Prolina(P)-Tirosina(Y)-Prolina(P)- Prolina(P)-Tirosina(Y). Dicha variante fue usada para cutinasa, celulasa, xilanasa.

Variante Celulasa-(YP)2Y: *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector de expresión pET22a portador de la secuencia de celulasa recombinante, la cual posee una cola adicional de polipéptidos hidrofóbicos, la que corresponde a Tirosina(Y)- Prolina(P)-Tirosina(Y)- Prolina(P)- Tirosina(Y). Dicha variante fue usada para cutinasa, celulasa.

2.1.2 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO (ANEXO B)

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 Taq DNA Polimerasa, kit pGEM®-T Easy
Fermentas	Estándar de tamaño molecular preteñido de proteínas, IPTG(Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido)
Qiagen	Sistemas de purificación de DNA plasmidial (kit QIAprep Spin Miniprep) y extracción de DNA desde geles de agarosa (Kit QIAEX II).
Merck	Ampicilina, Cloruro de Sodio, Sacarosa
Becton Dickinson	Medio Luria Bertani, Triptona (Extracto de Caseína), Extracto de Levadura
Winkler	Glicerol, Tris
Sigma	p-nitrofenolbutirato
Sigma –Aldrich	Tetrahidrofurano
Sigma	Azul de Commassie

2.1.3 EQUIPOS (ANEXO C)

El listado de los equipos utilizados se presenta en el anexo C

2.1.4 VECTORES DE CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN

En la transformación de las cepas bacterianas se utilizaron plasmidios de clonamiento y de expresión.

Tabla 2.3: Vectores de clonamiento y expresión usados para cada mutante estudiada

Vector	Mutantes insertadas
Plasmidio de clonamiento pGem®-T Easy	Mutantes de Cutinasa, Celulasa y Xilanasa
Plasmidio de expresión pET22b(+)	Mutantes de Celulasa y Xilanasa
Plasmidio de expresión pET11a	Mutantes de Cutinasa

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

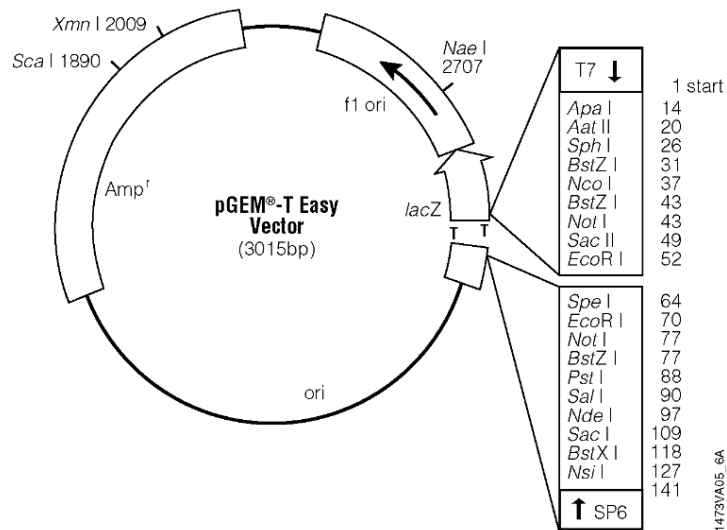


Figura 2.1. Vector pGem®-T Easy y sus puntos de referencia. Las regiones codificadas de utilidad para este trabajo corresponden a la resistencia a ampicilina Amp^r y el gen *lacZ* región codificante para la β-galactosidasa interrumpida por el sitio de clonamiento múltiple. En el recuadro a la derecha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

En la Figura 2.2 se muestra un esquema del vector de expresión pET22b(+) y sus principales puntos de referencia.

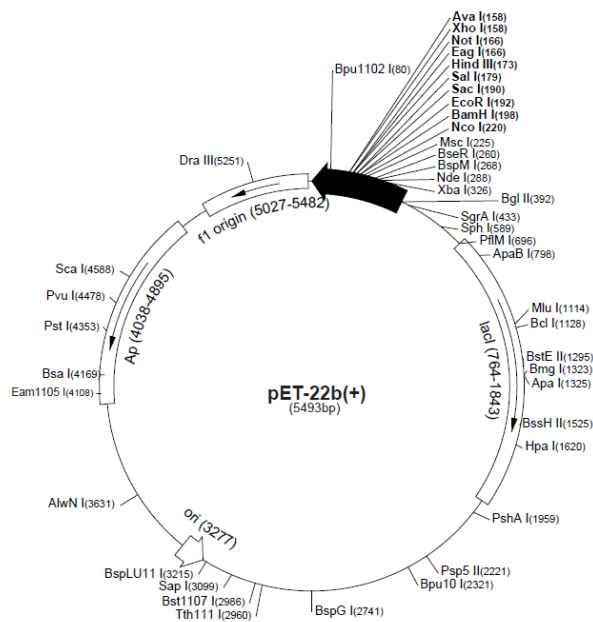


Figura 2.2. Vector pET-22b(+) y sus puntos de referencia. Arriba a la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento, serán usadas las enzimas de restricción NcoI y XhoI en este vector.

En la Figura 2.3 se muestra un esquema del vector de expresión pET11a y sus principales puntos de referencia.

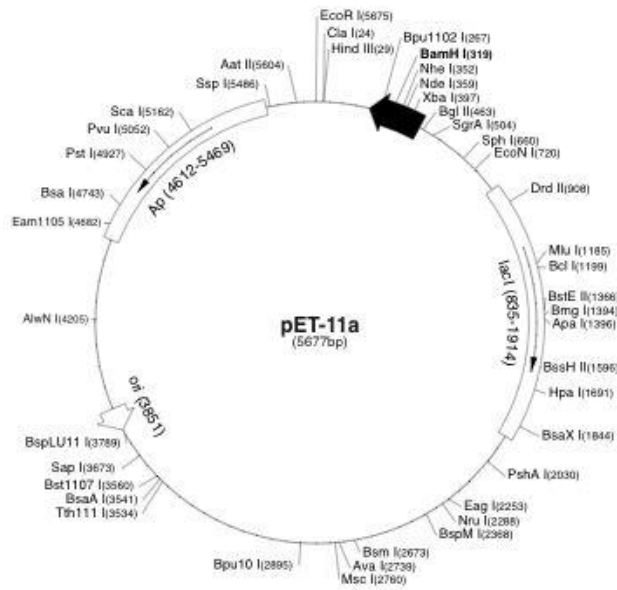


Figura 2.3. Vector pET-11a y sus puntos de referencia. Arriba a la derecha se listan los sitios de restricción disponibles en el sitio de múltiple clonamiento, serán usadas las enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI en este vector.

2.1.5 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción y los sitios corte en cada mutante, son presentados en la tabla 2.4.

Tabla 2.4: Enzimas de restricción utilizadas y características.

Enzimas	Sitio de corte	Mutante
NdeI	5'...CA/TATG...3' 3'...GTAT/AC...5'	Cutinasa
BamHI	5'...C/GATCC...3' 3'...CCTAG/G...5'	Cutinasa
XhoI	5'...C/TCGAG...3' 3'...GAGCT/C...5'	Celulasa y Xilanasa
NcoI	5'...C/CATGG...3' 3'...GGTAC/C...5'	Celulasa y Xilanasa

2.1.6 MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS Y SÓLIDOS

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

2.1.7 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 µm (Sartorius, Hannover-Alemania), se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a 4°C.

- Ampicilina 100 [mg/mL]: Se preparó una solución stock de 5 mL en agua Milli-Q estéril. Se esterilizó por filtración con un tamaño de poro de 0,2 μm , se alicuotó en volúmenes de 1 mL y se almacenó a -20°C .
- X-Gal 50 [mg/mL]: Se preparó una solución stock de X-Gal en di-metilformamida y se almacenó a -20°C en volúmenes pequeños y forrados con papel aluminio.

2.1.8 SÍNTESIS DE OLIGONUCLEÓTIDOS

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

2.2 MÉTODOS

2.2.1 METODOLOGÍA GENERAL

La metodología general, utilizada en el presente trabajo, se divide en tres grandes etapas, cada uno con actividades y objetivos claramente definidos. En una primera parte, se busca sintetizar el gen correspondiente a las enzimas hidrolíticas con el extremo WP4; en segundo lugar se trabaja en expresar todas las mutantes de enzimas recombinantes (cutinasa, celulasa y xilanasas); finalmente se separa y recuperan las proteínas del medio de cultivo y se realizan análisis de caracterización enzimáticos. La imagen 2.4 representa el flujo del proceso.

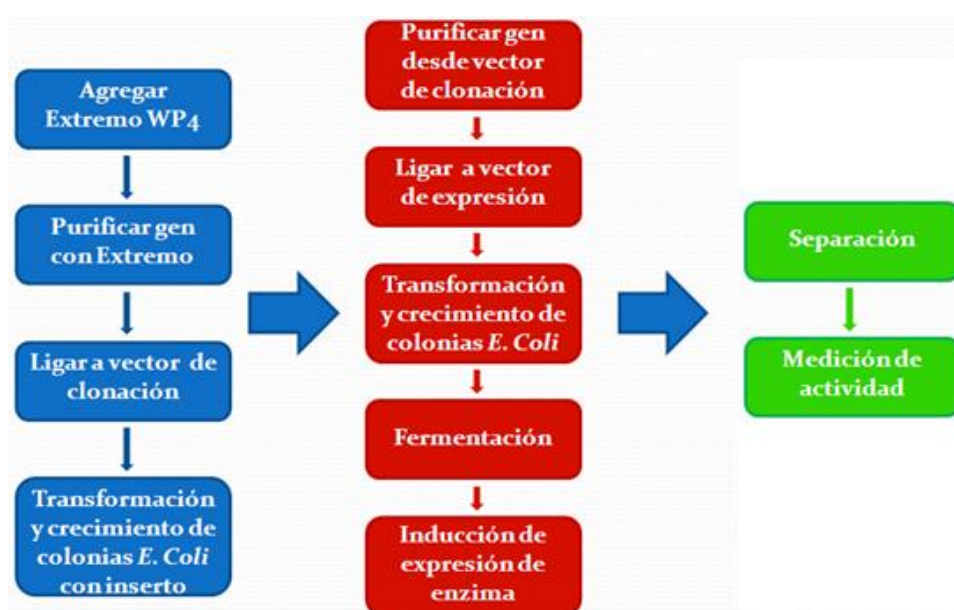


Imagen 2.4 Diagrama de flujo de la metodología general del trabajo realizado. En azul se esquematiza la primera etapa de síntesis de las mutantes wp4, en rojo la etapa de expresión enzimática y en verde la etapa de separación y caracterización.

2.2.2 DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñó un *partidor antisense* y un *partidor sense* para cada una de las enzimas (Cutinasa, Celulasa y Xilanasas), para que mediante la técnica de PCR se adicionara el extremo polipeptídico hidrofóbico WP4 en el extremo carboxilo terminal del dominio catalítico de cada una.

Para este diseño de partidores se tomó en cuenta la secuencia nucleotídica del gen del dominio catalítico de cada enzima nativa (wild type), de manera que los partidores tuvieran una secuencia complementaria de 9 nucleótidos aproximadamente.

En el caso de las enzimas Celulasa y Xilanasas se agregó un sitio de corte para la enzima de restricción *XhoI* en el partidor *antisense* (región 3' de la secuencia codificante), mientras que el partidor *sense* posee un sitio de corte para la enzima de restricción *NcoI* (región 5' de la secuencia codificante), en cambio en la enzima Cutinasa se agregó un sitio de corte para la enzima de restricción *BamHI* en el partidor *antisense* (región 3' de la secuencia codificante), mientras que el partidor *sense* posee un sitio de corte para la enzima de restricción *NdeI* (región 5' de la secuencia codificante).

El partidor *antisense* además contiene la secuencia codificante para el extremo hidrofóbico WP4, de 8 aminoácidos (24 nucleótidos) al final de la proteína, dos codones de término de la traducción y 3 nucleótidos de manera que cada partidor termine en C o G para fortalecer la unión entre la DNA polimerasa y la región codificante.

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

2.2.3 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDIAL

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

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

2.2.4 SÍNTESIS DE LOS GENES MODIFICADOS CON EXTREMO HIDROFÓBICO WP4

La reacción de síntesis fue llevada a cabo de manera homóloga para las 3 enzimas, ya que obtenido el gen nativo a partir de DNA plasmidial se realizó PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando los partidores *sense* y *antisense* diseñados previamente, para sintetizar el gen amplificado de la cutinasa con el extremo WP4.

Para las 3 enzimas estudiadas 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.

En el caso de cutinasa los parámetros fueron los siguientes:

- Se prepararon 50 µl de mezcla PCR para cada una de las reacciones, la cual contiene: 10 µl de Buffer 5X, 5 µl de Mg, 1 µl de dNTPs [10mM], 2,5 µl de Partidor Sense, 2,5 µl de Partidor Antisense, 2,5 µl de DNA, 1 µl Taq polimerasa, completando el volumen final deseado con 25,5 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.

Para la celulasa:

- Se prepararon 50 µl de mezcla de PCR para cada *partidor antisense* la cual contenía: 5 µL de Buffer 10X, 1 µL de dNTPs, 1 µL de partidor sense, 1 µL de partidor antisense, 2,5 µL de DNA Plasmidial, 0,5 µL de Vent DNA Polimerasa, completando el volumen final con 39 µL de H₂O estéril.
- Las condiciones de los ciclos térmicos fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C por 5 min; 30 ciclos a 94°C por 30 s, 61,3 °C por 30 s, 72°C por 45 s, y finalmente 1 ciclo a 72°C por 5 min.

Y para la Xilanasa:

- Se prepararon 50 μL de mezcla PCR para cada una de las reacciones, la cual contiene: 10 μL de Buffer 5X, 5 μL de Mg, 1 μL de dNTPs [10mM], 2,5 μL de Partidor Sense, 2,5 μL de Partidor Antisense, 2,5 μL de DNA, 1 μL Taq polimerasa, completando el volumen final deseado con 25,5 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, 62,1°C por 30 seg y 72°C por 45 seg, y finalmente un ciclo adicional de 72°C por 5 minutos.

