



**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del Instituto Politécnico Nacional**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Producción de la xilanasa Xyn11A_{AOX1} en biorreactor y
mejoramiento de las propiedades bioquímicas de la enzima
mediante ingeniería de proteínas**

Tesis que presenta:

Cayetano Cruz Maribel Emilia

Para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Directora de la tesis: Dra. María Eugenia Hidalgo Lara

Ciudad de México

Junio, 2016

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Xilanasas.....	1
1.1.1 Clasificación de las xilanasas.....	3
1.1.2 Aplicaciones industriales de la xilanasas	4
1.2 Proteínas recombinantes.....	5
1.2.1 <i>Pichia pastoris</i>	8
1.2.2 Promotor AOX1 en <i>P. pastoris</i>	9
1.2.3 Producción de proteínas recombinantes en <i>Pichia pastoris</i>	12
1.3 Ingeniería de proteínas.....	14
1.3.1 Diseño racional de proteínas.....	15
1.3.2 Evolución dirigida.....	16
1.3.3 Técnicas para generar diversidad	18
1.4 Simulaciones mediante dinámica molecular	19
1.4.1 Dinámica molecular de proteínas.....	20
1.4.2 Interacciones moleculares involucradas en la estabilidad de proteínas.....	20
1.5 Antecedentes directos	22
II. JUSTIFICACIÓN.....	24
III. HIPÓTESIS.....	25
IV. OBJETIVO GENERAL.....	26
IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
V. METODOLOGÍA.....	27
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1 CULTIVO EN BIORREACTOR.....	28
6.1.1 Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> /pPICZ α - <i>xyn11A</i> en medio mínimo con glucosa y metanol a nivel matraz.....	28
6.1.2 Cultivo de <i>P. pastoris</i> /pPICZ α - <i>xyn11A</i> en biorreactor en 1 y 2 etapas.....	28

6.1.3 Determinación de glucosa y metanol en el medio de cultivo.....	29
6.1.4 Determinación de la actividad xilanolítica.....	29
6.1.5 Cuantificación de proteína	30
6.1.6 Purificación y caracterización bioquímica de Xyn11A _{AOX1}	30
6.2 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR EVOLUCION DIRIGIDA.....	31
6.2.1 Amplificación del gen <i>xyn11A</i>	31
6.2.2 Mutación del gen <i>xyn11A</i>	31
6.2.3 Clonación de <i>xyn11A</i> y <i>xyn11A_mut</i> en el vector de expresión pET-38b(+).	31
6.2.4 Ligación y transformación de células competentes y electrocompetentes	32
6.2.5 Extracción de DNA plasmídico de clonas candidatas	32
6.2.6 Análisis de restricción de pET-38b(+)- <i>xyn11A</i>	33
6.2.7 Expresión de la proteína y determinación de actividad xilanolítica	33
6.2.8 Escrutinio de la biblioteca conteniendo el gen <i>xyn11A</i> mutado	34
6.3 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA	34
6.3.1 Amplificación del gen <i>xyn11A</i> con la mutación N9Y y expresión en <i>E. coli</i> BL21	34
6.3.2 Selección de clonas que expresan la xilanasa mutada en medio sólido.....	35
6.3.3 Expresión y purificación de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y	36
6.3.4 Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica	37
6.3.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática.....	37
6.3.6 Termoestabilidad de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y.....	37
6.3.7 Determinación de los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y	37
6.4 SIMULACIONES MEDIANTE DINAMICA MOLECULAR.....	38
6.4.1 Estructuras tridimensionales de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y	38
6.4.2 Simulaciones mediante Dinámica Molecular	38
VII. RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
7.1 CULTIVO EN BIORREACTOR.....	41
7.1.1 Cinética de crecimiento de <i>P. pastoris</i> /pPICZ α - <i>xyn11A</i> en medio mínimo con glucosa y metanol a nivel matraz.....	42
7.1.2 Cultivo de <i>P. pastoris</i> /pPICZ α - <i>xyn11A</i> en biorreactor en 1 y 2 etapas.....	45
7.1.3 Expresión extracelular de Xyn11A en <i>P. pastoris</i>	49

7.1.4 Purificación y caracterización bioquímica de Xyn11A _{AOX1}	52
7.2 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR EVOLUCION DIRIGIDA.....	54
7.2.1 Expresión del gen <i>xyn11A</i> y <i>xyn11A_mut</i> en <i>E. coli</i> BL21	55
7.2.2 Escrutinio de la biblioteca conteniendo el gen <i>xyn11A</i> mutado.....	60
7.3 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR MUTAGENESIS SITIO-DIRIGIDA	63
7.3.1 Selección del sitio de mutación.....	64
7.3.2 Amplificación del gen <i>xyn11A</i> con la mutación N9Y y expresión en <i>E. coli</i> BL21	65
7.3.3 Selección de clonas que expresan la xilanasa mutada en medio sólido.....	68
7.3.4 Expresión y purificación de Xyn11A-WT.....	69
7.3.5 Expresión y purificación de Xyn11A-N9Y	74
7.4 SIMULACIONES MEDIANTE DINAMICA MOLECULAR.....	80
7.4.1 Estructuras tridimensionales de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y	81
7.4.2 Simulaciones mediante Dinámica Molecular y parámetros estructurales	82
7.4.3 Análisis de estructura secundaria	87
7.4.4 Estructuras representativas de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y	89
7.4.5 Distancia entre residuo 9 y 14	91
7.4.6 Puentes salinos.....	94
VIII. CONCLUSIONES.....	96
IX. PERSPECTIVAS	99
BIBLIOGRAFÍA.....	101
ANEXOS.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura hipotética de la xilana mostrando diferentes sustituyentes y diferentes sitios de unión para el ataque de diversas xilanasas microbianas.	1
Figura 2. Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras. Las enzimas participantes están representadas por números romanos y sus productos mediante abreviaciones.	11
Figura 3. Ejemplo de cultivo de <i>P. pastoris</i> en cuatro etapas de crecimiento en biorreactor.	13
Figura 4. Presentación esquemática de la evolución dirigida.	17
Figura 5. Cinética de crecimiento en matraz con medio mínimo en sales (MSM) y glucosa o metanol como fuente de carbono.	42
Figura 6. Cinética de crecimiento en matraz con medio rico BMMY con metanol y medio mínimo en sales (MSM) con glucosa.	43
Figura 7. Cinética de crecimiento y cuantificación de actividad xilanolítica en matraz con medio rico BMMY con metanol.	44
Figura 8. Crecimiento (triángulos), actividad xilanolítica (círculos) y concentración de metanol (líneas punteadas) de <i>Pichia pastoris</i> /pPICZ α B-xyn11A. a) Fermentación en dos etapas y b) Fermentación en una etapa.	50
Figura 9. Análisis en SDS-PAGE de la expresión de proteínas en el sobrenadante de cultivo en biorreactor en lote alimentado con glucosa y metanol como fuentes de carbono.	51
Figura 10. Análisis en SDS-PAGE de proteínas secretadas al sobrenadante de cultivo con metanol como fuente de carbono.	51
Figura 11. Análisis de TLC de los productos después de la hidrólisis de xilana por Xyn11A _{AOX} . Estándares	53
Figura 12. Análisis electroforético de productos de PCR.	55
Figura 13. Análisis electroforético de productos purificados.	56
Figura 14. Amplificación por PCR colony del gen <i>xyn11A</i> de clonas candidatas.	56
Figura 15. Análisis de restricción de pET-38b(+)- <i>xyn11A</i> .	57

Figura 16. Tinción con Rojo Congo de clonas conteniendo la construcción pET-38b(+)- <i>xyn11A</i> .	57
Figura 17. Análisis electroforético de SN, parte soluble y cuerpos de inclusión, SDS-PAGE 10%.	58
Figura 18. Estabilidad térmica de extracto crudo y parte soluble a 60 °C.	58
Figura 19. Estabilidad térmica de extracto crudo y parte soluble a 50 °C.	59
Figura 20. Análisis electroforético de productos de gen <i>xyn11A</i> y producto de PCR propensa a error.	59
Figura 21. Escrutinio de biblioteca mutada por epPCR en medio sólido.	61
Figura 22. Análisis de biblioteca mutada por epPCR en medio sólido. Tinción con Rojo Congo, clonas con presunta mejora.	61
Figura 23. Alineamiento de xilanasas termofílicas y mesofílicas	65
Figura 24. Amplificación de fragmentos por PCR para ensamble del gen.	66
Figura 25. Gen <i>xyn11A</i> ensamblado y purificado.	67
Figura 26. Alineamiento de aminoácidos, conformación de cambio en el aminoácido nueve, cambio de N (nativa) por Y (mutada).	67
Figura 27. DNA plasmídico y análisis de restricción de pET-38b(+)- <i>xyn11A</i> .	68
Figura 28. Análisis funcional con Rojo Congo clonas con mutación N9Y.	69
Figura 29. Purificación de la xilanasas Xyn11A silvestre por cromatografía de intercambio aniónico a partir de la parte soluble.	70
Figura 30. Análisis electroforético de fracciones con actividad xilanolítica obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE 10%.	70
Figura 31. Purificación de la xilanasas Xyn11A silvestre por cromatografía de intercambio aniónico a partir del sobrenadante de cultivo.	71
Figura 32. Análisis electroforético de fracciones con actividad xilanolítica obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico	72
Figura 33. Purificación de la xilanasas mutada por cromatografía de intercambio aniónico a partir de sobrenadante de cultivo.	74
Figura 34. Análisis electroforético de xilanasas mutada purificada por cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE 10%.	75
Figura 35. Caracterización bioquímica de Xyn11A-WT and Xyn11A-N9Y.	76

Figura 36. Estabilidad térmica de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y.	77
Figura 37. Modelos estructurales de las xilanasas. Estructuras superpuestas de Xyn11A-WT (verde) y Xyn11A-N9Y (morado)	81
Figura 38. Mapas de potenciales electrostáticos de Xyn11A-WT and Xyn11A-N9Y	82
Figura 39. Análisis estructural de las simulaciones mediante dinámica molecular a 300 (rojo), 400 (verde) y 500 K (azul).	86
Figura 40. Evolución en el tiempo de la estructura secundaria de ambas xilanasas en las simulaciones por MD.	88
Figura 41. Imágenes representativas de la estructura de la proteína a diferentes tiempos de simulación y diferentes temperaturas	90
Figura 42. Residuos involucrados en la hidrólisis de la xilana en las estructuras después de 50 ns de simulación a 500 K.	91
Figura 43. Evolución de las distancias entre los residuos 9 y 14 en Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y a 300 K.	92
Figura 44. Estructuras tridimensionales mostrando la interacción entre residuos 9 y 14.	93

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar la mutación en <i>xyn11A</i>	35
Tabla 2. Comparación entre <i>Xyn11A</i> expresada en <i>E. coli</i> y <i>Xyn11A_{AOX1}</i> expresada en <i>P. pastoris</i>	52
Tabla 3. Comparación de las propiedades entre la xilanasa silvestre y la xilanasa 309 obtenida por Evolución Dirigida.	62
Tabla 4. Resumen de la purificación de la xilanasa <i>Xyn11A-WT</i> expresada en <i>E. coli</i> .	71
Tabla 5. $t_{1/2}$ de <i>Xyn11A</i> a las diferentes temperaturas	73
Tabla 6. Modelos utilizados para la estimación de los parámetros K_M y V_{max} .	73
Tabla 7. Resumen de la purificación de la xilanasa <i>Xyn11A-N9Y</i> expresada en <i>E. coli</i> .	74
Tabla 8. Comparación de las propiedades entre la xilanasa silvestre y la xilanasa mutada.	78
Tabla 9. Puentes salinos formados en <i>Xyn11A-WT</i> (WT) y <i>Xyn11A-N9Y</i> (N9Y) en las simulaciones a 300, 400 y 500 K.	95

RESUMEN

En este trabajo se plantearon dos objetivos principales tomando como modelo de estudio la xilanasas Xyn11A de la bacteria *Cellulomonas uda*. Por un lado, se propuso implementar una estrategia para incrementar la expresión extracelular de la xilanasas Xyn11A en *P. pastoris* por Ingeniería de Bioreactores, y por otro lado el mejoramiento en las propiedades bioquímicas de la xilanasas Xyn11A por Ingeniería de Proteínas.

