



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

ESTRATEGIA DE MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA PARA LA BÚSQUEDA DE UNA  
ENDOXILANASA CON ALTA ACTIVIDAD CATALÍTICA A TEMPERATURAS  
MODERADAS

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA

THAIS SIULING REYES CALDERÓN

PROFESORA GUÍA:  
MARÍA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

MIEMBROS DE LA COMISIÓN:  
ÁLVARO OLIVERA NAPPA  
IRENE MARTÍNEZ BASTERRECHEA

SANTIAGO DE CHILE  
2023

RESUMEN DE LA MEMORIA PARA  
OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA  
CIVIL EN BIOTECNOLOGÍA  
POR: THAIS REYES CALDERÓN  
FECHA: 2023  
PROF. GUÍA: ORIANA SALAZAR  
AGUIRRE

## ESTRATEGIA DE MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA PARA LA BÚSQUEDA DE UNA ENDOXILANASA CON ALTA ACTIVIDAD CATALÍTICA A TEMPERATURAS MODERADAS

Los desechos de biomasa lignocelulósica tienen gran potencial para ser reutilizados. El xilano, componente de este desecho orgánico, puede ser degradado por medios enzimáticos para obtener varios productos, entre ellos, xilooligosacáridos (XOS), que poseen propiedades prebióticas. Los prebióticos son beneficiosos para la salud digestiva de los humanos. Esta memoria se centró en la mutagénesis de una enzima xilanasa de la familia GH10 llamada extraída del hongo *Gloephyllum trabeum*, llamada GtXyn10A. Esta enzima hidroliza el sustrato xilano en XOS, y el objetivo de la mutación es aumentar su actividad catalítica a temperaturas moderadas (30-40°C). Utilizando herramientas bioinformáticas se predijo la estructura tridimensional de GtXyn10A con lo que se pudo identificar el residuo glutamina 124 (Q124) como posible blanco para mejorar la actividad enzimática. Utilizando técnicas de biología molecular se hizo una mutación puntual sustituyendo Q124 por ácido glutámico (E), para luego probar la actividad de la enzima xilanasa mutada a distintas temperaturas entre 30-90°C. La mutación se realizó por medio de mutagénesis *Overlap* PCR. Para amplificar el gen, éste fue subclonado en pGemT-easy y transformado en células de *Escherichia coli* cepa DH5a. Posteriormente, para la expresión recombinante de la xilanasa mutada, se utilizó el vector de expresión pET22b(+) y se transformó en células *E. coli* BL21(DE3). La expresión recombinante del gen silvestre se logró exitosamente, detectándose una banda de 37kDa que corresponde a GtXyn10A con una actividad xilanasa específica de 357,4 U en el medio de cultivo. Se expresó la enzima silvestre y mutada on Q124E en ambas en BL21(D23) y se les aplicó precipitación con sulfato de amonio, diálisis y cromatografía líquida. Al comparar la actividad enzimática de ambas luego de la cromatografía, se observa un aumento de un 15% en actividad específica de la enzima mutante contra la silvestre, con estadísticas favorables a un aumento de valor. Sin embargo, el nivel de purificación o separación de las proteínas no es apto para una caracterización de la actividad y la comparación específica de actividades se debe hacer luego de una purificación adecuada para cada proteína. El trabajo concluye que la enzima mutante posee una actividad específica similar a la silvestre, y tiene potencial para poder alcanzar mayor actividad enzimática con xilano a temperaturas moderadas.

## Agradecimientos

Agradezco al Centro de Biotecnología y Bioingeniería (CEBIB) y a proyecto Fondecip EQM160019, por prestarme el cromatógrafo líquido Akta Avant 25, para poder realizar esta investigación.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo durante mi proceso universitario, en especial mi tía Yiyi.

También quiero agradecer a mi amigo Seba y a mi profesora guía Oriana, que fueron un pilar de apoyo muy especial en la universidad.

Muchas gracias.

## Índice de contenidos

### Contenido

1. Introducción	1
1.1 Antecedentes	1
1.1.1 Alimentos funcionales	1
1.1.2 Residuos lignocelulósicos	2
1.1.3 Motivación	2
1.2 Marco teórico	2
1.2.1 Biomasa lignocelulósica	2
1.2.2 Xilo-oligosacáridos como prebióticos (XOS)	4
1.2.3 Xilanasas	5
1.2.4 Mecanismo de acción de Xilanasas GH10	6
1.2.5 Ingeniería de proteínas en xilanasas	7
1.2.6 Mutación Q124E	8
1.2.7 Sistemas recombinantes producción de xilanasas silvestre y mutada	10
1.3 Objetivos	11
2. Metodología experimental	11
2.1 Revisión Bibliográfica	11
2.2 Métodos experimentales	11
2.2.1 Modelación 3D, alineamiento e identificación de mutación para GtXyn0A	11
2.2.2 Diseño de partidores	13
2.2.3 Mutagénesis sitio dirigida	14
2.2.3.1 Extracción de plásmido pET22b(+) con el gen de GtXyn10A silvestre	14
2.2.3.2 Mutagénesis sitio-dirigida	14
2.2.3.3 Purificación de los productos de PCR	15
2.2.3.4 Subclonación con Cloning TA	15
2.2.4 Transformación de células <i>E. coli</i> DH5α	16
2.2.4.1 Verificación de la mutación	17
2.2.5 Clonación en el vector pET22b(+)	17
2.2.6 Transformación en células <i>E. coli</i> BL21(DE3)	18
2.2.7 Producción de enzima recombinante silvestre GtXyn10A y mutante GtXyn10A_Q124E	18

2.2.8 Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford	20
2.2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	20
2.2.10 Ensayo de actividad enzimática a diferentes temperaturas	21
3. Resultados y discusión	22
3.1 Alineamiento de GtXyn10A con GH10 caracterizadas	22
3.1 Modelo de la estructura tridimensional por homología de GtXyn10A	24
3.2 Mutagénesis para el cambio Q124E en GtXyn10A	25
3.2.1 Producción del gen mutado por <i>Overlap Extension</i> PCR	26
3.2.2 Obtención de un clon de E. coli con el gen de GtXyn10A mutado	27
3.3 Clonamiento de GtXyn10A en el vector de expresión pET22b(+)	31
3.2.1 Comparación de la dependencia de la actividad con diferentes temperaturas.	36
4. Conclusiones	40
5. Proyecciones a futuro	41
6. Bibliografía	42
7. Anexos	46
Anexo 1. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de GtXyn10A	49
Anexo 2. Mapas de vectores pGEM-T Easy y pET22b+	50
Mapa vector pGEM-T Easy de Promega	50
Mapa vector pET22b(+) de Novagen	51
Anexo 3. Tabla de concentraciones para Polimerasa X7, Polimerasa Taq y Ligasa T4	51
Anexo 4. Preparación Medio Terrific-Broth y sales fosfato	54
Anexo 5. Precipitación de proteínas con sales de sulfato de amonio	55
Anexo 6. Curva de calibración de proteínas según método de reactivo de Bradford	57
Anexo 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida	60
Anexo 8. Curva de calibración de xilosa	62
Anexo 9. MolProbity del modelo 3D de GtXyn10A	65

## Índice de figuras

Figura 1. Ilustración de composición del material lignocelulósico, formado por lignina, hemicelulosas y celulosa.	3
Figura 2. Estructura de cadena principal del xilano.	4
Figura 3. Estructura secundaria de cadena de aminoácidos de una GH10 (izquierda) y GH11 (derecha).	6
Figura 4. Mecanismo de acción de xilanasas GH10 con retención de la configuración..	7

Figura 5. (a) Estructura 3D de la enzima Xyl10C, mostrando los loops, hélices alfa y láminas beta. (b) Mapa de densidad electrónica de la xilobiosa. (c) En verde, residuo E175 y xilobiosa en el sitio activo. Se indican los aminoácidos importantes en la unión a la xilobiosa y los aminoácidos catalíticos en rojo. (d) Comparación estructural de Xyl10C y XylE. [19].	9
Figura 6 Alineamiento de secuencias de Streptomyces L10608.1 (WP_05561903.1) a GtXyn10A.	23
Figura 7. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de Xyl10C, GtXyn10A y XylE mediante el programa de alineamiento Clustal Omega.	24
Figura 8. Modelo tridimensional de GtXyn10A (a) y del sitio activo en el loop 2 de la proteína(b).	25
Figura 9. Mutagénesis sitio dirigida por Overlap Extension PCR.	26
Figura 10 Subclonación TA	28
Figura 11 Transformación de células DH5 $\alpha$ y selección de transformadas con pGEM-T Easy-GtXyn10A_Q124E.	28
Figura 12. Alineación de secuencias de los genes GtXyn10A y GtXyn10A_Q124E	30
Figura 13. Electroferograma de la secuenciación de una de las colonias de GtXyn10A_Q124E..	31
Figura 14 Gel de agarosa 1% con fragmentos de pet22b y gen mutado.	32
Figura 15 Gel agarosa de confirmación de inserción del gen en pET22b(+).	33
Figura 16 Gel agarosa de confirmación de transformación del vector ligado correctamente en células BL21(D3)..	33
Figura 17 Gel de proteínas de enzima silvestre y mutante en diferentes etapas de separación..	34
Figura 18 Actividad específica de GtXyn10A silvestre y mutante.	36
Figura 19 Actividad relativa de enzimas GtXyn10A silvestre y mutante Q124E	37
Figura 20 a) Modelo 3D del sitio activo de GtXyn10A_Q124E con valina V304 (aminoácido en celeste). b) Modelo 3D del sitio activo de GtXyn10A_Q124E con isoleucina I304 (aminoácido en celeste)..	40
Figura 21 Curva de Calibración de ensayo de AR con DNS	47
Figura 22 Curva de calibración con reactivo de Bradford	48
Figura 23 Curva de calibración para ensayo con reactivo de Bradford, para la medición de concentración de proteínas totales.	59
Figura 24 Curva de calibración para el ensayo de AR con DNS.	63
Figura 25 Puntajes de análisis geométrico y estérico de MolProbit para el primer modelo generado por I-TASSER de GtXyn10A.	65
Figura 26 Puntajes de análisis geométrico y estérico de MolProbit para el primer modelo generado por I-TASSER de GtXyn10A, después de pasarlo por Yasawa web y Galaxyweb.	65

## Índice de tablas

Tabla 1. Nombre, descripción y referencia de software usados.	12
Tabla 2. Partidores utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida y subclonación desde vector pGEM-T Easy a pET22b(+).	13

Tabla 3 Tabla de purificación de enzima GtXyn10A silvestre a 50°C, por 10 minutos de reacción a pH 5.	35
Tabla 4 Tabla de purificación de enzima GtXyn10A mutada Q124E a 50°C, por 10 minutos de reacción a pH 5.	35
Tabla 5 Tabla de comparación de residuos del sitio activo entre Xyl10C y GtXyn10A..	38
Tabla 6 Propiedades de las enzimas xilanasas GH10 Xyl10C, XylE y XylE2	39
Tabla 7 Absorbancias 550nm de ensayos DNS en triplicado a diferentes temperaturas para enzima silvestre y mutante	46
Tabla 8 Absorbancias de ensayo de AR con DNS de etapas de enzima silvestre	46
Tabla 9 Absorbancias de ensayo de AR con DNS de etapas de enzima mutante	46
Tabla 10 Absorbancias a 595nm de concentración de proteínas con método de reactivo de Bradford con BSA para la curva de calibración.	47
Tabla 11 Absorbancias a 595 con reactivo de Bradford de concentración de proteínas de diferentes fracciones en enzima mutante y silvestre.	47
Tabla 12 Componentes y concentraciones para una mezcla de reacción PCR con Phusion Polimerasa ( <a href="https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530">https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530</a> )	51
Tabla 13 Componentes para GoTaq Polimerasa de Promega.	52
Tabla 14 Componentes para hacer una mezcla de ligación con T4 ligasa de fragmentos con extremos cohesivo	53
Tabla 15 Tabla de saturación con sales de sulfato de amonio, cantidad a agregar según la saturación inicial y final de la solución.[31]	56
Tabla 16 Datos de absorbancia a 595 nm de ensayo de BSA con reactivo de Bradford	57
Tabla 17 Datos estadísticos de la absorbancia de BSA con reactivo de Bradford	58
Tabla 18 Composición gel de resolución 12,5%.	60
Tabla 19 Composición gel de concentración.	60
Tabla 20 Datos de absorbancia a 550 nm de ensayo de azúcares reductores con DNS con xilosa	62
Tabla 21 Datos estadísticos de absorbancias de xilosa con ensayo de azúcares reductores con DNS.	63

# 1. Introducción

## 1.1 Antecedentes

### 1.1.1 Alimentos funcionales

La dieta es un factor determinante en el riesgo de enfermedades en todo tipo de población humana. Hay evidencias de que los alimentos funcionales, alimentos que tienen como función mejorar la salud del individuo, tienen un impacto en enfermedades digestivas y disfunciones provocadas por diferentes modos de vida y el envejecimiento. La importancia de la microbiota intestinal en la salud humana ha sido un hallazgo importante que ha permitido avanzar en la investigación medicinal y nutricional. La simbiosis entre la microbiota intestinal y probióticos en el colon es reconocida como un gran factor en la salud y bienestar del humano, y para mantener esto, el concepto de los prebióticos ha adquirido mayor interés. Los prebióticos son nutrientes no digeribles por el ser humano que sirven como alimento para la microbiota intestinal y tienen potencial influencia en el cuerpo, y, en consecuencia, en la salud humana [1].

Además, debido a una creciente concientización de la población por preferir alimentos saludables y con beneficios para la salud del cuerpo humano, y la búsqueda de producción de alimentos de manera sustentable para mitigar las consecuencias del cambio climático, la obtención de prebióticos a partir de procesos enzimáticos ha adquirido mayor interés. Los procesos de degradación enzimáticos son más sustentables y menos contaminantes que los de obtención química, y por lo que se prefieren [2].

Entre los prebióticos existentes, los xilooligosacáridos (abreviado XOS) poseen ventajas ante otros prebióticos por su mayor rango de estabilidad a diferentes pH y una temperatura de hasta 100°C, además de tener peor absorción en ácido biliar (en comparación a otros prebióticos como isomaltooligosacáridos (GOS) y fructooligosacáridos (FOS), lo que permite un mejor control de azúcares en la sangre [3]. Además, se ha estudiado que los XOS en comparación a FOS y GOS administrada en menor cantidad en humanos, otorgan mayores beneficios a la salud, y mejoran selectivamente la cantidad de bacterias beneficiosas para la salud en el colon [4].

Los prebióticos presentan, además, un gran potencial en el mercado mundial. Su valor se avaluó en USD 4.070 millones en 2017 y se espera un aumento hasta USD 7.370 millones para 2023. [1]

### 1.1.2 Residuos lignocelulósicos

Actualmente, las industrias alimentaria y farmacéutica se han enfocado en encontrar procesos que permitan incrementar su producción y servicios sustentables. La investigación en el uso de residuos agroindustriales para producción de alimentos debe ser intensificada porque estos desechos son subutilizados y billones de toneladas se desechan anualmente [5].

Considerando que el material lignocelulósico representa el residuo orgánico más abundante del planeta, se ha estudiado ampliamente cómo se puede reutilizar este compuesto para producir otros para uso humano, promoviendo así la economía circular. El material lignocelulósico está compuesto mayoritariamente por hemicelulosa, y a su vez, este está formada principalmente de xilano. La hidrólisis del xilano produce los xilo-oligosacáridos [5].

### 1.1.3 Motivación

A partir de las ideas presentadas, nace el objetivo de reutilizar el material lignocelulósico que se desecha a partir de los cultivos, en particular el xilano. Esto es posible haciendo uso de endoxilanasas, que cortan este compuesto en cadenas más pequeñas formando XOS. Estas moléculas tienen propiedades prebióticas, un nutriente beneficioso para el ser humano.

Los xilooligosacáridos pueden ser producidos por métodos químicos o enzimáticos, estos últimos siendo los de interés, al usar una xilanasa para el procesamiento del material lignocelulósico. Por el uso de la enzima, se tiene la necesidad de obtener una xilanasa con alta capacidad de hidrolización del xilano para un proceso más eficiente.

En base a esto, este trabajo se centra en la ingeniería de proteínas de una xilanasa producida por el hongo *Gloephyllum trabeum*, para mejorar su actividad catalítica específicamente para degradar xilano, a una menor temperatura óptima (ya que el de la enzima silvestre es de alrededor de 80°C) o mejorar su rango de temperaturas las que posea mayor actividad catalítica, para así tener una mejor variedad de temperaturas a la que se pueda trabajar con esta enzima.

## 1.2 Marco teórico

### 1.2.1 Biomasa lignocelulósica

La lignocelulosa es considerada como el compuesto orgánico más abundante en la tierra. Este material proviene de las plantas y es producto del desecho de actividades agrícolas, de los cuales se desechan alrededor de 5 billones de toneladas cada año en el planeta. Esto lo hace un material potencial para ser reutilizado y reciclado, al

transformarlo en productos útiles para el ser humano, como por ejemplo comida para animales, productos farmacéuticos, biogás, y suplementos alimenticios. [6]

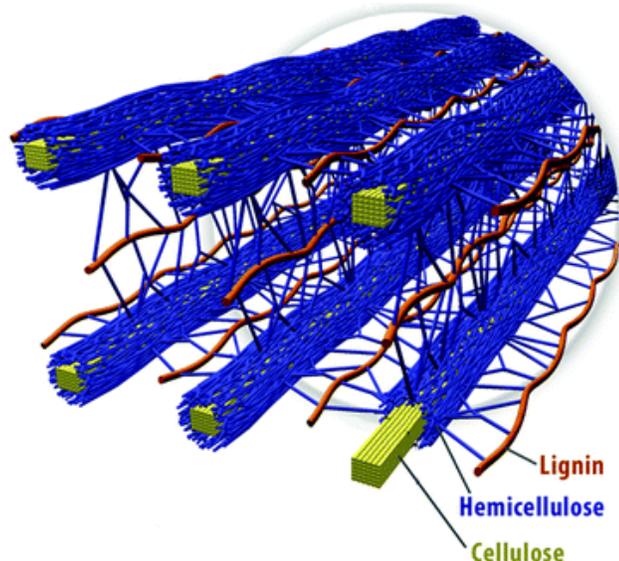


Figura 1. Ilustración de composición del material lignocelulósico, formado por lignina, hemicelulosas y celulosa. [6]

La biomasa lignocelulósica está formada por tres principales polímeros: lignina, celulosa y hemicelulosa (Figura 1). La hemicelulosa es un polímero formado por una cadena de sacáridos ramificada, y constituye entre un 15-35% del material lignocelulósico [6]. La cadena está compuesta por residuos de glucosa, manosa y xilosa unidos por enlaces 1,4  $\beta$ -D-piranosil. Las ramificaciones de la cadena son variadas y dependen de la planta de origen de la hemicelulosa. El polímero más abundante en la lignocelulosa es xilano, el cual está compuesto por una cadena de  $\beta$ -D-xilopiranosas (también llamada xilosa) unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosil, como se observa en la Figura 2. Unidos a esta cadena principal, se puede encontrar otros tipos de residuos de sacáridos, como arabinosa, ácido glucurónico, 4-O-metil éter o ácido acético.

El xilano, al ser el componente más abundante de la hemicelulosa (un 60-90% p/p, dependiendo de la planta de origen) [7], tiene un gran potencial como producto residual del material lignocelulósico. Entre ellos, se encuentra el uso de cadenas cortas de xilano, llamadas xilooligosacáridos (abreviados XOS), como prebióticos. Las xilanasas son las enzimas encargadas del hidrólisis del xilano y obtención de XOS y xilosa como productos. Este estudio se centra principalmente en una endoxilanasas obtenida a partir de un hongo de pudrición marrón llamado *Gloeophyllum trabeum* [8].

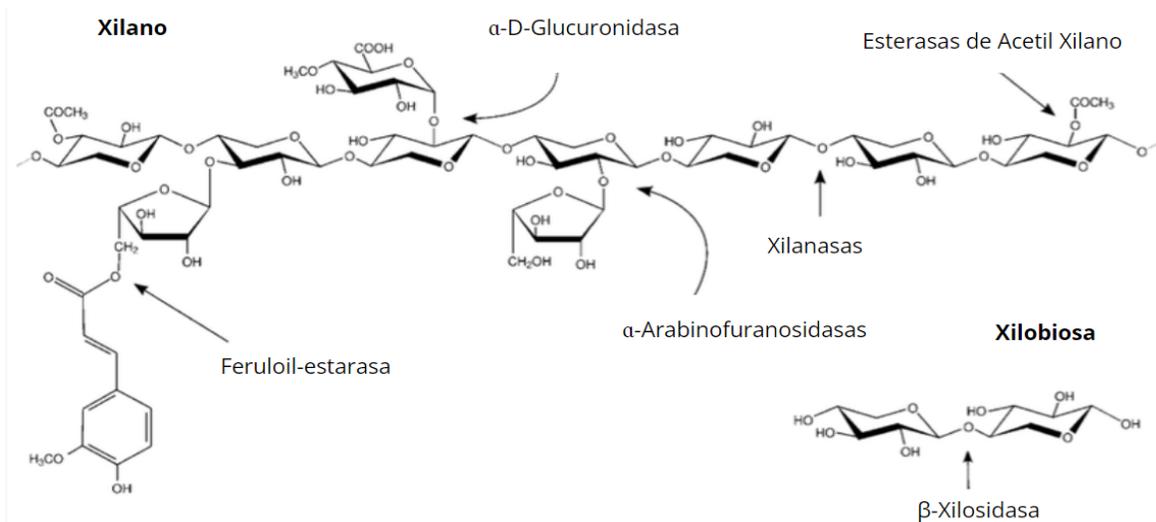


Figura 2. Estructura de cadena principal del xilano, formado por unidades de  $\beta$ -D-xilopiranosas unidas por enlaces  $\beta$ -1,4-glicosil, y con posibles cadenas laterales como ácido ferúlico, acetilo, arabinosa y ácido glucurónico. Se muestran las enzimas responsables del corte de estas ramificaciones y la cadena principal de xilano en las flechas, que indican el lugar de escisión. Modificado de Pastor y cols. (2007) [9].