2.2.5 CLONAMIENTO DE LOS GENES DE CELULASA MODIFICADOS

2.2.5.1 CLONAMIENTO EN EL VECTOR pGEM-TEASY

Para ligar al vector pGem®-T Easy los productos del PCR purificados desde el gel de agarosa al 1% p/v, se utilizó el siguiente protocolo: la mezcla de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 10 μL , con 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. La mezcla se dejó ligando a 4°C toda la noche. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* DH5 α electrocompetentes.

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

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

2.2.5.3 CLONAMIENTO 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 y 1 μL de T4 DNA ligasa. La mezcla se dejó a 4°C toda la noche. El producto de esta ligación se utilizó para transformar células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes.

2.2.6 PREPARACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

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

2.2.7 TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS ELECTROCOMPETENTES

Se agregó 1 μ L de mezcla de ligación a 20 μ L de bacterias electrocompetentes (*E. coli* DH5 α o BL21(DE3)). 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 transformadas se traspasaron a 1 mL de medio LB estéril y se incubaron a 37°C y a 200 rpm durante 1 h. Posteriormente se centrifugaron a 13.000 rpm durante 1 min y se descartaron 900 μ L del sobrenadante. El sedimento de células se resuspendió en el sobrenadante restante y se plaqueó sobre placas LB-Agar estériles suplementadas con Amp a una concentración final de 100 μ g/mL. En el caso de bacterias electroporadas con el vector pGem[®]-T Easy, las placas además de contener Amp, contenían X-Gal 50 μ g/mL e IPTG 0,5 mM. Las placas se incubaron a 37°C durante toda la noche, y posteriormente se mantuvieron a 4°C.

2.2.8 PCR DE COLONIAS

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

2.2.9 DIGESTIÓN DE DNA PLASMIDIAL

Para digerir los vectores de clonamiento y expresión, se usaron las enzimas de restricción mencionadas en la sección 2.1.4. Este protocolo se utilizó para linealizar los vectores o recuperar los insertos ligados a ellos. La reacción de ligación doble contenía 2 μ L

de tampón 4 (recomendado por el proveedor Promega), 2 μL de BSA, 1 μL de cada enzima, 10 μL de vector con inserto y 5 μL de agua Milli-Q estéril para así completar un volumen final de 20 μL . Esta mezcla se dejó a 37°C por 2 h y el resultado se visualizó en un gel de agarosa al 1% p/v.

2.2.10 ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

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

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

2.2.11 PURIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

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

2.2.12 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

2.2.12.1 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE CUTINASAS

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

Se midió absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp, a una D.O. final de 0,05. El cultivo se creció a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 1,5.

Una vez alcanzada la D.O. deseada, se agregó IPTG a una concentración final de 0,5 mM y se incubó toda la noche a 25°C y 200 rpm.

2.2.12.2 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE CELULASAS

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

Se midió absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp, a una D.O. final de 0,05. El cultivo se creció a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0,6.

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

2.2.12.1 INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE XILANASAS

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

Se midió absorbancia a 600 nm, utilizando como blanco medio estéril y se determinó el volumen requerido para inocular 100 mL de medio TB estéril, suplementado con Amp, a una D.O. final de 0,05. El cultivo se creció a 37°C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. de 0,6.

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

2.2.13 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DEL MEDIO DE CULTIVO

2.2.13.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PROTEÍNAS PERIPLASMÁTICAS (CUTINASA Y XILANASA)

Los 100 ml de cultivo se centrifugaron a 3.400 g durante 7 min. Se guardó el sobrenadante (Fracción extracelular). Posteriormente se resuspendió el pellet en 5 mL de Buffer TES frío (Tris-HCl 50 mM; pH 7,5; 20% sacarosa). A las células en suspensión, se agregó EDTA frío a una concentración final de 1 mM. Se agitaron los pellet resuspendidos suavemente en hielo durante 10 minutos y se centrifugaron por 10 min a 4 °C y 3.400 g. Se guardó el sobrenadante (Fracción recogida del lavado de células con buffer TES). Luego se resuspendió el pellet en 5 ml de agua fría estéril y se agitaron manualmente manteniéndose a baja temperatura durante 10 minutos, en este paso las proteínas periplasmáticas eran

liberadas al agua. Finalmente, se centrifugó a 4 °C por 30 minutos a 3.400 g. Se guardó el sobrenadante obtenido (Fracción periplasmática)

2.2.13.2 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES (CELULASA)

La fracción extracelular se recuperó centrifugando los 100 ml de cultivo 7 min a 4°C y 4400 rpm. Para extraer las proteínas de la fracción periplasmática se realizó choque osmótico a los sedimentos celulares de la sección anterior, los cuales se resuspendieron en 5 mL de Buffer TES frío y a las células en suspensión se les agregó EDTA frío a una concentración final de 1 mM. Se agitó suavemente en hielo durante 10 min, luego se centrifugó por 10 min a 4°C y 4400 rpm, guardándose los sobrenadantes para determinar la pérdida de proteína en esta etapa. Cada sedimento fue resuspendido en 5 mL de agua fría estéril, agitándose suavemente en hielo por 10 min. Finalmente se centrifugó a 4°C y 4400 rpm por 30 min y se recuperó el sobrenadante, correspondiente a la fracción periplasmática.

2.2.14 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

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

2.2.15 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

2.2.15.1 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE 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 $^{\circ}\text{C}$ 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):

$$\text{Ecuación 2.1:} \quad U \text{ cutinasa (U/ml)} = 16.32 * (\text{dAbs}_{400}/\text{dt}) * D$$

Donde D es la dilución y (d Abs₂₀₀/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 ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CELULASA

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

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

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

2.2.15.3 ENSAYO DE ACTIVIDAD, XILANASA

La actividad xilanolítica fue medida utilizando el método DNS con xilano de abedul soluble como sustrato (xylan from birchwood, SIGMA), y en presencia de un buffer Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 2 mM y pH 8,0. Para obtener el xilano soluble, se disolvió xilano de abedul a una concentración de 50 mg/mL en el buffer antes descrito, a temperatura ambiente en agitación durante 1 hr, luego se centrifugó la solución a 10.000 x g por 30 min y el sobrenadante correspondió a la fracción soluble del xilano.

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

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

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE GEN DE CELULASA CON EXTREMO POLIPETÍDICO WP4 A PARTIR DEL GEN DE CELULASA-WP2

La generación de los genes modificadas con el extremo hidrofóbico WP4 se llevó a cabo mediante la técnica de PCR, para la cual se usó como templado el DNA plasmidial que contenía el dominio catalítico del gen nativo (WT) de cada enzima y como partidores, los oligonucleótidos *sense* y *antisense* correspondientes.

En primera instancia se utilizó partidores previamente diseñados, para la síntesis de celulasaWP4, utilizando como templado el gen de celulasa con el extremo WP2. La imagen 3.1 representa la estrategia usada para la síntesis del gen de la celulasa mutante.

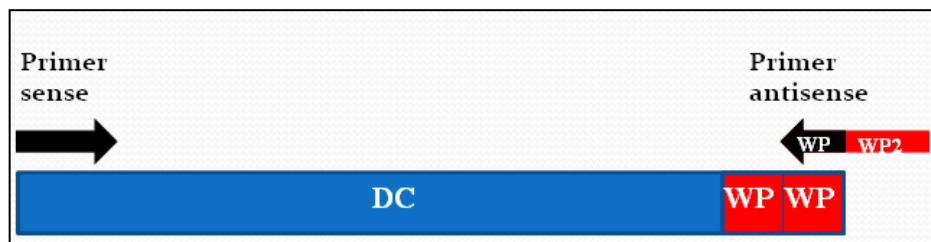


Figura 3.1: Representación del alineamiento de los partidores *sense* y *antisense* en la reacción de PCR para la síntesis de celulasa-WP4. En azul se representa el dominio catalítico (DC) del gen de celulasa nativo; en rojo los aminoácidos agregados en el extremo carboxilo en Cel-WP2. En los primers (flechas sobre el rectángulo) el color negro presenta la región del partidador que se alinea con el dominio catalítico y el color rojo al extremo WP2 que se quiere agregar al gen mediante PCR.

Las razones para utilizar esta estrategia fueron varias y tuvieron como objetivo hacer más favorable la reacción de PCR. Al utilizar como templado el gen de celulasa-WP2, se disminuye la cantidad de pares de bases en el partidador *antisense*, ya que se ahorran 4 codones del extremo WP4 (en comparación a utilizar el gen nativo como templado), con esto se obtiene una Tm menor y cercana a la Tm del primer *sense*; además al disminuir el largo del primer *antisense*, baja la probabilidad de alineamiento entre los dos partidores, el autoalineamiento, el alineamiento en otras regiones del dominio catalítico y formación de *harpins*.

El partidador *antisense* posee la siguiente estructura:

5' – 3' – 3 nun adicionales – sitio de corte *XhoI* – 2 codones de término (Stop) – extremo hidrofóbico – sec dominio catalítico – 3'

A continuación se detallan las secuencias, Tm y tamaño estos partidores previamente diseñados.

- **Partidor *sense* (Cel33NcoI):**

NcoI *Cel*
5'- ctt g **cc atg gca** gcc gtt gag cc -3'

Tm= 62°C

Tamaño= 23 pb

Partidor *antisense* (Cel-WP4):

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

Tm= 69°C

Tamaño= 36 pb

3.1.1 ADICIÓN DE EXTREMO POLIPTÍDICO WP4 A CELULASA-WP2

En primera instancia para la síntesis del inserto requerido, se usó como templado el DNA plasmidial de celulasa con el extremo hidrofóbico WP2 y como partidores, el partidor *sense* Cel33NcoI y el *antisense* CEL-WP4 previamente diseñados.

Como sólo se conocían las temperaturas de alineamiento teóricas de los partidores, en el programa de PCR se realizó un gradiente de temperatura, hasta encontrar aquella que mostrara un mejor resultado en cuanto a intensidad de banda y tamaño del fragmento amplificado en la electroforesis en un gel de agarosa del producto de PCR.

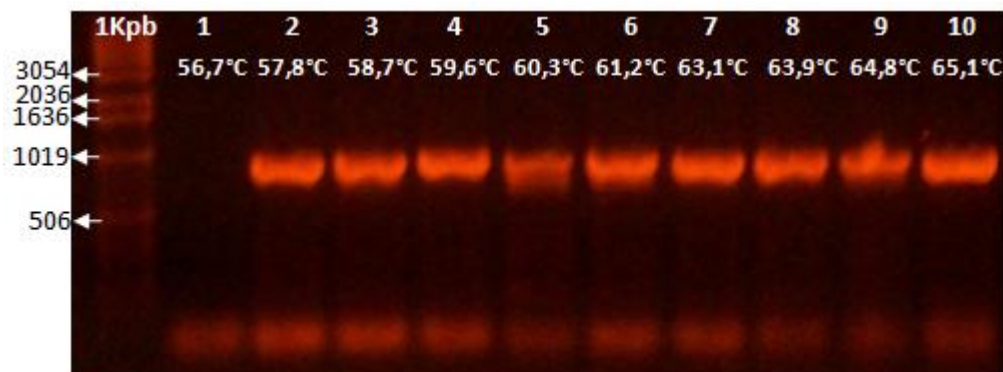


Figura 3.2: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para generar Cel-WP4. Marcador de peso molecular 1 kb, Carriles 1-10: Temperaturas de alineamiento: 56,7°C; 57,8°C; 58,7°C; 59,6°C; 60,3°C; 61,2°C; 63,1°C; 63,9°C; 64,8; 65,1.

De la Figura 3.2 se observa que existió amplificación de un fragmento de 930 pb, consistente con el tamaño esperado. La amplificación se produjo desde temperaturas de alineamiento de gen de celulasa a partir de 57,8°C y se mantuvo a todas las temperaturas probadas. Este resultado es coherente con las T_m de los partidores utilizados, ya que se partió con una temperatura de aproximadamente 5 °C más baja que el partidore *sense* (T_m=62 °C). Así se logró identificar en rango de temperaturas para el cual se hace efectiva la reacción de PCR, a partir de aquí se trabajó con una temperatura de 59° C en las amplificaciones posteriores.

Los resultados de la amplificación del gen de celulasa modificada con el extremo hidrofóbico WP4 se muestran en la Figura 3.2. El templado para la amplificación se obtuvo de la purificación de DNA plasmidial de un cultivo de la cepa recombinante que produce celulasa con extremo WP2. Ambos métodos se describen en las secciones 2.2.5 y 2.2.6.

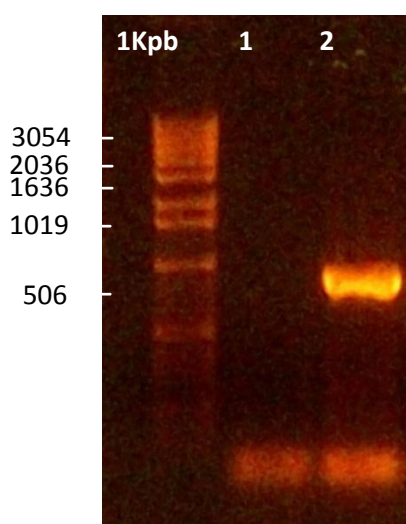


Figura 3.3: Amplificación del gen de celulasa-WP4. Mediante PCR. Marcador de peso molecular 1 kb (Invitrogen), Carril 1: Control Negativo (sin DNA templado); Carril (2) templado celulasa-WP2. La temperatura de alineamiento utilizada fue 59°C.

En la amplificación a 59 °C se descartan posibles alineaciones inespecíficas en regiones distintas del gen de celulasa-WP2, correspondientes al tamaño esperado del gen más el oligonucleótido codificante del polipéptido adicionado, lo cual suma 930 pares de bases aproximadamente.

3.1.2 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De Clonamiento PGem-T-Easy

Luego de generar los insertos codificantes para la celulasa modificada, se procedió a ligarlos al vector de clonamiento pGEM-T-easy. Esto con el fin de seleccionar aquellas colonias que incorporen correctamente el inserto y aumentar la cantidad de inserto generado mediante la clonación del DNA plasmidial en células transformadas con el vector pGEM-T-easy.

Se transformaron células DH5 α 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 3.4 se muestran los resultados para 4 colonias distintas.