Para alcanzar el primer objetivo del trabajo se evaluaron dos estrategias de cultivo en bioreactor de células de *P. pastoris* que portan la construcción pPICZ α B-xyn11A, y donde la expresión de la xilanasas Xyn11A se encuentra bajo el control del promotor inducible AOX1. La primera estrategia consistió en utilizar glucosa para la generación de la biomasa y después se cambió la fuente de carbono a metanol para la inducción y expresión de Xyn11A_{AOX1}. En la segunda estrategia se utilizó sólo metanol como única fuente de carbono para la inducción y expresión de Xyn11A_{AOX1} desde el inicio de la fermentación. Con la estrategia en una sola etapa se logró expresar la xilanasas Xyn11A como la principal enzima secretada al medio de cultivo. En sólo 48 h de fermentación se alcanzó una biomasa 34 g/L en peso seco y una concentración de proteína total de 1.16 g/L, valores comparables a lo reportado en bibliografía pero en fermentaciones de más de 100 h de cultivo.

Para alcanzar el segundo objetivo del proyecto se utilizaron dos estrategias de Ingeniería de Proteínas para mejorar las propiedades de Xyn11A: Evolución Dirigida y Mutagénesis Sitio-Dirigida.

En cuanto a la Evolución Dirigida, se estableció una metodología para la generación de mutaciones al azar por PCR propensa a error y un rápido escrutinio de la biblioteca genómica de mutantes por selección funcional en placas de agar-xilano teñidas con Rojo Congo. Se obtuvieron: i) clones que no presentan actividad xilanolítica, ya que las mutaciones fueron deletéreas, ii) clones que presentaban actividad a la misma temperatura que la xilanasas nativa, y iii) clones con actividad xilanolítica mejorada, ya que presentaban actividad a una mayor temperatura. De

estas clonas mejoradas, se purificó una variante de la xilanasa Xyn11A que exhibe cambios importantes en termoestabilidad a 50°C y en la V_{max} de la enzima.

Con respecto a la Mutagénesis Sitio-Dirigida, llevamos a cabo la mutación N9Y de la xilanasa Xyn11A de *C.uda*. Después de purificar y caracterizar la xilanasa mutante, se encontró que con sólo esta mutación se incrementó 10°C la temperatura óptima de la enzima y una unidad en el pH óptimo. Estos datos experimentales fueron complementados con estudios de simulaciones mediante dinámica molecular, en los que corroboramos una mayor estabilidad estructural atribuida principalmente a la interacción π - π formada entre los aminoácidos Y9-Y14 y al aumento en los puentes salinos en esta proteína sometida a una alta temperatura.

Por lo anterior, se puede decir que se cumplieron exitosamente los objetivos planteados en este proyecto.

ABSTRACT

In this project two main objectives were proposed using as model the Xyn11A xylanase from *Cellulomonas uda*. On the one hand, it was proposed to implement a strategy to increase extracellular expression of Xyn11A xylanase in *P. pastoris* by Bioreactor Engineering and on the other hand, the improvement of the gene encoding xylanase Xyn11A by Protein Engineering.

To achieve the first objective of the work two strategies were evaluated in culture bioreactor of *P. pastoris* cells harboring the plasmid pPICZ α B-xyn11A, and where Xyn11A xylanase expression is under the control of the inducible AOX1. The first strategy consisted of use glucose to generate biomass and then changing the carbon source to methanol for induction and expression of Xyn11A_{AOX1}. In the second strategy only methanol was used as sole carbon source for induction and expression of Xyn11A_{AOX1} since the beginning of fermentation. In the one-step strategy, we obtained the xylanase as the main enzyme secreted into the culture medium. In just 48 h of fermentation, a dry cell weight of 34 g/L and total protein concentration of 1.16 g/L were obtained, these values are comparable to those reported in literature but in fermentations of more than 100 h of culture.

To achieve the second objective of the project, two strategies of Protein Engineering were used in order to improve Xyn11A properties: Directed Evolution and Site-Directed Mutagenesis.

In directed evolution, a method for generating random mutations was established by error prone PCR and a rapid method for the screening of the mutant genomic library by functional selection in plates containing xylan and stained with Congo Red. We obtained: i) clones without activity since mutations were deleterious, ii) clones exhibiting activity at the same temperature as wild type xylanase and iii) clones with supposed improvement in activity, because they showed activity at a higher temperature. Of these improved clones, a variant Xyn11A xylanase was purified,

exhibiting significant changes in thermostability at 50°C and the V_{max} value of the enzyme.

Regarding site-directed mutagenesis, we conducted the N9Y mutation of Xyn11A xylanase from *C. uda*. After purifying and characterizing the enzyme, we saw that this single mutation caused an increase of 10 ° C at the optimum temperature and an increase in one unit of the optimum pH. These experimental data were complemented by studies of molecular dynamics simulations, in which greater structural stability was corroborated, mainly attributed to the π-π interaction between amino acids Y9-Y14 and the increase in salt bridges in the protein subjected to high temperature.

Therefore, it can be said that objectives in this project were achieved successfully.

I. ANTECEDENTES

1.1 Xilanasas

Las xilanasas (endo- β -1,4-xilanasas) son un conjunto de enzimas capaces de degradar a la xilana. Son producidas por organismos de diversos tipos, de entre los que destacan los hongos y las bacterias. Actúan sobre la cadena principal de la xilana hidrolizando los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$ entre moléculas de xilosa, dando lugar a una mezcla de xilooligosacáridos de diferentes tamaño (Biely, 1985).

Las endoxilanasas o xilanasas verdaderas (endo- β -1,4-xilanasas) son las enzimas que actúan sobre la cadena principal de la xilana hidrolizando los enlaces internos $\beta(1\rightarrow4)$ entre moléculas de xilosa (Biely, 1985) (**Figura 1**).

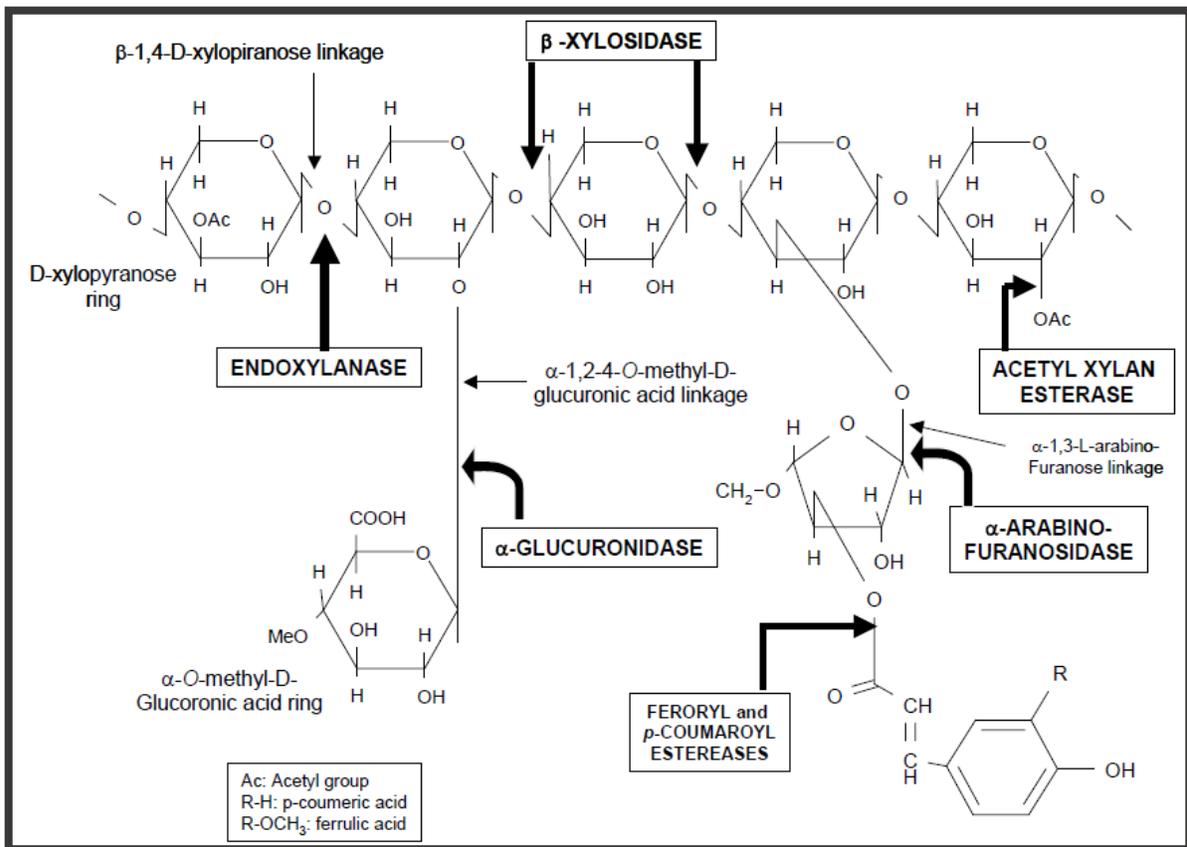


Figura 1. Estructura hipotética de la xilana mostrando diferentes sustituyentes y diferentes sitios de unión para el ataque de diversas xilanasas microbianas. Adaptado de Beg *et al.*, 2001.

