

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 DH5α 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 (https://international.neb.com/protocols/0001/01/01/pcr-protocol-m0530)	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