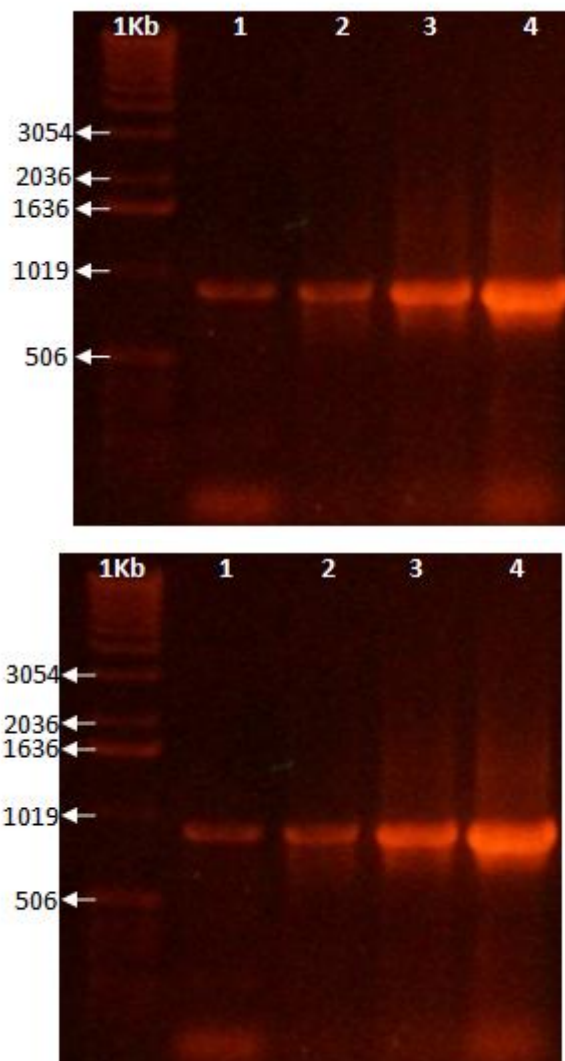


Figura 3.4: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy
Carril 1 al 4 presentan Colonias con gen de celulasa-WP4

Para realizar el PCR de colonias, se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.2.8. Dado que se conservaron las mismas condiciones del PCR para generar el gen de celulasa-WP4, solo puede haber amplificación de DNA en aquellas colonias que contengan el gen de interés en su DNA plasmidial. Aquí, de las 4 colonias seleccionadas, todas presentaron resultados positivos.

Se crecieron las colonias seleccionadas y se les extrajo el DNA plasmidial, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, las cuales flanquean la secuencia de la

celulasa con el fin verificar los tamaños tanto de insertos como de vector. En la Figura 3.5 se muestra una de las digestiones realizadas.

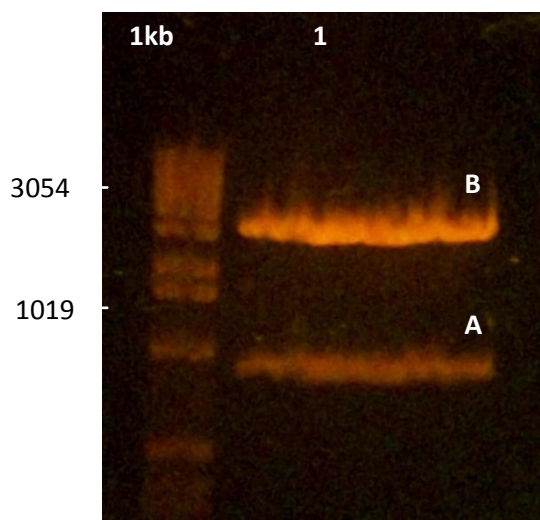


Figura 3.5: Digestión del DNA plasmidial de los clones de celulasa modificada en pGEM-T-easy(A): Carril (1): Celulasa con extremo WP4 (930 pb) (B): Carril (1): Vector de clonamiento digerido (3054 pb)

Se aprecia que el inserto fue correctamente digerido del vector de clonamiento. En la imagen 3.5 se observan 2 bandas, donde la banda superior corresponde al vector de clonamiento (3015 pb) y la inferior a la celulasa con el extremo hidrofóbico WP4 (930 pb). De la banda inferior se deduce que fue posible aumentar la cantidad de inserto mediante el vector de clonamiento para la posterior ligación al vector de expresión.

3.1.3 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De expresión pET22-b (+)

El gen de la enzima celulasa con el extremo hidrofóbico, se purificó de la banda correspondiente al inserto en los productos de restricción de los plasmidios pGEM-T-easy recombinantes, y luego se ligaron al vector de expresión pET22-b(+). Una vez obtenidos los plasmidios de expresión recombinantes, se electroporaron a células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes, las cuales se crecieron en placas LB-agar suplementadas con ampicilina. Se seleccionaron 4 colonias a las que se les realizó PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto.

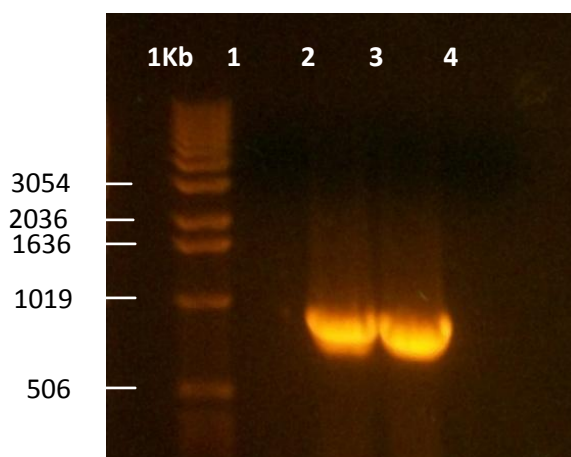


Figura 3.6: PCR colonias celulasa-(WP)4, vector de expresión pET22-b(+). Carril 2 y 3 con resultados positivos.

En la Figura 3.6 se muestran los resultados del PCR de colonias para la cepa que contiene el inserto de la celulasa modificada en el vector de expresión pET-22b(+). En ellas, los carriles que presentan la banda de aproximadamente 930 pb corresponden a las colonias que dieron positivo para el PCR, mientras que los carriles vacíos (3 y 4) corresponden a las colonias que no contenían el vector de expresión con el inserto.

3.1.4 SECUENCIAMIENTO DE PLASMIDIO OBTENIDO

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

Los resultados indicaron que la secuencia de la celulasa modificada con el extremo (WP)4, no correspondía a la secuencia del dominio catalítico de la celulasa wild type más la secuencia del extremo agregado, si no que a la secuencia de la celulasa wild type más el extremo (WP)2.

La discusión del resultado del secuenciamiento obtenido mediante la estrategia de síntesis antes descrita será analizada más adelante, en comparación a los resultados obtenidos con la estrategia propuesta a continuación.

3.2 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE GENES DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS CON EXTREMO POLIPETÍDICO WP4 A PARTIR DEL GEN WILD TYPE

Al no obtener satisfactoriamente el gen de celulasa-WP4 mediante la estrategia antes explicada, se diseñaron nuevos partidores para la síntesis de los genes de cutinasa, celulasa y xilanasas con el extremo hidrofóbico WP4, esta vez utilizando como templado el gen wild type de la enzima correspondiente. La figura 3.7 representa la estrategia usada para la síntesis de los genes de interés.



Figura 3.7: Representación del alineamiento de los partidores sense y antisense en la reacción de PCR. Dominio Catalítico (DC): En azul se representa el gen de celulasa WT. Primers: En negro se presenta la región del partidor que se alinea con el dominio catalítico, en rojo los codones codificantes para el extremo hidrofóbico WP4 agregado al gen mediante PCR.

Los partidores *antisense* poseen la siguiente estructura:

5' – 3 nun adicionales – sitio de corte *XhoI* – codón de término (Stop) – extremo hidrofóbico – sec dominio catalítico – 3'

Cutinasa:

- **Partidor sense (Cut-S (sense)):**

NdeI
5' - ata **cat atg** aaa caa agt act att gca ctg gca ctg gca ctc ctc -3'

Tm= 67.3°C

Tamaño= 45 pb

Partidor antisense (Cut-WP4 (antisense)):

BamHI Stop
5' - tat **g'ga tcc tca** cgg cca cgg cca cgg cca cgg cca agc aga acc -3'

Tm= 77.3°C

Tamaño= 45 pb

Celulasa:

- **Partidor sense (Cel-S (sense)):**

5'- ctt gcc atg gca gcc gtt gag cca tta aac gtg agc gga aat caa-3'
NcoI

Tm= 70.9°C

Tamaño= 45 pb

Partidor antisense (Cel-WP4 (antisense)):

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

Tm= 76.4°C

Tamaño= 45 pb

Xilanasa:

- **Partidor sense (Xil-S (sense)):**

5'- ctt tcc atg gcg tgc ggg ggg aat aat aaa gat aca ccg gtg - 3'
NcoI

Tm= 70.4°C

Tamaño= 42 pb

Partidor antisense (Xil-WP4 (antisense)):

5'- gct cga gtt atc acg gcc acg gcc acg gcc acg gcc ata atg cat tag- 3'
XhoI Stop

Tm= 75.7°C

Tamaño= 48 pb

En esta estrategia se usan partidores mucho más largos, lo que lleva consigo varios inconvenientes; aumenta la T_m de reacción, crece la probabilidad de autoalineamiento, alineamiento con otras partes de templado y formación de harpin.

3.2.1 ADICIÓN DE EXTREMO POLIPTÍDICO WP4 A CUTINASA-WT

Los resultados de la amplificación del gen de cutinasa modificada con extremo hidrofóbico WP4, se muestran a continuación. 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 2.2.3 y 2.2.4.

Se realizó un gradiente de temperatura en la reacción de PCR, para encontrar aquella que mostrara un mejor resultado en cuanto a intensidad de banda en la electroforesis en gel de agarosa.

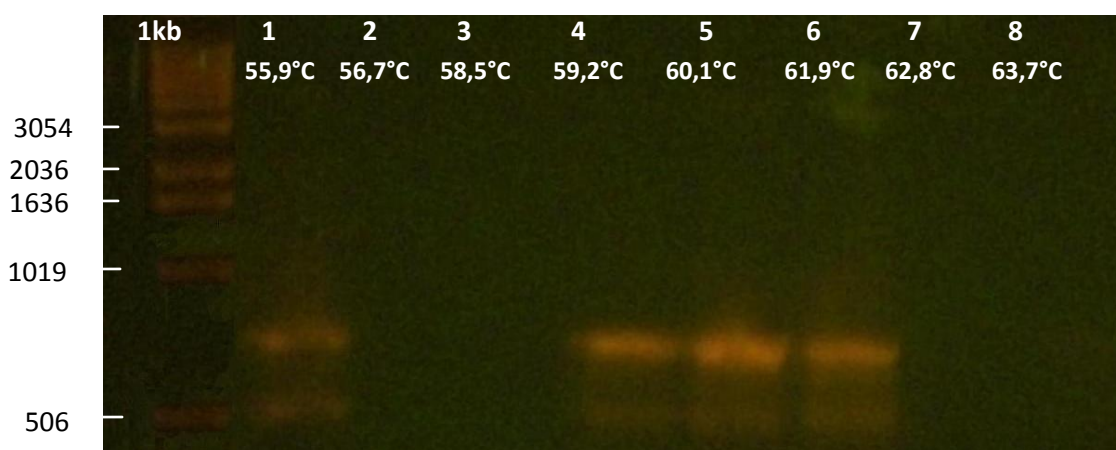


Imagen 3.8: Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR usando gradiente de temperatura para Cut-WP4. Marcador de peso molecular 1 kb, Carriles 1- 8: Temperaturas primeros ciclos: 55,9°C; 56,7°C; 58,5°C; 59,2°C; 60,1°C; 61,9°C; 62,8°C; 63,7°C .

En la figura 3.8 se destacan varios factores, primero se observa que existió amplificación en 4 temperaturas, 55,9°C, 59,2°C, 60,1°C, 61,9°C para el gen de cutinasa wild type, lo cual está dentro del rango esperado debido a la temperatura el primer *sense*, dado esto se siguió trabajando de aquí en adelante a una temperatura de 60°C, ya que a esta temperatura se obtuvo la mayor intensidad de banda. Otro punto a destacar, es que aquí se pueden identificar dos bandas luego de la reacción de PCR.

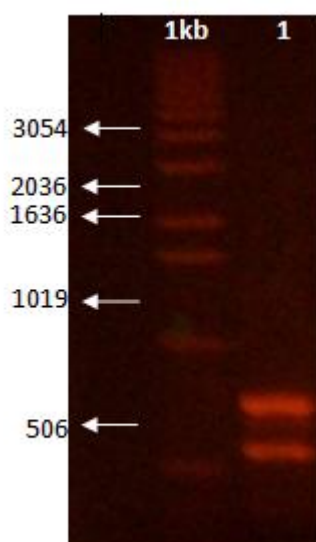


Imagen 3.9: Celulasa Modificada mediante PCR

Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Muestra de reacción de PRC a 60°C

Se observa que a 60°C se obtuvo amplificación del gen en la reacción de PCR, además se aprecian dos bandas, lo que sugiere que hubo alineamiento en más de una región del dominio catalítico, lo cual es esperable por el largo del primer utilizado. Las bandas observadas están en 730 pb y 600 pb aproximadamente, sabiendo que el peso molecular de esta proteína más la secuencia polipeptídica adicionada corresponde a 730 pb aproximadamente, se deduce que existió un alineamiento antes del extremo carboxilo terminal, por lo que se generó una secuencia más corta que la esperada. Es por esto que se sigue trabajando con el inserto de 730 pb, que a priori, es el gen de cutinasa que contiene el extremo WP4.

3.2.2 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De Clonamiento PgEM-T-Easy

Generados los insertos codificantes para la cutinasa-WP4, se procedió a ligarlos al vector de clonamiento pGEM-T-easy. Con el fin de seleccionar aquellas colonias que incorporen correctamente el inserto y aumentar la cantidad de inserto generado mediante la clonación del DNA plasmidial en células transformadas con el vector pGEM-T-easy.

Se transformaron células DH5 α 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 3.4 se muestran los resultados para 9 colonias distintas.