### 1.2.2 Xilo-oligosacáridos como prebióticos (XOS)

Los probióticos y prebióticos son dos ingredientes alimenticios que confieren efectos fisiológicos a través del sistema gastrointestinal. Los prebióticos son ingredientes alimenticios no digeribles que afectan la salud del huésped benéficamente al estimular de manera selectiva el crecimiento o actividad de un número limitado de bacterias en el colon [10].

La asociación científica internacional para probióticos y prebióticos (ISAPP) definió a los prebióticos como “sustrato que es selectivamente elegido por microorganismos hospedadores que otorgan un beneficio a la salud del huésped” [11], siendo el huésped un humano o animal. El hecho de que sean selectivos quiere decir que los prebióticos deberían afectar positivamente solo a bacterias que benefician a la salud del huésped, tales como los microorganismos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* del tracto intestinal, y no a los organismos patógenos para el cuerpo. Al mejorar la calidad alimenticia de las bacterias intestinales ingeridas, puede mejorar la salud digestiva del portador. Se ha descubierto que la salud gastrointestinal está involucrada en muchos otros procesos del cuerpo, como la defensa inmunológica ante patógenos y enfermedades, disminución de enzimas carcinogénicas, aumento de absorción de minerales y otros nutrientes, entre otros [11].

Los prebióticos más industrializados son los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS). Los XOS son un prebiótico emergente que posee varias ventajas ante estos dos prebióticos. Como se mencionó, los XOS resisten mayores

valores de pH y temperaturas sin ser degradados. Además, mantienen sus propiedades prebióticas por mayor tiempo en almacenamiento. También, se necesitan menos dosis diaria de XOS (2,8 g diarios) que de FOX y GOS (más de 10 g diarios) para obtener un efecto prebiótico similar [12].

Los XOS se pueden obtener mediante procesos químicos, de auto-hidrólisis o enzimáticos [7]. Los procesos químicos y de auto hidrólisis poseen varias desventajas como la producción de compuestos no deseados y alto costo de procesamiento río-abajo, además de generar XOS con un rango amplio de polimerización (entre 2-20 monómeros). Es sabido que los XOS que actúan como prebióticos en el cuerpo humano deben ser de 2-6 monómeros, por lo que se requiere tener un bajo número de polimerización. Es por esto que se prefiere la producción de XOS mediante procesos enzimáticos o mediante procesos combinados, ya que las enzimas endoxilasas pueden generar menos xilasas y otros productos indeseados, y producir mayor rendimiento de XOS con el valor de polimerización deseado (entre 2 y 4 monómeros de xilosa) [7].

### 1.2.3 Xilasas

Los XOS pueden ser obtenidos desde xilano usando enzimas llamadas xilasas, que tienen actividad xilanolítica. Las endo- $\beta$ -1,4-xilasas son enzimas que rompen los enlaces  $\beta$ -1,4-glicosídicos internos que unen a la cadena principal de los xilanos. Al hidrolizarse estos enlaces, se producen xilooligosacáridos y xilosa en menor medida. La estructura de las endo- $\beta$ -1,4-xilasas consiste en un módulo catalítico formado por 2 subunidades, a veces unido a módulos de unión a carbohidratos (carbohydrate-binding module, abreviado CBM). En la base de datos de glicosil hidrolasas (abreviadas GHs) CAZy (Carbohydrate-active enzymes, <http://www.cazy.org/>), se clasifican las hidrolasas según su similitud en secuencia aminoacídica de los módulos catalíticos. La mayoría de las xilasas están en las familias GH10 y GH11.

La familia GH10 tiene una estructura (mixta de hoja  $\beta$ /hélice  $\alpha$ ), denominada TIM-barrel, mientras que las GH11 tienen un plegamiento ed rollo beta ( $\beta$ -jelly roll), como se observa en la Figura 3. Las GH10 poseen en promedio un peso molecular mayor y un menor punto isoeléctrico en comparación a las GH11. En términos de escisión de la cadena de xilano, las GH10 pueden cortarlas al lado de xilasas con cadena lateral, mientras que las GH11 hidrolizan la cadena principal dos monómeros después de xilasas con cadena lateral. Esto sugiere que las GH10 pueden obtener productos de XOS de menor largo que las GH11. Además, las GH10 pueden hidrolizar otros compuestos además del xilano, como la celulosa, mientras que las GH11 sólo hidrolizan el xilano [13].

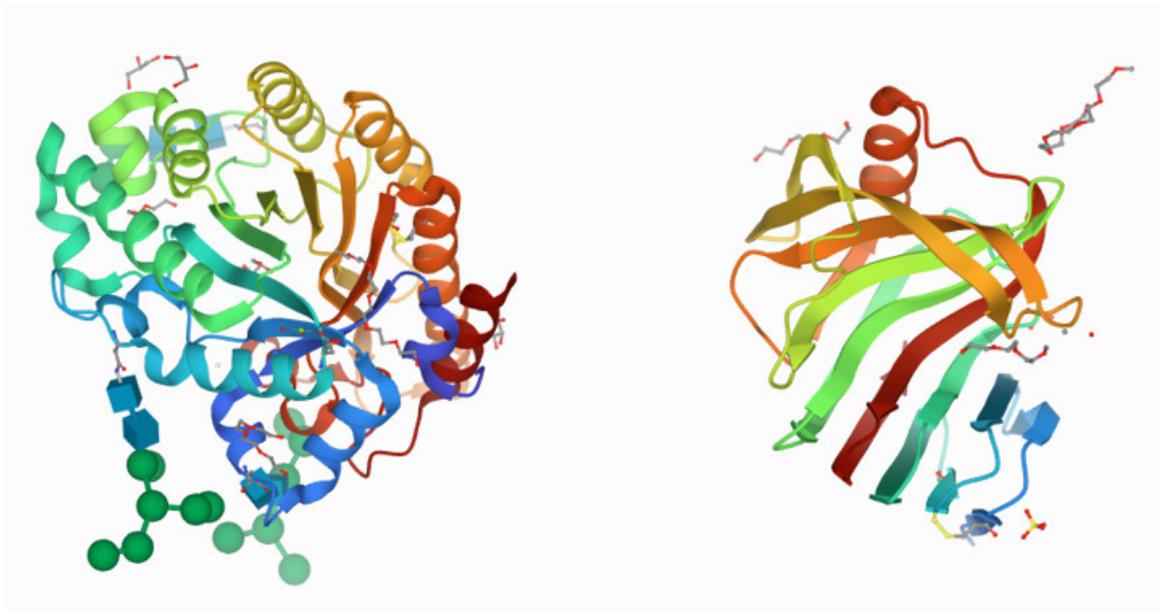


Figura 3. Estructura secundaria de cadena de aminoácidos de una GH10 (izquierda) y GH11 (derecha). Códigos uniprot: S7Q6I2, B2LWN3, respectivamente. Se observa el TIM-barrel de láminas beta al medio de la GH10, rodeado de hélices alfa (además presenta glicosilaciones, representadas por cubos y círculos). En la estructura de la GH11 se observa la estructura de rollos de láminas beta.

Las xilanasas GH10 son producidas y pueden obtenerse de bacterias y hongos. Las enzimas provenientes de los hongos poseen alta estabilidad en amplios rangos de pH y temperatura en comparación con las de origen bacteriano. En particular, se propuso estudiar la xilanasas del hongo *Gloephyllum trabeum* denominada GtXyn10A [14], clasificada como una GH10. Esta enzima posee un alto potencial para la producción de XOS, por su alta termo estabilidad, además de tener producción de xilosa casi nula en comparación con la producción de XOS [1]. Más específicamente, la enzima GtXyn10A (producida en sistema recombinante de *Pichia pastoris*) tiene una temperatura óptima de 80°C, pH óptimo de 4-5 y alta termoestabilidad a 50°C [15].

#### 1.2.4 Mecanismo de acción de Xilanasas GH10

Las xilanasas poseen una actividad clasificada como glicosidasa que hidroliza el polisacárido xilano a xilooligosacáridos y últimamente a xilosa (monómero). Cabe señalar que, en condiciones experimentales y controladas, lo ideal es no llegar a la producción de xilosa ya que esta inhibe a la enzima (inhibición por producto) y la xilosa, al ser un monómero, no es útil como prebiótico. Las xilanasas GH10 utilizan un mecanismo de hidrólisis con retención con configuración anomérica. Este método implica dos residuos de glutamato en el sitio activo, lo que indica un mecanismo de acción de doble desplazamiento, en el que primero se forma una configuración intermedia de unión covalente enzima-sustrato y luego esta es hidrolizada usando estados de transición tipo ión oxocarbenio. Uno de los glutamatos del sitio activo actúa como ácido catalítico y el otro hace un ataque nucleofílico, que resulta en el corte del

grupo saliente y la formación del intermediario  $\alpha$ -glicosil enzima (ocurre una inversión de configuración  $\alpha$  a  $\beta$ ). En la segunda etapa, el grupo carboxilo del residuo del primer ácido carboxílico actúa como base, tomando un protón desde una molécula de agua nucleofílica, la cual ataca al carbono anomérico. Esto resulta en una sustitución en que el carbono anomérico pasa por el estado de transición del ión oxocarbenio nuevamente, para dar como resultado el producto con la configuración  $\beta$ , reteniendo la configuración inicial del carbono anomérico [16]. En la Figura 4 se observa una ilustración del mecanismo de retención de configuración anomérica en el enlace entre xilasas.

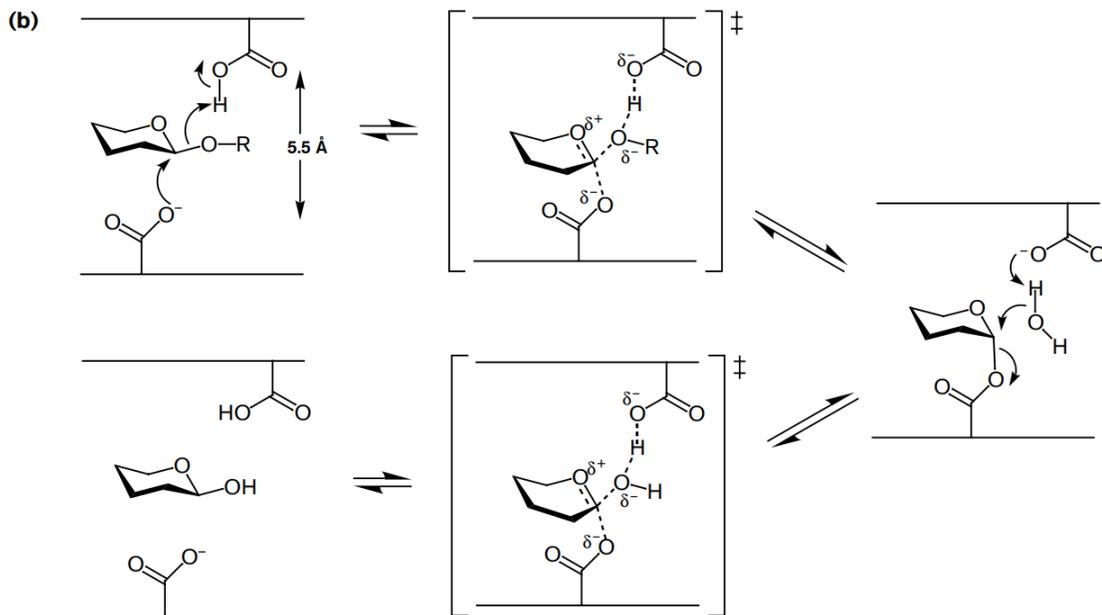


Figura 4. Mecanismo de acción de xilasas GH10 con retención de la configuración. Modificado de [16].

### 1.2.5 Ingeniería de proteínas en xilanasas

Con el fin de hacer más eficiente la reacción a temperaturas moderadas ( $30^{\circ}\text{C}$ ) y la producción de XOS con la xilanasas de *Gloephyllum trabeum*, el propósito de este trabajo es aumentar su actividad catalítica a menor temperatura. Como se ha dicho anteriormente, la temperatura óptima de la GtXyn10A silvestre (*wild-type*) es de  $80^{\circ}\text{C}$  y es termoestable a  $50^{\circ}\text{C}$  [15]. Esto obligaría a mantener los equipos a una temperatura óptima alta por mucho tiempo para producir XOS con alta eficiencia. Por tanto, al disminuir la temperatura óptima de operación de la enzima, se desea aumentar su actividad a menores temperaturas para así ahorrar energía al producir XOS. Se ha determinado que aumentar la actividad enzimática a  $30\text{-}40^{\circ}\text{C}$  sería lo ideal, ya que se desea utilizar la GtXyn10A dentro de un sistema de expresión eucariote, como es la levadura *Pichia pastoris* y producir XOS en este tipo de cultivo, en conjunto con el crecimiento de la levadura.

Para lograr esto, se puede realizar ingeniería de proteínas sobre esta enzima, lo que involucra el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen que genera la GtXyn10A, además del análisis de su secuencia aminoacídica traducida a partir de este gen. Con esto, se podría diseñar una mutación en alguno de sus aminoácidos, y producir una mutante de xilanasa con las características deseadas.

Xiong y cols. [17] produjeron mutantes de GH10 y GH11 en la bacteria *Streptomyces* con el fin de minimizar la producción de xilosas y aumentar la de los XOS llamados xilobiosa (X2), xilotriosa (X3) o xilotetraosa (X4), de acuerdo al largo de la cadena del monómero. La variante con mejor resultado fue la mutación de un residuo de asparagina en la posición 86 a una glutamina. Esta posición fue elegida por estar cerca del sitio activo. El resultado de la mutación fue una menor producción de xilosa y un aumento en la actividad catalítica de 1,85 veces. Sin embargo, no hubo mayores cambios, como una mayor actividad enzimática, que era lo que se deseaba. [17]

Siaoyu Wang y cols. [18] propuso el cambio de dos alaninas cerca del sitio catalítico a ácido aspártico o ácido glutámico en una xilanasa del hongo *Bispora MEY-1*. Los cambios se hicieron en dos alaninas en las posiciones 160 y 161, a aspartato y glutamato por separado, con el fin de aumentar su actividad catalítica. Las mutantes resultaron en una mayor actividad catalítica, con un aumento de 1,9 veces en comparación con la cepa silvestre (wild-type, sin mutaciones). Además, la enzima resultante tiene un pH óptimo ligeramente más ácidos.

Aparte de estos trabajos descritos, en la mayoría de las otras mutaciones sitio-dirigidas que se han hecho en endoxilanasas GH10 de otros hongos, al alinear las secuencias de xilanasas con las del hongo *Gloephyllum trabeum*, resulta que las mutaciones con intención de mejorar su actividad enzimática a diferentes temperaturas y pH ya son parte del gen de GtXyn10A. Por esta razón, hay un limitado número de opciones que se pueden proponer en la xilanasa de estudio GtXyn10A (la secuencia nucleotídica y aminoacídica de la proteína se puede ver en el Anexo 1).

### 1.2.6 Mutación Q124E

A pesar de esto, You S., y cols [19] han identificado en la xilanasa Xyl10C del hongo *Bispora sp. MEY-1* un residuo de ácido glutámico estructural en posición 175 (E175), que permite que la xilanasa mantenga una alta actividad catalítica en un variado rango de temperatura y pH. Este residuo interactúa fuertemente con la lisina de la posición 135 y la metionina en la posición 137 (posiciones en XYL10C), ambos ubicados en el loop 2 de la proteína. Esta interacción entre residuos genera una estabilización en la conformación que se produce durante la unión al sustrato, lo que influencia la eficiencia catalítica de la enzima [19].

Para verificar la alta estabilidad y la importancia del residuo E175 en Xyl10C, los autores realizaron una mutagénesis sitio dirigida de saturación, que consiste en mutaciones variadas de aminoácidos en la posición del glutamato 175, produciendo mutantes con diferentes sustituciones aminoacídicas en su lugar. Sin embargo, todas las variantes mostraron peor actividad catalítica y peor estabilidad en la actividad frente a alto pH. También se mutó otras 2 enzimas, XylE del hongo *Penicillium scopiformis* y XynE2 de la bacteria *Anoxybacillus* sp., para mutar la glutamina en esa posición homóloga a ácido glutámico, y se observó un aumento en su actividad enzimática de hasta un 200%. Por tanto, se dedujo que el residuo E175 de Xyl10C tiene un rol clave en la estabilización del sitio activo de la enzima que afecta su actividad catalítica. [19]

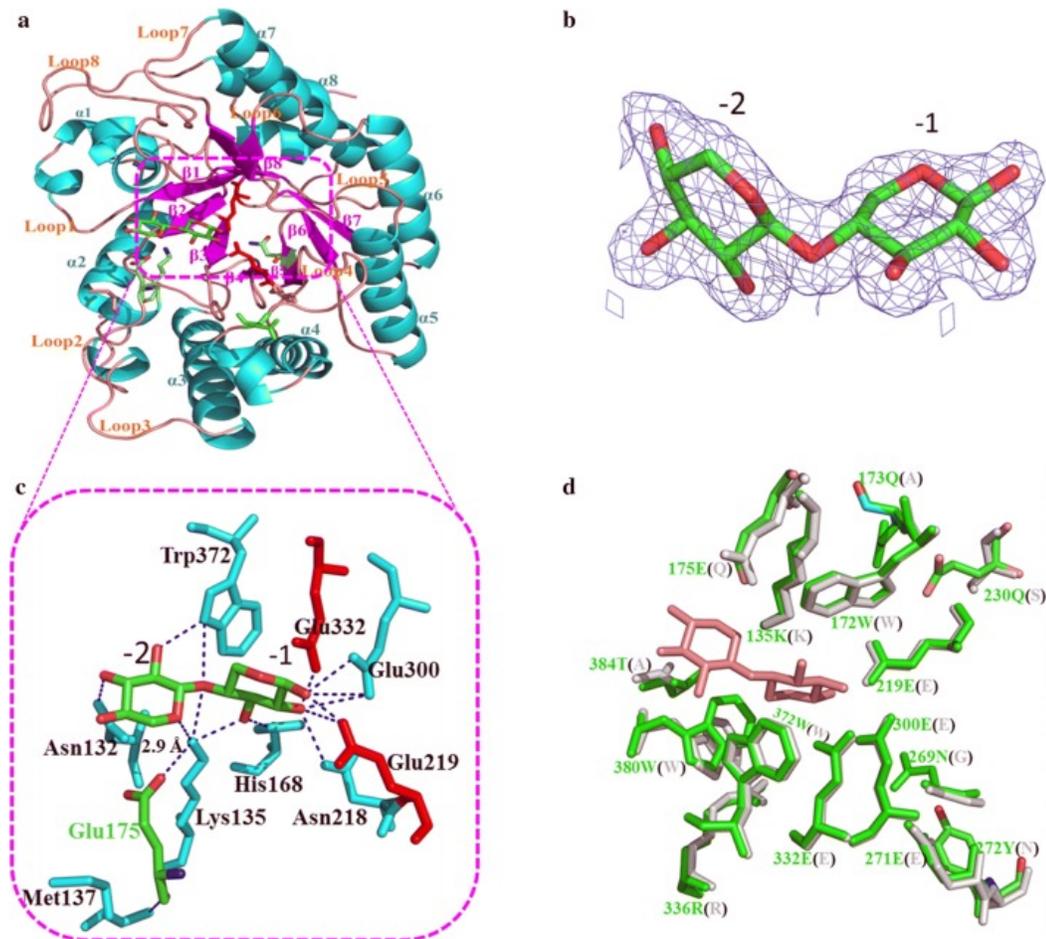


Figura 5. (a) Estructura 3D de la enzima Xyl10C, mostrando los loops, hélices alfa y láminas beta. (b) Mapa de densidad electrónica de la xilobiosa. (c) En verde, residuo E175 y xilobiosa en el sitio activo. Se indican los aminoácidos importantes en la unión a la xilobiosa y los aminoácidos catalíticos en rojo. (d) Comparación estructural de Xyl10C y XylE. Los aminoácidos de XylE están entre paréntesis [19].

En la Figura 5(c), se muestran los residuos principales que actúan en la unión al sustrato xilobiosa. Se observan los dos residuos catalíticos glutamato en rojo y el

glutamato en estudio, E175, en verde en la esquina inferior izquierda donde se observa su interacción con K135 y M137. El sustrato xilobiosa se encuentra en el bolsillo del sitio activo, mostrando con líneas punteadas su interacción con los residuos indicados del sitio activo de Xyl10C. En (d), se observan las diferencias de aminoácidos en el sitio activo entre Xyl10C y XylE. A pesar de estas diferencias, al hacer la mutación de Q a E en este residuo, aumenta la actividad catalítica.

### 1.2.7 Sistemas recombinantes producción de xilanasa silvestre y mutada

Se han usado principalmente dos sistemas de producción de endoxilanasas recombinante GH10: la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y la levadura *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) como hospederos. La ventaja de usar la levadura *P. pastoris* como sistema recombinante es que es un sistema eucariota capaz de realizar las modificaciones post-traduccionales de endoxilanasas producidas en hongos. Sus desventajas son su lento crecimiento. Las ventajas de la bacteria *E. coli* son un rápido crecimiento, alta densidad celular, medio de cultivo barato y fácil accesibilidad a gran variedad de vectores y plásmidos de clonación. Las desventajas de usar *E. coli* como sistema recombinante son su falta de capacidad de hacer glicosilaciones post-traduccionales o puentes disulfuro de las proteínas heterólogas, acumulación de proteasas y toxinas. Actualmente, se desconoce el grado en que afectan estas glicosilaciones en la actividad de la endoxilanasas, o si es que tiene glicosilaciones en su estructura. También se sabe que posee puentes disulfuro, que pueden afectar en su estructura y por tanto, también en su actividad catalítica con el xilano.