Para la hidrólisis de la xilana, las xilanasas lo realizan mediante dos actividades según el modo de acción:

- a) Endoxilanasas (β -1,4-xilanasas), actúan al azar sobre la cadena de xilana para producir grandes cantidades de xilooligosacáridos de diferente tamaño.
- b) Exoxilanasas (exo β -1,4-D-xilosidasas), estas enzimas remueven las unidades de xilosa de los extremos no reductores de la cadena de xilana, siendo su principal producto la xilosa.

En los microorganismos xilanolíticos hay una gran multiplicidad de xilanasas (varios genes distintos que codifican para diferentes xilanasas en función del procesamiento postranscripcional y postraduccion), que difieren en su especificidad respecto a la xilana (Wong *et al.*, 1988). La gran diversidad de xilanasas está relacionada con el hecho de que la xilana es un polímero muy complejo y se requieren xilanasas distintas para degradar las diferentes regiones de la xilana y las diferentes xilanas. Así, muchas xilanasas sólo pueden actuar sobre regiones de xilana no sustituidas, mientras que otras requieren un determinado tipo de ramificación adyacente al sitio de corte (Coughlan y Hazlewood, 1993).

Se ha visto que la producción de xilanasas en bacterias es generalmente inducida por xilana; sin embargo, algunas cepas bacterianas muestran actividad xilanolítica constitutiva. La regulación de la secreción de xilanasas en organismos procariontes no ha sido completamente dilucidada. Debido a que la xilana no puede atravesar la membrana celular, la producción de las xilanasas es inducida por fragmentos de xilana de bajo peso molecular, los cuales son producidos en el medio por una pequeña cantidad de enzimas constitutivas (Bastawde, 1992).

La regulación de la síntesis de xilanasas está frecuentemente coordinada con la expresión de celulasas, como en el caso de *Aspergillus*, en el cual varias proteínas regulatorias incluyendo el activador transcripcional XlnR y el represor CreA han sido identificados y caracterizados. Aunque la mayoría de las xilanasas son enzimas extracelulares, generalmente secretadas por el sistema Sec-dependiente, se han

descrito xilanasas periplásmicas en algunas bacterias del rumen y en *Cellvibriomixtus* (Pastor *et al.*, 2007).

Las xilanasas, tanto de bacterias como de hongos, son mayoritariamente monoméricas y ampliamente variables en cuanto a su peso molecular (PM) y punto isoeléctrico (pI) (Kulkarni *et al.*, 1999; Stülke y Hillen, 2000).

1.1.1 Clasificación de las xilanasas

Existe una gran variedad de xilanasas distintas, que se diferencian en cuanto a su especificidad de sustrato, su secuencia y su estructura. Wong *et al.* (1988) clasificaron a las xilanasas en dos tipos en base a sus propiedades fisicoquímicas:

- i) Un grupo de peso molecular bajo (<30 kDa) y punto isoeléctrico básico
- ii) Un grupo de peso molecular alto (>30 kDa) y punto isoeléctrico ácido

Aunque muchas de estas enzimas entran dentro de esta clasificación, el número de xilanasas descritas desde entonces ha aumentado enormemente y hasta la fecha, algunas de propiedades intermedias no entran en estas categorías. Una clasificación más completa fue introducida en 1991 por Henrissat para las glicosil hidrolasas, un grupo de enzimas en el que las xilanasas están incluidas, el cual está basado en la comparación de la estructura primaria del dominio catalítico y el agrupamiento de enzimas, con secuencias de aminoácidos relacionadas, en familias. Las xilanasas por lo general están clasificadas dentro de las familias 10 (anteriormente F) y 11 (anteriormente G). La familia 10 incluye xilanasas de alto peso molecular y bajo pI, y la familia 11 incluye xilanasas de bajo peso molecular y alto pI (Pastor *et al.*, 2007).

La estructura tridimensional (3D) de muchas xilanasas de bacterias y hongos de la familia 10 y 11 han sido reportadas. A pesar de grandes diferencias en tamaño y secuencia entre los miembros de las glicosil hidrolasas de la familia 10, éstas en general poseen un dominio catalítico de 250-450 aminoácidos, comparten un

plegamiento común Tim-barril (β/α)₈ y la estructura 3D del sitio activo está conservada. Muchas de estas enzimas son modulares, conteniendo un módulo de unión a carbohidrato unido al dominio catalítico por una secuencia de aminoácidos denominada “linker”. Las xilanasas de la familia 11 por lo general tienen un dominio catalítico de 180-200 residuos que se pliega en una estructura 3D del tipo sándwich β -plegada (“righthand”) o “ β -jelly roll”. Interesantemente, las enzimas de la familia 11 son más específicas por xilana, por lo que no contienen dominios adicionales (Pastor *et al.*, 2007).

La comparación de las propiedades catalíticas de las xilanasas de la familia 10 y 11 muestra que las enzimas de la familia 10 tienen mayor versatilidad catalítica o menor especificidad hacia el sustrato, en comparación con aquellas de la familia 11. Además, las xilanasas de la familia 10 muestran mayor actividad sobre oligosacáridos cortos que las enzimas de la familia 11, indicando la existencia de pequeños sitios de unión (Biely *et al.*, 1985; Leggio *et al.*, 2000; Sabini *et al.*, 1999).

1.1.2 Aplicaciones industriales de la xilanasas

Las xilanasas tienen importantes aplicaciones en diferentes procesos biotecnológicos debido a su enorme potencial para modificar y transformar la materia lignocelulósica, utilizada como materia prima en varios procesos industriales.

Las xilanasas se utilizan para mejorar la calidad del pan, al utilizar estas enzimas se ha visto un incremento en el volumen del pan. Esto se mejora con el uso de amilasas en combinación con xilanasas.

Debido a que la xilana está presente en grandes cantidades en residuos procedentes de la agricultura y la industria de alimentos, las xilanasas son utilizadas para la conversión de xilana en xilosa. El desarrollo de un proceso eficiente de hidrólisis enzimática ofrece nuevas perspectivas para el tratamiento de residuos de hemicelulosa.

Las xilanasas son utilizadas junto con celulosas y pectinasas para la clarificación de jugos, licuefacción de frutos y vegetales y para el pretratamiento de forraje para mejorar la digestibilidad de alimentos para rumiantes.

Xilanasas en sinergismo con otras enzimas como mananasas, xilosidasas, glucanasas, glucosidasas, entre otras pueden ser utilizadas para la generación de combustibles biológicos, como el etanol y xilitol a partir de biomasa lignocelulosica.

Actualmente, la principal aplicación industrial de las xilanasas se da en la industria papelera. Más de 2×10^6 toneladas de cloro y derivados clorados son usados anualmente en los Estados Unidos para el blanqueamiento de la pulpa. Los derivados clorados generados por este proceso constituyen un serio problema medio ambiental. Investigaciones recientes han demostrado la factibilidad del uso de tratamientos enzimáticos como alternativas al uso de compuestos clorados para la remoción de lignina de la pulpa. El tratamiento con xilanasas permite la liberación de la xilana y residuos de lignina sin la pérdida de otros componentes importantes de la pulpa. Las xilanasas para poder ser utilizadas en este proceso deben satisfacer ciertas características: 1) no deben presentar actividad celulolítica con el fin de evitar la hidrólisis de las fibras de celulosa, 2) su peso molecular debe ser bajo para facilitar la difusión en las fibras de la pulpa, 3) deben ser estables a altas temperaturas y pH alcalino y 4) se deben obtener buenos rendimientos de la enzima a bajo costo (Viikari *et al.*, 1994; Bajpai, 2004). La mayoría de las xilanasas disponibles en el mercado solo cumplen parcialmente estos criterios.

1.2 Proteínas recombinantes

La tecnología del DNA recombinante es una técnica que ha permitido unir *in vitro* DNA de al menos dos fuentes mediante técnicas de biología molecular. El proceso consiste en tomar el DNA de interés de un microorganismo y ponerlo en otro, de modo que éste lo incorpore a su genoma y, como en el caso de proteínas recombinantes, lo exprese como si fuera suyo. Esta tecnología se desarrolló a pasos

agigantados a partir del descubrimiento de las endonucleasas de restricción y el modo de acción sobre los ácidos nucleicos (Zoller, 1992).

El primer experimento de clonación exitosa fue reportado en 1970 cuando el gen específico de una bacteria fue manipulado, removido e insertado dentro de otra bacteria hospedera y del cual se obtuvieron copias idénticas del DNA. El conocimiento en ésta técnica rápidamente evolucionó y con la tecnología del DNA recombinante se hizo posible el uso de una gran variedad de sistemas de expresión, *in vitro* e *in vivo*, resultando en una herramienta universal aplicada en muchos campos. En el área de la salud, la tecnología del DNA contribuye para la producción de biofármacos, creación de tratamientos que tengan el potencial de regenerar células y tejidos dañados y desarrollo de terapia genética para el tratamiento y cura de enfermedades (Chedrese, 2009).

Una gran variedad de organismos son utilizados como hospederos para la clonación y expresión de genes. Los tres sistemas de expresión más utilizados son bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) y células de mamíferos. Otras posibilidades incluyen hongos filamentosos, células de insectos, animales transgénicos y plantas, y sistemas *in vitro*. La elección del sistema está influenciada principalmente por el tipo de proteína a ser expresada. El hospedero más utilizado es el sistema de bacterias, las cuales por un proceso conocido como transformación se incorpora exitosamente el DNA en la célula. Las bacterias transformadas se seleccionan utilizando un marcador de selección, y posteriormente pueden ser crecidas en mayor volumen, de modo que se pueden recuperar grandes cantidades del DNA recombinante (Chedrese, 2009; Fothergill-Gilmore, 1993).

Los sistemas de expresión se pueden clasificar en dos grandes categorías: procariotas y eucariotas.

Los sistemas procariotas son convenientes para crecer en grandes fermentadores, son excelentes para la expresión de proteínas de bacterias; sin embargo, no pueden realizar modificaciones postraduccionales como glicosilación y estos sistemas forman cuerpos de inclusión que son relativamente fáciles de purificar, pero la

proteína es difícil de renaturalizar. La bacteria *E. coli* es el primer sistema procariota elegido para la producción de proteínas recombinantes y ampliamente utilizado para clonación, manipulación genética y producción a pequeña escala para propósitos de investigación. Las proteínas recombinantes obtenidas de esta bacteria carecen de modificaciones postraduccionales, las cuales están presentes en la mayoría de las proteínas eucariotas y estas modificaciones juegan un papel importante en el plegamiento, procesamiento, estabilidad, actividad biológica e inmunogenicidad de la proteína, de ahí que la deficiencia en estas modificaciones resulte en una proteína insoluble, inestable o inactiva. Otra desventaja se debe a la frecuencia con la que aparecen los diferentes codones en los genes de *E. coli*, los cuales son diferentes a los que ocurren en los genes humanos. De ahí que aquellos genes que contienen codones raros para *E. coli* van a ser expresados ineficientemente y causar terminación prematura de la síntesis de la proteína, reduciendo con esto el rendimiento de la versión de la proteína esperada (Yin *et al.*, 2007; Debnath *et al.*, 2010).