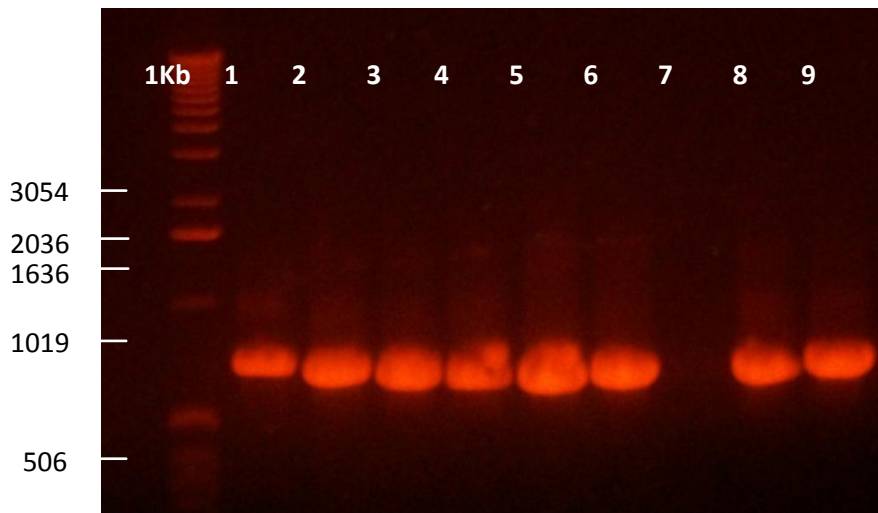


Imagen 3.10: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy
 Carril 1 al 9 exceptuando la 7, presentan Colonias con gen de cutinasa-WP4

Para realizar el PCR de colonias, se utilizó el protocolo descrito en la sección 2.2.8. amplificándose el DNA en aquellas colonias que contengan el gen de interés en su DNA plasmidial. Aquí, de las nueve colonias seleccionadas, ocho presentaron resultados positivos.

Se crecieron las colonias seleccionadas y se les extrajo el DNA plasmidial, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. En la Figura 3.11 se muestra una de las digestiones realizadas.

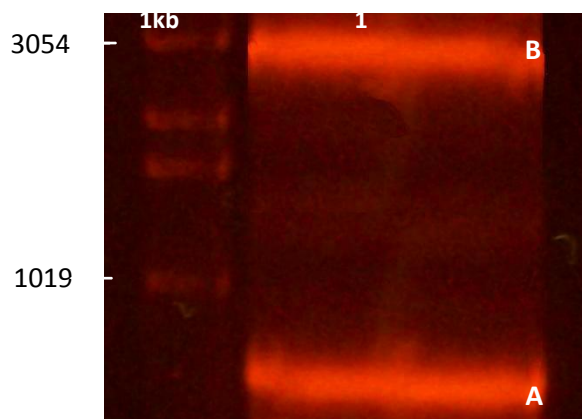


Imagen 3.11: Digestión del DNA plasmidial de los clones de cutinasa modificada en pGEM-T-easy(A):
 Carril (1): Cutinasa con extremo WP4 (730 pb)(B): Carril (1): Vector de clonamiento digerido (3054 pb)

En la imagen 3.11 se observan 2 bandas, donde la banda superior corresponde al vector de clonamiento (3015 pb) y la inferior a la cutinasa con el extremo hidrofóbico WP4 (730 pb), lo que indica que el inserto fue digerido de manera correcta y que los sitios de corte sitiados en el partidor, en presencia de las enzimas de restricción, causan el efecto deseado.

3.2.3 Clonamiento del Gen de cutinasa-WP4 Modificado En El Vector De expresión pET11a

Se purificó el gen de cutinasa-WP4 de la banda correspondiente y se ligó al vector de expresión pET11a. Una vez obtenidos los plasmidios de expresión recombinantes, se electroporaron a células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes, las cuales se crecieron en placas LB-agar suplementadas con ampicilina. Se seleccionaron 4 colonias a las que se les realizó PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto.

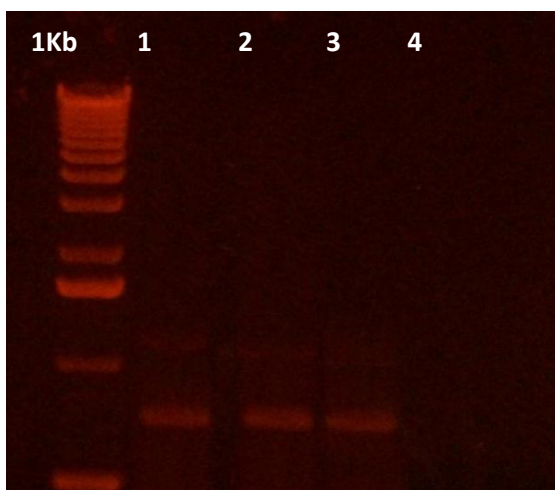


Figura 3.12: PCR colonias cutinasa-(WP)4, vector de expresión pET11a. Carril 1, 2 y 3 con resultados positivos.

En la Figura 3.12 se observan los resultados del PCR de colonias para la cepa que contiene el inserto de la cutinasa modificada en el vector de expresión pET11a. En ellas, los carriles que presentan la banda de aproximadamente 730 pb corresponden a las colonias que dieron positivo para el PCR, mientras que los carriles vacíos corresponden a las colonias que no contenían el vector de expresión con el inserto.

3.2.4 ADICIÓN DE EXTREMO POLIPTÍDICO WP4 A GEN DE CELULASA NATIVO

Siguiendo con el procedimiento antes descrito, se purificó DNA plasmidial de un cultivo de la cepa recombinante que produce celulasa nativa y se realizó PCR de colonias para llegar a una temperatura óptima de alineamiento. Así se obtuvo una temperatura de reacción de 63°C, el resultado del PCR realizado se presenta en la figura 3.13.

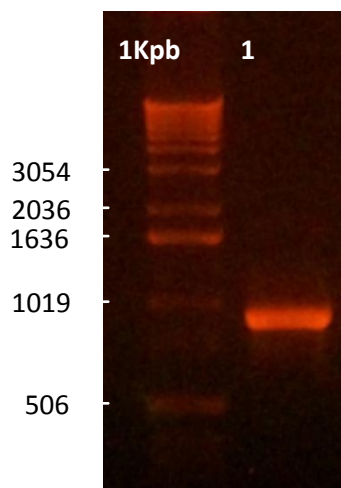


Imagen 3.13: Celulasa Modificada mediante PCR a 63°C
Marcador de peso molecular 1 kb, Carril 1: Celulasa-WP4

Se aprecia que a 63°C hubo amplificación del gen en la reacción de PCR, además se descartan posibles alineaciones en regiones distintas del gen de celulasa-WT, ya que se identifica una sola banda en el carril número 2. A priori, se tiene un resultado positivo para la síntesis de celulasa-WP4 dada la banda en un peso molecular de aproximadamente 930 pb.

Se puede observar que en este caso no existieron alineamientos no deseados con el dominio catalítico. Cabe destacar que se obtuvo un resultado óptimo, a pesar de estar en condiciones poco favorables en la reacción de PCR debido al largo de los partidores y su consecuente T_m elevada.

3.2.5 Clonamiento del Gen de celulasa-WP4 en El Vector De Clonamiento Pgem-T-Easy

El producto de PRC se ligó al vector de clonamiento pGEM-T-easy, con el fin de seleccionar aquellas colonias que incorporen correctamente el inserto y aumentar la cantidad de inserto generado mediante la clonación del DNA plasmidial en células transformadas con el vector pGEM-T-easy.

Se transformaron células DH5 α electrocompetentes con 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 3.14 se muestran los resultados para 6 colonias distintas.

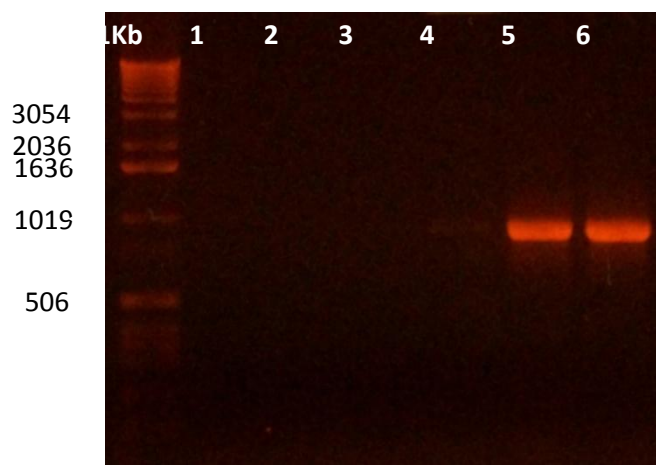


Imagen 3.14: PCR de colonias transformante en pGEM-T Easy
Carril 5 y 6 presentan Colonias positivas con gen de celulasa-WP4

Aquí, se observa claramente que de las colonias seleccionadas (carril 5 y 6) son positivas, además se puede ver una leve banda en el carril 4, pero ésta se pudo deber a contaminación al momento de cargar la muestra en el gel, por lo que no se consideró como positiva. Se crecieron las colonias seleccionadas y se les extrajo el DNA plasmidial, el cual fue digerido con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, las cuales flanquean la secuencia de la celulasa con el fin verificar los tamaños tanto de insertos como de vector. Se purificó desde el gel de agarosa el gen de celulasa digerido desde el vector de clonamiento para su posterior ligación al vector de expresión pET22-b(+).

3.2.6 Clonamiento del Gen Modificado En El Vector De expresión pET22-b (+)

El gen de la enzima celulasa con el extremo hidrofóbico, se purificó de la banda correspondiente al inserto en los productos de restricción de los plasmidios pGEM-T-easy recombinantes, y luego se ligaron al vector de expresión pET22-b(+). Una vez obtenidos los plasmidios de expresión recombinantes, se electroporaron a células de *E. coli* BL21(DE3) electrocompetentes, las cuales se crecieron en placas LB-agar suplementadas con ampicilina. Se seleccionaron 3 colonias a las que se les realizó PCR de colonias para corroborar la presencia del inserto.

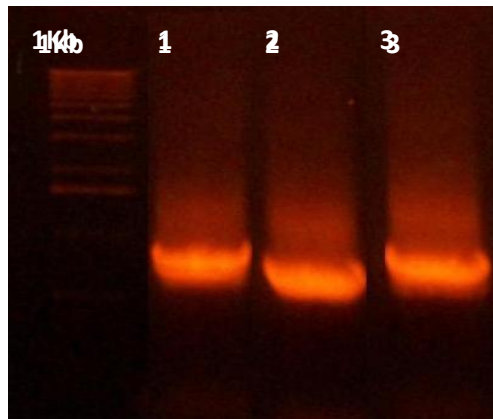


Figura 3.15: PCR colonias celulasa-(WP)4, vector de expresión pET22-b(+). Carril 1, 2 y 3 con resultados positivos. Numerar los carriles. Carril cero marcador?? Unidades

En la Figura 3.15 se muestran los resultados del PCR de colonias para la cepa que contiene el inserto de la celulasa modificada en el vector de expresión pET-22b(+). En ellas, los carriles que presentan la banda de aproximadamente 930 pb corresponden a las colonias que dieron positivo para el PCR, mientras que los carriles vacíos corresponden a las colonias que no contenían el vector de expresión con el inserto.

3.2.7 ADICIÓN DE EXTREMO POLIPTÍDICO WP4 A XILANASA-WT

Al igual que para los casos de las enzimas cutinasa y celulasa, se diseñaron los partidores *Xil-S (sense)* y *Xil-WP4 (antisense)* (descritos en la sección 3.1) para la síntesis de la enzima xilanasa-WP4. Al obtener los partidores necesarios, se procedió a realizar un gradiente de temperaturas para buscar aquella donde ocurre el alineamiento de los partidores con el templado.

En el gradiente de temperatura se uso el siguiente rango: [55°C, 75 °C] en dos programas con gradiente de 10°C cada uno.

En este caso no se obtuvo amplificación a ninguna temperatura, por lo cual, no se logró sintetizar la enzima con el extremo polipeptídico WP4. Esto estaba dentro de los resultados posibles, debido a la gran extensión de los partidores utilizados y los consecuentes problemas que esto conlleva. En el análisis realizado al hacer la secuencia de los partidores, se estudió la posibilidad de que existiera formación de hairpin, complementariedad entre partidores *sense* y *antisense* y autoalineamiento para cada uno de ellos, donde los partidores *Xil-S (sense)* y *Xil-WP4 (antisense)* fueron los que presentaron mayores complicaciones. Este análisis se presenta a continuación, para mostrar una explicación del porqué no se obtuvo amplificación en la reacción de PCR en el caso de la enzima xilanasa. Para hacer este análisis se utilizó la aplicación *OligoCalc* del sitio <http://www.basic.northwestern.edu/>

Partidor *sense Xil-S (sense)*:

- **Potencial formación de hairpin:** Se utilizó la restricción de que mínimo 4 bases seguidas fueran complementarias dentro del partidor (según recomendación de software *OligoCalc*), para que existiera la posibilidad de un plegamiento en forma de horquilla (hairpin) dentro de la secuencia en estudio. Se presentan en rojo y mayúscula las bases que potencialmente se podrían alinear dentro del partidor.

1. 5' – CTTT cca tgg cgt gcg ggg gga ata at AAAG ata cac cgg tg – 3'
2. 5' – ct TTCC atg gcg tgc ggg g GGAA taa taa aga tac acc ggt g – 3'

Aquí se observa que existen 2 posibles configuraciones donde el DNA del partidor *sense* se podría plegar en forma de horquilla, impidiendo el alineamiento con la secuencia de la xilanasa nativa.

- **Potencial autoalineamiento:** Se busca si existe la posibilidad de que dos secuencias nucleotídicas del partidor *sense* se puedan alinear entre sí, por a lo menos 5 bases nitrogenadas (según recomendación de software *OligoCalc*). En este caso no existen

configuraciones que cumplan con esta restricción, por lo que se elimina dentro del análisis el autoalineamiento entre secuencias del partidor *sense*.

Partidor *antisense* Xil-WP4 (*antisense*):

- **Potencial formación de hairpin:** Al igual que en el caso anterior, se utilizó la restricción de que mínimo 4 bases seguidas fueran complementarias dentro del partidor, para que existiera la posibilidad de un plegamiento en forma de horquilla (hairpin). Se presentan en rojo y mayúscula las bases que potencialmente se podrían alinear dentro del partidor.