Como muchas endoxilanasas de origen fúngico contienen glicosilaciones y puentes disulfuro, que son modificaciones post-traduccionales propias producidas por las células eucariontes, lo ideal sería usar la levadura *Pichia pastoris* para la producción recombinante, ya que esta posee los mecanismos celulares necesarios para realizar estas modificaciones. Sin embargo, para trabajos de corto tiempo, es posible usar *E. coli*, pues ya se ha visto que las endoxilanasas GtXyn10A producidas en ellas son activas. Sin embargo, esto podría potencialmente tener consecuencias negativas en la endoxilanasas, como menor tiempo medio de vida y menor estabilidad, por la falta de puentes disulfuro. Cabe hacer notar que la xilanasa de interés GtXyn10A, tiene un peso molecular reportado de 37kD [14].

La cepa de *E. coli* mayoritariamente usada para la expresión recombinante de proteínas es la *E. coli* BL21(DE3), por su baja cantidad de proteasas y mayor permeabilidad para los vectores y por poseer el gen DE3, que contiene la secuencia para la T7 RNA polimerasa bajo un promotor *lac*, la cual produce alta cantidad de proteína recombinante bajo el control del promotor T7 [20]. La transformación con el inserto del gen de interés se realiza en el vector pET22b(+) (ver Anexo 2 para ver el mapa del vector). Este vector posee varias ventajas en la reproducción recombinante de proteínas tales como el promotor de T7 RNA polimerasa bajo el promotor *lac*, que en

conjunto con la maquinaria de la cepa BL21(DE3), produce en altas cantidades la proteína recombinante al inducir el cultivo con isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Además, posee una secuencia al final del polylinker para una cola de seis histidinas, que es muy útil para una purificación por afinidad mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con columna IMAC, lo que beneficia una fácil purificación de la proteína recombinante. [20]

## 1.3 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es aplicar una estrategia racional utilizando una mutagénesis sitio dirigida para aumentar la actividad catalítica de la enzima endoxilanasas GtXyn10A obtenida del hongo *Gloephyllum trabeum* a temperatura moderada, más baja que la óptima de 80°C.

Los objetivos específicos son:

- Identificar y seleccionar los residuos aminoacídicos que permitan un incremento en la actividad catalítica de GtXyn10A mediante la predicción de estructura 3D y alineamiento de secuencia aminoacídica usando métodos bioinformáticos.
- Generar una variante de GtXyn10A que contenga la mutación seleccionada (Q124E), utilizando técnicas de biología molecular, y en particular, mutagénesis sitio-dirigida.
- Producir la enzima mutada GtXyn10A\_Q124E en células procariontes (*E. coli*), evaluar su actividad enzimática frente a la temperatura y compararla con la de la enzima silvestre.

## 2. Metodología experimental

### 2.1 Revisión Bibliográfica

Se inició el trabajo realizando una revisión bibliográfica, usando el buscador académico Google Académico y el repositorio académico de la Universidad de Chile. Se utilizaron palabras clave respecto al trabajo tales como: xilano, potencial de xilooligosacáridos como prebióticos, xilanasas GH10, mutagénesis sitio-dirigida en xilanasas GH10, mejoramiento de actividad xilanasas GH10, GtXyn10A y xilanasas *Gloephyllum trabeum*. en inglés. También se usaron como referencia artículos de memoria y tesis anteriores relacionados al tema, proporcionados por la profesora guía.

## 2.2 Métodos experimentales

### 2.2.1 Modelación 3D, alineamiento e identificación de mutación para GtXyn0A

Se utilizó el programa I-TASSER (Iterative Threading ASSEmby Refinement, Universidad de Michigan) para la generación de un modelo 3D de la enzima en estudio usando la secuencia aminoacídica de GtXyn10A provista por la profesora guía (Anexo 1). El programa compara la secuencia con otras secuencias y estructuras 3D obtenidas experimentalmente de proteínas similares desde el banco de proteínas PDB (Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>). Luego, el modelo resultante fue sometido a una minimización de energética, usando softwares tales como Yasara, Galaxyweb refine2 y MolProbity. Este último permite además verificar su estabilidad estructural. El resumen de software utilizados y su función se muestran en la Tabla 1.

*Tabla 1. Nombre, descripción y referencia de software usados.*

Nombre	Función	Referencia
I-TASSER	Generación de modelo 3D predictivo de proteínas por homología a partir de una secuencia aminoacídica.	[21]
GalaxyWeb	Minimización de energía de enlaces y formación geométrica de modelo 3D.	[22]
Yasara	Minimización de energía de enlaces y formación geométrica de modelo 3D.	[23]
MolProbity	Análisis geométrico y estérico de modelo 3D de macromoléculas.	[24]
Pymol	Visualización y manipulación de modelos 3D de macromoléculas.	[25]
Blast	Base de datos de proteínas y búsqueda por alineamiento de secuencias nucleotídica o aminoacídicas.	[26]
Clustal Omega	Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas.	[27]
Swiss Model Translate	Traducción de secuencias nucleotídicas a aminoacídicas, lee Open-reading frames, directo o inverso y los 3 diferentes reading frames del ADN.	[28]

A partir de la búsqueda bibliográfica sobre posibles mutaciones en xilanasas GH10 de otros hongos, se logró identificar una posible mutación que mejoraría la actividad catalítica de la GtXyn10A. Con un análisis bioinformático de la secuencia de ADN del gen codificante para GtXyn10A usando el programa Pymol, la secuencia se comparó con el ADN codificante de la enzima Xyl10C del hongo *Bispora MEY-1*, usando el programa Clustal Omega (que está integrado en Pymol) para alinear estas secuencias. Se encontraron los aminoácidos homólogos para las glutaminas del sitio activo, el residuo a mutar y otros aminoácidos que interactúan en la unión con el sustrato (homólogos de los residuos de la Figura 5).

### 2.2.2 Diseño de partidores

Se diseñaron los partidores necesarios para mutar el residuo glutamina (Q) en la posición 124 del gen de GtXyn10A, mostrados en la Tabla 2. Como se explicó en la sección de marco teórico, para la mutagénesis sitio-dirigida *overlap extension* se necesitan 4 partidores. Dos de estos, llamados partidores de flanqueo, se ubican en los extremos 5' y 3' del gen, y otros 2, llamados partidores mutagénicos, contienen la mutación en su secuencia para introducirla en el lugar deseado. Se utilizaron los partidores de flanqueo GtXylpET\_F y GtXylpET\_R, que se encontraban disponibles en el laboratorio cuya secuencia se indica en la Tabla 2. Estos partidores contienen los sitios de corte de las enzimas de restricción *XhoI* y *NcoI* para poder insertar el producto de amplificación en el vector pET22b(+). Los partidores mutagénicos fueron diseñados a partir de la secuencia de GtXyn10A, tal que puedan hibridar con la secuencia de ésta, es decir, son diseñados en base a su secuencia complementaria a la hebra a la que se unirán. Los partidores mutagénicos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies (IDT, EEUU).

*Tabla 2. Partidores utilizados en la mutagénesis sitio-dirigida y subclonación desde vector pGEM-T Easy a pET22b(+).*

Nombre partidor	Secuencia (5'-3')	Función
GtXylpET_F (flanqueo)	TATCCATGGATGCACCTCCTACTCC	Mutagénesis sitio-dirigida y clonación en vector pGem-T Easy y pET22b(+) (para el fragmento dirección 5'-3') Temperatura de hibridación: 75°C
GtXylpET_R (flanqueo)	ATACTCGAGCTGCCAGCCAGCAAC	Mutagénesis sitio-dirigida y clonación en vector pGem-T Easy y pET22b(+) (para el fragmento dirección 3'-5') Temperatura de hibridación:

		75°C
GtXyn10A Q124E_F (mutagénico)	TGGTACAACGAACTCCCCAGC	Insertar mutación en GtXyn10A (para el fragmento dirección 5'-3') Temperatura de hibridación: 55°C
GtXyn10A Q124E_R (mutagénico)	GCTGGGGAGTTCGTTGTACCA	Insertar mutación en GtXyn10A (para el fragmento dirección 3'-5') Temperatura de hibridación: 55°C

### 2.2.3 Mutagénesis sitio dirigida

La sustitución del residuo de glutamina (Q) por un ácido glutámico (E) en la posición 124 de GtXyn10A se realizó mediante mutagénesis sitio-dirigida, siguiendo el método de *overlap extension* descrito por Ho, y cols [29]. Ésta técnica consiste básicamente en la síntesis de 2 fragmentos de PCR utilizando 4 partidores, dos de flaqueo y dos mutagénicos, insertando la mutación en una parte de una secuencia elegida en los partidores mutagénicos que se diseñan para que contengan la mutación deseada, a partir de la secuencia del gen que se muestra en el Anexo 1. Luego, ambos fragmentos de PCR se utilizan como templados para obtener el gen completo utilizando solo los partidores de flaqueo para obtener la secuencia completa con el gen conteniendo la mutación. En el laboratorio, el gen de GtXyn10A a mutar se obtuvo de una cepa de *E. coli* que posee el plásmido pET22b+ solo.

#### 2.2.3.1 Extracción de plásmido pET22b(+) con el gen de GtXyn10A silvestre

Se extrajo el plásmido a partir de la cepa de *E. coli DH5a* que posee el plásmido pET22b(+) (Novagen) conteniendo el gen silvestre de la GtXyn10A previamente hecho en el laboratorio [30]. Ésta cepa, conteniendo el gen de interés, fue cultivada en medio Luria-Broth (LB; BD Biosciences, EEUU) suplementado con ampicilina (Winkler, Chile) a 100 µg/mL en un tubo Falcon de 50 ml en un incubador orbital Yihder LM-250D a 200 rpm, a 37°C durante toda una noche. Al día siguiente, el cultivo de células fue centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R (Sigma Aldrich, EE UU). Se desechó el sobrenadante y se procedió a la extracción del plásmido utilizando el GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fischer, EEUU). La extracción del plásmido se eluyó en 100 µl y se midió la concentración del plásmido purificado en un nanofotómetro (Fermelo MaestroGen, Chile) directamente, usando 1 µl de éste, midiendo a longitudes de onda de 280 y 260 nm.

### 2.2.3.2 Mutagénesis sitio-dirigida

El plásmido purificado conteniendo el gen silvestre de la GtXyn10A se utilizó para realizar las reacciones de PCR necesarias para iniciar la mutagénesis sitio-dirigida. Se prepararon dos mezclas de PCR para generar dos fragmentos que correspondían al inicio y final de la secuencia del gen. Una mezcla se preparó conteniendo 0,5 M del partidor de flanqueo directo 5' (GtXylpET\_F) y partidor mutagénico reverso conteniendo la mutación (GtXyn10A Q124E\_F), 200µM de cada dNTP, 5,8 ng de ADN templado, 0,2 µl de ADN polimerasa X7 (Phusion X7, New England Biolabs, Reino Unido) y completando con agua miliQ hasta llegar al volumen indicado (detalles de concentraciones en Anexo 1). La segunda mezcla para el segundo fragmento en dirección 3'-5' contuvo los mismos componentes, pero con el partidor de flanqueo reverso 3' y el partidor mutagénico directo, en las mismas concentraciones anteriores. Ambas mezclas de PCR se llevaron a un termociclador Thermomixer PCR Touch T960 (EEUU) usando un programa con una incubación de 98°C por 2 minutos, 30 ciclos de 98°C por 10 segundos, seguido de un gradiente de temperaturas de hibridación de 55°C, 58°C y 68°C por 20 segundos, finalizando con 72°C por 30 segundos, y finalmente, una incubación de 1 minuto a 75°C. Se probó un gradiente de temperaturas de hibridación de 55°C, 58°C y 68°C para elegir aquella más eficiente, de las que se eligió la de 68°C para el resto de reacciones de PCR por presentar. Esto se debe a que la temperatura indicada por el proveedor (IDT) de los partidores es de 55°C, pero temperaturas mayores a ésta demuestran tener mejores resultados que aquella recomendada.

### 2.2.3.3 Purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron sometidos a una electroforesis en gel de agarosa (Fermelo, Chile) al 1%, a 80 V por 30 min en una cámara de electroforesis PowerPac Basic (BioRad, EEUU). Las bandas de los fragmentos de ADN de interés fueron escindidas con un bisturí estéril bajo lámpara UV para visualizar las bandas. Para purificar el ADN a partir del gel, se utilizó el kit GeneJet Plasmid miniprep (ThermoFischer, EEUU), obteniendo un volumen final de 50 µl de cada uno de los fragmentos. Se midió la concentración de cada fragmento en el nanofotómetro.

Utilizando ambos productos de PCR conteniendo el inicio y el final del gen mutado generados en la primera reacción de PCR, se procedió a la unión y extensión del gen en una segunda reacción. Se preparó una mezcla conteniendo 0,5 µl de Polimerasa X7, 2,5 ng del fragmento 1 (300bp), 2,5 ng del fragmento 2 (700bp), 1X de buffer Phusion 5x, 200 µM de dNTPs, y se completó con agua miliQ (detalles de concentraciones en Anexo 3). Se puso en el termociclador con un programa empezando por una incubación de 98°C por 2 minutos, seguida de 27 ciclos de 98°C por 30 segundos, seguidos por 68°C por 30 segundos, y finalmente 30 segundos a 72°C. En el séptimo ciclo, se pausó el programa para rápidamente agregar 2,5 µl de los partidores de flanqueo de la secuencia GtXynpET\_F y GtXynpET\_R (que están a una concentración de 100 mM), y

luego siguieron los 20 ciclos restantes. Al finalizar estos ciclos, se cerró el programa con 1 ciclo de 10 minutos a 72°C. Se realizó un gel de agarosa al 0,7% con tinción GelRed (Probiotek) para verificar el tamaño de los productos de PCR.

#### 2.2.3.4 Subclonación con Cloning TA

También conocida como clonación rápida, es una técnica de subclonamiento que evita el uso de enzimas de restricción, lo que hace el proceso más rápido y fácil. Esta técnica se basa en la propiedad de las bases complementarias de timina para unirse a la adenina, que están en los extremos del vector cortado, con tal que puede usarse para hibridar cualquier inserto con extremos de adenina a un vector con extremos de timidina (mapa del vector en Anexo 2).

Se hizo la subclonación TA al gen producido por PCR para insertarlo en un vector de clonación pGEM-T Easy (Promega, EEUU), el cual posee extremos cohesivos con timinas singulares en su forma linealizada. Para ligar los productos de PCR al vector con estas timinas salientes, se adenula los extremos del producto de PCR. La adenilación consiste en agregar adeninas singulares a la secuencia de interés por medio de PCR con polimerasa Taq (Promega, usando las instrucciones del proveedor).

Para esto, se hizo una mezcla que contenía 0,2 mM de dATP (adenina) a 10 mM (1 µl), 1X del buffer GreenTaq Polimerasa (4 µl), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> a 25 mM (1,28 µl), 0,025 U/L de Taq Polimerasa (1 µl) y 0,125 µg/µl del producto de PCR (12,27 µl) (detalles de concentraciones en Anexo 3). La mezcla se incubó en el termociclador a 72°C por 30 minutos. El producto de PCR se corrió en una electroforesis con gel de agarosa al 0,7% y se purificó el fragmento de 1 kb a partir de la banda escindida desde el gel, usando el kit de extracción de plásmidos geneJET (ThermoFisher, EEUU) para purificación a partir de geles.

Para la ligación al vector pGEMT-Easy, se hizo una mezcla de ligación con T4 Ligasa (ThermoFischer, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La mezcla fue hecha con 1X rapid ligation buffer (5 µl) (ThermoFischer, EEUU), 50 ng de pGEM-T Easy (Promega, EEUU) (1 µl), 10 U de T4 ADN Ligasa (1 µl), 300 ng de inserto del PCR (2 µl) y agua mili-Q (detalles de concentraciones en Anexo 3). Esta mezcla se dejó incubando durante una noche a 4°C en refrigerador.

También se hizo un control positivo y negativo para verificar una transformación exitosa. El control positivo sirve para confirmar que el método de transformación funciona, y el negativo sirve para confirmar que el antibiótico usado funciona en células que no integran los plásmidos. Para el control positivo, se realizó la misma mezcla, pero se reemplazó el plásmido por pBlueScript. En el negativo, se hizo la misma mezcla, pero se reemplazó la solución con el inserto por agua mili-Q. Las mezclas de ligación se pusieron a incubar a 4°C durante una noche.

## 2.2.4 Transformación de células *E. coli* DH5 $\alpha$

Se prepararon 4 cápsulas Petri con 100 ml de medio LB suplementado con 1,4 g de bacto-agar (BD, EEUU), agregando 100  $\mu$ l de ampicilina a 100  $\mu$ l/ml, 10  $\mu$ l de IPTG (Fermentas, Lituania) a 1 M, y 100  $\mu$ l de X-gal (Fermentas, Lituania) a 0,02 mg/ $\mu$ l. Esta mezcla se dividió en 4 cápsulas Petri bajo campana estéril.

Se llevó a cabo la transformación de células *E. coli* quimiocompetentes DH5 $\alpha$  y la mezcla de ligación descrita en el paso anterior. Se agregó toda la mezcla de ligación (alrededor de 10  $\mu$ l) en 100  $\mu$ l de una suspensión de *E. coli* (según protocolo para hacer células quimiocompetentes) DH5 $\alpha$ . La mezcla se dejó en hielo por 20 minutos, se le sometió a un shock térmico en baño de agua a 42°C por 1 minuto, y luego se dejó en hielo por 5 minutos. Se sembraron las placas con el medio LB que se preparó anteriormente, con las células transformadas y los controles positivos y negativos. Se dejaron incubando todas las placas en una incubadora Gallenkamp a 37°C durante una noche.

Se seleccionaron 4 colonias de la placa de células transformadas con el gen mutado (GtXyn10A\_Q124E) en pGEM-T-Easy y se dejaron crecer por separado en medio de cultivo LB (20 mL) con 20  $\mu$ l de ampicilina a concentración de 100  $\mu$ g/ml a 37°C y 200 rpm en incubador orbital. Al día siguiente se usaron 10 ml del cultivo de células transformadas con el gen mutado para extraer los plásmidos usando GeneJet Plasmid Miniprep Kit y enviarlos a secuenciar a Macrogen (Corea). Los otros 10 ml se usaron para hacer un stock de células transformadas. Para esto, se tomaron 300  $\mu$ l de cada cultivo y se mezclaron con 100 $\mu$ l de glicerol (Winkler) estéril al 80% y se guardaron en un freezer a -80°C.

### 2.2.4.1 Verificación de la mutación

Se verificó que el inserto en pGEM-T-Easy fuese el gen GtXyn10A\_Q124E, y que la ligación ocurrió correctamente. Se purificaron los plásmidos de las 4 colonias elegidas con el GeneJet Plasmid Miniprep. Se hizo una digestión enzimática de los plásmidos usando las enzimas de restricción *Nco*I y *Xho*I (New England Bio Labs, Reino Unido). La reacción se realizó en el buffer SmartCut (Bio Labs, EEUU) y se incubó a 37°C por 1 hora en un termoagitador Dlab HM100-pro (Dlab, EEUU). Luego se incubó a 65°C por 20 minutos para denaturar las enzimas. Finalmente, se hizo un gel de agarosa al 1% para ver las bandas de ADN y confirmar la banda de 1 Kb que correspondía al inserto del gen mutante.

## 2.2.5 Clonación en el vector pET22b(+)

Se tomaron células DH5 $\alpha$  transformadas con el gen GtXyn10A\_Q124E clonado en pGEMTeasy para hacer un cultivo de 10 ml en medio LB, ampicilina a 100  $\mu$ l/ml. Se dejó 24 horas creciendo a 37°C y 200 rpm en una incubadora orbital. Paralelamente, se

cultivó 20 ml de *E.coli* TOP10 conteniendo el plásmido pET22b(+) (Novagen, EEUU) en las mismas condiciones que el cultivo de células DH5a.

Se extrajeron los plásmidos de ambos cultivos con GeneJet Plasmid Miniprep Kit luego de centrifugarlos por 10 minutos a 10.000 rpm en una centrífuga DLAB D3024 (DLBA, EEUU). Se obtuvieron 60 µl de cada plásmido; los del gen mutante en pGem-T-Easy y en pET22b(+) que fueron extraídos. Luego se procedió a digerir cada plásmido con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*. Los plásmidos fueron incubados con las enzimas de restricción a 37°C por 5 horas en el termoincubador Dlab HM100-pro.

Los productos de la digestión fueron cargados en un gel de agarosa al 0,7%. Se cortaron los fragmentos correspondientes a 5kb para pET22b(+) y 1kb para el inserto mutante. Se procedió a extraerlos usando el kit de extracción de plásmidos geneJET, obteniendo 100 µl de extracto de cada uno. Se midió la concentración de cada extracto en el nanofotómetro.

Para la ligación al vector pET22b(+), se procedió a realizar la ligación del gen GtXyn10A\_Q124E y pET22b(+) extraídos. Se hizo una mezcla de 21 µl conteniendo T4 Ligasa (ThermoFischer, EEUU) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. La mezcla fue de hecha con 1X rapid ligation buffer (5 µl) (ThermoFischer, EEUU), 70 ng de pET22b(+) extraído (3 µl), 10U de T4 ADN Ligasa (1 µl), 190 ng del inserto (gen mutado) purificado (9 µl) y agua mili-Q (detalles en Anexo 3), para alcanzar una proporción alrededor de 1:3 de vector a inserto. La ligación se dejó a 16°C durante una noche en el termoagitador.