Los sistemas de expresión eucariotas son más complejos. Se obtienen buenos rendimientos de las proteínas recombinantes expresadas en estos sistemas, son buenos para la expresión de proteínas de levaduras pero también pueden ser expresadas proteínas de eucariontes superiores. Realizan modificaciones postraduccionales pero generalmente difieren de aquellas modificaciones de mamíferos y se pueden utilizar exitosamente señales de secreción de otros microorganismos. Dentro de estos sistemas de eucariontes, *S. cerevisiae* es el organismo del que se tiene más información. Este sistema surge como una necesidad de expresar aquellas proteínas en las que se hacen indispensables las modificaciones postraduccionales y cuando la proteína no es producida en forma soluble en los sistemas procariotas. Las levaduras son capaces de llevar a cabo varias modificaciones postraduccionales como O-glicosilación, fosforilación, acetilación y acilación. El principal inconveniente de este sistema de expresión está relacionado con la N-glicosilación, la cual difiere de los eucariotas superiores, en los que las cadenas laterales de azúcar de contenido de alta manosa adicionados por

S. cerevisiae afecta la inmunogenicidad del producto final (Chedrese, 2009; Fothergill-Gilmore, 1993).

Otro sistema eucariota que ha cobrado gran interés en la actualidad es *Pichia pastoris* y esto se debe principalmente a algunas ventajas que tiene con respecto a *S. cerevisiae*, como el hecho que *P. pastoris* que puede crecer en metanol como única fuente de energía, que crece a altas densidades celulares y bajo condiciones ideales puede multiplicarse al punto donde la suspensión celular es prácticamente una pasta (Verma *et al.*, 1998; Yin *et al.*, 2007).

P. pastoris tiene un promotor inducible fuerte que puede ser utilizado para la producción de la proteína heteróloga. Además, es capaz de generar modificaciones postraduccionales más similares a las modificaciones de proteínas humanas. Otra ventaja es el hecho de que *P. pastoris* no secreta muchas proteínas endógenas, con lo que se facilita la purificación de la proteína recombinante (Fleer, 1992).

1.2.1 *Pichia pastoris*

P. pastoris es una de las aproximadamente 30 especies de levaduras, que representan dos diferentes géneros (*Pichia* y *Candida*), capaces de metabolizar metanol. Es una levadura metilotrófica ampliamente utilizada para la expresión de proteínas recombinantes. Un amplio número de propiedades hace a *P. pastoris* adecuada para esta tarea (Jahic *et al.*, 2006; Cereghino y Cregg, 2000), entre las que se pueden mencionar:

- 1) Tiene una velocidad de crecimiento alta y es capaz de crecer en un medio simple y barato.
- 2) Puede crecer tanto en matraz como en fermentadores, lo que la hace adecuada para pequeña y gran escala de producción.

-
- 3) Es un microorganismo preferentemente aerobio. Este hecho evita la generación de subproductos indeseables típicos de procesos fermentativos, como el etanol, lo que facilita su cultivo a altas densidades celulares (>100 g de peso seco/l). El alcanzar niveles elevados de biomasa es muy deseable en la expresión de proteínas que van asociadas al crecimiento celular.
 - 4) Las proteínas recombinantes en *P. pastoris* pueden ser expresadas tanto intracelularmente como secretadas al medio. Debido a que *P. pastoris* secreta pocas proteínas endógenas y a que el medio de cultivo no contiene proteínas, una proteína recombinante secretada comprende la gran mayoría del total de proteínas en el medio. Así, la secreción sirve como un primer paso de purificación, separando la proteína recombinante del resto de las proteínas celulares.
 - 5) Las modificaciones postraduccionales generadas por *P. pastoris* se asemejan más a las de organismos eucariotas superiores que las realizadas, por ejemplo, por *S. cerevisiae*. A diferencia de esta último, *P. pastoris* no hiperglicosila, es decir, la longitud máxima de las cadenas de oligosacáridos introducidas no supera los 30 residuos de manosa, en comparación a los 50 o 150 residuos generados por *S. cerevisiae*.

1.2.2 Promotor AOX1 en *P. pastoris*

La enzima alcohol oxidasa es la responsable de la primera de las reacciones de oxidación del metanol en *P. pastoris* y su síntesis está principalmente regulada por el promotor P_{AOX1} (**Figura 2**), que ha sido utilizado ampliamente en la expresión de proteínas heterólogas en este microorganismo. Existen dos genes en *P. pastoris* que codifican para la enzima alcohol oxidasa, AOX1 y AOX2, pero el gen AOX1 es el responsable de la gran mayoría de la actividad de la alcohol oxidasa en la célula. La expresión del gen AOX1 está altamente regulada y es inducida a niveles altos por metanol. En cultivos con metanol en matraz, la cantidad de esta proteína soluble

puede llegar a ser del 5% de las proteínas totales pero en fermentadores con alimentación de metanol puede llegar a ser hasta del 30% (Darby *et al.*, 2012; Higgins y Cregg, 1998).

El primer paso en el metabolismo del metanol es la oxidación del metanol a formaldehído por la enzima alcohol oxidasa (AOX) generando peróxido de hidrógeno en el proceso. Para evitar la toxicidad del peróxido de hidrógeno, este primer paso en el metabolismo del metanol se lleva a cabo en un organelo especializado denominado peroxisoma, el cual confina el peróxido de hidrógeno del resto de la célula. La AOX tiene poca afinidad por el oxígeno, lo cual es compensado con la producción de grandes cantidades de la enzima para la degradación del metanol en el medio (Cos *et al.*, 2006).

El control de la expresión del gen *AOX1* está regulado de modo que su expresión se reprime en presencia de otras fuentes de carbono, como glucosa y glicerol, y es estimulada por el metanol.

El sistema de regulación de la transcripción del gen *AOX1* está sometido a dos tipos de mecanismo, un sistema de represión/desrepresión por catabolito y uno de inducción específica por sustrato, que en este caso concreto es el metanol. En *P. pastoris*, las condiciones de desrepresión no son suficientes para que se dé una transcripción significativa del gen *AOX1*, sino que se requiere de la presencia del sustrato inductor (Tschopp *et al.*, 1987).

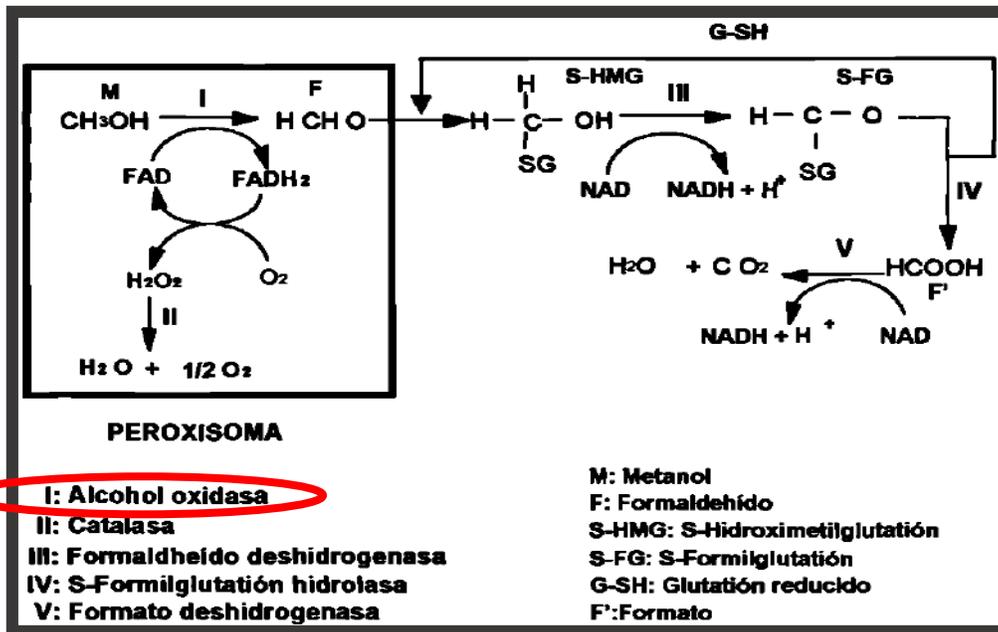


Figura 2. Vía metabólica para la oxidación del metanol en levaduras. Las enzimas participantes están representadas por números romanos y sus productos mediante abreviaciones.

Todas estas observaciones son importantes a la hora del diseño de los cultivos de producción de proteínas heterólogas mediante *P. pastoris* bajo el P_{AOX1}. En la primera etapa, para la generación de biomasa en cultivos de *P. pastoris*, no se requieren grandes concentraciones de la fuente de carbono, que puede ser glucosa o glicerol, sino sólo los requerimientos nutricionales necesarios para la célula. Después de esta etapa, para la producción de la proteína recombinante sólo se requiere el inductor, en este caso el metanol, cuidando de que la concentración en el medio no sobrepase los 5 g/L (Cregg *et al.*, 1993).

La mayoría de vectores de expresión diseñados para *P. pastoris* poseen el P_{AOX1} y están sometidos por lo tanto, a este tipo de control.

1.2.3 Producción de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris*

Aunque existen proteínas que han sido expresadas a nivel matraz en *P. pastoris* en buenos niveles, se ha encontrado que al hacerlo en reactores estos niveles se incrementan considerablemente. Este hecho se fundamenta en que al controlar y suministrar todos los nutrientes para el crecimiento en reactor se pueden alcanzar altas densidades celulares, aumentando con esto los rendimientos de la proteína recombinante. Además, se han obtenido rendimientos más altos en los cultivos en condiciones limitantes en metanol en comparación con aquellos cultivos con exceso en esta fuente de carbono y esta condición sólo puede ser alcanzada y mantenida con un buen control de condiciones de operación en fermentadores (Wagner *et al.*, 1997; Crowley *et al.*, 2000; Almuzara *et al.*, 2002).

Una ventaja adicional de *P. pastoris* se debe al hecho que crece tanto en medios sólidos como líquidos, además de poder utilizar una amplia variedad de sustratos como fuente de carbono.

Con respecto al pH óptimo de crecimiento de este microorganismo, se ha encontrado que es capaz de crecer en un amplio rango (pH 3-7) pudiendo con esto poder reducir la proteólisis escogiendo un pH que no sea el óptimo para una proteasa problema. En el reactor el ajuste del pH se realiza con la adición de ácido fosfórico e hidróxido de amonio, éste último además de servir como control se utiliza como fuente de nitrógeno (Cregg *et al.*, 1993; Inan *et al.*, 1999; Files *et al.*, 2001).