1. 5' – gct cga g **TTAT** cac ggc cac ggc cac ggc cac ggc c **ATAA** tgc att ag – 3'
2. 5' – gct cga gtt atc ac **GGCC** acg gcc acg gcc ac **GGCC** ata atg cat tag – 3'
3. 5' – gct cga gtt atc acg gcc ac **GGCC** acg gcc ac **GGCC** ata atg cat tag – 3'
4. 5' – gct cga gtt atc ac **GGCC** acg gcc ac **GGCC** acg gcc ata atg cat tag – 3'
5. 5' – gct cga gtt atc acg gcc ac **GGCC** ac **GGCC** acg gcc ata atg cat tag – 3'
6. 5' – gct cga gtt atc ac **GGCC** ac **GGCC** acg gcc acg gcc ata atg cat tag – 3'

En este caso, existen 6 posibles configuraciones que cumplen con la restricción impuesta para considerar la potencial formación de hairpin en el cebador *antisense*, lo cual es 3 veces mayor a la del partidor *sense*.

- **Potencial autoalineamiento:** Probabilidad de que dos secuencias nucleotídicas del partidor *antisense* se puedan alinear entre sí, por lo menos 5 bases nitrogenadas. Se presentan en rojo y mayúscula las bases que potencialmente se podrían alinear con una secuencia complementaria.

1. 5' – gctcgagttatcacggccacggccacggccacggc**CATAATG**cattag – 3'
3' -
gattac**GTAATAC**cggcaccggcaccggcaccggcactattgagct
2. 5' - gctcgagttatcacggccacggccacggccac**GGCCAT**aatgcattag - 3'
3' - gattacgtaataccggcaccggcaccggca**CCGGCA**ctattgagctcg - 5'

3. 5' – gctcgagttatcacggccacggccacggccacGGCCATaatgcattag - 3'
3' - gattacgtaataccggcaccggcaCCGGCAccggcactattgagctcg - 5'

4. 5' – gctcgagttatcacggccacggccacggccacGGCCATaatgcattag - 3'
3' - gattacgtaataccggcaCCGGCAccggcaccggcactattgagctcg - 5'

5. 5' – gctcgagttatcacggccacggccacggccacGGCCATaatgcattag - 3'
3' - gattacgtaataCCGGCAccggcaccggcaccggcactattgagctcg -
5'

El resultado anterior muestra que existen 5 formas que cumplen con las restricciones de autoalineamiento descritas.

Los resultados del análisis de formación de hairpin y autoalineamiento de los partidores *sense* y *antisense* para la síntesis de xilanasa-WP4, muestran que los dos partidores presentan posibles problemas y que el partidador *antisense* es el que tiene mayores opciones de formar estos alineamientos no deseados. Por lo tanto, es posible que la falta de amplificación en la reacción de PCR se haya producido por una de las causas presentadas.

Otra opción que siempre está presente es el error en el procedimiento experimental, pero cabe destacar que el ensayo de gradiente de temperatura se realizó 3 veces por cada rango de temperatura antes descrito (6 en total), para minimizar este factor. Además, en el diseño de los partidores se siguió el mismo procedimiento que en el caso de las enzimas cutinasa y celulasa, en las cuales no surgieron estas dificultades.

Claramente, la gran repetición de codones de síntesis de los aminoácidos Prolina (P) y Triptofano (W) en el partidador *antisense* afectan el rendimiento de la reacción de PCR y dado su alto contenido de bases C y G, aumentan en gran medida la T_m de los partidores diseñados, por lo que se deben sintetizar partidores *sense* de gran tamaño para acercar las T_m de reacción. Estos hechos sumados a la secuencia propia del gen de xilanasa nativa, pueden ser los responsables de no obtener el gen de xilanasa-WP4.

3.2.8 SECUENCIAMIENTO DE LOS PLASMIDIOS OBTENIDOS

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

Los resultados indican que las secuencias nativas de cutinisa y celulasa modificadas con el extremo WP4 utilizando como templado la secuencia wild type correspondiente están correctamente sintetizadas.

En el caso de la estrategia de síntesis del gen de celulasa-WP4 a partir del gen de celulasa-WP2, en un principio se argumentó que el obtener la secuencia de celulasa con el extremo WP2 en vez de WP4, se pudo deber a un error experimental, particularmente a usar una concentración muy alta de templado (con extremo WP2), por lo que al realizar la ligación al vector de clonamiento, se pudo haber ligado la secuencia de celulasa-wp2 en vez de la de celulasa-WP4 y así seguir con colonias “falsas-positivas”. Por esto, se realizó nuevamente el desarrollo experimental de síntesis de celulasa-WP4 con el DNA plasmidial de celulasa-WP2 diluido 10 veces, el cual se presentó en la sección 3.1, pero se obtuvieron los mismos resultados. O sea que esta estrategia fue probada dos veces durante el trabajo, a distintas concentraciones de templado, obteniéndose resultados idénticos.

Es por esto que se concluye que este método y el diseño de los partidores para tal efecto no fue el indicado, ya que al usar nuevos partidores y la secuencia nativa como templado, se logró obtener la secuencia deseada.

3.3 CARACTERIZACIÓN DE ENZIMA CELULASA

3.3.4 ANÁLISIS DE ACTIVIDAD EN CELULASA

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

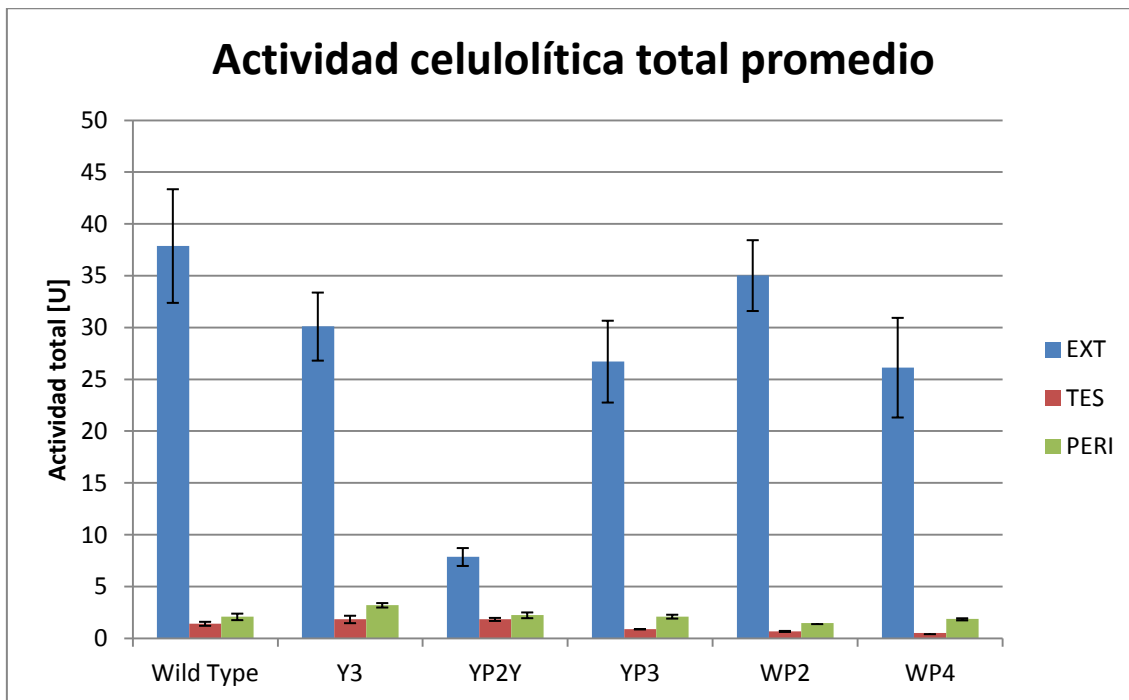


Figura 3.16 Actividad celulolítica total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.

Se observa que la enzima con el extremo polipeptídico WP4 presenta el mayor error porcentual en el medio EXT, el cual es aproximadamente un 18% y la Cel-WP2 el menor con aproximadamente un 10%. De todas maneras, el valor máximo de error no supera el 20% por lo que se tiene una buena reproducibilidad de los experimentos.

De esta misma figura también es posible apreciar que todas las enzimas modificadas presentan el mismo comportamiento que la celulasa nativa en términos de la distribución subcelular, donde la mayor actividad se presenta en el medio extracelular. Si se hace un análisis cuantitativo de la actividad, y considerando la actividad de la enzima nativa como un 100%, se tiene que Cel-Y3 tiene un 79,5% de actividad con respecto a Cel-WildType, de la misma manera, Cel-YP2Y, Cel-YP3, Cel-WP2 y Cel-WP4 presentan valores de 20,8%, 70,5%, 92,5% y 69,0% respectivamente.

Si bien existen diferencias en la unidades de actividad entre las cepas estudiadas, hay que ser cuidadoso en sacar conclusiones, sobre todo en aquellos valores de actividad que estén muy cercanos, como el caso de Cel-YP3 y Cel-WP4 ya que estas diferencias podrían deberse a un mínimo cambio en la densidad de inoculación de los cultivos lo que generaría un crecimiento desigual y por ende una producción desigual de proteína o también a pequeños cambios en el tiempo de crecimiento o inducción que pudiesen afectar la producción de proteína. Esto se debe a que el sistema de producción de proteínas no es un sistema automatizado y depende de la manipulación de los cultivos.

De la figura 3.16 también se destaca que Cel-WP2 es la variante que produce más unidades de actividad con respecto a la enzima nativa, lo cual es coherente a los resultados expuestos en los ensayos de Delpiano (2009). Así mismo la cepa Cel-YP2Y presenta menos unidades de actividad, lo que se puede deber a menor producción (mg de celulasa por litro de cultivo) o menor actividad específica, pero además este resultado es mucho más bajo a los obtenidos con las demás mutantes. Lo otro que resulta interesante es que esta cepa presenta un comportamiento similar a las demás celulasas, en términos de actividad, en el medio periplasmático, por lo que se puede inferir que de alguna forma se está inhibiendo el traslado de la enzima al medio extracelular, por lo que la actividad en el medio periplasmático, es elevada.

Con respecto a la variante Cel-WP4, se aprecia que es activa y que tiene un comportamiento de distribución enzimática en los medios subcelulares descritos, similar a la enzima nativa, siendo esta la enzima de mayor hidrofobicidad. Es de suma importancia que esta haya presentado valores razonables de actividad en comparación a la enzima nativa (69%), ya que a priori es la cepa que tendría un mayor tiempo de retención en la columna cromatográfica pero que más cambios estructurales podría provocar en la enzima.

Se debe decir, que en estos ensayos se obtuvo menor actividad que la medida en los trabajos de Delpiano (2010), expuestos en la sección 1.4.2, los cuales se comparan mediante porcentajes en la siguiente tabla.

Tabla 3.2: Porcentaje de actividad total con respecto a enzima WT y comparación a los medidos en los trabajos de Delpiano (2010)

MUTANTE	% DE ACTIVIDAD TOTAL RESPECTO A WT EN EXT	% DE ACTIVIDAD TOTAL RESPECTO A WT EN EXT (DELPIANO 2010)	% DE DIFERENCIA
WILD TYPE	100%	100%	0
Y3	79,5%	89,2%	15,4%
YP2Y	20,8%	94,6%	78,0%
YP3	70,5%	71,7%	1,7%
WP2	92,5%	98,5%	6,1%
WP4	69%	-	-

Aquí se observa que en general se obtuvo alrededor de 80% de los valores de unidades de actividad de estudios anteriores, lo cual nuevamente se puede deber al hecho de la manipulación de los medios de cultivos en la etapa experimental y a la falta de automatización del proceso, ya que aunque se cuida muy bien de respetar las condiciones de cultivo, es imposible hacer dos cultivos exactamente iguales, de manera manual.

También se puede apreciar que, exceptuando el caso de la mutante YP2Y, se mantiene la relación entre mutante y porcentaje de actividad, siendo la enzima celulasa-WP2 la de mayor porcentaje de actividad con respecto a celulasa-WT.

Un hecho que llama la atención de la tabla 3.2 es el bajo porcentaje de actividad que se obtiene en la cepa Cel-YP2Y, el cual es el único valor que se aleja de un rango razonable.

Resulta interesante e informativo estudiar la actividad de manera porcentual, es decir, sumar las actividades en las 3 fracciones, y luego calcular qué porcentaje del total corresponde cada una de ellas (Figura 3.17).

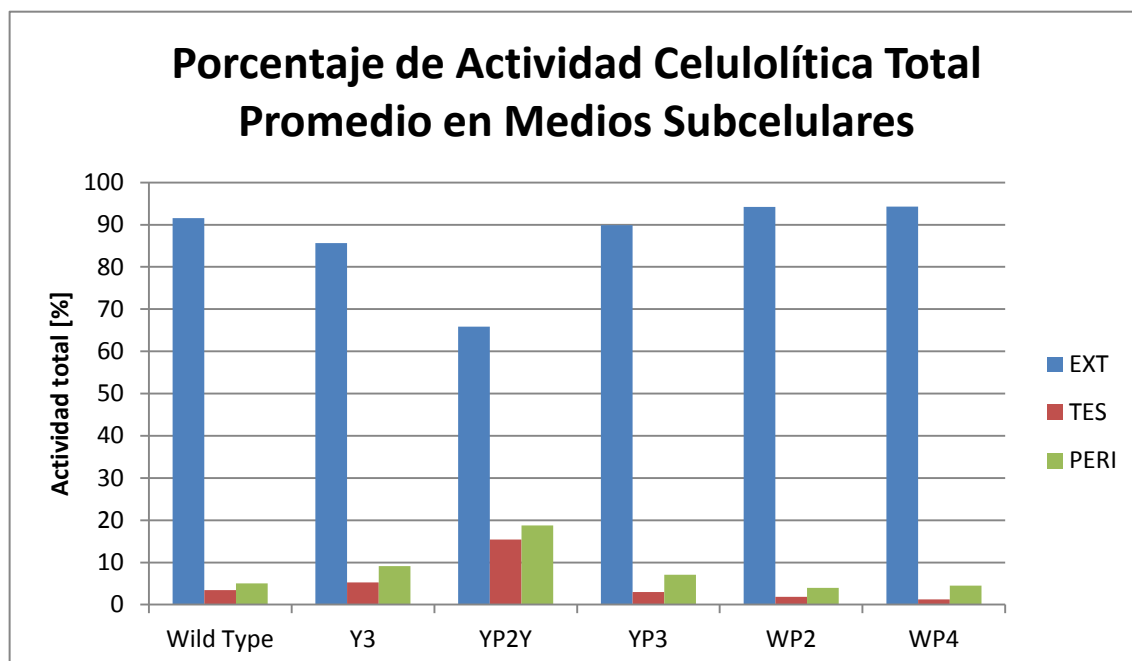


Figura 3.17. Distribución subcelular de celulasa-WT y modificadas en *E.coli* BL21. Las fracciones corresponden a medio extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).