#### 2.2.6 Transformación en células *E.coli* BL21(DE3)

Se transformaron células quimiocompetentes BL21(DE3) utilizando el mismo protocolo que se utilizó para transformar células DH5α con la mezcla de ligación con pET22b(+). Se envió a secuenciar el plásmido obtenido de células BL21(DE3) transformadas a MacroGen (Corea) para verificar la mutación en el gen GtXyn10A\_Q124E y se guardó en stock algunas colonias a -80°C en medio de congelación preparado con 100 µl de medio de cultivo LB y 300 µl de glicerol estéril al 80%. También se realizó una digestión con enzimas *NcoI* y *XhoI* para luego verificar en un gel de agarosa al 1% la presencia del inserto y su peso molecular, al igual que en el paso 2.2.3.1.

#### 2.2.7 Producción de enzima recombinante silvestre GtXyn10A y mutante GtXyn10A\_Q124E

Las enzimas recombinantes silvestre y mutante fueron producidas para medir su actividad catalítica a distintas temperaturas y compararlas. Las cepas de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el gen silvestre GtXyn10A y mutante GtXyn10A\_Q124E se hicieron crecer en dos litros de medio Terrific-Broth (medio TB, ver Anexo 4), el cual

presenta las ventajas de permitir una mayor densidad de crecimiento celular de *E. coli* en comparación a otras cepas, lo que resulta en mayor producción de enzima recombinante. Se inoculó con cada una de las *E. coli* conteniendo el vector pET22b+ con inserto del gen silvestre GtXyn10A y GtXyn10A\_Q124E en matraces Erlenmeyer de 500 ml con 300ml de medio TB según la densidad óptica del preinóculo. Se midió la absorbancia a 600 nm de 1 ml de ambos pre inóculos en un espectrofotómetro Biochrom Libra (Reino Unido), y se calculó cuántos mililitros se deben inocular en los cultivos para que la densidad óptica de éstos quede entre 0,05 y 0,95. En este caso, se inocularon 7,6 ml de la cepa silvestre y 8,945 ml de la cepa mutante. Se calculó la densidad óptica nuevamente para dejarla como registro. Los matraces se pusieron a incubar a 37°C y 200 rpm en incubadora orbital por 40 minutos. Luego, se dejaron los cultivos en hielo y se midió la densidad óptica a 600 nm cada 20 minutos hasta alcanzar una lectura de 0,4 de densidad óptica. En este punto, se indujo las células en cada cultivo con 120µl de IPTG 100 mM. Inmediatamente después de la inducción, los cultivos se dejaron incubando a 20°C y a 200 rpm en incubador orbital, durante una noche.

Al día siguiente se centrifugaron los cultivos a 10.000 rpm por 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC 6+ de ThermoFisher (EE UU). Se guardó el sobrenadante y se desechó el pellet de células. Se guardó una alícuota de 1 ml de los sobrenadantes de cultivo a 4°C para posteriores experimentos. Luego, se midió el volumen de cada sobrenadante para calcular la cantidad de sales sulfato de amonio a usar en la etapa de precipitación. Se hizo pasar los sobrenadantes por filtros de 0,3 µm marca Whatman (Reino Unido) para eliminar contaminantes usando una bomba de vacío, obteniendo un volumen de 300 ml aprox en ambos sobrenadantes. Las proteínas producidas por ambos cultivos fueron precipitadas incubando los sobrenadantes con sulfato de amonio 0,5 M a pH 7 en buffer TRIS a 4°C por 2 horas (ver detalles en Anexo 5).

Se centrifugaron los medios a 10.000 rpm por 45 minutos en centrífuga Sorvall RC 6+. Se descartó el sobrenadante y se guardó el pellet de proteínas, el cual fue disuelto en 15 ml de buffer TRIS. Las sales fueron extraídas por medio de diálisis. Se usaron bolsas de diálisis de 15 ml (Spectra, EE UU) previamente remojadas en agua mili-Q por 30 minutos y se dializó cada muestra de proteína contra 2 L de buffer TRIS agitando durante una noche. La proteína dializada fue centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C en la centrífuga Eppendorf 5804R para decantar proteína degradada y otros contaminantes. El sobrenadante se pasó por un filtro de jeringa de 0,22 µm (Biofil, España), y se guardó una alícuota de 1 ml en un tubo eppendorf a 4°C para posteriores experimentos.

Se realizó una cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) para separar los componentes producidos en el medio de cultivo por ambas cepas de *E. coli* transformadas con el gen silvestre GtXyn10A y mutante GtXyn10A\_Q124E, utilizando el

cromatógrafo ÄKTA Avant 25. Se utilizó una columna de intercambio iónico de Q-Sefarosa con un volumen de lecho de 8 ml y el software Unicorn 5.1.1 para programar cada paso en el equipo, configurando un flujo de 2 ml/min y presión de 0,3 mPA. Se hizo un lavado y calibración de la columna con 4 volúmenes de columna, usando buffer Tris 20 mM, a pH 7,5, que fue preparado con agua mili-Q y filtrado a través de un filtro de 0,22 µm usando una bomba de vacío. Luego se inyectó la muestra directamente, en el caso de la enzima mutante, una dilución de 1:10 con buffer Tris 20 mM, a la columna. Al finalizar la carga de la muestra se hizo pasar 3 volúmenes de columna con Buffer Tris 20 mM a pH 7,5, y de inmediato se eluyó con 10 volúmenes de columna con buffer Tris 20 mM NaCl 0,5 M a pH 7,5, aforado con agua miliQ y filtrado a través de un filtro de 0,22 µm. Las muestras pasadas por la columna se fueron recolectando en una placa DeepWell de 96 pocillos de 2 ml/pocillo. El cromatógrafo midió la conductividad eléctrica en microsiemens (mS) y la absorbancia a 280 nm en tiempo real en cada fracción.

Para seleccionar las fracciones la cromatografía que contienen la mayor concentración de enzima, se realizó un ensayo de actividad enzimática de azúcares reductores (AR), incubando con xilano de haya como sustrato y ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), como se detalla a continuación. En una microplaca de 96 pocillos, se tomó una alícuota de 20 µl de cada fracción de la placa DeepWell obtenida del FPLC, y se agregaron 80µl de xilano de haya al 1% disuelto en buffer acetato de sodio 50 mM a pH 5. La microplaca se incubó a 37°C, 200 rpm, por 20 minutos en el termoagitador. Luego, se agregaron 100 µl de DNS a cada pocillo, y se incubó a 95°C por 5 minutos en el termoagitador. El DNS es un reactivo que cambia de color de amarillo a anaranjado (550 nm) en presencia de AR. En este caso, detecta la producción de xilosa por la actividad enzimática de la xilanasa. Luego, se traspasaron 100 µl de cada pocillo a otra placa de 96 pocillos para la lectura en espectrofotómetro a 550 nm (ClarioStar, BMG Labtech), utilizando el programa MARS para interpretar las lecturas. Se eligieron las fracciones con mayores valores de absorbancia, y se mezclaron en un tubo Falcon. Se guardó una alícuota de 1 ml de estas fracciones conteniendo la proteína recombinante silvestre y mutante para posterior ensayo de proteínas totales y la medición de actividad enzimática en cada fase de la purificación.

### 2.2.8 Cuantificación de proteínas totales por método de Bradford

Se realizó una cuantificación de proteínas de los productos de FPLC y las alícuotas recolectadas del sobrenadante del cultivo inicial y la diálisis, en triplicado. Se preparó una dilución del reactivo del reactivo de Bradford (Pierce 660 nm Protein Assay Agent, Thermo Scientific) con proporción 1:5 con agua miliQ. La dilución de Bradford se filtró con un filtro de 11 µm, 24 cm de diámetro marca Whatman. Las alícuotas fueron diluidas en proporción 1:16. En una placa transparente de 96 pocillos, se mezclaron 200 µl del reactivo de Bradford más 10 µl de cada una de las alícuotas obtenidas del sobrenadante de la cepa silvestre y mutante. En total se realizaron 18 mediciones. El

blanco contenía solamente 10  $\mu$ l de agua y 200  $\mu$ l de reactivo de Bradford. Se dejó incubar 5 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm a temperatura ambiente.

Se hizo una curva de calibración usando la proteína de suero de albúmina de bovino (BSA) en concentración 2 mg/ml a diferentes concentraciones. Con esta curva fue posible extrapolar la absorbancia leída con la concentración de proteínas (Anexo 6).

### 2.2.9 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar la pureza de las enzimas recombinantes purificadas, se hizo un gel de poliacrilamida denaturante (sodium dodecyl sulphate, SDS-PAGE) al 12,5%. Se prepararon las muestras según la concentración calculada por el método de Bradford. Se cargaron 5  $\mu$ g de proteína de cada muestra, las cuales se mezclaron con 4  $\mu$ l de solución buffer de carga denaturante (Anexo 7), y se completó con agua mili-Q hasta llegar a un volumen final de 20  $\mu$ l y se incubaron a 95°C por 5 minutos para denaturar las proteínas.

Se cargaron las muestras y en pocillos separados, 3  $\mu$ l de marcadores de peso molecular (Invitrogen) en el gel y se llevó a cabo la electroforesis de proteínas en una cámara vertical Bio-Rad. Ésta se llenó con aproximadamente 800 ml de buffer de corrida con dodecilsulfato sódico (SDS). Se ejecutó a temperatura ambiente a 200 V por 45 minutos.

Pasados los 45 minutos, se sacó el gel de la cámara y se puso en un recipiente para teñirlo con tinción con Coomassie Blue R al 0,25% por 2 horas con agitación suave. Luego, se destiñó con solución de ácido acético al 10% por aproximadamente 2 horas. Se llevó a un lector de geles Gel Doc EZ Imager BioRad (EEUU) en luz blanca y se registró el resultado en una foto.

### 2.2.10 Ensayo de actividad enzimática a diferentes temperaturas

Como se mencionó anteriormente, en el paso de medición enzimática del producto de FPLC (2.2.7), se utilizó el método de azúcares reductores (AR) con DNS. Primero, se midió la actividad enzimática de las enzimas silvestre y mutante a diferentes concentraciones utilizando diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000 con agua mili-Q, para obtener un estimado de la dilución adecuada para el ensayo. Las mediciones se realizaron en triplicado en una microplaca de 250  $\mu$ l. Para realizar las mediciones, se colocó primero 20  $\mu$ l de las muestras y 80  $\mu$ l de xilano de haya al 1%. El blanco fue hecho con 20  $\mu$ l de buffer acetato de Sodio 50mM pH 5 y 80  $\mu$ l de xilano de haya. Se selló la microplaca con una goma protectora y se incubó a 37°C por 10 minutos a 200 rpm. Luego, se pipeteó 100  $\mu$ l de DNS en cada pocillo y se llevó a incubar a 95°C por 5 minutos. Las muestras se traspasaron a una placa transparente para ser leída en un

lector de placas a 550 nm. Este procedimiento se repitió para incubar las reacciones enzimáticas de las muestras de enzima silvestre y mutante a 30°C, 40°C, 60°C, 70°C y 80°C.

Curva de Calibración de Xilosa. Se preparó una curva de calibración utilizando un stock de xilosa a 1 mg/ml mediante el método de azúcares reductores con DNS. Así, se pudo usar los valores de densidad óptica de la curva de calibración para extrapolar con la concentración de xilosa de cada muestra producidos por la enzima y calcular la actividad enzimática de cada muestra en unidades por litro (U/L). Cada unidad de actividad enzimática corresponde a la liberación de 1  $\mu$ M de xilosa por minuto (Anexo 8).

### 3. Resultados y discusión

El objetivo general de este trabajo fue aplicar una estrategia racional utilizando mutagénesis sitio-dirigida, para aumentar la actividad catalítica de la enzima endoxilanasas GtXyn10A obtenida del hongo *Gloephyllum trabeum* a temperatura moderada, por ejemplo a 30°C.

El primer objetivo específico planteado fue identificar y seleccionar residuos aminoacídicos que potencialmente permitan aumentar la actividad catalítica de GtXyn10A mediante la predicción de su estructura tridimensional y alineamiento de secuencia aminoacídica usando métodos bioinformáticos (BLASTP, I-TASSER, Yasara, GalaxyWeb, Molprobit, Pymol, referencias en la Tabla 1). Para lograr este objetivo, se llevó a cabo los siguientes pasos y actividades.

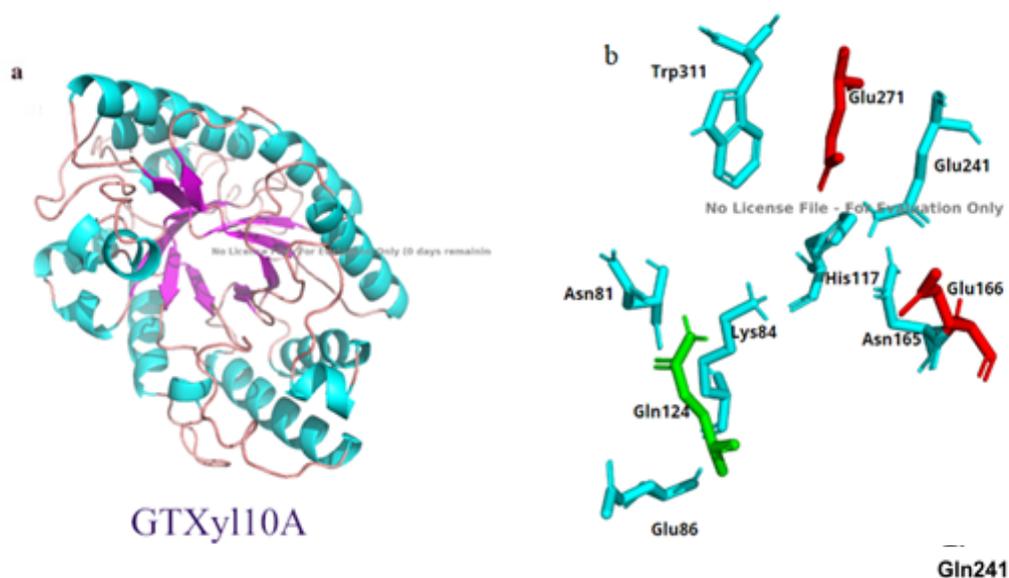
#### 3.1 Alineamiento de GtXyn10A con GH10 caracterizadas

En la búsqueda de mutaciones para GtXyn10A, se alineó la secuencia de esta enzima con la secuencia de la xilanasas GH10 de la bacteria *Streptomyces* cepa L10608.1. En la investigación de Xiong y cols [17]., se mutó el aminoácido asparagina en posición 86 a una alanina, lo que cambió su rango de temperaturas óptimas desde alrededor de 60°C en la enzima silvestre hasta alrededor de 50°C. En la Figura 6 se observa el alineamiento de la secuencia de esta enzima con GtXyn10A.





analizado mediante el software MolProbity. MolProbity valida el modelo atómico 3D de proteínas producidas experimentalmente pero también se utiliza para modelos tridimensionales generados por I-TASSER. Su principal característica es el análisis de contacto de todos los átomos, de su interacción estérica y el grado de libertad rotacional de sus electrones [24]. El modelo fue mejorado considerablemente al pasar la estructura tridimensional por los programas Yasara y GalaxyWebRefine2 (detalles de puntajes MolProbity en Anexo 9), los cuales refinan la estructura tridimensional considerando el estado energético más bajo, y por ende, el más estable. Entre ellos, está 98,6% de rotámeros favorecidos, 95% de número de ramachandran favorecidos y menor cantidad de ángulos y enlaces no favorecidos (Anexo 9). El modelo tridimensional resultante se muestra parcialmente en la Figura 8.



*Figura 8. Modelo tridimensional de GtXyn10A (a) y del sitio activo en el loop 2 de la proteína(b). Los aminoácidos rojos son los ácidos glutámicos catalíticos. El aminoácido en verde de GtXyn10A es el residuo Gln124 a mutar El resto de los aminoácidos calipso son algunos residuos esenciales en el sitio activo para la interacción con el sustrato. (b), equivalente en posición a Glu175 en Xyl10C. Los residuos calipso son aquellos que interactúan entre sí o en unión al sustrato xilobiosa*

En la Figura 8, se puede observar el modelo de GtXyl10A y el sitio de interacción con el sustrato de la enzima de referencia Xyl10C que ya ha sido cristalizada, y la enzima en estudio GtXyn10A. Se confirma que la posición Q124 en GtXyn10A es equivalente a la de E175 en Xyl10C (Figura 5).

### 3.2 Mutagénesis para el cambio Q124E en GtXyn10A

El segundo objetivo específico de esta memoria fue generar una variante de GtXyn10A que contenga la mutación seleccionada (Q124E). Para esto se utilizó técnicas de

biología molecular, específicamente, mutagénesis sitio-dirigida por *Overlap Extension* PCR.

### 3.2.1 Producción del gen mutado por *Overlap Extension* PCR

La temperatura óptima para la hibridación de los partidores mutagénicos y no mutagénicos en la PCR fue de 68°C (ver sección Metodología), por lo que se eligió para realizar todas las reacciones de PCR en adelante.

Para llevar a cabo la mutagénesis sitio dirigida por *Overlap Extension* PCR, el partidore de flanqueo 5' fue diseñado para comenzar río abajo de la secuencia correspondiente al péptido señal de 16 pb del gen silvestre de GtXyn10A, por lo que el producto de PCR mutante posee 16 pb menos que el silvestre. Luego se inició el primer paso de la mutagénesis que consistió en la síntesis del fragmento 'A' de 300bp y, por separado, el fragmento 'B' de 700bp, este último correspondiente al que tiene la mutación, (Figura 9a, b) con los partidores señalados en la Tabla 1. Los productos de este PCR fueron corridos en gel de agarosa y sus pesos moleculares verificados (Figura 9b). El segundo paso consistió en la extensión de ambos fragmentos 'A' y 'B' para formar el gen completo de 1 kb conteniendo la mutación en su secuencia. En el tercer y último paso, se agregaron los partidores de flanqueo para amplificación del gen completo GtXyn10A\_Q124E (Figura 9a). El producto de este PCR fue analizado mediante electroforesis en gel de agarosa y se confirmó su peso molecular de 1 kb (Figura 9c).

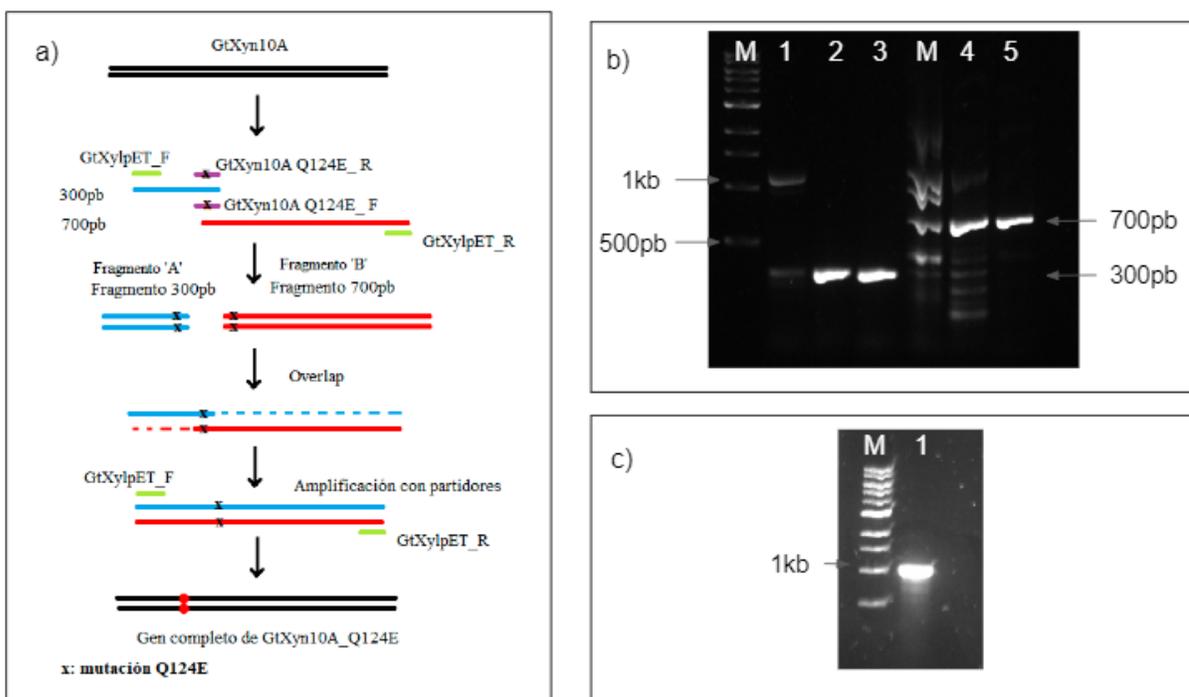


Figura 9. Mutagénesis sitio dirigida por *Overlap Extension* PCR. a) Representación esquemática de los pasos involucrados en la mutagénesis sitio-dirigida por *Overlap Extension* PCR. Líneas en negro: gen GtXyn10A; en verde: partidores de flanqueo; en morado: partidores mutagénicos; en celeste: producto de PCR de 300pb (fragmento A); en rojo: producto de PCR de 700 pb

(fragmento B) b,c) Productos de PCR del primer y tercer paso fueron analizados en gel de agarosa al 1% y fotografiados bajo luz UV con tinción con RedGel. b) Carriles M: Ladder de tamaños moleculares. Carriles 1, 2 y 3: producto de PCR del primer paso (fragmento A), generó una banda de 300pb. Carriles 4 y 5: productos de PCR del primer paso (fragmento B), generó una banda de 700pb. c) Carril M: Ladder de tamaño moleculares. Carril 1: productos de PCR del tercer y último paso (fragmento C), produjo una banda de aproximadamente 1 kb correspondiente al gen completo GtXyn10A\_Q124E.