En estudios realizados se ha encontrado que la temperatura óptima de crecimiento y de producción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* está entre 26 y 30 °C. En cuanto a las concentraciones de la fuente de carbono, éstas varían dependiendo de la fuente de carbono a utilizar, ya que fuentes represoras como la glucosa inhiben la expresión de proteínas bajo el promotor AOX1. De ahí la importancia de optimizar la estrategia tanto de alimentación del sustrato como las condiciones de cultivo en el fermentador (Boze *et al.*, 2001; Files *et al.*, 2001).

En los estudios realizados a nivel matraz el medio utilizado es un medio rico con fuente de carbono glucosa o glicerol para la generación de biomasa y con metanol en la fase de inducción. Una vez que se alcanza cierta densidad celular en el medio con glucosa, el cultivo se centrifuga y la pastilla se resuspende en el medio con metanol para la producción de la proteína recombinante.

El cultivo en biorreactor comprende diferentes etapas, una primera etapa de cultivo en lote en un medio mínimo en sales con glucosa o glicerol para la generación de biomasa a altas densidades celulares, una segunda etapa en lote alimentado con la fuente de carbono utilizada en la etapa anterior hasta cierta densidad celular establecida y una última etapa de inducción con metanol para la producción de la proteína recombinante. A lo largo de las diferentes etapas de cultivo las condiciones deben ser mantenidas de modo que no exista ninguna limitación para el crecimiento.

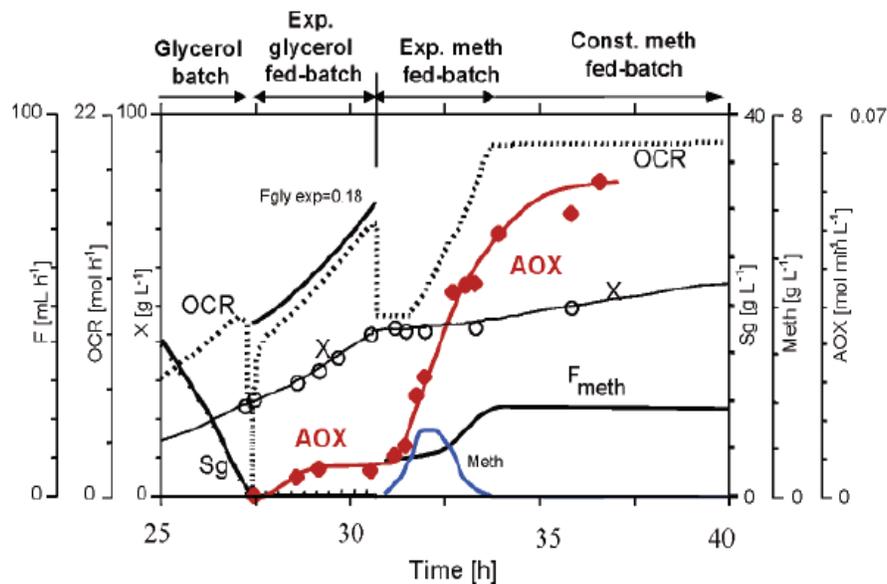


Figura 3. Ejemplo de cultivo de *P. pastoris* en cuatro etapas de crecimiento en biorreactor (Tomado de Jahic *et al.*, 2006).

En la optimización del cultivo para la expresión de diferentes proteínas recombinantes se han propuesto diferentes estrategias como por ejemplo, la disminución en la temperatura de cultivo, adición de diferentes nutrientes en

diferentes tiempos de crecimiento, aumento en etapas de alimentación con las diferentes fuentes de carbono, entre otros (Chiruvolu *et al.*, 1997; Inan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2000).

En la mayoría de las investigaciones, la biomasa alcanzada antes de la etapa de inducción en el reactor es de aproximadamente 52 g DWC/L. Sin embargo, se debe tener en cuenta que cuanto mayor biomasa se obtenga mayor va a ser la demanda tanto del nuevo sustrato como de la cantidad de oxígeno requerido para la oxidación de éste. Además, se incrementan las exigencias para la transferencia de masa desde el gas burbujeado, generalmente aire y/o oxígeno, hasta el medio de cultivo (Jahic *et al.*, 2003).

1.3 Ingeniería de proteínas

Muchos procesos industriales requieren el uso de condiciones drásticas de proceso, compuestos químicos tóxicos, altas temperaturas o pH's extremos. Investigadores biotecnólogos están enfocados en el reemplazamiento de estos procesos por aquellos mediados por enzimas, las cuales puedan tolerar estas condiciones extremas y con ello reducir el uso de compuestos químicos, o llevar a cabo la misma reacción bajo condiciones más moderadas. El éxito en estas áreas de investigación podría significar la reducción del daño al ambiente, bajos costos en términos de la energía utilizada, menor dependencia de recursos no renovables y menor riesgo para los empleados de producción.

Hasta ahora, no se ha podido elucidar la relación entre la secuencia y la estructura de una proteína, lo que se ha considerado como el santo grial de la biología estructural, y parece estar muy lejos de ser alcanzado. El término *Ingeniería de Proteínas* se ha utilizado para referirse al diseño de proteínas con propiedades valiosas y útiles. Las técnicas que se utilizan en esta rama han llegado a ser posibles debido al aumento del conocimiento en las estructuras de las proteínas (Tishkov y Popov, 2006; Willemsen *et al.*, 2008).

La Ingeniería de Proteínas requiere la utilización de técnicas de Biología Molecular, entre las cuales podemos mencionar la clonación, la expresión de proteínas recombinantes, la preparación de proteínas mutantes, la mutagénesis dirigida, entre otras. Existen dos métodos para el diseño de proteínas: el diseño racional (*rational design*) y la evolución dirigida.

1.3.1 Diseño racional de proteínas

En el diseño racional se requiere contar con un conocimiento previo tanto de la estructura 3D como de la función de la proteína a mejorar. La técnica es muy sencilla, involucrando mutaciones a nivel genético seguidas de la expresión de estos genes y la caracterización. Este enfoque se apoya en el análisis estructural y la mutagénesis sitio dirigida para el diseño de propiedades mejoradas. El diseño racional de proteínas ha proporcionado algunos éxitos; sin embargo, tiene sus limitaciones. La predicción estructural y mutagénesis sitio dirigida de ciertos residuos tiende a ser costosa tanto en recursos y mano de obra, así como consumidora de tiempo. Más aún, los efectos de múltiples mutaciones en la función de la proteína no son fácilmente predecibles, aún con datos estructurales disponibles (Johannes y Zhao, 2006).

El diseño de proteínas mediante este enfoque requiere que tanto la estructura como la secuencia sean especificadas, así como las fuerzas básicas que determinan las interacciones no covalentes dentro de la cadena polipeptídica con el disolvente circundante y con los ligandos: fuerzas de Van der Waals e interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, el efecto hidrofóbico y las interacciones favorables de empaquetamiento asociadas con el estado condensado del interior de la proteína. Sin embargo, es muy vasto el número de conformaciones que un polipéptido particular puede adoptar, así como el número de diferentes secuencias que se pueden construir incluso en una pequeña proteína. Además, muchas de estas secuencias y su conformación sólo son distintas por diferencias relativamente pequeñas de energía. La combinación de la inmensa complejidad combinatoria y

las diferencias energéticas sutiles convierten a las interacciones básicas aparentemente sencillas en un auténtico desafío con posibilidades infinitas. La capacidad de un algoritmo para explorar esta vasta información y encontrar las mejores soluciones, las cuales tienen que ser distinguidas de posibilidades inferiores pero estrechamente relacionadas, es un componente crucial de cualquier enfoque de diseño racional. Todos los métodos de diseño utilizan el mismo enfoque para reducir la inmensa complejidad del problema analizado.

La relación entre la teoría y las pruebas experimentales convierten a este enfoque en un método poderoso para comprobar teorías generales de estructura y función.

1.3.2 Evolución dirigida

La evolución dirigida es un segundo método de la Ingeniería de Proteínas que involucra la construcción de bibliotecas en las que el material se encuentra mutado aleatoriamente. El resultado de muchas de estas mutaciones puede ser predicho intuitivamente, mientras que el resultado de otras es desconocido. Después de la traducción de los genes se realiza el escrutinio de la proteína de acuerdo con la característica que se desea mejorar (**Figura 4**) (Kurtzman *et al.*, 2001).

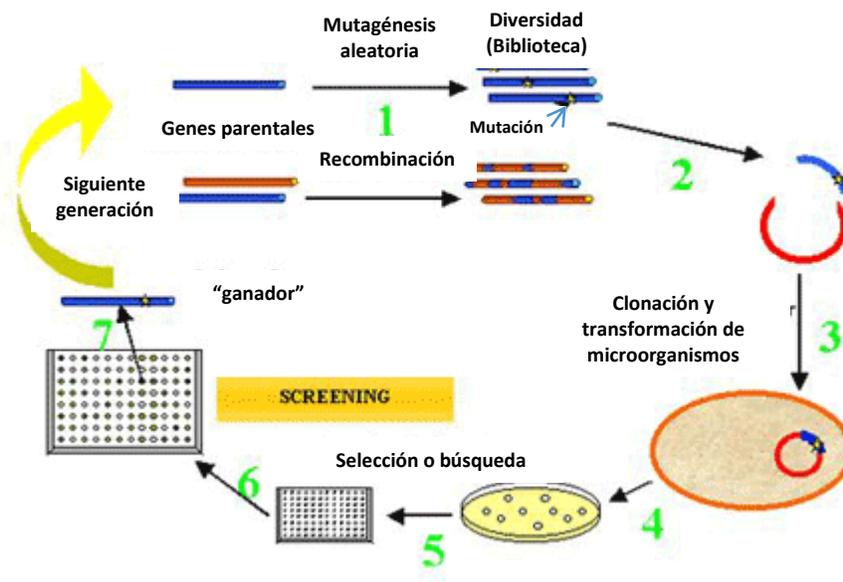


Figura 4. Presentación esquemática de la evolución dirigida.

Avances recientes en evolución dirigida regresan a la fórmula exitosa utilizada en la evolución natural. El estado de arte de los métodos para generar diversidad de secuencias funcionales ahora involucra mutaciones reiterativas y elementos recombinantes, permitiendo el acceso rápido dentro de zonas de la secuencia que no son accesibles utilizando enfoques de mutagénesis sitio-dirigida o mutagénesis aleatoria no recombinante (Hida *et al.*, 2007).