De la Figura 3.17 se observa que todas las enzimas mutadas y la endoglucanasa nativa presentan el mismo comportamiento en términos de la distribución celular, donde el mayor porcentaje de actividad se obtiene en el medio extracelular, en el lavado con TES se pierde alrededor del 4%, y en el periplasma se retiene un 6% de actividad, aproximadamente.

Se tiene que la endoglucanasa nativa presenta un 91,6% de actividad celulolítica en el medio extracelular, cel-Y3, cel-YP2Y y cel-YP3 tienen 85,7%, 65,9%, 89,9% respectivamente. cel-WP2 y cel-WP4 por su parte, tiene un valor de 94,2% y 94,3% respectivamente, el cual es levemente mayor que el de la enzima nativa.

Estos resultados resultan ser bastante positivos para el trabajo, ya que al adicionar estos extremos la actividad se mantuvo en todas las mutantes y se pudo comprobar que ésta no se vio afectada mayormente.

En el caso de cel-YP2Y, se ve que la actividad en el medio periplasmático es de un 18,7%, lo cual es mucho mayor que en los otros casos. Esto nos muestra que la baja actividad de esta cepa en el medio extracelular, se debe a que de alguna manera se está reteniendo un alto porcentaje de enzima en el medio periplasmático.

Además se recomienda, realizar un estudio más exhaustivo que pueda establecer las condiciones óptimas de cultivo, de crecimiento e inducción, para cada una de las endoglucanasas mutadas y, de esta manera, poder comparar entre los escenarios óptimos de las distintas variantes. Esto, ya que diferencias en los tiempos de inducción pueden variar la concentración enzimática en los medios subcelulares, por lo cual pueden existir diferencias en las condiciones de cultivo, según la mutante que se esté analizando.

3.3.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNA Y ACTIVIDAD ESPECÍFICA EN CELULASA

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

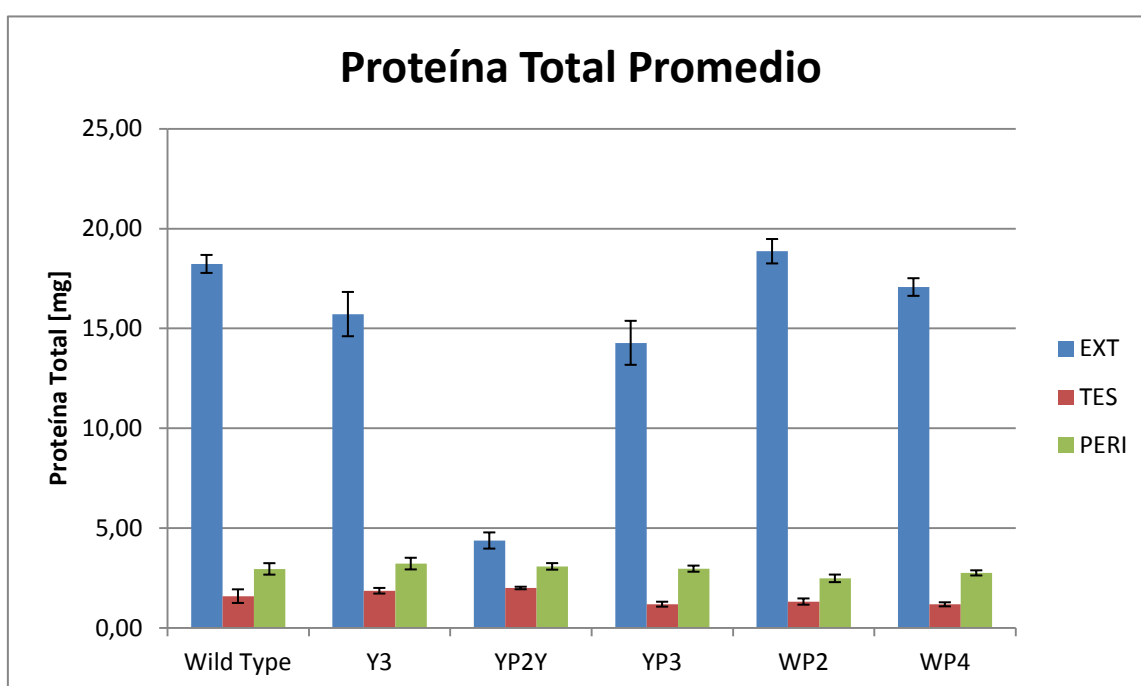


Figura 3.18. Proteína total promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden a la desviación estándar de los tres cultivos para cada variante.

De la Figura 3.18, se tiene que todas las celulasas mutadas y Cel-WildType presentan una mayor cantidad de proteínas en el medio extracelular que en las otras fracciones. En el lavado con TES, por otro lado, se perdió muy poca cantidad de proteínas. Cel-YP2Y presenta el mayor error en el medio extracelular, y la cel-WP4 el menor. De todas maneras, el valor de éstos no supera el 10% por lo que se tiene una buena reproducibilidad de los experimentos.

De esta misma figura se puede apreciar que cel-WP2, presenta la mayor cantidad de enzima en el medio extracelular, llegando a ser levemente mayor que el de la enzima nativa. Este resultado *a priori* muestra que el extremo WP2, afecta la actividad de la enzima, ya que

el medio extracelular se ve enriquecido con la enzima, pero los valores de actividad total son menores que en el caso de cel-WT, para verificar esto se debe realizar el cálculo de actividad específica (figura 3.20). Con respecto a la cantidad de proteína, no se puede hacer una afirmación en relación a si el extremo WP2 afecta en la producción enzimática, ya que presenta un valor muy cercano a la proteína nativa y esta variación se puede deber a diferencias en los medios de cultivo.

El menor valor de cantidad de proteína en el medio periplasmático lo presenta la mutante cel-YP2Y, esto refleja que la baja actividad presente en esta enzima se debe principalmente a la baja síntesis de la misma. Lo anterior se puede deber a problemas en el stock de células *E. Coli* BL21 que presentan el vector *pET22* con el inserto de cel-YP2Y. Este stock se realizó en el trabajo de Delpiano (2010) y se encuentra guardado en glicerol a -80°C y no se tuvo control sobre sus características.

Los caso de cel-Y3 y cel-YP3 presentan una producción menor a la cel-WT, 86% y 79% respectivamente. En el caso de cel-WP4 tiene un 94% de similitud con la enzima nativa en relación a la producción enzimática en el medio extracelular. Este resultado indica que el extremo WP4 no afecta mayormente la síntesis de la proteína ni tampoco la migración de esta al medio extracelular.

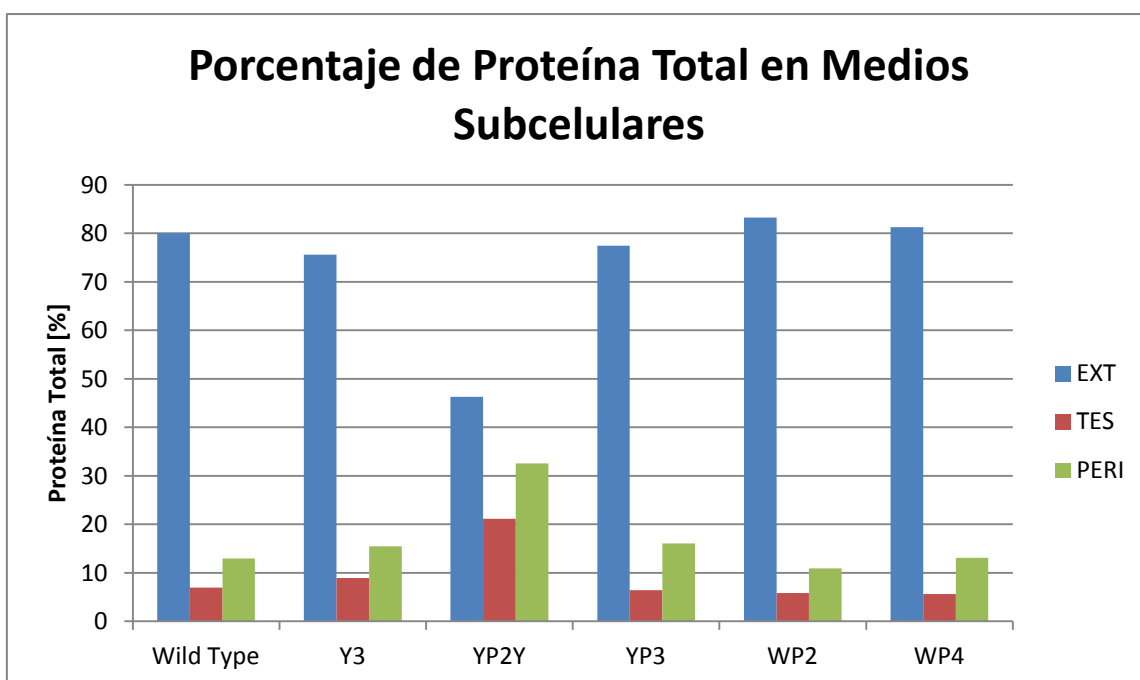


Figura 3.19. Porcentaje proteína total presente en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI).

De la Figura 3.19 es posible apreciar que exceptuando la mutante cel-YP2Y, se tiene una similar distribución de proteína total: aproximadamente de un 80% en el medio extracelular, 5% para el lavado con TES y 15% en la fracción periplasmática.

En el caso de cel-YP2Y, en términos de porcentaje, se ve que dentro del total de enzima producida un alto porcentaje queda en TES y PERI, pero también se debe destacar que aquí se obtiene un menor producción de enzima, por lo que no se puede ser categórico al relacionar el extremo YP2Y con la migración de la misma al medio extracelular. Lo anterior también se puede deber al que al existir menor cantidad de proteína la migración al medio extracelular se vea poco favorecido en la maquinaria celular.

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

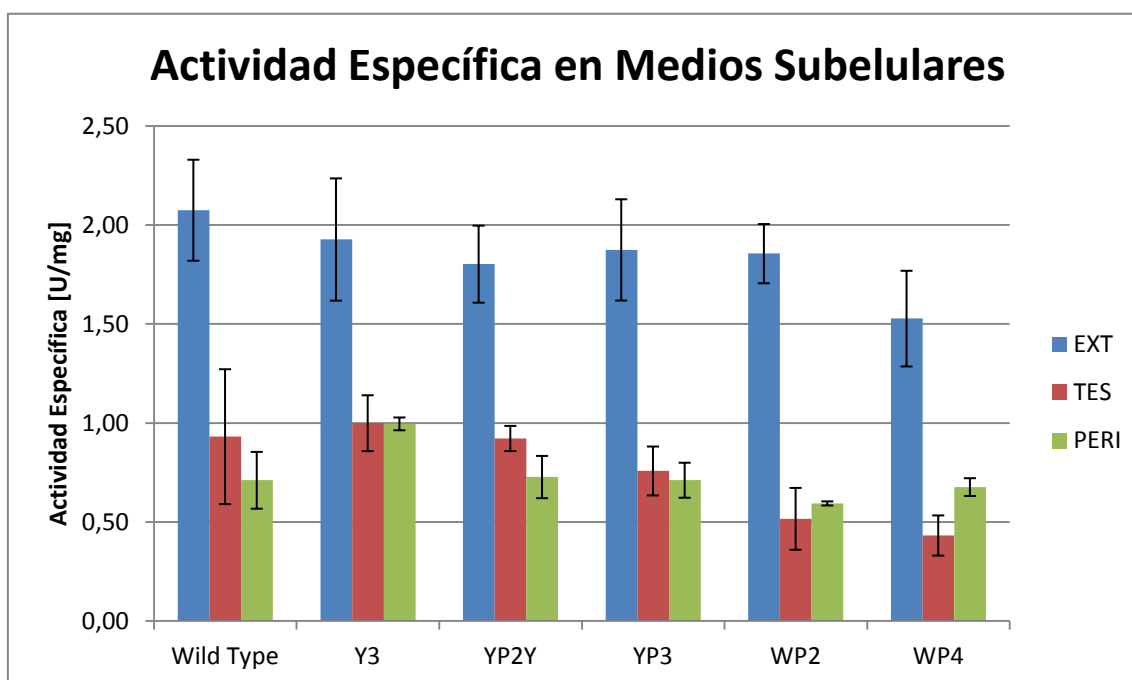


Figura 3.20. Actividad específica promedio en las fracciones extracelular (EXTRA), lavado con TES (TES) y periplasma (PERI). Los experimentos fueron realizados en triplicado, donde las barras de error corresponden al valor más alto y más bajo de las desviaciones estándar de los tres cultivos para cada variante.

La figura 3.20 muestra que todas las celulasas, presentan una mayor actividad específica en la fracción extracelular que en las otras fracciones. Esto significa que el medio extracelular es el que se ve más enriquecido con la enzima, porque es la fracción que tiene más actividad por mg de proteína total.

Considerando los errores, se tiene que en el medio extracelular (EXT) el mayor error corresponde a cel-Y3 siendo un 16,02% y el menor de 8,06% correspondiente a la mutante con el extremo WP2. Este rango, verifica una buena reproducibilidad en los experimentos, considerando que aquí se espera un error mayor, ya que se arrastran los errores de la medición de actividad y de la cantidad de proteína.

Se observa que cel-WT tiene la mayor actividad específica en el medio extracelular, este resultado indica que, en diferente medida, los extremos hidrofóbicos añadidos a la secuencia polipeptídica de la celulasa nativa, afectan la actividad de la enzima. En este sentido, la mayor actividad específica dentro de las mutantes se obtuvo para cel-Y3, con un 93% de la actividad específica exhibida por la celulasa nativa. Además se ve que para las cepas de celulasa estudiadas hay actividad, lo que verifica que no es necesaria la inclusión del aminoácido prolina para que la enzima sea activa, pero no podemos adivinar con estos resultados que la inclusión de este aminoácido no ayuda a la estabilidad de la carga superficial de la proteína al añadir el extremo hidrofóbico.