Cabe destacar aquí las razones por las que se eligió realizar la mutación mediante la llamada mutagénesis por *Overlap Extension* PCR. De los principales métodos para hacer mutagénesis dirigida, el de mutagénesis por *Overlap Extension* PCR tiene la ventaja de ser 100% eficiente en aplicar una mutación, obteniendo con seguridad la secuencia mutada al purificar los fragmentos amplificados con los partidores mutagénicos, además de ser especialmente útil para mutaciones puntuales. La desventaja que tiene es la mayor probabilidad de mutaciones no intencionales que pueden aparecer en la secuencia al tener que realizar dos amplificaciones por PCR, lo que se puede minimizar usando una DNA polimerasa termoestable con actividad autocorrectora. Por limitaciones de tiempo, se eligió éste método que además permite ahorrar el paso de selección de colonias transformadas con el gen mutado, ya que es un método 100% eficiente [29]. Otros métodos de mutagénesis sitio dirigida, como el Rapid PCR Site-Directed Mutagenesis (cambio rápido), es mucho menos efectivo y más lento ya que se requiere la amplificación del plásmido completo y la remoción posterior del plásmido parental con una endonucleasa dependiente de metilaciones [29].

### 3.2.2 Obtención de un clon de E. coli con el gen de GtXyn10A mutado

Ya teniendo el gen GtXyn10A\_Q124E, este fue introducido en un vector pGEM-T Easy el cual tiene las ventajas de ser un vector linealizado con extremos de timinas desapareadas en el sitio de inserción (Figura 10), permitiendo el fácil subclonamiento de productos de PCR. Además, este plásmido posee el gen de la beta galactosidasa (*lacZ*), el cual permite la selección de colonias blanco/azul. Por lo tanto, previo a la ligación en el vector pGEM-T Easy, se realizó una adenilación en el producto de mutagénesis sitio-dirigida por *Overlap Extension*, para agregar adeninas desapareadas en los extremos del gen de GtXyn10A\_Q124E (Figura 10) y ligarlo en el vector pGEM-T Easy.

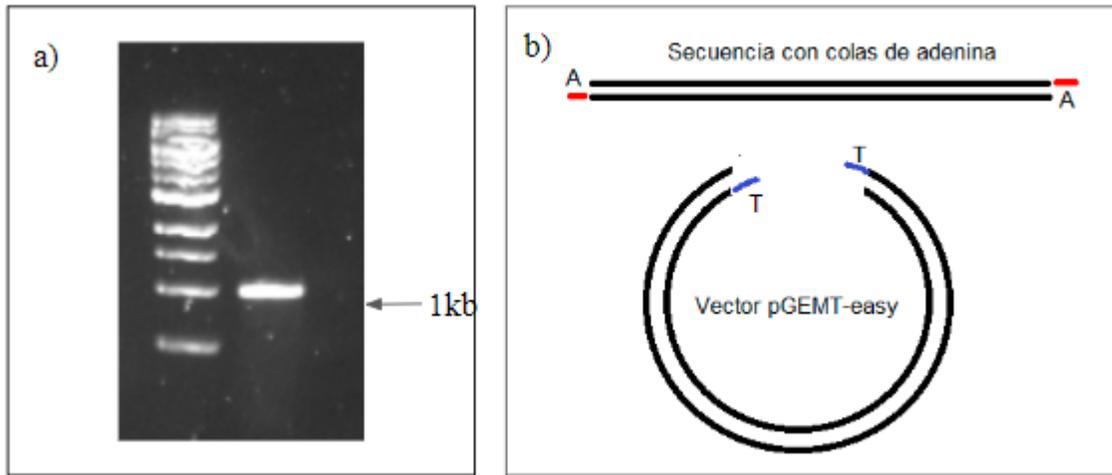


Figura 10 Subclonación TA: al producto de la muta génesis sitiodirigida, *GtXyn10A\_Q124E* se le agregaron las colas de adenina para posterior ligación al plásmido *pGEM-T Easy*. a) Los productos de la reacción de PCR fueron cargados y corridos en un gel de agarosa al 1% y fotografiado bajo luz UV con tinción con GelRed. Carril izquierdo: Ladder de peso molecular. Carril derecho: gen *GtXyn10A\_Q124E* producto de la mutación sitio-dirigida, después de la reacción de adenilación, que generó un producto de PCR de aproximadamente 1 kb. b) Resultado de adenilación en una secuencia nucleotídica, y diagrama del vector *pGEM-T easy* y sus timidinas desapareadas en los extremos.

El producto de PCR de subclonación TA del gen *GtXyn10A\_Q124E*, fue ligado al vector *pGEM-T Easy* con T4 ligasa para luego ser transformado en células quimiocompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$ . El vector *pGEM-T Easy* contiene el gen *lacZ* que produce la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual, al expresarse en la bacteria, forma una colonia de color azul en la presencia de X-gal en el medio de crecimiento. Esto es útil para hacer una selección de colonias transformadas por medio del color de las mismas. Las colonias blancas resultan cuando el gen de estudio se ha insertado en el plásmido correctamente, irrumpiendo en la secuencia del gen de *lacZ*, lo cual evita que se exprese la  $\beta$ -galactosidasa y por lo tanto hace que no haya reacción con el X-gal. En la Figura 11 se muestran las colonias resultantes luego de sembrar las células *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con *pGEM-T Easy-GtXyn10A\_Q124E* (Figura 11a). Como control positivo de transformación se usó el vector *pBlueScript* que también posee el gen *lacZ* produciendo colonias azules cuando no se ha introducido inserto (Figura 11b). De cientos de colonias desarrolladas se seleccionaron 17 colonias de células transformadas (Figura 11), de las cuales sólo 4 de ellas fueron azules. Las trece colonias blancas restantes corresponden a las células transformadas exitosamente. De estas trece colonias, cuatro se eligieron para verificar la secuencia nucleotídica del gen transformado en cada una de las cuatro colonias. Las muestras fueron enviadas a secuenciar a Macrogen (Corea).

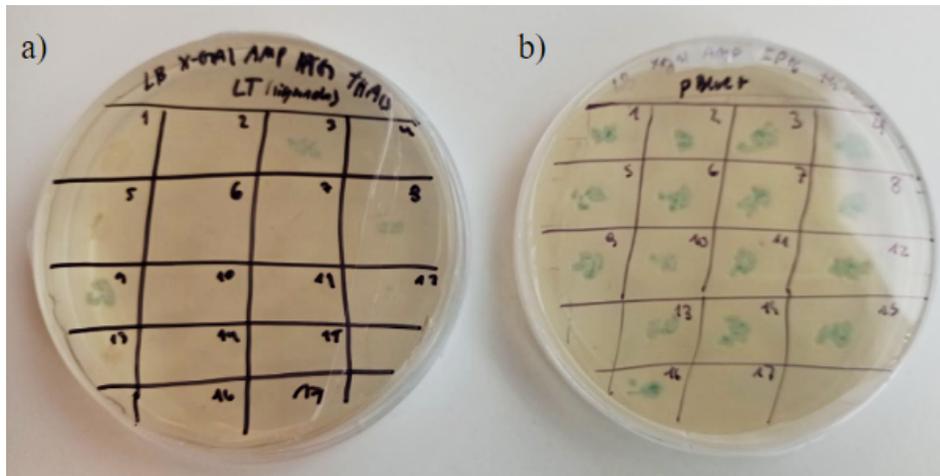
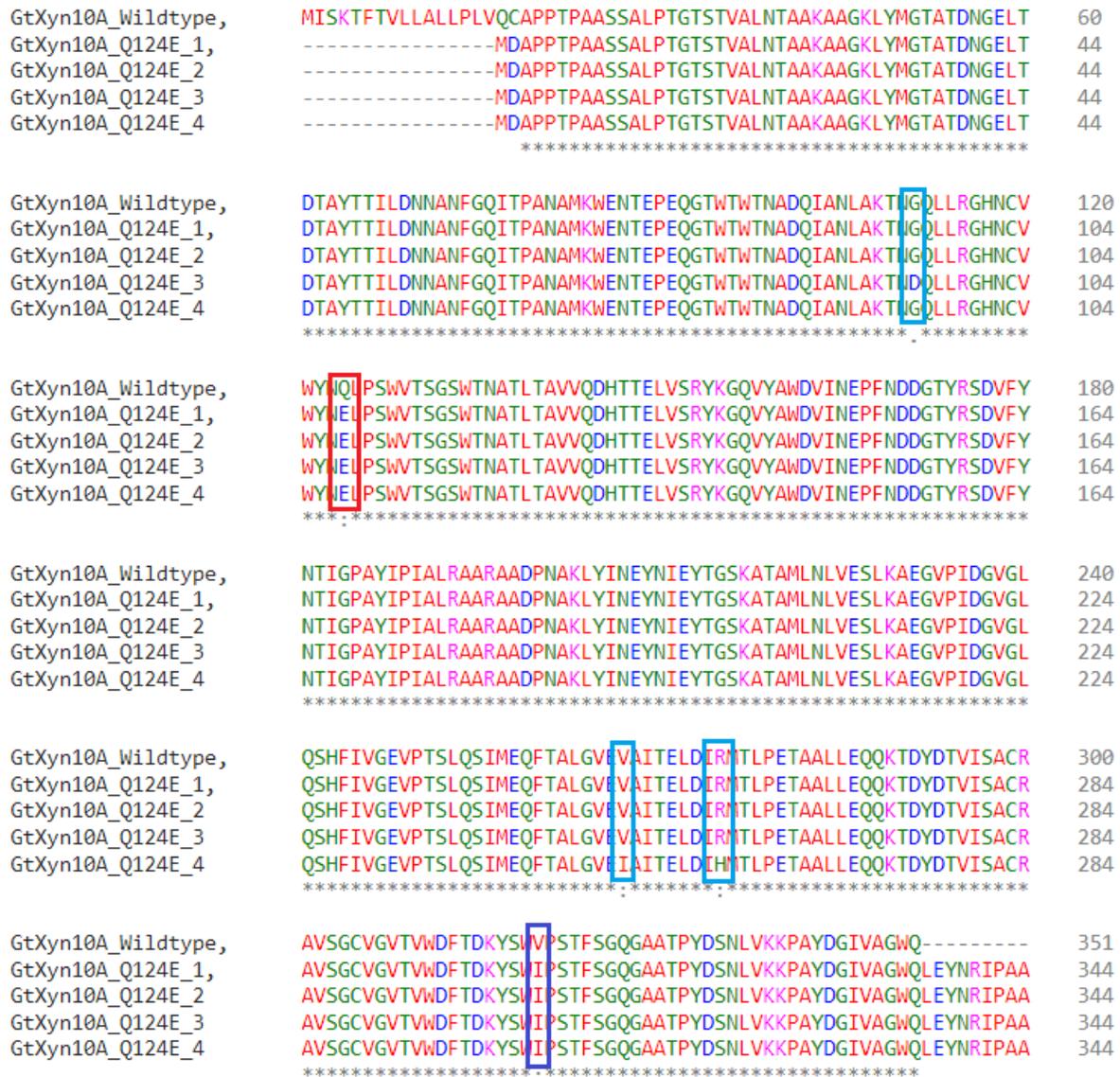


Figura 11 Transformación de células DH5α y selección de transformadas con pGEM-T Easy-GtXyn10A\_Q124E. a) Cápsula de Petri sembrada con células DH5α transformadas con pGEM-T Easy-GtXyn10A\_Q124.; de ésta placa se seleccionaron cuatro colonias al azar. b) Cápsula de Petri sembrada con células DH5α transformadas con pBlueScript como control positivo de la transformación.

La secuencia nucleotídica producto de la secuenciación de las cuatro colonias seleccionadas fue traducida a una secuencia aminoacídica usando un programa de traducción de nucleótidos a aminoácidos Expasy Translate (Swiss Model). Este programa traduce la secuencia nucleotídica directa y reversa, además de dar resultados de los 3 marcos de lectura posibles para cada uno de los genes. Al buscar la secuencia aminoacídica de la secuencia de GtXyn10A silvestre, se puede hacer coincidir con parte de la secuencia de la mutante, reconociendo el marco indicado de lectura.

Como se observa en la Figura 12, el alineamiento de GtXyn10A y las secuencias aminoacídicas obtenidas de las cuatro colonias transformadas con el gen GtXyn10A\_Q124E, muestra que todas poseen la mutación diseñada Q124E. A su vez, se observa una mutación no intencional en todas ellas, en la posición 304 de GtXyn10A\_Q124E, donde Val fue sustituida por Ile (V304I). Se observa además que GtXyn10A\_Q124E\_3, gen obtenido de la tercera colonia, posee una segunda mutación no intencional que sustituye Gly por Asp en posición 95 de GtXyn10A\_Q124E (G95D). Por último, la secuencia correspondiente a la Colonia 4 posee una tercera y cuarta mutación no intencionales que substituye Val por Ile en posición 251 (V251I) y Asn por His en posición 259 (R259H). Se observa que la secuencia de las colonias GtXyn10A\_Q124E\_1 y GtXyn10A\_Q124E\_2 no poseen ninguna otra mutación aparte de las indicadas, por lo que se seleccionó la primera colonia para realizar el resto de los experimentos.

Figura 12. Alineación de secuencias de los genes *GtXyn10A* y *GtXyn10A\_Q124E*, obtenidos de cuatro clones de *E. coli* DH5a seleccionadas con el screening de colonias blancas. La



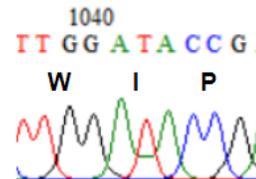
alineación se realizó mediante el programa Clustal Omega. Se observa enmarcado en rojo que la mutación deseada Q124E se realizó efectivamente en los 4 genes seleccionados. Enmarcado en azul se encuentran algunas mutaciones no intencionales de algunas colonias particulares, y en azul oscuro la mutación que tuvieron todas las colonias mandadas a secuenciar. Simbología: “\*”: aa idénticos, “.”: aa algo similares, “.”: aa muy similares.

Las razones por las que se produjeron mutaciones no intencionales son discutibles y podrían tener variado origen. En particular, esto puede ser debido a:

- Errores de la polimerasa durante la mutagénesis sitio dirigida por Overlap Extension PCR.
- Errores de secuenciación.

La mutación V304I en todas las colonias se puede explicar por una mutación no intencional que ocurrió en una etapa temprana de la mutagénesis sitio dirigida, en la amplificación del fragmento de 700 pb (donde se encuentra la mutación), que fue heredada en los siguientes pasos durante las amplificaciones. La segunda alternativa, es que la secuenciación del DNA de las cuatro colonias no fuese correcta. Por una parte, porque es difícil que haya un error de lectura que se repita exactamente igual cuatro veces. En segundo lugar, el electroferograma de secuenciación muestra un peak normal sin superposiciones en la sección de este aminoácido, como se muestra en la Figura 13.

En la secuencia de la enzima silvestre, el aminoácido valina 304 (V304) está codificado por un triplete "GTA", en tanto que los cuatro genes mutantes muestran la secuencia "ATA" por lo que hubo una mutación singular de "G" a "A", resultando en la codificación de isoleucina.



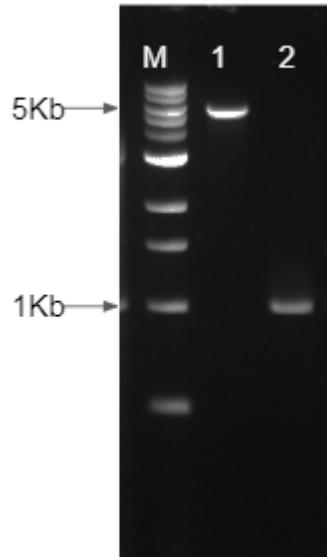
*Figura 13. Electroferograma de la secuenciación de una de las colonias de GtXyn10A\_Q124E. Se observa que el primer "A" de la isoleucina (I, triplete ATA), en verde, tiene un peak alto, sin otro peak de otro nucleótido.*

Los tripletes de valina e isoleucina se diferencian solo en su primer nucleótido ("GTA" para valina, "ATA" para isoleucina), por lo que la mutación fue única en este nucleótido.

### 3.3 Clonamiento de GtXyn10A en el vector de expresión pET22b(+)

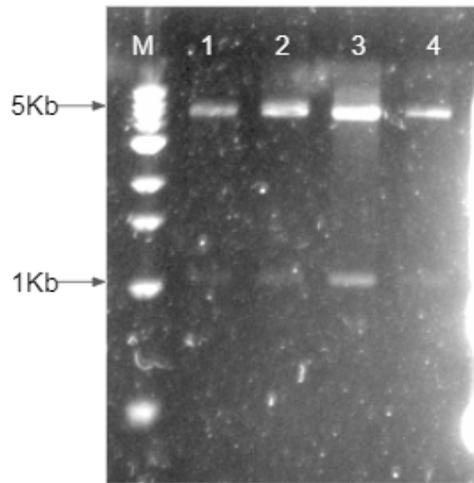
Para el tercer objetivo específico, que es producir la variante mutante de GtXyn10A en *E. coli*, se realizó la producción de GtXyn10A y GtXyn10A\_Q124E, las xilanasas silvestre y mutada respectivamente. Con el propósito de expresar el gen GtXyn10A\_Q124E para síntesis recombinante de la enzima en grandes cantidades, se usó la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual posee 2 grandes ventajas, que son la carencia de proteasas que podrían degradar la enzima recombinante, y poseer los genes para la producción de la maquinaria para la síntesis de la ARN polimerasa T7. Los genes de la xilanasas silvestre y mutada fueron subclonados en el plásmido pET22b(+), el cual posee el promotor de la ARN Polimerasa T7 bajo el control del operón lac inducible con IPTG. La ARN Polimerasa T7 permite la transcripción masiva de genes que están bajo su control, permitiendo la síntesis de grandes cantidades de enzima recombinante [21].

Para todos los experimentos con la enzima mutada se eligió la colonia que contiene el gen de la colonia 1 (GtXyn10A\_Q124E\_1), por su bajo número de mutaciones no intencionales en comparación a las otras colonias secuenciadas. Este gen fue extraído y escindido de pGEM-T Easy con las enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI* para luego ser insertados en el vector pET22b(+), obtenido de una cepa de *E. coli* TOP10 con dicho vector. Se verificó el tamaño de los fragmentos a ligar de pET22b(+) y del gen mutante cortados con enzimas de restricción *NcoI* y *XhoI*, tal que puedan ser ligados con extremos cohesivos. Los fragmentos cortados se observan en la Figura 14.



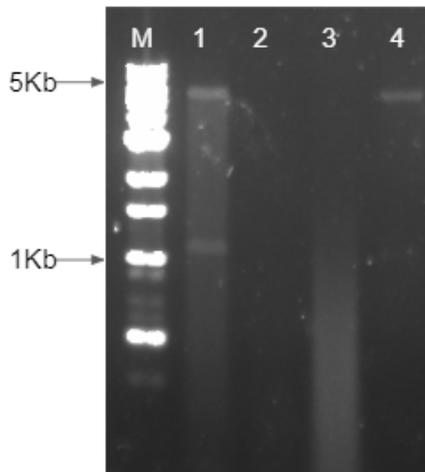
*Figura 14 Gel de agarosa 1% con fragmentos de pet22b y gen mutado. El carril M es el marcador molecular, en que se destacan los tamaños importantes, correspondientes a 5 Kb para el carril 1 que es el vector pet22b cortado, y 1 Kb en el carril 2, que corresponde al gen mutante, cortados con *NcoI* y *XhoI* cada uno.*

Estos fragmentos se ligaron con ligasa T4 toda la noche a 16°C. Los resultados de la extracción y digestión de los plásmidos de estas colonias (digeridos con *XhoI* y *NdeI*) se observan en la Figura 15. Se puede ver que hay una banda de 5kb en las 4 colonias que corresponde al largo de pET22b(+) y una banda de 1kb correspondiente al gen mutado, por lo que la transformación fue un éxito.



*Figura 15 Gel agarosa de confirmación de inserción del gen en pET22b(+). Carril M es el marcador molecular, y del 1-4 son las colonias elegidas para verificar el inserto. En cada uno, se observa una banda de 1kb, correspondiente al gen mutado que se ligó al vector pET22b(+).*

Luego se transformó *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos extraídos de las colonias 1 y 2 para la producción recombinante de enzima mutada. Se obtuvieron colonias luego de la transformación y se realizó el mismo procedimiento de extracción y digestión desde 2 colonias para verificar que hayan sido transformadas con el vector mutado. Los resultados se muestran en la Figura 16, en la que se observa que al menos la colonia 1 del carril “1” posee el vector pET22b(+) de 5 kb y el gen mutado de 1 kb. El resto de las colonias en carriles 2, 3 y 4 no se alcanza a apreciar las dos bandas. Esto se puede deber a la baja cantidad de plásmido que producen las células BL21(DE3), además de que éstas poseen nucleasas que pueden degradar el plásmido extraído durante la extracción con miniprep.