El poder de la evolución dirigida radica en la capacidad para el diseño rápido de proteínas sin el requerimiento de un entendimiento profundo tanto de su estructura o de su mecanismo de acción detallado. La evolución dirigida implica la creación de una gran cantidad de variantes (la biblioteca) de uno o más péptidos o proteínas utilizando técnicas de biología molecular. La creación de la biblioteca es seguida por la identificación de aquellos miembros diferentes con propiedades mejoradas por medio del uso de procesos de escrutinio diseñados dependiendo de la característica a mejorar. Para identificar clonas mejoradas, es esencial mantener una conexión entre el genotipo y el fenotipo (Arnold *et al.*, 2001).

En el diseño de una proteína determinada es frecuente emplear una combinación de ambas técnicas. Primero se aplica el diseño racional y se somete al producto a evolución dirigida.

1.3.3 Técnicas para generar diversidad

La creación de una librería con diferentes mutantes es un paso clave que determina el éxito del enfoque de la evolución dirigida. Debido a que una variante con alguna propiedad mejorada sólo puede ser encontrada siendo un miembro de la biblioteca, existen varios métodos para la generación de bibliotecas para evolución dirigida. Los métodos más comunes y exitosos han sido agrupados en tres enfoques: mutagénesis aleatoria, mutagénesis en “cassette” y recombinación.

En la mutagénesis aleatoria las mutaciones son introducidas a lo largo del gen o en una región del gen. La técnica que más se utiliza en este enfoque es PCR propensa a error, en la cual se utiliza una DNA polimerasa propensa a error y/o condiciones de reacción en las cuales se altere la fidelidad de transcripción de dicha polimerasa, como pueden ser diferentes concentraciones de Mn^{2+} o la adición de otras sustancias permitiendo con esto controlar la velocidad de mutación. Las velocidades de error óptimas son aquellos que nos permiten el balance entre el aumento de la diversidad génica (favorecida a velocidades de error altas) con la necesidad de encontrar proteínas que conserven la actividad biológica (favorecida a velocidades de error bajas) y este balance dependerá tanto de la proteína como del protocolo de mutagénesis (Hida *et al.*, 2007).

En la mutagénesis en “cassette” se introducen múltiples mutaciones pero éstas son dirigidas a una región del gen. Especialmente, las mutaciones son dirigidas a regiones específicas como puede ser el sitio activo o regiones de unión a sustrato. En este enfoque, los métodos utilizados para la creación de las librerías involucran pequeñas secuencias de DNA (oligonucleótidos), los cuales son sintetizados realizando los cambios que se desean introducir en el gen. La principal ventaja de

la mutagénesis en “cassette” es que la diversidad en la librería está enfocada en una región de la proteína que se sabe o se cree que es importante para la función.

En cuanto a la recombinación génica *in vitro*, ésta ocurre cuando un segmento de un gen es intercambiado por un segmento análogo de un segundo gen homólogo. El método que mejor ejemplifica este enfoque es el de DNA “shuffling” y consiste en la fragmentación del gen por digestión con una nucleasa inespecífica y subsecuentemente el reensamblado mediante la amplificación con oligonucleótidos específicos. En comparación con la mutagénesis aleatoria y la mutagénesis en “cassette”, este método crea una biblioteca más diversa en término de las diferencias entre las secuencias de sus miembros. Dicha biblioteca consiste de clonas que son muy diferentes en secuencia entre ellas y potencialmente muy diferentes en función (Roodveldt *et al.*, 2005).

1.4 Simulaciones mediante dinámica molecular

La dinámica molecular (MD) es un método de simulación por computadora para el estudio de los movimientos de átomos y moléculas. En estos estudios, los átomos y moléculas interactúan en un periodo fijo de tiempo, dándonos un panorama de la evolución dinámica del sistema. Por lo general, las trayectorias de átomos y moléculas son determinadas por soluciones numéricas de las ecuaciones de movimiento de Newton para un sistema de partículas interactuando, donde las fuerzas entre las partículas y su potencial de energías son calculadas utilizando potenciales interatómicos o campos de fuerza moleculares (Dagget, 2006).

MD ha cobrado gran popularidad en materiales, bioquímica y biofísica. MD es frecuentemente utilizada en biología estructural para refinar estructuras tridimensionales de proteínas y otras macromoléculas obtenidas mediante técnicas experimentales como la cristalografía o NMR. Así como para estudiar el movimiento de moléculas biológicas como las proteínas y los ácidos nucleicos, los cuales pueden ser de utilidad para la interpretación de datos experimentales y para el

modelado de interacciones con otras moléculas o entre los residuos de una misma proteína (Verli et al., 2007).

1.4.1 Dinámica molecular de proteínas

MD es la técnica más realista de simulación disponible, permitiendo detalle de todas las interacciones entre la proteína y los átomos del solvente monitoreados a lo largo del tiempo. Para comprender el proceso completo de plegamiento/desplegamiento de una proteína, necesitamos caracterizar los estados conformacionales a lo largo del proceso –nativa, transición, intermediario y desnaturalizado- así como los mecanismos de conversión entre estos estados. Sin embargo, la caracterización es difícil experimentalmente debido a la dinámica, heterogénea y transitoria naturaleza de estados de plegamiento. Por esto, enfoques experimentales nos proporcionan información limitada de las transiciones estructurales e interacciones que ocurren durante el plegamiento de la proteína. Estudios teóricos pueden complementar muy bien los datos experimentales. Aunque la teoría y los experimentos han proporcionado respuestas a muchas de las preguntas fundamentales del proceso de plegamiento, aun no es claro cómo la secuencia proporciona dichas características. Por ello se sabe que es esencial continuar incrementando el conocimiento y entendimiento del proceso de plegamiento y desplegamiento de las proteínas desde un punto de vista multidisciplinario (Dagget, 2006; Hess et al., 2008).

1.4.2 Interacciones moleculares involucradas en la estabilidad de proteínas

Hay un balance entre interacciones no-covalentes y fuerzas termodinámicas en la estabilidad estructural y la función de proteínas. Típicamente las interacciones que son consideradas las más dominantes para la estabilidad de la proteína son dependientes de efectos hidrofóbicos, enlaces de hidrogeno, interacciones

electrostáticas, entre otras, localizadas en superficies internas de la proteína. Estas interacciones moleculares que influyen en la estabilidad de la proteína pueden ser evaluadas por técnicas experimentales y computacionales. Estos estudios nos ayudan a entender las fuerzas físicas y químicas como la llave hacia la predicción del plegamiento de proteínas, reconocimiento, función, entre otras propiedades biológicas. Se sabe que las proteínas tienen estabilidad estructural, la cual es la suma de un gran número de interacciones intermoleculares no enlazantes. Estas interacciones intermoleculares no enlazantes son los enlaces covalentes, puentes salinos, enlaces de hidrógeno, interacciones electrostáticas largo-rango e interacciones de Van der Waals (Ilizaliturri et al., 2012).

Las interacciones de hidrógeno son mediadas entre un hidrógeno localizado en un heteroátomo y un átomo polar como oxígeno, nitrógeno, azufre y también con átomos de halógeno. Hay otra poco estudiada interacción de hidrógeno, interacciones hidrógeno- π la cual es mediada entre el hidrógeno localizado en un heteroátomo y un anillo aromático. Los enlaces de hidrógeno son muy comunes en intra- o inter-proteínas. Los enlaces de hidrógeno intramoleculares se pierden en el desplegamiento de las proteínas y son reemplazados por enlaces nuevos con el agua. Debido al efecto hidrofóbico, las cadenas laterales no polares evitan el contacto con el agua y tienden a reunirse una cerca a la otra. Como resultado, los residuos hidrofóbicos forman el "core" hidrofóbico de la proteína. Esencialmente, son localizados en la parte interna de la proteína y pueden mantener la estructura globular plegada. Las interacciones electrostáticas son algunas veces nombradas como puentes salinos y pueden formar un enlace de hidrógeno con grupos polares como OH, SH, NH, los cuales son localizados en la proteína o ligando. Es poco probable que los puentes salinos sean factores dominantes que gobiernen la estabilidad de las proteínas. Sin embargo, las proteínas de organismos termófilos e hipertermófilos tienen más, y frecuentemente conectados, puentes salinos comparados con las proteínas de los organismos mesófilos. Incrementando la estabilidad térmica de proteínas con la optimización de interacciones carga-carga es un buen ejemplo de solución evolutiva utilizando factores físicos. Con relación a las interacciones aromáticas, estas pueden ser consideradas interacciones

hidrofóbicas, sin embargo, son importantes de mencionar debido a su interés de interacciones proteína-proteína y algunas veces para reconocimiento de ligandos. En particular, contactos intra- e inter-proteína son esencialmente mediados por residuos de tirosina, fenilalanina o triptófano (Kemink y Creighton, 1995; Porebski et al., 2015).

1.5 Antecedentes directos

En nuestro grupo de trabajo, Amaya Delgado, 2007 clonó el gen que codifica para la xilanasa extracelular Xyn11A de *Cellulomonas flavigena*, a partir de una biblioteca de DNA genómico. El gen *xyn11A* de *C. flavigena* (999 pb) codifica para la xilanasa extracelular Xyn11A, cuyo peso molecular estimado es de 35,110 Da. Esta proteína fue expresada en *Escherichia coli*; sin embargo, se observó que el 60% se agregaba dando lugar a la formación de cuerpos de inclusión.

Con la finalidad de resolver el inconveniente de los cuerpos de inclusión que generalmente se forman a partir de proteínas recombinantes expresadas en *E. coli*, Pavón-Orozco (2010) clonó el gen *xyn11A* de *C. uda* y lo expresó extracelularmente en *P. pastoris*. El vector utilizado fue pGAPZ, el cual cuenta con promotor constitutivo. La xilanasa expresada a partir de células de *P. pastoris/pGAPZ-xyn11A* presentó un PM aproximado de 35,110 Da y mostró ser catalíticamente activa.

En el trabajo de Maestría, se subclonó el gen *xyn11A* de *C. uda* en el vector pPICZ α B y se expresó en *P. pastoris*, pero utilizando un promotor inducible, el AOX1. Se logró expresar extracelularmente una proteína de aproximadamente 45 kDa con actividad xilanolítica. La xilanasa se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*, crecida en metanol como única fuente de carbono, mediante una sola etapa de cromatografía de intercambio iónico. La temperatura y pH óptimos de la xilanasa fueron 50°C y 6.5, respectivamente. La termoestabilidad ($t_{1/2}$) a 50°C fue 26.82 min y a 60°C de 1.5 min. Con estas características, sobre todo de termoestabilidad, esta xilanasa aún no es apta para ser utilizada en la aplicación

industrial principal de estas enzimas, en la industria de la pulpa y el papel. Por lo que la propuesta que se hace en este trabajo es la mejora de la termoestabilidad y/o pH de la xilanasa Xyn11A mediante ingeniería de proteínas, así como el cultivo de la cepa *P. pastoris*/pPICZaB-xyn11A en biorreactor.