La cepa cel-YP2Y, presenta un 87% de la actividad específica de la enzima nativa, lo que nuevamente muestra que la baja actividad total presentada por esta mutante se debe a la baja concentración de enzima en el medio extracelular y no a que la agregación del extremo polipeptídico haya alterado de tal forma la estructura molecular de la enzima como para hacerla inactiva.

Para los casos de cel-YP3 y cel-WP2, se observa un comportamiento similar en la actividad específica en el medio extracelular, llegando a aproximadamente un 90% de la enzima nativa, lo cual es un muy buen resultado considerando el aumento en la hidrofobicidad superficial de la enzima.

En la figura 3.20 se muestra que la menor actividad específica en el medio extracelular la tiene la mutante con el extremo WP4, siendo ésta un 74% de la actividad específica de la enzima nativa. Este resultado se ajusta al supuesto de que siendo este el extremo que mayor hidrofobicidad superficial aporta a la enzima, es el que teóricamente afectaría mayormente a la estructura molecular de la proteína y por consiguiente a su actividad enzimática. Pero hay que destacar que no se observa una relación totalmente decreciente entre actividad y aumento de hidrofobicidad, ya que los valores de actividad específica para la demás mutantes son bastante similares, estando incluso dentro del margen de error de la desviación estándar de los resultados.

Considerando los errores, se tiene que todas las variantes presentan valores similares de actividad específica en el periplasma y en el lavado con TES, siendo Cel-Y3 donde el periplasma se encuentra más enriquecido por la enzima. Por otro lado, Cel-Y3 presenta mayor actividad específica que Cel-WildType, pero dado que los errores son cercanos al 20% en la actividad específica en el medio periplasmático de la enzima nativa, esta diferencia no es significativa. Además es considerable, que la actividad específica en el lavado con TES y en el periplasma en una misma mutante son similares para todos los casos estudiados.

En este caso también es importante señalar las diferencias de los resultados obtenidos con los del trabajo de Delpiano (2010). Esto se observa en la tabla 3.3.

Tabla 3.3: Porcentaje de actividad total con respecto a enzima WT: Se presentan los valores observados en el presente estudio y los medidos en los trabajos de Delpiano (2010)

MUTANTE	% DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA RESPECTO A WT	% DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA RESPECTO A WT (DELPIANO 2010)	% DE DIFERENCIA
WILD TYPE	100%	100%	-
Y3	93,2%	118,9%	21,6%
YP2Y	87,0%	95,1%	8,5%
YP3	90,3%	91,6%	1,4%
WP2	89,9%	99,7%	9,8%
WP4	73,9%	-	-

Dada la comparación con los resultados de Delpiano (2010) mostrada en la tabla 3.3, se debe decir que en ambos estudios la mutante con mayor actividad específica fue cel-Y3, con la diferencia de que aquí no se obtuvo una actividad específica mayor a la enzima nativa, lo cual es más coherente con los resultados esperados.

Otro punto a considerar es que en todas las mutantes es estudio, se observa un menor porcentaje de actividad con respecto a la enzima nativa, esta diferencia se puede deber a la forma de manipular los medios de cultivo y/o a la manera de medir la actividad y concentración de proteína, ya que si bien se utilizaron métodos idénticos, no se trata de un proceso automatizado, por lo que el factor de variación experimental entre un estudio y otro es importante. Por esto se recomienda estudiar las condiciones óptimas de cultivo para cada una de las células modificadas y para la proteína nativa.

En el trabajo Anterior (Delpiano 2010) se usó como criterio cuantitativo que el extremo a adicionar en las enzimas nativas debe tener una hidrofobicidad menor a 500 para no afectar fuertemente la actividad enzimática. Por otra parte se sabe que existe una relación lineal entre el aumento de DRT y el aumento de hidrofobicidad, por lo que a mayor hidrofobicidad

el tiempo de retención en cromatografía HIC es mayor, favoreciendo la purificación. Por lo tanto en este trabajo se usó el extremo WP4 con hidrofobicidad de 878, para observar el efecto que esta propiedad provoca en la actividad de la enzima. El gráfico 3.21 muestra como varía la actividad específica medida en cada cepa en comparación a como varía su hidrofobicidad.

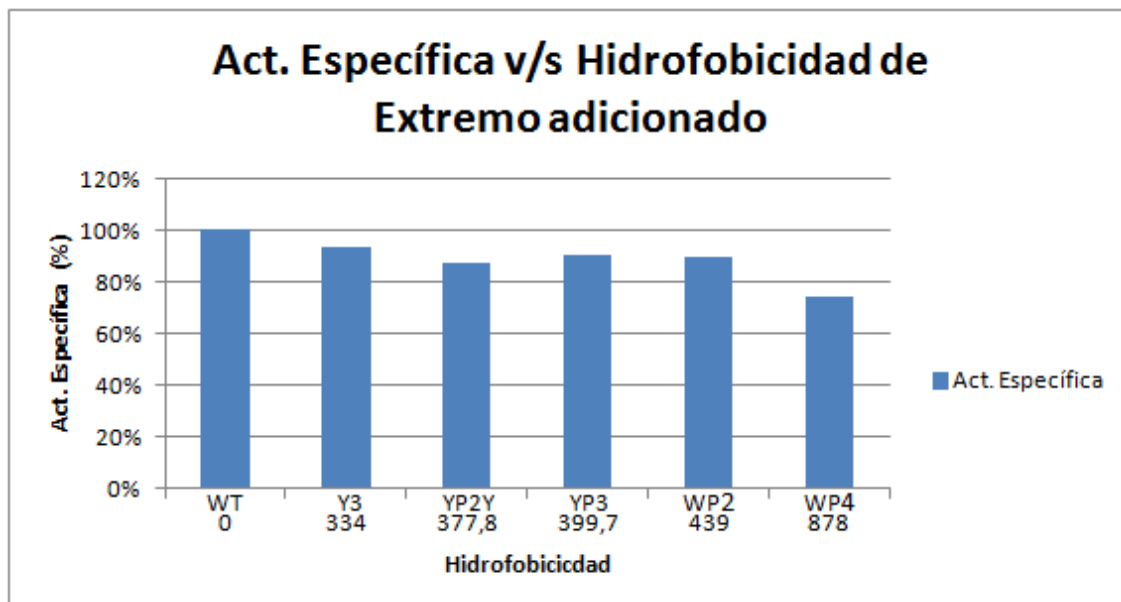


Figura 3.21. Actividad específica promedio v/s hidrofobicidad del extremo en cada cepa de celulasa.

En el gráfico 3.21 se puede ver que para los experimentos realizados, ninguna de las cepas con extremo hidrofóbico adicionado tiene mayor actividad específica que la cepa nativa. Este hecho es compatible con la hipótesis planteada, de que la hidrofobicidad del extremo tiene un efecto negativo en la actividad de la enzima.

Aquí también es apreciable que para hidrofobicidades similares en el extremo polipeptídico adicionado, la actividad específica promedio es parecida, variando entre 87% y 93% para hidrofobicidades entre 334 y 439. Por otro lado, se ve claramente que la mayor caída en la actividad específica en comparación con la celulasa sin extremo, es para el extremo polipeptídico WP4 con un 73,9% de actividad respecto a la enzima nativa.

4 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 CONCLUSIONES

El método propuesto para modificar cutinasas y celulasas, paratiendo con la enzima nativa como templado fue adecuado, ya que fue posible modificar las enzimas cutinasa y celulasa mediante la adición del extremo polipeptídico compuesto por 4 pares de los aminoácidos triptófano y prolina (WP4), obteniéndose la secuencia del dominio catalítico de las proteínas nativas más la secuencia del extremo descrito en cada caso. Para la enzima xilanasa el método propuesto no dio resultado, al parecer porque el diseño del partidador de gran tamaño, conlleva una alta probabilidad de formación de harpin y/o autoalineamiento. Por lo tanto el método de agregación de extremos de interés con partidadores de gran tamaño, está supedito a las características de los aminoácidos constituyentes del dominio catalítico, sin embargo es de vital importancia destacar que fue posible hacer la mutación en dos de los 3 casos estudiados, a partir de un diseño de partidadores que considera largos de secuencia similares entre el sense y el anti-sense.

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

Se comprobó mediante análisis de actividad, cantidad de proteínas y actividad específica, que para todas las variantes de celulasa la enzima migra en su mayoría al medio celular. Se concluye de esto que las mutaciones no afectan la migración de esta endoglucanasa al medio extracelular.

Se concluye que las variantes de endoglucanasa modificadas con extremos hidrofóbicos son activas. Las enzimas con los extremos polipeptídicos Cel-Y3, Cel-YP2Y, Cel-YP3, Cel-WP4 presentan valores superiores al 87% de actividad específica residual con respecto a la nativa, y por lo tanto, esta adición no afecta significativamente su actividad catalítica. La cepa de celulasa que presentó el mejor resultado de actividad específica fue la con el extremo polipeptídico Y3, con un 93% respecto a la enzima nativa. En el caso de Cel-WP4 la actividad específica en el medio extracelular es un 74% de la enzima nativa. Por lo tanto se concluye que el extremo que mayor hidrofobicidad superficial aporta a la enzima, es el que mayor afectó su actividad enzimática, aunque la pérdida no fue significativa.

A partir de lo anterior se puede decir que el criterio de que el extremo de una hidrofobicidad mayor a 500 afecta de mayor manera la actividad de la enzima, resultó ser correcto en este estudio, ya que para el caso de Cel-WP4 que posee una hidrofobicidad de 878, la actividad específica fue solo de un 74% respecto a la enzima nativa.

Además, se observa que las enzimas mutadas, con excepción de la variable Cel-YP2Y, presentaron el mismo comportamiento que la endoglucanasa nativa, donde la mayor actividad celulolítica, se obtiene en el medio extracelular. Los valores de proteína total demostraron que la endoglucanasa nativa y las mutadas tienen una igual distribución de proteínas, aproximadamente de un 80% en el medio extracelular. A partir de estos resultados, actividad y proteína total, se aprecia que no hay disminución en la recuperación

de la enzima en comparación con la endoglucanasa nativa, por lo que esta adición tampoco afectaría la recuperación de la misma.

En el caso de cel-YP2Y, se sospecha que la baja actividad presentada en el medio extracelular se debió a la baja producción de enzima lo cual pudo deberse al estado del stock de células de *E. Coli* utilizado. Pero no se puede descartar que el extremo YP2Y afecta negativamente la migración de la misma al medio extracelular ya que es en este caso donde se encontró más actividad en el medio periplasmático y en el lavado con TES.

Finalmente, se define como criterio cualitativo que no es necesaria la inclusión del aminoácido prolina para que la enzima sea activa, pero no podemos descartar que la inclusión de este aminoácido ayude a la estabilidad de la proteína al añadir el extremo hidrofóbico. Y como criterios cuantitativos, se establecen que el extremo a adicionar debe tener una hidrofobicidad menor a 500.

4.2 RECOMENDACIONES

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

Se recomienda realizar un nuevo estudio de adición de extremos polipeptídicos a partir de un gen de enzima modificado, ya que en el presente trabajo no fue posible añadir el extremo WP2 a la glucanasa modificada Cel-WP2 para así llegar a Cel-WP4. Se presenta este punto, ya que si se logra realizar la síntesis a partir de un templado previamente modificado, se tiene la ventaja de utilizar partidores más cortos, con una T_m menor y con menos probabilidad de alineamiento en sitios erróneos, autoalineamiento o harpin.

Además en un estudio futuro, se puede seguir analizando la pérdida de actividad de las enzimas con extremos hidrofóbicos con hidrofobicidad mayor a 500. Para esto se deben diseñar extremos entre los valores 439 (WP2) y 878 (WP4) de hidrofobicidad, para ver si existe una relación lineal entre estos 2 parámetros.

Por último se sugiere seguir con este estudio, para estimar los efectos del extremo WP4 en cutinasa y ver el verdadero efecto que tiene la mayor hidrofobicidad de las enzimas en la purificación por cromatografía de interacción hidrofóbica.

5 BIBLIOGRAFÍA

5 BIBLIOGRAFÍA

5.1 REFERENCIAS

Taiz, L. y Zeiger, E. Plant physiology. 3ra edición. Inglaterra, Sunderland. Universitat Jaume I. 2002.

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. *lisi*. 1975. *Biochemistry* **14**:2824-2831.

Lin, T.S. y Kolattukudy, P.E. Induction of a Biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *lisi*. *J. Bacteriol.* 1978. **133**(2): 942-951.

Carvalho, C.M.L., Aires-Barros, M.R. y Cabral, J.M.S. Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnol. Bioeng.* 1999. **66**(1): 17-34.

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.

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.

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.

Martínez, C., de Geus, P., Lauwereys, M., Matthyssens, G. y Cambillau, C. *Fusarium solani* cutinase is a lipolytic enzyme with a catalytic serine accessible to solvent. 1992. *Nature* **356**: 615, 618

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.

Jelsch, C., Longhi, S. and Cambillau, C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. 1998. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **31**:320-333.

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.

Jelsch, C., Longhi, S. and Cambillau, C. Packing forces in nine crystal forms of cutinase. 1998. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **31**:320-333.

Lin, T.S. y Kolattukudy, P.E. Induction of a Biopolyester hydrolase (cutinase) by low levels of cutin monomers in *Fusarium solani* f. sp. *pisii*. *J. Bacteriol.* 1978. **133(2)**: 942-951.

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.

Kazlauskas, R.J. Elucidating structure-mechanism relationships in lipases: prospects for predicting and engineering catalytic properties. 1994. *BIBTECH* **12**: 464-472.

Jaeger, J.E., Dijkstra, B.W. y Reetz, M.T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. 1999. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**: 315-351.

Badenes, S.M., Lemos, F. y Cabral, J.M.S. Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. 2010. *Biotechnol. Lett.* **32**: 399-403.

Carvalho, C.L.M., Serralheiro, M.L.M, Cabral, J.M.S. y Aires-Barros, M.R. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT-reversed micelles. (1997). *Enzyme Microb. Technol.* **21(2)**: 117-123

Sharma, R., Chisti, Y. y Banerjee, U.C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. 2001. *Biotechnol Adv.* **19(8)**: 627-662.