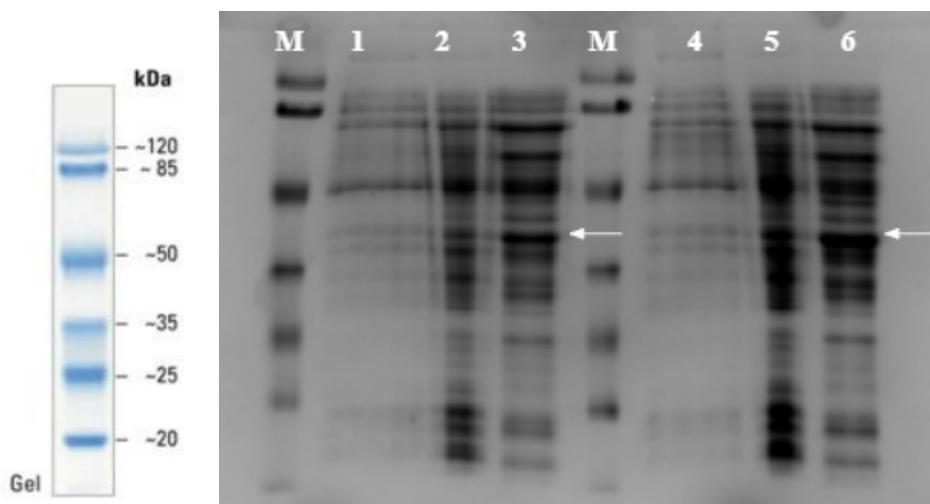
*Figura 16 Gel agarosa de confirmación de transformación del vector ligado correctamente en células BL21(D3). Carril M es el marcador molecular, y del 1-4 son las colonias elegidas para verificar el inserto. En cada uno, se observa una banda de 1 kb, correspondiente al gen mutado que se ligó al vector pET22b(+).*

Se realizaron dos cultivos con medios Terrific-Broth de 300 ml con 100  $\mu\text{m}/\text{ml}$  de antibiótico carbecinilina cada uno, para enzima silvestre y mutante Q124E. Se indujeron con IPTG cuando su densidad óptica a 600 nm calzó el valor de 0,4, y se dejó a 20°C toda la noche en una incubadora a 200 rpm.

Al día siguiente, se realizaron los métodos de separación descritos en el informe: centrifugación para separar las células, precipitación de sales sulfato de amonio con saturación al 80%, diálisis, y finalmente cromatografía iónica con la columna de Q-Sefarosa de 8 ml, en un rango de 3 días.

Se realizó un gel de poliacrilamida al 12,5% y SDS-PAGE para observar la presencia y grado de separación de proteína la enzima GtXyn10A, observado en la Figura 17. En esta, se puede ver que la muestra de sobrenadante se encuentra más diluida que las demás. Esto tiene sentido, ya que, en la precipitación de sales y diálisis, se concentraron la mayoría de las proteínas del sobrenadante, pasando de un volumen de aproximadamente 300ml de sobrenadante de cultivo a 23ml de proteínas precipitadas. Por esto, se obtiene mayor definición de proteínas rescatadas desde la cromatografía iónica.

El gel de proteínas no presenta alto nivel de purificación como muestra el carril 3 y 6 (última etapa para enzima silvestre y mutada, respectivamente), por la gran cantidad de barras notorias además de la correspondiente a 37kDa (tamaño reportado de GtXyn10A [14]). Esto afectará la medición de actividad catalítica de las enzimas, ya que hay factores extra que no permiten una medición precisa.



*Figura 17 Gel de proteínas de enzima silvestre y mutante en diferentes etapas de separación. "M" se refiere al marcador de peso molecular de proteínas. Los carriles 1, 2 y 3 son respectivamente una muestra del sobrenadante inicial, resultado de la diálisis y resultado del pooling luego de la cromatografía para la enzima silvestre. Los carriles 4, 5 y 6 son lo mismo, pero para la enzima mutante. Se puede distinguir la barra de 37 kDa (indicada con las flechas*

blancas) más notoria en los carriles de pooling, correspondiente a la GtXyn10A silvestre y mutante [14].

En la Tabla 3 y Tabla 4 se muestran los parámetros de purificación de la enzima silvestre y mutante respectivamente.

*Tabla 3 Tabla de purificación de enzima GtXyn10A silvestre a 50°C, por 10 minutos de reacción a pH 5.*

Etapa	Sobrenadante	Diálisis	Cromatografía
Volumen (L)	0,3	0,023	0,018
U/L	1170,027	3916,49 6	4493,565
Concentración Proteína (g/L)	1,846	5,304	1,073
Proteína total (g)	553,894	121,984	19,323
U	351,008	90,079	80,884
Act. específica (U/mg)	0,634	0,738	4,186
Purificación	1	1,165	6,605
Rendimiento (%)	100	25,663	23,043

*Tabla 4 Tabla de purificación de enzima GtXyn10A mutada Q124E a 50°C, por 10 minutos de reacción a pH 5.*

Etapa	Sobrenadante	Diálisis	Cromatografía
Volumen (L)	0,3	0,023	0,018
U/L	1191,353	6278,767	5869,681
Concentración Proteína (g/L)	1,729	5,539	1,124
Proteína total (g)	518,603	127,396	20,227
U	357,406	144,412	105,654
Act. específica (U/mg)	0,689	1,134	5,223
Purificación	1	1,645	7,579
Rendimiento (%)	100	40,405	29,561

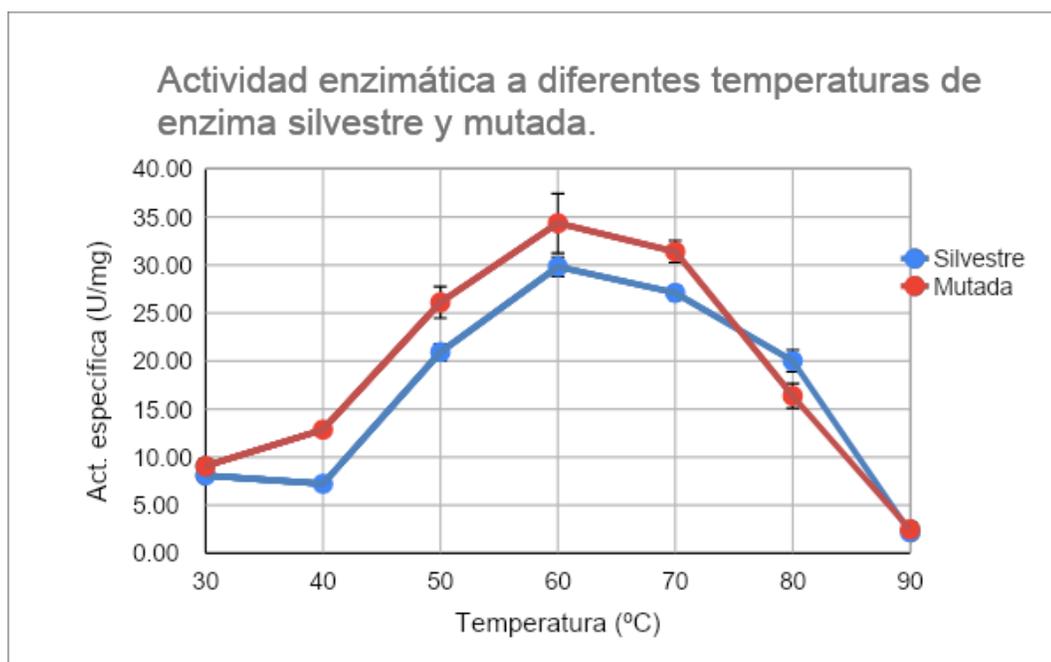
Los valores de absorbancia para el cálculo de la concentración de proteínas y la curva de calibración usada se pueden ver en el Anexo 1.1. La concentración de cada fracción en ambas tablas de separación es coherente entre cada fracción de purificación

Se puede observar de ambas tablas que se tienen valores similares de actividad específica, purificación y rendimiento final (luego de la cromatografía) entre ambas enzimas, lo que indica similitud entre ambas enzimas a pesar de la mutación.

Los valores de actividad específica son bajos por el bajo nivel de purificación o separación de contaminantes u otras proteínas. El valor de actividad específica de una enzima purificada apropiadamente es del orden de los 1000, como en el trabajo de You, et al., que muestra que la enzima Xyl10C pura tiene actividad específica de 8600 [19].

### 3.3.1 Comparación de la dependencia de la actividad con diferentes temperaturas.

A continuación, se realizaron ensayos de actividad enzimática de las enzimas en el pool (fracción más separada de otros contaminantes) de GtXyn10A silvestre y mutada a diferentes temperaturas desde 30°C hasta 90°C. Esta comparación se hizo para observar los cambios en la actividad catalítica que podría haber producido la mutación Q124E en la xilanasa. Se muestran los resultados de la actividad enzimática en actividad específica de cada proteína a estas temperaturas en la Figura 18. También se puede ver la actividad relativa de cada enzima en la Figura 19.



*Figura 18 Actividad específica de GtXyn10A silvestre y mutante. Se observa la misma curva a casi la misma cantidad de actividad específica para cada temperatura. U/g fue calculado como  $U(\mu\text{M/L} \cdot \text{min de xilosa producidos}) \cdot \text{gramos de proteínas totales}$ .*

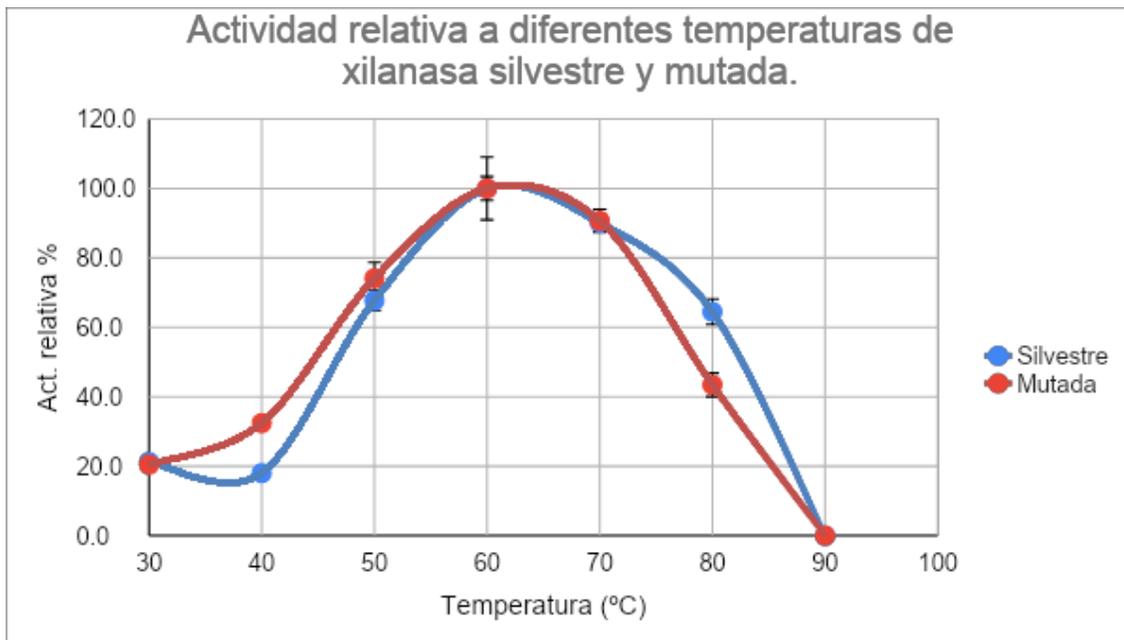


Figura 19 Actividad relativa de enzimas GtXyn10A silvestre y mutante Q124E.

Debido al nivel de contaminantes que tienen las muestras de enzima usada (luego de cromatografía), los valores de la Figura 18 no predicen con precisión los valores de actividad específica de cada enzima. Por tanto, no se podría decir que la enzima mutada tiene mejor actividad que la enzima silvestre a menores temperaturas, a pesar que así se ve en el gráfico incluido con los errores, que muestran que son diferentes valores. Hace falta una mayor purificación y caracterización de las enzimas para compararlas y medir su actividad específica correcta, sin embargo, al verse ambas similares, se observa que la enzima mutada es al menos igual o no tiene mucho cambio respecto a la silvestre.

Desde la Figura 19, se puede apreciar de manera normalizada las curvas que tienen las actividades de las enzimas a las diferentes temperaturas. Se observa que la curva de actividad de la enzima mutada es más amplia que la silvestre en temperaturas moderadas, lo que indica una posible mejora de actividad a estas temperaturas de la enzima mutada. Esto requeriría confirmación a partir de una purificación adecuada de ambas enzimas para la comparación de sus actividades y sus parámetros cinéticos.

En la Figura 18, también se observa que la actividad de la enzima silvestre a 40°C baja en respecto a la de 30°C, que debe ser un error de medición en el momento, ya que teóricamente la actividad debería subir hasta alcanzar su temperatura óptima. Este suceso contribuye al hecho de que los valores de actividad pueden verse influenciados por factores externos al experimento. Además, es sabido que el ensayo de azúcares reductores con DNS no es el más eficaz para medir la actividad xilanasa de las GH10 [7].

Las posibilidades del cambio en actividad catalítica de la enzima mutada y silvestre se explican según las diferencias que se lograron gracias a la mutación sitio-dirigida en el lugar del sitio activo de cada enzima.

*Tabla 5 Tabla de comparación de residuos del sitio activo entre Xyl10C y GtXyn10A. En azul se muestra el residuo a mutar; en naranja los residuos que permanecen iguales en ambas xilanasas; en rojo las que difieren en las xilanasas. Las funciones de los residuos fueron sacadas de You et al y del análisis de secuencia para encontrar los aminoácidos catalíticos de GtXyn10A. El ligando corresponde a la xilobiosa.*

Posición en Xyl10C	Residuo	Posición en GtXyn10A	Residuo	Función
132	N (Asn)	81	N (Asn)	Unión a ligando
135	K (Lys)	84	K (Lys)	Unión a Glu124 y ligando
137	M (Met)	86	E (Glu)	Unión a Glu124
168	H (His)	117	H(His)	Unión a ligando
175	E (Glu)	124	Q (Gln)	Estructural, lugar de mutación
218	N (Asn)	165	N (Asn)	Unión a ligando
219	E (Glu)	166	E (Glu)	Residuo catalítico
300	E (Glu)	241	Q (Gln)	Unión a ligando
332	E (Glu)	271	E (Glu)	Catalítico
372	W (Trp)	311	W (Trp)	Unión a ligando

La Tabla 5 muestra en forma comparativa los residuos de aminoácidos que participan en el sitio activo de XYL10C y GtXyn10A incluyendo los ácidos glutámicos catalíticos, y el residuo estructural E175. Se observa que solo 2 aminoácidos difieren, uno de ellos es la metionina 137 en XylC, que es el ácido glutámico 86 de GtXyn10A, y el ácido glutámico (E300) en Xyl10C, que corresponde a la glutamina en GtXyn10A (Q241). Se concluye que no habrían mayores diferencias en el sitio activo, y que se podrían ver los cambios esperados en actividad catalítica con la mutación Q124E en GtXyn10A, ya que en las xilanasas Xyl10C y XylE habían diferentes aminoácidos en el sitio activo también (Figura 5, d), pero XylE mostró un aumento en su actividad catalítica a pesar de esto. Por tanto, se deduce que lo mismo pasaría con GtXyn10A.

Una comparación de 50 xilanasas de la familia GH10 mediante alineamiento de la secuencia, muestra que cuatro de ellas tienen glutamina en este sitio, equivalente a E175 de Xyl10C [19]. De acuerdo a la estructura tridimensional de esta xilanasas, E175 interactúa con Lys135 y Met137 del loop 2 de la proteína por lo que se piensa que podría tener una importante función en la estabilización del complejo formado por la enzima con el sustrato influenciando la actividad catalítica de XYL10C. De hecho, You y cols. [19] demostraron que al mutar solamente este residuo E175 sustituyéndolo por otros 19 aminoácidos diferentes, todos redujeron su eficiencia catalítica ( $K_m$ ) entre 50 y 10%. A su vez, estos autores mostraron que al mutar el residuo Gln116 de XylE, en posición equivalente a E175 de Xyl10C, aumenta su actividad catalítica en 370% [19]. Estas evidencias indican la importancia clave de este residuo estructural E175 de XYL10 por lo que se decidió mutar el residuo equivalente en GtXyn10A, Gln124 a ácido glutámico (Q124E). Esta mutación coincide con la que se realizó en XylE (Q116E), que incrementó su actividad en casi cuatro veces como se mencionó anteriormente. En la Tabla 6 se observan la actividad específica,  $K_m$ ,  $K_{cat}/K_m$ , temperatura y pH óptimos de Xyl10C, XylE y XynE2.

Considerando el rol de E175 en la actividad catalítica de Xyl10C, se procedió a seleccionar el aminoácido equivalente en la estructura de GtXyn10A, bajo la hipótesis de que este cambio provocará un cambio estructural en las propiedades de la enzima, y en consecuencia incrementando la actividad de esta xilanasas a temperaturas moderadas.

*Tabla 6 Propiedades de las enzimas xilanasas GH10 Xyl10C, XylE y XylE2 usadas por You y cols. [19]*

Parámetro	Actividad específica (U/mg)	pH óptimo	Temperatura óptima (°C)	$K_m$ (mg/ml)	$K_{cat}/K_m$ (ml/s/mg)
Xyl10C	8700	4,0	80	0,71	8800

XylE	620	5,0	70	1,01	490
XynE2	870	8,0	65	0,93	1600

Las propiedades de valina e isoleucina son similares, ambos siendo aminoácidos con cadena lateral sin carga. La única diferencia es que isoleucina tiene un carbono más en la cadena, por lo que se propone que no habría mayores cambios en la función de la enzima por esta mutación no intencional. Por lo tanto, se espera que su presencia no interfiera en la interpretación del efecto de la mutación Q124E en las propiedades de GtXyn10A. En un intento por verificar que no hay mayores cambios conformacionales, se introdujo la mutación en la estructura de GtXyn10A\_Q124E utilizando Pymol. Los cambios geométricos pueden ser visualizados predictivamente en la Figura 20, que incluye la mutación Q124E en magenta y en celeste la valina e isoleucina.

Esta mutación extra de isoleucina en esta posición puede alterar la forma del sitio activo, por ejemplo, desplazando el Trp311, lo que puede ser un cambio deletéreo para el sitio activo y afectar negativamente la actividad de la enzima. Es necesario purificar correctamente las enzimas silvestre y mutante para poder hacer una comparación de actividad enzimática y determinar si esta mutación no intencional tuvo un efecto a pesar de la mutación principal.

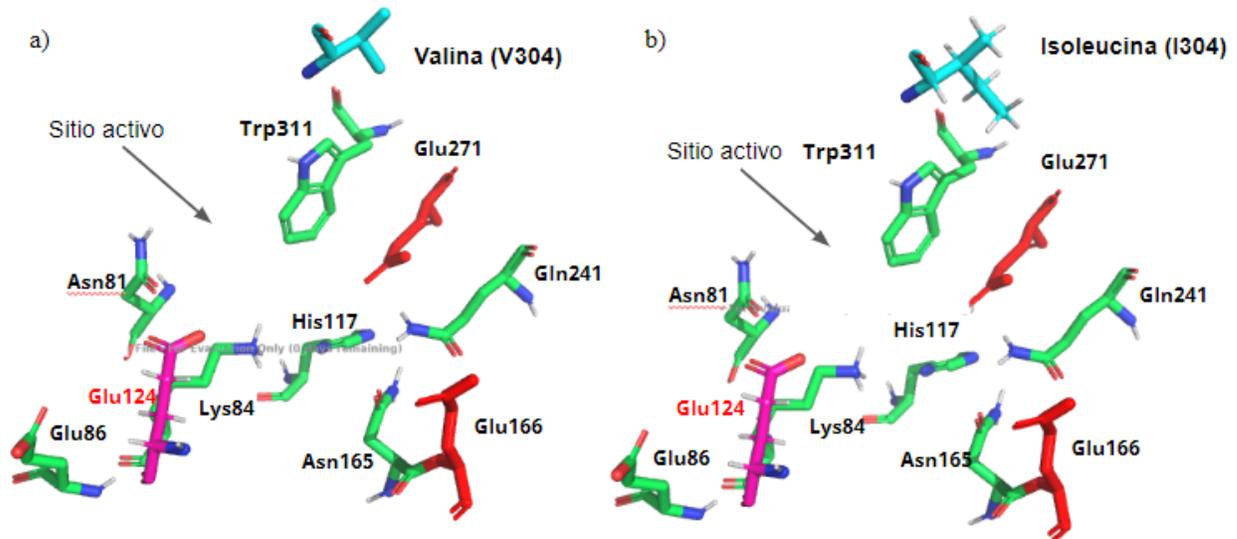


Figura 20 a) Modelo 3D del sitio activo de GtXyn10A\_Q124E con valina V304 (aminoácido en celeste). b) Modelo 3D del sitio activo de GtXyn10A\_Q124E con isoleucina I304 (aminoácido en celeste). Los aminoácidos en rojo son los ácidos glutámicos catalíticos. En magenta se muestra la mutación Q124E. Se observa que la geometría del aminoácido I304 en el contexto tridimensional del sitio activo no cambia respecto a V304, excepto una cadena de un carbono más a la derecha del sitio activo.

## 4. Conclusiones

En conclusión, se logró completar los objetivos. Los dos primeros objetivos específicos, de modelar computacionalmente un modelo 3D con herramientas bioinformáticas la enzima GtXyn10A y la identificación de un residuo Q124 que podría ser clave en la actividad enzimática, como ha mostrado ser su equivalente en función y posición en otras 2 xilanasas XYL10C, XylE y XylE2. Se logró introducir una mutación puntual Q124E en su secuencia aminoacídica utilizando herramientas de biología molecular, aunque el método experimental trajo consigo una mutación no intencional en otra posición.

De acuerdo a la discusión presentada en la sección Resultados y Discusión, es poco probable que esta mutación no intencional V304I tenga algún efecto significativo sobre la actividad enzimática de GtXyn10A\_Q124\_1, sin embargo, si acaso tiene consecuencias en la actividad funcional de la enzima, debe ser considerado.

El último objetivo, sobre la producción y comparación de las actividades enzimáticas de las enzimas GtXyn10A silvestre y mutada, se logró hacer y llegar a conclusiones preliminares sobre las diferencias entre las actividades. Los resultados muestran que la enzima mutada posiblemente tenga una actividad xilanasas levemente mayor a temperaturas moderadas (entre 30°C-60°C), que es lo que se planteaba como objetivo. Sin embargo, un estudio con la comparación con las enzimas purificadas adecuadamente es necesario para llegar a esa conclusión totalmente.