II. JUSTIFICACIÓN

A pesar del gran número de investigaciones realizadas sobre xilanasas provenientes de diversas fuentes, aún sigue siendo importante su estudio para la obtención de enzimas que tengan características apropiadas para aplicaciones industriales o la mejora de las xilanasas ya existentes.

Entre las herramientas valiosas para el mejoramiento de enzimas tenemos: como un enfoque no racional la evolución dirigida y como un enfoque racional la mutagénesis Sitio-Dirigida. La utilización de estos métodos de generación de variabilidad vislumbra un futuro muy prometedor para obtener lo que se conoce como “enzimas hechas a la medida”. Por lo que, en este trabajo se propone la mejora de las características bioquímicas de la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* mediante evolución dirigida y/o mutagénesis Sitio-Dirigida, así como la implementación de una estrategia para el cultivo de *P. pastoris*/pPICZ-xyn11A a nivel biorreactor, por Ingeniería de Biorreactores.

III. HIPÓTESIS

H1: La utilización de metanol como única fuente de carbono en cultivos de *P. pastoris*/pPICZaB-*xyn11A* en biorreactor bajo condiciones controladas conducirá a la obtención en mayor cantidad de la xilanasa de forma extracelular que utilizando glucosa y metanol como fuentes de carbono.

H2: El rediseño de la xilanasa Xyn11A mediante evolución dirigida y/o mutagénesis Sitio-Dirigida mejorará sus propiedades bioquímicas.

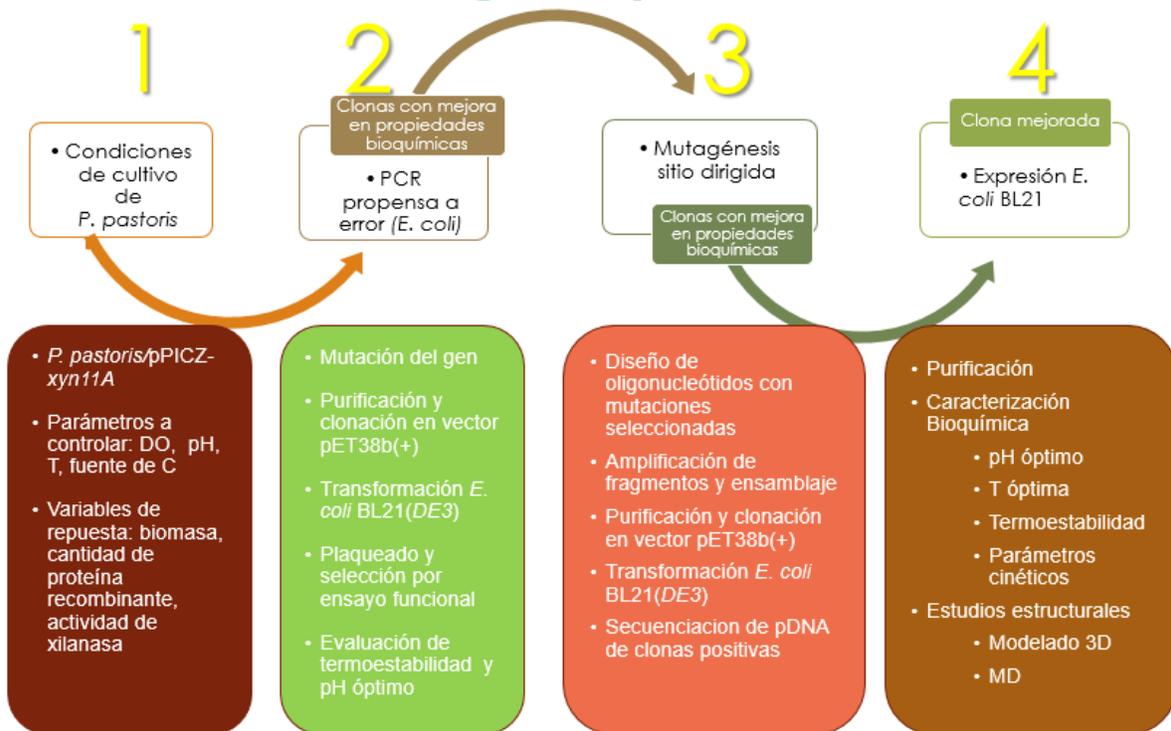
IV. OBJETIVO GENERAL

- Establecer condiciones de operación en biorreactor para la producción extracelular de la xilanasas Xyn11A expresada en *P. pastoris*.
- Mejorar las propiedades bioquímicas de la xilanasas Xyn11A mediante ingeniería de proteínas.

IV.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer las condiciones de operación para el cultivo de la cepa recombinante *P. pastoris*/pPICZaB-xyn11A en biorreactor.
2. Generar variantes al azar de la xilanasas Xyn11A de *C. uda* por PCR “error-prone” (ep-PCR) y seleccionar aquellas con mayor termoestabilidad con respecto a la enzima silvestre.
3. Generar mutantes de la xilanasas Xyn11A de *C. uda* mediante mutagénesis Sitio-Dirigida y evaluar los cambios de termoestabilidad con respecto a la enzima silvestre.
4. Expresar la enzima mejorada por evolución dirigida y/o mutagénesis sitio dirigida en *E. coli* BL21 (DE3), caracterizarla bioquímicamente y realizar estudios de Dinámica Molecular.

V. METODOLOGÍA



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 CULTIVO EN BIORREACTOR

6.1.1 Cinética de crecimiento de *P. pastoris*/pPICZ α -xyn11A en medio mínimo con glucosa y metanol a nivel matraz

Se realizó una cinética de crecimiento de la cepa *P. pastoris*/pPICZ α -xyn11A en matraz conteniendo el medio mínimo en sales MSM (4 g/L de KH₂PO₄; 4 g/L de (NH₄)₂SO₄; 0.38 g/L de CaCl₂; 18.2 g/L de K₂SO₄; 9.4 g/L de MgSO₄·H₂O; 1 mL/L de PTM1) y con fuente de carbono glucosa (40 g/L de glucosa) o metanol (2.5 g/L). La solución de elementos traza PTM1 contiene: 5.99 g/L CuSO₄·5H₂O, 8 mL 10×NaI solución, 3 g/L MnSO₄·H₂O, 0.20 g/L Na₂MoO₄·2H₂O, 0.50 g/L CoCl₂·6H₂O, 20.04 g/L ZnCl₂·5H₂O, 65.05 g/L FeSO₄·7H₂O, 800 μ L 100× H₃BO₃ solución concentrada, 19.2 mL 96.2% H₂SO₄ y 0.40 g/L de biotina. Se tomó muestra cada 12 h y al mismo tiempo se realizó la adición de metanol en los matraces con esta fuente de carbono. El seguimiento del crecimiento se llevó a cabo mediante OD_{600nm}.

6.1.2 Cultivo de *P. pastoris*/pPICZ α -xyn11A en biorreactor en 1 y 2 etapas

Las fermentaciones se llevaron a cabo en un reactor de 7 L BIOSTAT Aplus. Para la propagación, *P. pastoris* se cultivó en medio YPD. Las células del pre-inóculo para el reactor se crecieron en 200 mL de medio YPD inoculados con 2% en matraces Erlenmeyer de 1 L, incubados a 28°C y 200 rpm por 24 h. El medio fue centrifugado a 8000 rpm por 10 min y el paquete celular fue resuspendido en 300 mL de medio mínimo en sales (MSM) para inocular el reactor.

Para la fermentación, se utilizó el medio basal MSM adicionada con la solución de elementos traza PTM1. Las condiciones de operación fueron: 3.5 L de volumen de operación, 28 \pm 1°C, pH 7.0, 600 rpm y 1 vvm de aireación inicial. El pH se mantuvo automáticamente por la adición de NH₄OH (30%) y H₃PO₄ (8.5%). Con el objetivo

de mantener el oxígeno disuelto (DO) arriba de 20%, la agitación y aireación fueron controladas entre 600-1000 rpm y 1–1.5 vvm, respectivamente.

Para la fermentación en 2 etapas, la fermentación se inició con una etapa de cultivo en lote usando una concentración de glucosa de 40 g/L. La etapa de lote terminó hasta el agotamiento de la glucosa y fue cuando comenzó la siguiente etapa, los pulsos de metanol al 0.5% (v/v) se aplicaron cada 2 h.

Para la fermentación en una etapa, esta se inició con una etapa de lote con una concentración inicial de metanol de 2.5 g/L. Después del consumo de metanol durante la fase en lote, indicado por un incremento en la concentración de DO, se inició la etapa de lote alimentado.

Para ambos métodos, la solución de alimentación para la etapa de lote alimentado contenía una mezcla de 12 mL de la solución PTM1 y 1000 mL de metanol al 100%. La solución de alimentación se adicionó por pulsos con el objeto de mantener la concentración de metanol debajo de 0.5% en el reactor. El antiespumante fue utilizado como un supresor de espuma y fue adicionado cuando era necesario.

6.1.3 Determinación de glucosa y metanol en el medio de cultivo

La cuantificación de la concentración de glucosa y metanol en el medio de cultivo se realizó utilizando un analizador bioquímico YSI 2700. Una muestra de medio de cultivo (1 mL) se centrifugó a 13000 rpm por 5 min, el sobrenadante se separó y fue analizado directamente en el equipo.

6.1.4 Determinación de la actividad xilanolítica

Se centrifugó 1 mL del medio de cultivo y se separó el sobrenadante. Se determinó la actividad xilanolítica de este sobrenadante. A 900 µl de solución de xilana (xilana al 0.2% en regulador de citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.5) se adicionaron 100 µL de

solución proteica (fracción soluble) y se incubó la mezcla a 50°C durante 20 min. La cantidad de azúcares reductores se cuantificó mediante la técnica de DNS (Miller, 1959). La actividad enzimática fue expresada en U/mL, donde una U = μmol de azúcares reductores liberados por minuto, bajo las condiciones de ensayo.

6.1.5 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína en el sobrenadante de cultivo se realizó con la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) usando albumina bovina como estándar.

6.1.6 Purificación y caracterización bioquímica de Xyn11A_{AOX1}

La xilanasas fue purificada por cromatografía de intercambio iónico. Una vez que se obtuvo la proteína purificada se determinó el pH y temperatura óptima, así como la termoestabilidad de la proteína a tres diferentes temperaturas 40, 50 y 60°C. Así mismo, se determinaron los parámetros cinéticos V_{max} y K_M . Tanto la purificación como la caracterización bioquímica fueron realizadas de acuerdo a lo reportado en Cayetano-Cruz, 2011.