Flipsen, J.A.C., Appel, A.C.M., van der Hijden, H.T.W.M. y Verrips, C.T. Mechanism of removal of immobilized triacylglycerol by lipolytic enzymes in a sequential laundry wash process. 1998. *Enzyme Microb. Technol.* **23 (3-4)**: 274-280.

Vasudevan, P.T. y Briggs, M. Biodiesel production-current state of the art and challenges. *J. Ind. Microbiol.* 2008. *Biotechnol.***35**: 421- 430.

Chou, T.Y.C., Chang, M.M., Tsao, G.T. Structure, pre-treatment and hydrolysis of cellulose. 1981. *Advances in Biochemical Engineering.* **20**: 16-42.

Fan, L.T., Lee, Y.H., Gharpuray, M.M. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. 1982. *Advances in Biochemical Engineering.* **23**: 158-187.

- Rastogi N.K., Rajesh G., Shamala T.R. Optimization of enzymatic degradation of coconut residue. 1998. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **76**: 129-134.
- Sarker B.C., Singh R.K., Kumbhar B.K., Agrawal Y.C., Kulshreshtha M.K. Response surface analysis of enzyme assisted oil extraction factors for sesame, groundnut and sunflower seeds. *Journal of Food Science and Technology*. 1999. **36**: 511-514.
- Lee, C.H., Kim, D.H., Kim, J.H., Bae, S.E., Seo, J.H., Oh, T.K. Enhancement of natural pigment extraction using *Bacillus species* xylanase. 2005. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **53**: 2541-2545.
- Ohara, H., Noguchi, J., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. Sequence of eg Vand Properties of Eg V, a *Ruminococcus albus* Endoglucanase Containing a Dockering Domain. 2000. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**: 80-88.
- Pérez, O. y Ponce, T. Celulasas y xilanasas en la industria. 2002. *Avance y perspectiva*. **21**: 273-277.
- Ryu, D.D.Y., Mandels, M. Cellulases: biosynthesis and applications. 1980. *Enzyme and Microbial Technology*. **2**: 91-102.
- Lee, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. 1997. *Journal of Biotechnology*. **56**: 1-24.
- Marsden, W.L., Gray, P.P. Enzymatic hydrolysis of cellulose in lignocellulosic materials. 1986 *CRC Critical Reviews in Biotechnology*. **3**: 235-274.
- Bhat, M.K., Bhat, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. 1997. *Biotechnology Advances*. **15**: 583-601.
- Hahn-Hägerdal, B., Palmqvist, E. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. 2000. *Bioresource Technology*. **74**: 25-33.
- Beldman, G., Voragen, A.G.J., Rombouts, F.M., Pilnik, W. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride*. 1988. *Biotechnology and Bioengineering*. **31**: 173-178.
- Ladisich, M.R., Lin, K.W., Voloch, M., Tsao, G.T. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. 1983. *Enzyme and Microbial Technology*. **5**: 82-102.

Philippidis, G.P., Smith, T.K. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. 1995. Applied Biochemistry and Biotechnology. **51/52**: 117-124.

Galante, Y.M., Formantici, C. Enzyme Application in Detergency and in Manufacturing Industries. 2003. Current Organic Chemistry. **7**: 1399-1422.

Shirai, T., Ishida, H., Noda, J., Yamane, T., Ozaki, K., Hakamada, Y., Ito, S. Cristal Structure of Alkaline Cellulase K: Insight into the Alkaline Adaptaron of an Industrial Enzyme. 2001. J. Mol. Biol. **310**: 1079-1087.

Beilen, J. B., Li, Z. Enzyme Technology: an overview. 2002. Current Opinion in Biotechnology. **13**: 338-344.

Dienes, D., Egyházi, A., Réczey, K. Treatment of recycled fiber with Trichoderma cellulases. 2003. Industrial Crops and Products. **20**: 11-21.

Pèlach, M.A., Pastor, F.J., Puig, J., Vilaseca F. Mutjé P. Enzymic deinking of old newspapers with cellulase. 2002. Process Biochemistry. **38**: 1063-1067.

Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. 2000. Biotechnology Advances. **18**: 355-383.

Wyman, C. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. 1999. In: R. Socolow, D. Anderson and J. Harte, Editors, Ann Rev Energy Environ, **24**: 189-226 Annual Reviews, Palo Alto, CA.

Van Zessen, E., Weismann, M., Bakker, R.R., Elbersen, H.W., Reith, J.H. and den Uil H. Lignocellulosic ethanol, a second opinion Report 2GAVE-03.11. 2003. Netherlands Agency for Energy & Environment.

Mishima, D., Tateda, M., Ike, M. y Fujita, M. Comparative study on chemical pretreatments to accelerate enzymatic hydrolysis of aquatic macrophyte biomass used in water purification processes. 2006. Bioresour Technol. **97**: 2166–2172.

Gallardo Román, Óscar. Tesis de Doctorado: “Caracterización de nuevas xilanasas bacterianas. Ingeniería de enzimas con la xilanasas B de Paenibacillus barcinonensis”. 2007. Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona.

Sipat, A., Taylor, K., Lo, R., Forsberg, C. Molecular cloning of a xylanase gene from Bacteroides succinogenes and its expression in Escherichia coli. 1986. Applied and Environmental Microbiology. p: 447-481.

- Collins T., Gerday C., Feller G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. 2005. FEMS Microbiology Reviews. **29**: 3-23.
- Collins T., Meuwis M., Stals I., Claeysens M., Feller G., Gerday C. A novel Family 8 xylanase, functional and physicochemical characterization. 2002. The Journal of Biological Chemistry. **277**: 35133-35139.
- De Vries, R. P., Visser, J., De Graaf, L.H. Modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. 1999. Research in Microbiology. **150(4)**: 281-285.
- Wong K.K.Y., Tan L.U.L, Saddler J.N. Multiplicity of-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. 1988. Microbiological Reviews. **52**: 305-317.
- Biely P. Microbial xylanolytic systems. Trends in Biotechnology. 1985. **3**: 286-290.
- Fontes C.M., Gilbert H.J., Hazlewood G.P., Clarke J.H., Prates J.A., Mckie V.A., Nagy T., Fernandes T.H., Ferreira L.M. A novel cellvibrio mixtus family 10 xylanase that is both intracellular and expressed under non-inducing conditions. 2000. Microbiology. **146**: 1959-1967.
- Davis G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. 1995. Structure. **3(9)**: 853-859.
- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. 2005. Applied Microbiology and Biotechnology. **67(5)**: 577-591.
- Hoondal, G.S., Tiwari, R.P., Tewari, R., Dahiya, N., Beg, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications. 2002. Applied Microbiology and Biotechnology. **59(4)**: 409-418.
- Viikari L., Tenkanen M., Suurnäkki A. Biotechnology in the pulp and paper industry. 2001. REHM, H.J. (ed) Biotechnology. Weinheim: Wiley-VCH. **10**: 523-546.
- Belter, P., Cussler, E.L., Hu, W. Processing for Biotechnology. John Wiley & Sons. New York. 1988, pp 368.
- Fausnaugh J.L. y F.E. Regnier; Solute and mobile phase contributions to retention in hydrophobic interaction chromatography. 1986. J. Chromatography. **359**: 131-146.
- Dill K. A. Dominant force in protein folding. 1990. Biochemistry. **29**: 7133-7155.

Eriksson K. Hydrophobic Interaction Chromatography. 1998. Protein purification: Principles High-Resolution Methods and Applications. New York. 283-309.

Lienqueo M.E., Salazar O., Robinson M., Quilodran C., Montecinos C., Asenjo J.A. Identification of criteria for selection of optimal hydrophobic tags for protein purification by HIC. 2009.

6 ANEXOS

6.1 ANEXO A: AMINOÁCIDOS

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

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

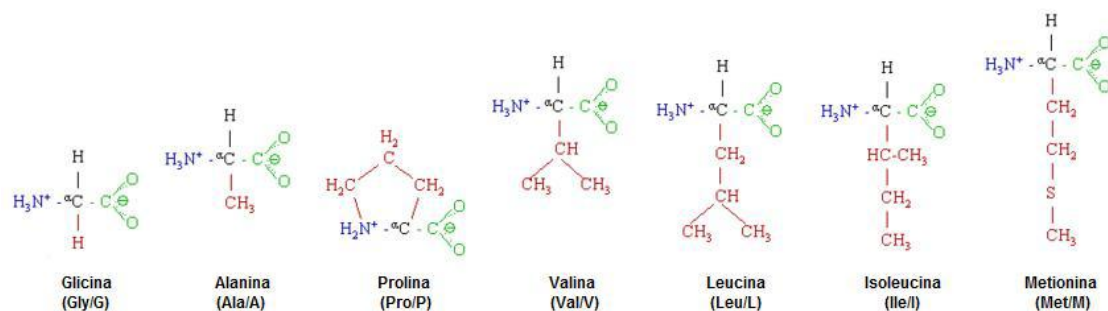


Figura 6.1. Estructura química aminoácidos apolares alifáticos.

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

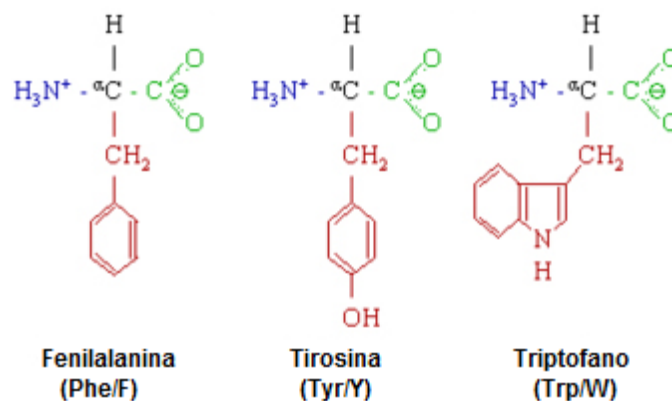


Figura 6.2. Estructura química aminoácidos aromáticos.

Grupo R polares sin carga: estos grupos son bastante solubles en agua a diferencia de los hidrofóbicos, debido, principalmente, a que sus grupos funcionales forman puentes de

hidrógeno con el agua. Se encuentran la **Serina**, **Treonina**, **Cisteína**, **Asparagina** y **Glutamina**.

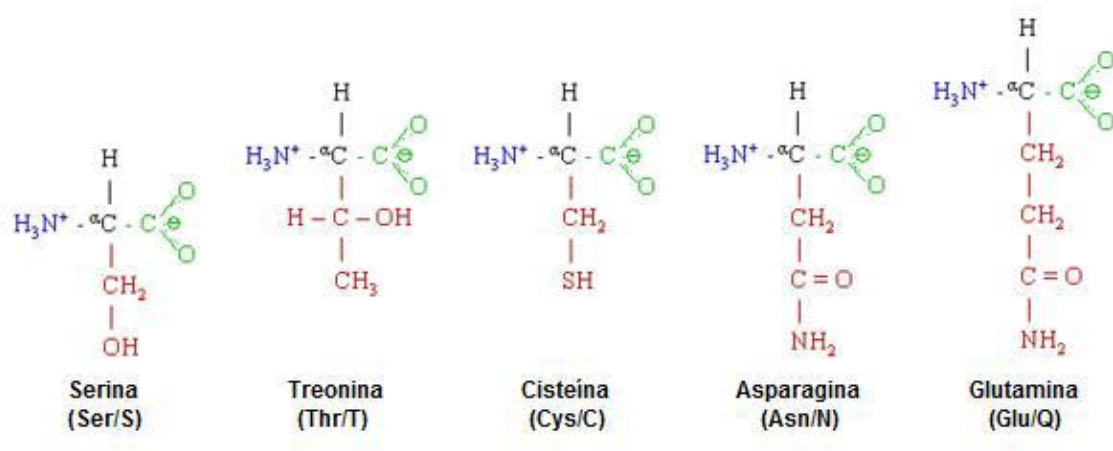


Figura 6.3. Estructura química aminoácidos polares sin carga.

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

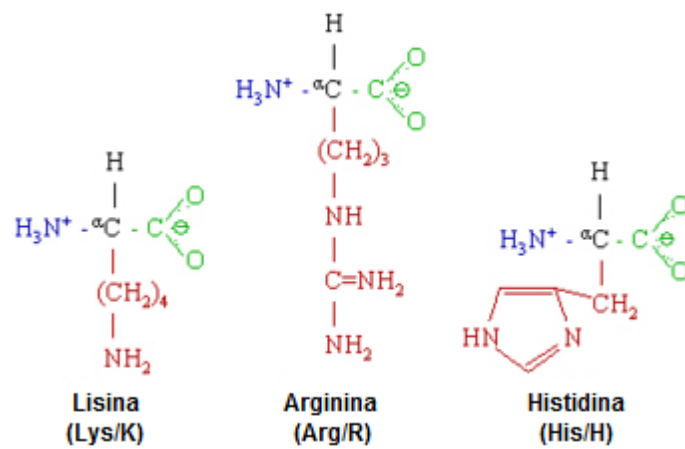


Figura 6.4. Estructura química aminoácidos cargados positivamente.

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

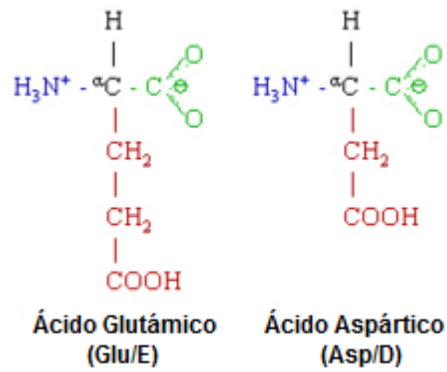


Figura 6.5 Estructura química aminoácidos cargados negativamente.

6.2 ANEXO B:

6.2.1 ANEXO B: MEDIOS DE CULTIVO LÍQUIDOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Por separado se preparan 100 mL de una solución 0,17 M de KH_2PO_4 , 0,72 M K_2HPO_4 , la cual contiene:

- 90 mL agua Milli-Q
- 2,31 gr de KH_2PO_4
- 12,54 gr K_2HPO_4

6.2.2 ANEXO B: MEDIOS DE CULTIVO SÓLIDOS

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

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

6.3 ANEXO C: EQUIPOS

En la Tabla 6.1 se presentan los equipos utilizados con su respectivo fabricante y modelo.

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
Fuente de poder para electroforesis	BRL Model 500 Bio-Rad Power Pac 1000
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	ÄKTA Purifier 10