## 5. Proyecciones a futuro

En las discusiones se menciona el bajo nivel de purificación que se tuvo de las GtXyn10A silvestre y mutante. Por tanto, como primera proyección, se sugiere purificar adecuadamente estas enzimas luego de la producción recombinante. Esto puede hacerse agregando etapas de purificación, como una cromatografía de afinidad (IMAC) usando la cola de histidinas que posee la traducción de pET22b(+), que debería estar presente en las xilanasas expresadas. Para esta cromatografía, se debe intentar usar varios buffers, ya que la bibliografía muestra que el buffer con fosfato puede denaturar la xilanasas GtXyn10A.

Luego de obtener una proteína pura, se debe hacer una caracterización correspondiente a ambas enzimas silvestre y mutante, ya que la proteína no ha sido expresada usando sistema con *E. coli*. Se puede intentar expresar la GtXyn10A con la mutación Q124E expresada usando *Pichia pastoris* como sistema recombinante y medir su actividad enzimática para obtener mejor factibilidad de su uso comercial para obtener XOS.

Finalmente, se debería proyectar ver el impacto de la mutación no deseada V203I en la actividad enzimática, y observar si la mutación Q124E aumenta la actividad sin la influencia de esta mutación.

## 6. Bibliografía

- [1] Achary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
- [2] Amorim, C., Silvério, S. C., Prather, K. L. J., & Rodrigues, L. R. (2019). From lignocellulosic residues to market: Production and commercial potential of xylooligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 37(7), 107397. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.05.003>
- [3] Vázquez, M. J., Alonso, J. L., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2000). Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends in Food Science & Technology*, 11(11), 387–393. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00031-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00031-0)
- [4] Finegold, S. M., Li, Z., Summanen, P. H., Downes, J., Thames, G., Corbett, K., Dowd, S., Krak, M., & Heber, D. (2014). Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food & Function*, 5(3), 436. <https://doi.org/10.1039/c3fo60348b>

- [5] Carvalho, A. F. A., Neto, P. de O., da Silva, D. F., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>
- [6] Naidu, D. S., Hlangothi, S. P., & John, M. J. (2018). Bio-based products from xylan: A review. *Carbohydrate Polymers*, 179, 28–41. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.064>
- [7] Santibáñez, L., Henríquez, C., Corro-Tejeda, R., Bernal, S., Armijo, B., & Salazar, O. (2021). Xylooligosaccharides from lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Carbohydrate Polymers*, 251, 117118. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117118>
- [8] Wang, X., Luo, H., Yu, W., Ma, R., You, S., Liu, W., Hou, L., Zheng, F., Xie, X., & Yao, B. (2016). A thermostable *Gloeophyllum trabeum* xylanase with potential for the brewing industry. *Food Chemistry*, 199, 516–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.028>
- [9] Tovar, O. (2015). *EVALUACIÓN DE UN MATERIAL LIGNOCELULÓSICO PARA LA PRODUCCIÓN DE CELULASAS, XILANASAS Y LACASAS POR BASIDIOMICETOS DEL NORESTE DE MÉXICO*, Universidad de Nueva León, México.
- [10] Chow, J. (2002). Probiotics and prebiotics: A brief overview. *Journal of Renal Nutrition*, 12(2), 76–86. <https://doi.org/10.1053/jren.2002.31759>
- [11] G. R. Gibson et al., “Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics,” *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 14, no. 8, pp. 491–502, 2017, doi: 10.1038/nrgastro.2017.75.
- [12] Finegold, S. M., Li, Z., Summanen, P. H., Downes, J., Thames, G., Corbett, K., Dowd, S., Krak, M., & Heber, D. (2014). Xylooligosaccharide increases bifidobacteria but not lactobacilli in human gut microbiota. *Food & Function*, 5(3), 436. <https://doi.org/10.1039/c3fo60348b>
- [13] Bhardwaj, N., Kumar, B., & Verma, P. (2019). A detailed overview of xylanases: an emerging biomolecule for current and future prospective. *Bioresources and Bioprocessing*, 6(1), 40. <https://doi.org/10.1186/s40643-019-0276-2>
- [14] Sanhueza, C., Carvajal, G., Soto-Aguilar, J., Lienqueo, M. E., & Salazar, O. (2018). The effect of a lytic polysaccharide monoxygenase and a xylanase from *Gloeophyllum trabeum* on the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic residues using a commercial

cellulase. *Enzyme and Microbial Technology*, 113, 75–82.

<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.11.007>

[15] Soto, J. (2016). "EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA MEZCLA DE PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD TIPO EXPANSINA Y XILANASAS SOBRE LA ACCIÓN HIDROLÍTICA DE CELULASAS EN RESIDUOS LIGNOCELULÓSICOS. Universidad de Chile, Santiago de Chile. [<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/186341>]

[16] Collins, T., Gerday, C., & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 3–23.

<https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.06.005>

[17] Xiong, K., Xiong, S., Gao, S., Li, Q., Sun, B., & Li, X. (2018). Improving Hydrolysis Characteristics of Xylanases by Site-Directed Mutagenesis in Binding-Site Subsites from *Streptomyces* L10608. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 834.

<https://doi.org/10.3390/ijms19030834>

[18] Wang, X., Zheng, F., Wang, Y., Tu, T., Ma, R., Su, X., You, S., Yao, B., Xie, X., & Luo, H. (2017). Improvement of the catalytic efficiency of a hyperthermophilic xylanase from *Bispora* sp. MEY-1. *PLOS ONE*, 12(12), e0189806.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189806>

[19] You, S., Chen, C.-C., Tu, T., Wang, X., Ma, R., Cai, H., Guo, R.-T., Luo, H., & Yao, B. (2018). Insight into the functional roles of Glu175 in the hyperthermostable xylanase XYL10C- $\Delta$ N through structural analysis and site-saturation mutagenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 11(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13068-018-1150-8>

[20] Ahmad, I., Nawaz, N., Darwesh, N. M., ur Rahman, S., Mustafa, M. Z., Khan, S. B., & Patching, S. G. (2018). Overcoming challenges for amplified expression of recombinant proteins using *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 144, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2017.11.005>

[21] Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40 (2018).

[22] Lee GR, Won J, Geo L, Seok C. GalaxyRefine2: Simultaneous refinement of inaccurate local regions and overall protein structure. *Nuclear Acids Research* 47(W1):W452-5 (2019)

[23] Krieger E, Koraimann G, Vriend G "Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA—a self-parameterizing force field". *Proteins*. 47 (3): 393–402 (2002)

- [24] Williams et al. MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. *Protein Science* 27: 293-315 (2018)
- [25] Schrödinger LLC. The PyMOL Molecular Graphics System. 1.3 (2010).
- [26] Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28:235–42 (2000)
- [27] Larkin M a, Blackshields G, Brown NP, et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–8 (2007)
- [28] Arnold K, Bordoli L, Kopp J, et al. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22:195–201 (2006)
- [29] Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., & Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, 77(1), 51–59. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(89\)90358-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(89)90358-2)
- [30] Bernal, S. (2020). *Mutación sitio dirigida de una xilanasa del hongo Gloeophyllum trabeum para la producción de xilooligosacáridos*. Memoria de Universidad de Chile para optar a título de Ingeniero molecular en Biotecnología. Santiago de Chile.
- [31] Merck, Fractional Precipitation Protocol for Affinity Chromatography Samples (2018) en línea  
[<https://www.sigmaaldrich.com/CL/es/technical-documents/protocol/protein-biology/protein-purification/fractional-precipitation>]

## 7. Anexos

### Anexo 1.1 Datos crudos y curva de calibración Bradford y DNS

*Tabla 7 Absorbancias 550nm de ensayos DNS en triplicado a diferentes temperaturas para enzima silvestre y mutante*

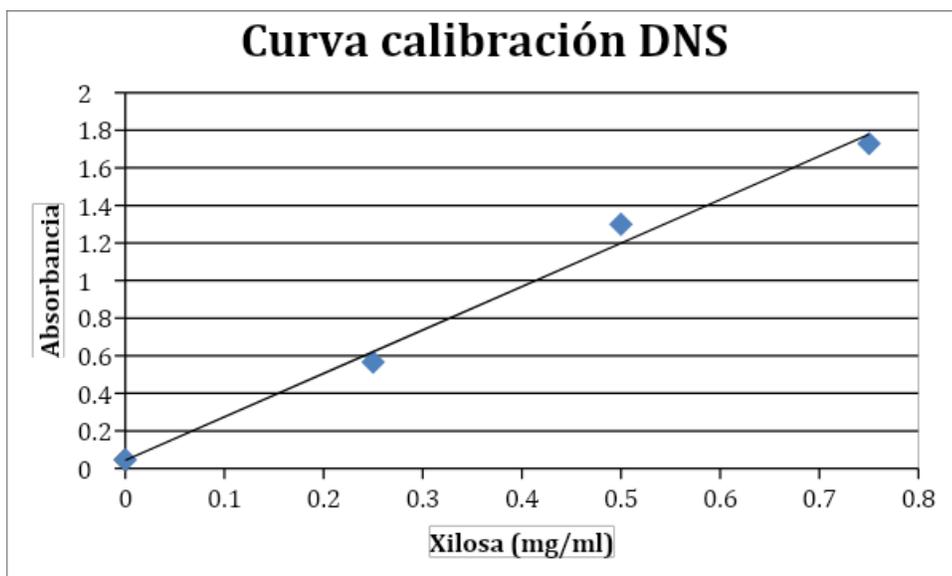
Temperatura (°C)	Silvestre			Mutante		
	abs 1	abs 2	abs 3	abs 1	abs 2	abs 3
30	0,309	0,326	0,303	0,336	0,399	0,361
40	0,295	0,292	0,25	0,513	0,514	0,525
50	0,821	0,823	0,763	1,065	0,974	1,102
60	1,097	1,16	1,169	1,24	1,405	1,483
70	1,01	1,068	1,036	1,206	1,274	1,294
80	0,725	0,767	0,812	0,62	0,637	0,716
90	0,093	0,082	0,083	0,138	0,082	0,087

*Tabla 8 Absorbancias de ensayo de AR con DNS de etapas de enzima silvestre*

Silvestre			
Etapas	Sobrenadante	Diálisis	Pool
Absorbancia (550nm)	0,238	0,144	0,821
	0,22	0,164	0,823
	0,291	0,12	0,763
Dilución	1	0,01	0,05

*Tabla 9 Absorbancias de ensayo de AR con DNS de etapas de enzima mutante*

Mutante			
Etapas	Sobrenadante	Diálisis	Pool
Absorbancia (550nm)	0,182	0,224	1,065
	0,245	0,262	0,974
	0,143	0,194	1,102
Dilución	1	0,01	0,05



*Figura 21 Curva de Calibración de ensayo de AR con DNS*

*Tabla 10 Absorbancias a 595nm de concentración de proteínas con método de reactivo de Bradford con BSA para la curva de calibración.*

Concentración proteína (mg/ml)	0	0,0078125	0,015625	0,03125	0,125
Absorbancias (595nm)	0,299	0,781	0,834	0,351	0,39
	0,276	0,291	0,308	0,307	0,545
	0,266	0,286	0,301	0,349	0,505

*Tabla 11 Absorbancias a 595 con reactivo de Bradford de concentración de proteínas de diferentes fracciones en enzima mutante y silvestre.*

Fracción de purificación	Sobrenadante de silvestre	Silvestre luego de diálisis	Silvestre luego de cromatografía	Sobrenadante Mutante	Mutante luego de diálisis	Mutante luego de cromatografía
Dilución	0,1	0,05	0,25	0,1	0,05	0,25
Absorbancias	0,318	0,438	0,414	0,292	0,445	0,435
	0,311	0,458	0,465	0,283	0,47	0,489
	0,297	0,434	0,467	0,292	0,474	0,485

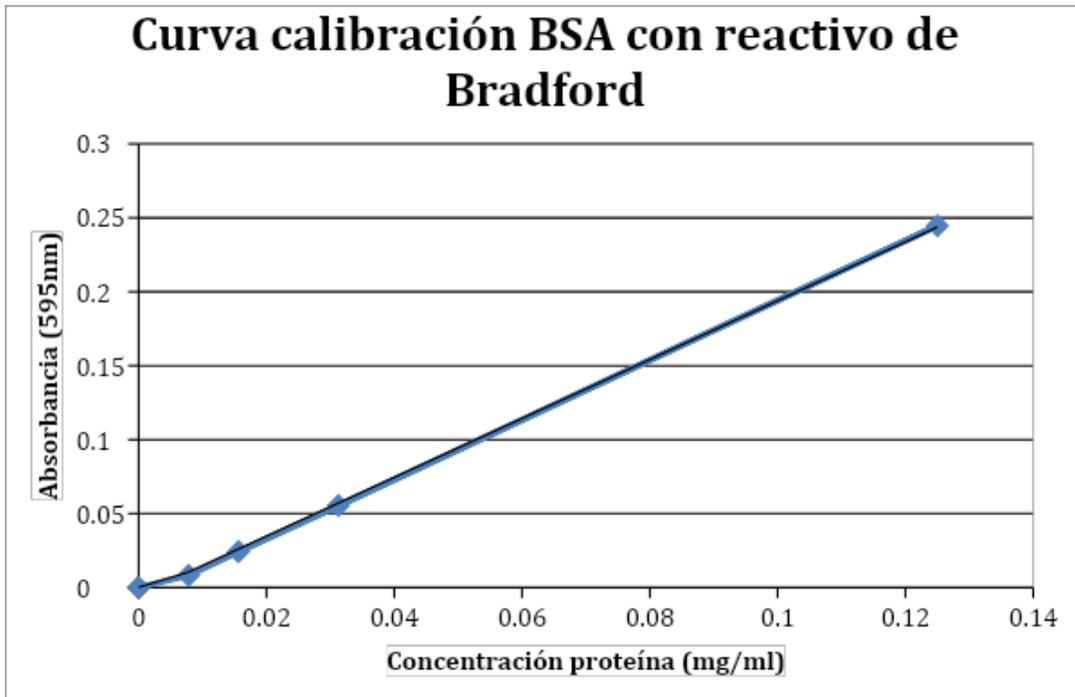


Figura 22 Curva de calibración con reactivo de Bradford

## Anexo 1. Secuencia nucleotídica y aminoacídica de GtXyn10A

La secuencia aminoacídica en rojo corresponde a la secuencia de péptido señal.

Secuencia nucleotídica GtXyn10A de *G. trabeum* (GI:469658689) \*Considera péptido señal nativo y codón stop.

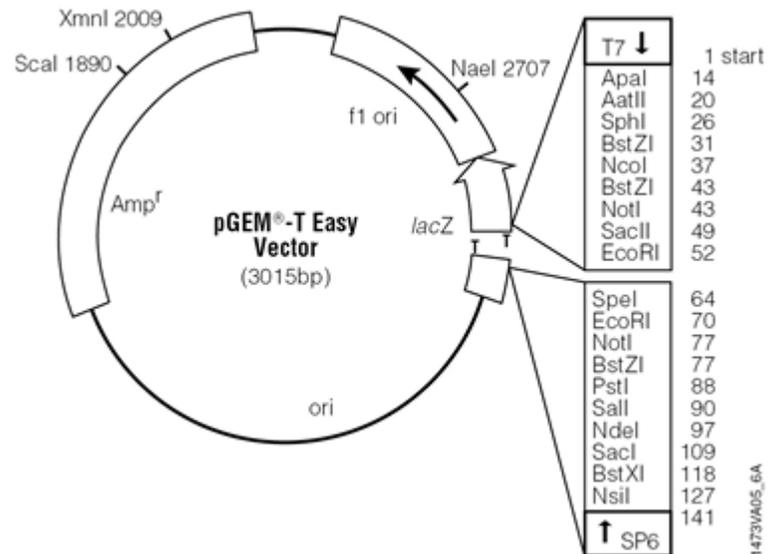
**ATGATTCTAAGACCTTCACCGTTCTCCTTGCTGCCCTTGTGCAATGC**GCACCTCCTACTCCCGCC  
GCCTCTTCGGCTTTGCCGACTGGTACATCTACCGTCGCCCTCAATACTGCGGCGAAGGCCGGCAGGGAAA  
CTGTACATGGGTACTGCCACCGACAACGGGGAGCTTACTGACACCGCTTATACCACTATCCTGGACAACA  
ATGCAAACCTTCGGCCAGATCACCCCTGCGAACGCCATGAAATGGGAAAATACAGAGCCGGAGCAGGG  
AACATGGACCTGGACGAACGCTGACCAGATCGCCAACCTCGGAAGACCAATGGCCAGCTCCTGAGAG  
GCCACAACCTGTGTCTGGTACAACCAGCTCCCCAGCTGGGTGACCTCCGGGTCTTGGACCAATGCCACAC  
TTACTGCCGTAGTTCAGGACCATACTACGGAATTGGTTAGCCGCTATAAGGGACAAGTTTATGCCTGGG  
ATGTAATCAATGAGCCCTTCAATGACGACGGTACTTACCGCTCGGATGTCTTCTACAACCCATCGGCCC  
AGCATAATTCCCATCGCCCTGCGCGCAGCCAGAGCCGCCGACCCTAATGCCAAGCTCTACATCAACGA  
GTACAACATTGAGTACACGGTTCCAAGGCGACAGCTATGCTGAACCTCGTGGA  
TAAGGCAGAGGGCGTTCATCGACGGTGTGGTCTGCAGTCCCACTTCATCGTCGGCGAAGTCCCCAC  
CTCGCTTCAGTCCATCATGGAGCAGTTCACCGCGCTCGGCGTCGAGGTCGCCATCACCGAGCTGGACAT  
CCGCATGACCCTCCCCGAACTGCTGCCCTCCTGGAGCAGCAGAAGACCGATTATGACTGTCTCTCT  
GCATGCAGGGCCGTCTCCGGCTGCGTTGGCGTCACCGTTTGGGACTTCACTGACAAGTACTCTTGGGTA  
CCGAGCACCTTCTCCGGTCAGGGTGCCGCGACACCTTACGACTCGAACCTTGTGAAGAAGCCTGCCTAC  
GACGGAATTGTTGCTGGCTGGCAGTAA

Secuencia aminoacídica GtXyn10A de *G. trabeum* (GI:521722511) \*Considera péptido señal nativo y codón stop.

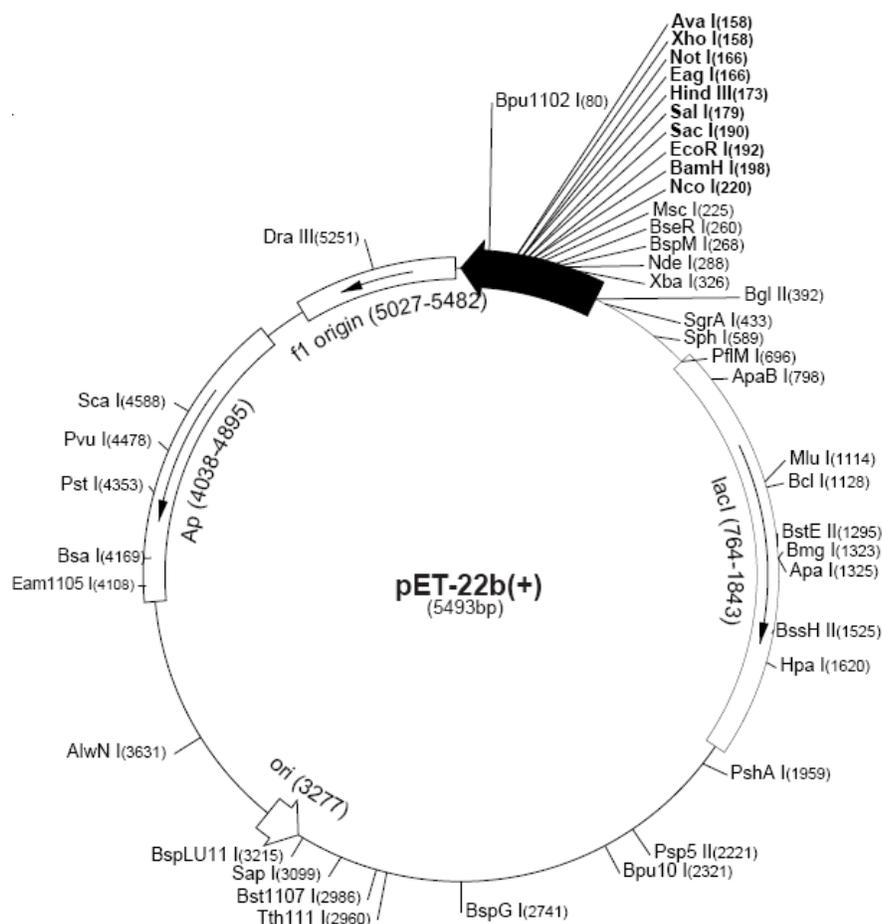
**MISKFTVLLALLPLVQC**APPTPAASSALPTGTSTVALNNTAAKAAGKLYMGTATDNGELDTAYTTILDNNA  
NFGQITPANAMKWENTEPEQGTWTWTNADQIANLAKTNGQLLRGHNCVWYNQLPSWVTSWSWTNA  
TLTAVVQDHTTELVSRYKGQVYAWDVINEPFNDGTYRSDVFYNTIGPAYIPIALRAARAADPNKLYINEY  
NIEYTGSKATAMLNLVESLKAEGVPIDGVGLQSHFIVGEVPTSLQSIMEQFTALGVEVAITELDIRMTLPETA  
ALLEQQKTDYDTVISACRAVSGCVGVTVWDFTDKYSWVPSTFSGQGAATPYDSNLVKKPAYDGIVAGWQ

## Anexo 2. Mapas de vectores pGEM-T Easy y pET22b+

### Mapa vector pGEM-T Easy de Promega



## Mapa vector pET22b(+) de Novagen



## Anexo 3. Tabla de concentraciones para Polimerasa X7, Polimerasa Taq y Ligasa T4

Se detallan las concentraciones finales que necesitan las mezclas de PCR y ligación según los protocolos de cada componente.

*Tabla 12 Componentes y concentraciones para una mezcla de reacción PCR con Phusion Polimerasa (<https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530>)*

Componente	Reacción de 20 µl	Reacción de 50 µl	Concentración final

Agua libre de nucleasas	Hasta 20 $\mu$ l	Hasta 50 $\mu$ l	-
5X Phusion HF o GC Buffer	4 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1X
10 mM dNTPs	0,4 $\mu$ l	1 $\mu$ l	200 $\mu$ M
10 $\mu$ M Partidor directo	1 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
10 $\mu$ M Partidor reverso	1 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
ADN templado	variable	variable	< 250 ng
DMSO (opcional)	(0,6 $\mu$ l)	(1,5 $\mu$ l)	3%
Phusion DNA Polimerasa	0,2 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l	1,0 U/50 $\mu$ l PCR

*Tabla 13 Componentes para GoTaq Polimerasa de Promega.*

Componente	Volumen final	Concentración final
5X Green GoTaq Buffer de reacción	10 $\mu$ l	1X (1.5mM MgCl <sub>2</sub> )
dNTPs	1 $\mu$ l	0,2mM cada dNTP
Partidor directo	variable	0,1-1,0 $\mu$ M

Partidor reverso	variable	0,1-1,0 $\mu$ M
GoTaq Polimerasa ADN (5U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l	1,25U
ADN templado	variable	<0,5 $\mu$ g/50 $\mu$ l
Agua libre de nucleasas	Hasta 50 $\mu$ l	-

*Tabla 14 Componentes para hacer una mezcla de ligación con T4 ligasa de fragmentos con extremos cohesivo*  
(<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fbrochures%2F711-011109%20TB%20T4%20DNA%20Ligase.pdf>)

Componente	Cantidad
5x Buffer de Ligasa	2 $\mu$ l
Vector ADN	1 $\mu$ g
ADN inserto	50ng
Agua destilada	Hasta 10 $\mu$ l

## Anexo 4. Preparación Medio Terrific-Broth y sales fosfato

Se preparó medio Terrific-Broth (TB) y sales fosfato para TB. El medio TB se preparó, para 450 ml, con: 12 g de extracto de levadura, 10 g de triptona (Gibco, EE UU) y 2 ml de glicerol.

Para las sales, se usó 5,75 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para hacer 200 ml de una solución de buffer fosfato 0,89 M ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,17M;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,72 M).

Se hicieron dos frascos con 300 ml de TB cada uno, se autoclavaron con un autoclave (Eppendorf, EE UU) y luego se le agregó 50ml de sales autoclavadas a cada uno. También se le agregó 300 $\mu$ l de carbenicilina (Biological, EE UU) a 100mg/ml (concentración final de 100  $\mu$ g/ml) todo bajo campana estéril. El medio TB se llevó a dos matraces de 2 litros cada uno, uno de ellos rotulado para la bacteria con plásmido con el inserto silvestre y el otro para el plásmido con la mutación Q124E.

## Anexo 5. Precipitación de proteínas con sales de sulfato de amonio

Se precipitaron los sobrenadantes con la técnica de “salting out” por precipitación de sales. Para la precipitación con sulfato de amonio, se agregó 50 ml buffer Tris (Winkler, Chile) 0,5 M a pH7 a una concentración 10x a cada sobrenadante. Además, se prepararon 4,7 ml de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Winkler) disuelto en isopropanol (Sigma Aldrich) con concentración 100 µg/ml, para evitar la degradación de proteínas por actividad de proteasas.

Para calcular la cantidad de sales de sulfato de amonio a usar, se consideró 0% de saturación de sales inicial y 80% de saturación final. Se calculó usar 236,6 g de amonio siguiendo los valores de la tabla 9 en cada sobrenadante, ya que ambos tienen un volumen similar (300ml).

Luego se siguieron los siguientes pasos:

- Se dejó cada vaso de precipitados con estas mezclas de sobrenadante sobre un agitador magnético Velp Arec (Italia) rodeadas de hielo, para mantener una temperatura de 4°C a cada uno.
- Lentamente, se fue agregando sulfato de amonio sólido hasta que este se disolvió totalmente.
- Luego de disolver las sales, se dejó 2 horas en reposo a 4°C.
- Se procedió a centrifugar a 10.000 rpm por 45 minutos, según la metodología. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet de proteínas en buffer Tris.

Tabla 15 Tabla de saturación con sales de sulfato de amonio, cantidad a agregar según la saturación inicial y final de la solución.[31]

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	113	144	176	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	761
5	85	115	146	179	212	246	282	319	358	397	439	481	526	572	621	671	723
10	57	86	117	149	182	216	251	287	325	364	405	447	491	537	584	634	685
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	596	647
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	465	511	559	609
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	386	429	475	522	571
30			0	30	61	92	125	160	195	232	270	309	351	393	438	485	533
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495
40					0	31	63	96	130	166	202	241	281	322	365	410	457
45						0	31	64	98	132	169	206	245	286	329	373	419
50							0	32	65	99	135	172	210	250	292	335	381
55								0	33	66	101	138	175	215	256	298	343
60									0	33	67	103	140	179	219	261	305
65										0	34	69	105	143	183	224	267
70											0	34	70	107	146	186	228
75												0	35	72	110	149	190
80													0	36	73	112	152
85														0	37	75	114
90															0	37	76
95																0	38

## Anexo 6. Curva de calibración de proteínas según método de reactivo de Bradford

Se preparó el reactivo de Bradford como se mencionó en la sección de Metodología y se prepararon varias diluciones de albúmina de suero bovino (BSA), partiendo por concentración 1 mg/ml hasta llegar a una dilución de 1/256, como se muestra en la tabla. Se muestran también los resultados de las absorbancias medidas a 595 nm

*Tabla 16 Datos de absorbancia a 595 nm de ensayo de BSA con reactivo de Bradford*

Dilución	BSA (mg/ml)	Absorbancia a 595nm		
0,5	1	1,198	1,577	1,282
0,25	0,5	1,446	1,543	1,164
0,125	0,25	1,349	1,519	1,52
0,0625	0,125	0,601	0,675	0,659
0,03125	0,0625	0,396	0,455	0,449
0,015625	0,03125	0,313	0,331	0,328
0,0078125	0,015625	0,283	0,295	0,284
0,00390625	0,0078125	0,281	0,285	0,279
0	0	0,271	0,29	0,272

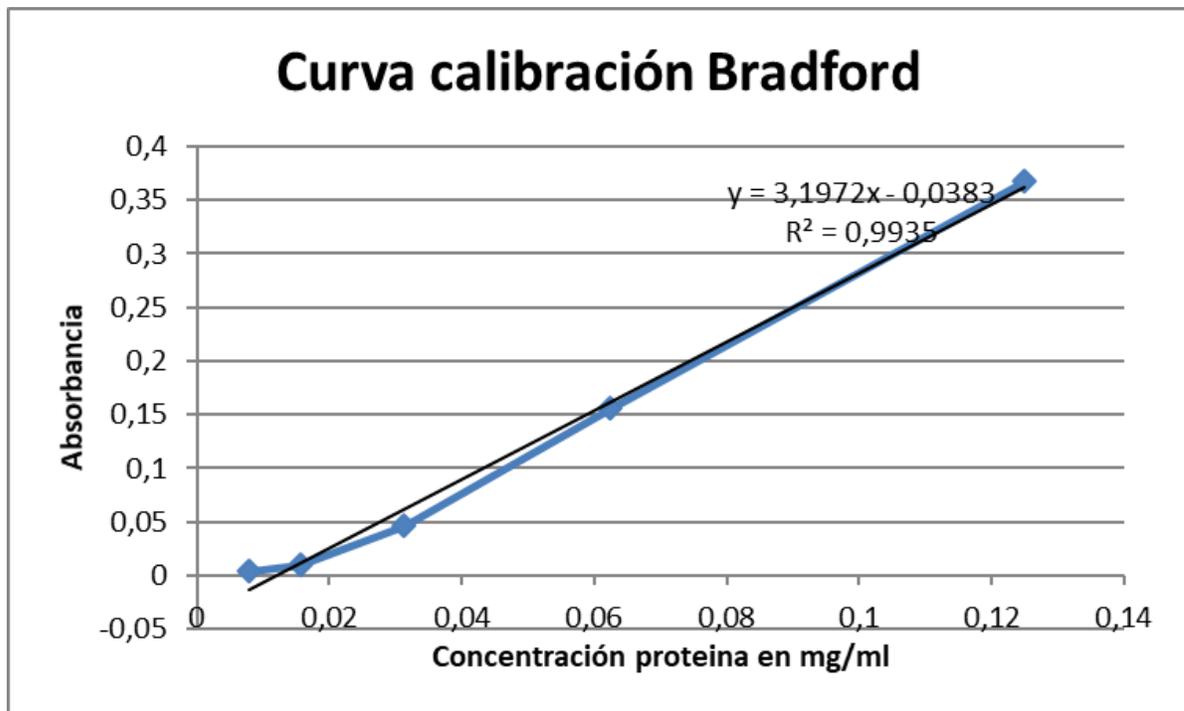
Para calcular los valores de absorbancia para la curva de calibración, se calcula el promedio de los valores de absorbancia de cada dilución. Luego, siguiendo la fórmula (1), se calculó el promedio corregido el cual considera la lectura de absorbancia del blanco. Para determinar la diferencia entre el promedio y los datos, se calculó la desviación estándar ( $\sigma$ ) y para evaluar la diferencia relativa entre la variabilidad de los datos con la media, se calculó el coeficiente de variabilidad porcentual (CV). Se calculó la raíz del error cuadrático medio (RMSE) entre la desviación estándar del blanco y el resto de los datos, valor que sirve para observar el error asociado a cada grupo de datos. Se sintetizan estos datos en la Tabla 17.

$$Abs_{595 \text{ corregida}} = Abs_{595 \text{ muestra}} - Abs_{595 \text{ blanco}} \quad (1)$$

Tabla 17 Datos estadísticos de la absorbancia de BSA con reactivo de Bradford

Dilución	BSA (mg/ml)	Promedio Absorbancia	Promedio corregido	$\sigma$	CV	RMSE
0,5	1	1,352	1,075	0,199	14,719	0,094
0,25	0,5	1,384	1,107	0,197	14,222	0,093
0,125	0,25	1,463	1,185	0,098	6,730	0,044
0,0625	0,125	0,645	0,367	0,039	6,037	0,014
0,0312	0,0625	0,433	0,156	0,032	7,493	0,011
0,0156	0,0312	0,324	0,046	0,010	2,976	0,001
0,00781	0,0156	0,287	0,010	0,007	2,317	0,002
0,00390	0,00781	0,282	0,004	0,003	1,085	0,004
0	0	0,278	0,000	0,011	3,851	0,000

Se muestra el gráfico de la curva de calibración de proteínas con el método de Bradford en la Figura 23, en conjunto con su coeficiente de determinación de la recta ( $R^2$ ) para esclarecer la linealidad de los puntos. Para la curva, se omitieron las diluciones de 0.5, 0.25, y 0.125, pues no se encuentran en el rango lineal.



*Figura 23 Curva de calibración para ensayo con reactivo de Bradford, para la medición de concentración de proteínas totales.*

La proteína total fue calculada usando la curva de calibración y luego multiplicando por el volumen de la fracción respectiva desde la que se está calculando la proteína total.

## Anexo 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida

La composición del gel de resolución al 12,5% y la composición del gel de concentración se presentan en la Tabla 18 y Tabla 19, respectivamente.

*Tabla 18 Composición gel de resolución 12,5%.*

Gel de resolución 12,5%	
Reactivo	Volumen [ul]
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	1,580
Buffer Tris 1,5M pH 8,8 + SDS 0,4%	950
Glicerol 40%	1,270
TEMED	2
Persulfato de amonio (PSA) 10%	20

*Tabla 19 Composición gel de concentración.*

Gel de concentración 12,5%	
Reactivo	Volumen [ul]
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	168,5
Buffer Tris 0,5M pH 6,8 + SDS 0,4%	250
Agua destilada	575
TEMED	1,25
Persulfato de amonio (PSA) 10%	7,5

El buffer de carga denaturante 5X se compone de:

- Buffer Tris 60 mM pH 6,8
- Glicerol 25% p/v
- 2-mercaptoetanol 5% p/v
- Azul de bromofenol 0,1% p/v

El buffer de corrida Tris-Glicina 10X se compone de:

- 30 g de Tris
- 114 g de Glicina

- 10 g de SDS
- Agua destilada hasta completar 1 L de solución

La composición de la solución de tinción de Azul de Coomassie es:

- Azul de Coomassie 0,25% p/v
- Metanol 50% v/v
- Ácido acético 10% v/v
- Agua destilada 40% v/v

Por otra parte, la composición de la solución de destinción es:

- Metanol 50% v/v
- Ácido acético 10% v/v
- Agua destilada 40% v/v

## Anexo 8. Curva de calibración de xilosa

Se preparó la xilosa como se mencionó en la sección de Metodología y se prepararon varias diluciones de ésta, partiendo por concentración 1 mg/ml hasta llegar a una dilución de 1/8, que se muestra en la Tabla 20 (además del blanco). Se muestran también los resultados de las absorbancias medidas a 550 nm.

*Tabla 20 Datos de absorbancia a 550 nm de ensayo de azúcares reductores con DNS con xilosa*

Dilución	Xilosa (mg/ml)	Absorbancia a 550 nm			
1	1	2,566	2,648	2,371	2,649
0,75	0,75	1,668	1,706	1,691	1,851
0,5	0,5	1,318	1,37	1,216	1,296
0,25	0,25	0,567	0,568	0,549	0,58
0,125	0,125	0,229	0,238	0,217	0,228
0	0	0,046	0,048	0,046	0,044

Para calcular los valores de absorbancia para la curva de calibración, se calcula el promedio de los valores de absorbancia de cada concentración. Luego, siguiendo la fórmula (2), se calculó el promedio corregido en que se resta la lectura del blanco. Para determinar la diferencia entre el promedio y los datos se calculó la desviación estándar ( $\sigma$ ) y para evaluar la diferencia relativa entre la variabilidad de los datos con la media, se calculó el coeficiente de variabilidad porcentual (CV). Se calculó la raíz del error cuadrático medio (RMSE) entre la desviación estándar del blanco y el resto de los datos, valor que sirve para observar el error asociado a cada grupo de datos. Se sintetizan estos datos en la Tabla 21.

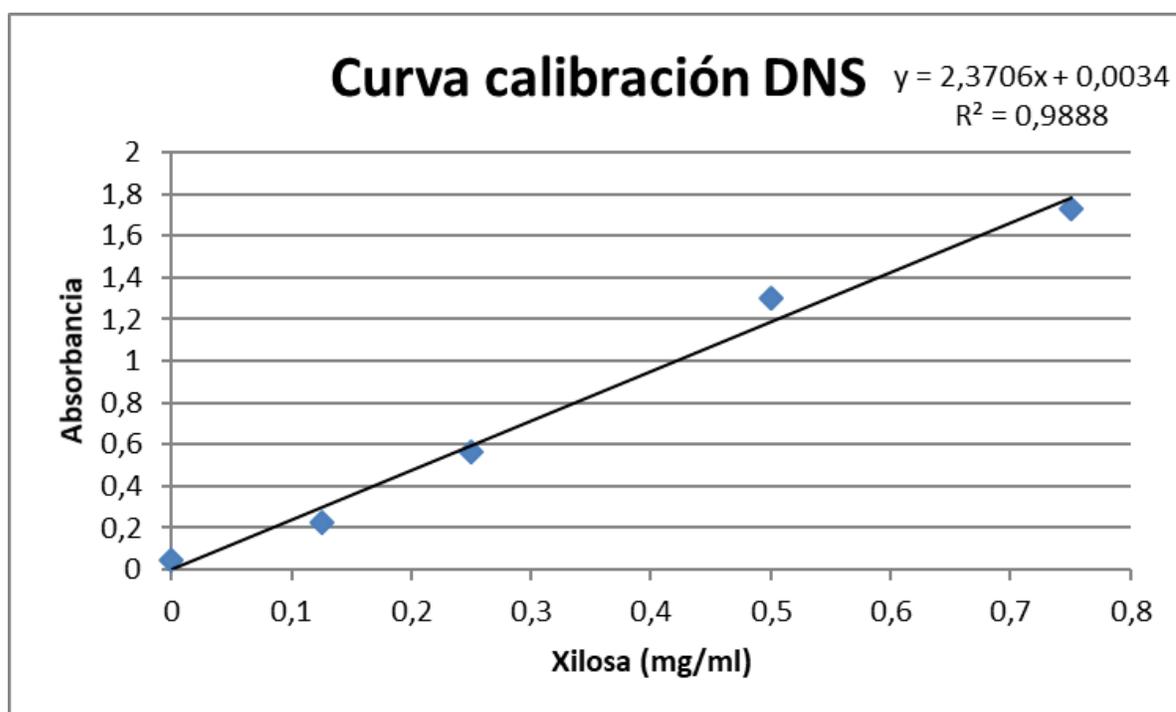
$$Abs_{550 \text{ corregida}} = Abs_{550 \text{ muestra}} - Abs_{550 \text{ blanco}} \quad (2)$$

*Tabla 21 Datos estadísticos de absorbancias de xilosa con ensayo de azúcares reductores con DNS.*

Dilución	Xilosa (mg/ml)	Promedio absorbancia	Promedio corregido	$\sigma$	CV	RMSE
1	1	2,559	2,513	0,131	5,117	0,065

0,75	0,75	1,729	1,683	0,083	4,790	0,041
0,5	0,5	1,300	1,254	0,064	4,925	0,031
0,25	0,25	0,566	0,520	0,013	2,258	0,006
0,125	0,125	0,228	0,182	0,009	3,773	0,003
0	0	0,046	0,000	0,002	3,550	0,000

Se muestra el gráfico de la curva de calibración de xilosa en la Figura 24, en conjunto con su coeficiente de determinación de la recta ( $R^2$ ) para esclarecer la linealidad de los puntos. Para la curva, se omitió la dilución de 1, pues no se encuentra en el rango lineal.



*Figura 24 Curva de calibración para el ensayo de AR con DNS.*

Los cálculos para las unidades de enzima para las tablas de purificación fueron usando las siguientes fórmulas para la concentración de azúcares reductores, actividad enzimática y actividad específica:

- $AR(uM) = AR (mg/ml) * PM \text{ Xilosa } (g/mol)$
- $Actividad \text{ enzimática } (U/L) = AR (uM) / Tiempo \text{ de reacción } (min)$
- $Actividad \text{ específica } (U/g) = Actividad \text{ enzimática } (U/l) / Concentración \text{ de enzima } Gtxyn10A\_Q124E (mg/ml)$

Parámetros para las tablas de purificación:

- **Volumen**: Volumen obtenido al final del proceso indicado medido con probetas o tubos falcon.
- **U/L**: Actividad catalítica que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por min por litro. Fue medido dividiendo los micromoles ( $\mu\text{M}$ ) de xilosa producidos en los minutos que se dejó la reacción.

$$\frac{U}{L} = \frac{\mu\text{M}}{\text{min}}$$

- **Concentración Proteína (g/L)**: medida al final de cada proceso indicado usando el método de Bradford.
- **Act. específica (U/g)**: Actividad catalítica que transforma 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato/min por gramo de proteína. Fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\frac{U}{g} = \frac{U/L}{\text{Concentración proteína } (\frac{\text{mg}}{\text{ml}})}$$

## Anexo 9. MolProbity del modelo 3D de GtXyn10A

Se muestran los puntajes en molProbity de los modelos 3D de Gtxyn10A antes (Figura 25) y después (Figura 26) de pasarlos por Yasara y Galaxyweb.

### Summary statistics

Protein Geometry	Poor rotamers	30	10.49%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	226	79.02%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	37	10.60%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	280	80.23%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-4.64 ± 0.36		Goal: abs(Z score) < 2
	Cβ deviations >0.25Å	31	9.48%	Goal: 0
	Bad bonds:	3 / 2735	0.11%	Goal: 0%
	Bad angles:	82 / 3753	2.18%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 18	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Twisted Peptides:	23 / 350	6.57%	Goal: 0
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	38	11.0%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	12	3.46%	Goal: <0.5%
Additional validations	Tetrahedral geometry outliers	4		

Figura 25 Puntajes de análisis geométrico y estérico de MolProbity para el primer modelo generado por I-TASSER de GtXyn10A.

### Summary statistics

Protein Geometry	Poor rotamers	2	0.70%	Goal: <0.3%
	Favored rotamers	282	98.60%	Goal: >98%
	Ramachandran outliers	4	1.15%	Goal: <0.05%
	Ramachandran favored	332	95.13%	Goal: >98%
	Rama distribution Z-score	-0.58 ± 0.40		Goal: abs(Z score) < 2
	Cβ deviations >0.25Å	6	1.83%	Goal: 0
	Bad bonds:	5 / 2736	0.18%	Goal: 0%
	Bad angles:	32 / 3755	0.85%	Goal: <0.1%
Peptide Omegas	Cis Prolines:	0 / 18	0.00%	Expected: ≤1 per chain, or ≤5%
	Twisted Peptides:	2 / 350	0.57%	Goal: 0
Low-resolution Criteria	CaBLAM outliers	12	3.5%	Goal: <1.0%
	CA Geometry outliers	5	1.44%	Goal: <0.5%
Additional validations	Tetrahedral geometry outliers	1		

Figura 26 Puntajes de análisis geométrico y estérico de MolProbity para el primer modelo generado por I-TASSER de GtXyn10A, después de pasarlo por Yasawa web y Galaxyweb.