En este trabajo de Doctorado se complementó la caracterización bioquímica con la determinación de los productos de hidrólisis y que no se ha reportado en trabajos anteriores. Los productos de degradación de la xilana fueron analizados por TLC. Un total de 7 U de Xyn11A_{AOX1} se incubó a fueron incubados a 40°C en 150 μL de xilana al 1% (w/v) en buffer citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.5. Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos. 3 μL de cada muestra y 2 μL de estándares de xilo-oligómeros (xilosa, xilobiosa, xilotetraosa y xilohexosa) fueron aplicadas en placas de silica gel Merck KGaA. Los productos de hidrólisis fueron separados con un sistema de solventes etanol (30% v/v), butanol (50% v/v) y H₂O (20% v/v). Las placas fueron rociadas con ácido sulfúrico (15% v/v) y calentadas por 40 min a 80°C en una estufa para visualizar los xilo-oligómeros.

6.2 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

6.2.1 Amplificación del gen *xyn11A*

Debido a que el gen *xyn11A* se encuentra clonado en el vector pPICZ α B flanqueado con los sitios de restricción *Xba* I y *Pst* I, lo primero que se realizó es el cambio de sitios de restricción por *Nhe* I y *Xho* I para poder realizar la expresión en *E. coli* BL21 utilizando el vector pET-38b(+). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un total de 30 ciclos.

6.2.2 Mutación del gen *xyn11A*

La mutación del gen *xyn11A* se llevó a cabo mediante PCR propensa a error utilizando el Kit GeneMorph II Random Mutagenesis (Agilent Technologies, EU) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para generar el número de mutaciones que se desean en todo el gen. El fragmento amplificado y mutado del gen *xyn11A*, se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % utilizando el kit “QIAquick® Spin Handbook” (QIAGEN), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

6.2.3 Clonación de *xyn11Ay xyn11A_mut* en el vector de expresión pET-38b(+)

Tanto el vector pET-38b(+) como el producto de la amplificación correspondientes al gen *xyn11Ay xyn11A_mut* fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Xho* I. La mezcla de reacción que se realizó fue la siguiente: 12 μ l H₂O, 4 μ l DNA a digerir, 2 μ l buffer Cutsmart, 1 μ l *Nhe* I y 1 μ l *Xho* I. La mezcla de reacción se incubó durante 4 h a 37 °C. El vector y amplificado, con extremos cohesivos *Nhe* I y *Xho* I, se purificó a partir de geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1 % utilizando el

kit “QIAquick® Spin Handbook” (QIAGEN), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

6.2.4 Ligación y transformación de células competentes y electrocompetentes

Se realizó una reacción de ligación con el vector y el ORF, ambos con extremos cohesivos *Nhe* I y *Xho* I. Para la ligación se utilizó T4 DNA ligasa. Con este procedimiento se obtuvo la construcción pET-38b(+)-*xyn11A* y pET-38b(+)-*xyn11A_mut*. Con la construcción pET-38b(+)-*xyn11A* se transformó por choque térmico a células de *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes, utilizando la técnica descrita por Sambrook *et al.*, 2001. La selección de las células transformantes se llevó a cabo en base al marcador de resistencia a Kanamicina. Las células transformadas se sembraron en medio LB adicionado con 30 µg/mL de este antibiótico. Por otro lado con la construcción pET-38b(+)-*xyn11A_mut* se transformaron por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) ya que necesitábamos una mejor eficiencia de transformación para generar la biblioteca conteniendo el gen mutado.

6.2.5 Extracción de DNA plasmídico de clonas candidatas

Para la extracción de DNA plasmídico, se partió de un cultivo en medio LB de 5 mL de *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector recombinante pET-38b(+)-*xyn11A* o pET-38b(+)-*xyn11A_mut*. El paquete celular fue separado por centrifugación a 10000 rpm a 4 °C por 1 min y se siguió la técnica modificada de Birnboim y Doly-Sambrook para aislamiento de DNA plasmídico a pequeña escala. Las células se resuspendieron en 150 µl de una solución de Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, pH 7.5 y glucosa 1 M, se adicionaron 300 µl de una solución de NaOH 0.2 M y SDS 1%, se agitó en agitador orbital (vortex) por 1 ó 2 s y se dejó reposar 5 min en un baño de hielo, se adicionaron 300 µl de una solución fría de acetato de potasio 5 M,

ácido acético glacial y agua, se mezcló por inversión aproximadamente 100 veces y se dejó reposar en baño de hielo por 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 13000 rpm por 15 min, fue separado el sobrenadante en un tubo nuevo y se le adicionó un volumen igual de fenol:cloroformo, mezclándose la fase orgánica y acuosa por vortex y después se centrifugó la emulsión a velocidad máxima a 4°C por 2 min en una microcentrífuga. La fase superior acuosa se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 700 µl de isopropanol al 100%, se agitó bruscamente por inversión y se dejó reposar por 20 min a -20°C. Se centrifugó a 13000 rpm por 30 minutos, el sobrenadante fue desechado cuidadosamente y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol al 70%. Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. El DNA fue secado calentando a 60°C el tiempo requerido y se resuspendió en 40 µl de buffer EB. El DNA plasmídico se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

6.2.6 Análisis de restricción de pET-38b(+)-xyn11A

Para comprobar la presencia del inserto, el DNA plasmídico se digirió con las enzimas *Nhe* I y *Xho* I en una doble digestión. La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente: 12 µl H₂O, 4 µl vector pET-38b(+), 2 µl buffer Cutsmart, 1 µl *Nhe* I y 1 µl *Xho* I. La mezcla de reacción se incubó a 37 °C durante 4 h. El producto de la digestión se analizó por electroforesis en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

6.2.7 Expresión de la proteína y determinación de actividad xilanolítica

Las clonas candidatas a analizar fueron crecidas en medio LB con 30 µg/mL de Kanamicina a 37 °C y 180 rpm hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.4-0.8, momento en el que se realizó la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración de 1mM. Se incubaron en estas condiciones por 3-5 h. Se analizó el

sobrenadante de cultivo para la determinación de la actividad xilanolítica. A 900 μ l de solución de xilana (xilana al 0.2% en regulador de citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.5) se adicionaron 100 μ L de solución proteica (fracción soluble) y se incubó la mezcla a 50°C durante 10 min. La cantidad de azúcares reductores se cuantificó mediante la técnica de DNS (Miller, 1959).

6.2.8 Escrutinio de la biblioteca conteniendo el gen *xyn11A* mutado

El escrutinio de la biblioteca conteniendo el gen mutado se llevó a cabo en medio sólido. A partir de la biblioteca se sembraron por duplicado las colonias en medio 2TY conteniendo xilana al 0.2% e IPTG 1 mM. Se incubaron a 50 y 70°C por 1.5 h. para la detección de la actividad xilanolítica, las cajas se tiñeron con solución acuosa de Rojo Congo al 1% y se destiñeron con una solución de NaCl 1 M.

6.3 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR MUTAGÉNESIS SITIO-DIRIGIDA

6.3.1 Amplificación del gen *xyn11A* con la mutación N9Y y expresión en *E. coli* BL21

La mutagénesis Sitio-dirigida se llevó a cabo por el método de PCR de extensión por solapamiento. Se diseñaron y sintetizaron oligonucleótidos para realizar el cambio del aminoácido nueve (N9Y). Dos oligonucleótidos fueron utilizados para amplificar el fragmento conteniendo la mutación y otro par de oligonucleótidos se utilizaron para amplificar el resto del gen utilizando como templado el gen *xyn11A* sin mutar. El gen completo se ensambló utilizando una concentración equimolar de los productos generados y utilizando los oligonucleótidos que flanquean el gen con los sitios de restricción Nhe I y Xho I (**Tabla 1**).

Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados para generar la mutación en *xyn11A*

Mutación/ Sitio de restricción	Secuencia de oligonucleótido sequence (5´-3´)
N9Y	acgtccaaccagaccggcTACagcggc
Nhe I	gaGCTAGCgcggtgacgtccaaccag
Xho I	cgCTCGAGtcagcagaacgcgctgg

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 95 °C por 1 min, 65 °C por 1 min, 72 °C por 1 min y un total de 30 ciclos. El material ensamblado se purificó y clonó en el vector de clonación pDrive utilizando el kit “PCR cloning” (QIAGEN), siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de dejar las placas incubando toda la noche, se seleccionaron colonias para crecer en medio líquido y realizar la extracción de DNA plasmídico. El DNA plasmídico fue digerido con *Nhe* I y *Xho* I. La mezcla de reacción que se realizó fue la siguiente: 12 µl H₂O, 4 µl DNA a digerir, 2 µl buffer Cutsmart, 1 µl *Nhe* I y 1 µl *Xho* I. El DNA que después de la digestión liberó un fragmento de aproximadamente 900 pb se envió a secuenciar para corroborar que las mutaciones hayan sido realizadas correctamente. Este producto liberado se subclonó en el vector de expresión pET-38b(+). Los plásmidos conteniendo la xilanasa nativa y la mutada fueron transformados en *E. coli* BL21.

6.3.2 Selección de clones que expresan la xilanasa mutada en medio sólido

Las clones que contienen el plásmido pET-38b(+)/*xyn11A*-N9Y se crecieron a 37°C por 2 h en medio sólido 2TY conteniendo 30 µg/mL de kanamicina, 1 mM de IPTG y xilana al 0.2%(w/v). Las clones positivas fueron seleccionadas por la detección de la actividad xilanolítica visualizada por los halos de hidrólisis después de la tinción con rojo Congo de las placas. Con el objeto de conocer si la mutación había producido algún cambio relacionado con la actividad xilanolítica a una mayor temperatura, incubamos las placas de agar a 50°C (temperatura óptima de la

xilanasa nativa) y a 70°C (temperatura en la que ya no se observaba halo de hidrólisis en la xilanasa nativa).

6.3.3 Expresión y purificación de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

Las células de *E. coli* expresando la xilanasa nativa y mutada se crecieron en medio 2TY hasta alcanzar una densidad óptica (A_{600}) de 0.6. Momento en el que se comenzó con la inducción adicionando isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. El cultivo se mantuvo toda la noche a 37°C sin agitación. Seguida de 5 h de agitación a 180 rpm. El sobrenadante fue separado por centrifugación a 8000 rpm por 10 min. El sobrenadante libre de células se concentró utilizando un Centriconde 10 kDa de corte y se dializó en el buffer bajo en sales para ser cargado a la columna de intercambio iónico.

La xilanasa nativa (Xyn11A-WT) se purificó por cromatografía de intercambio aniónico con el buffer A (Tris-HCl 50 mM, KCl 25 mM, PMSF 0.1 mM, pH 7.5). Las proteínas que interaccionaron con la resina fueron eluidas de la columna con un gradiente lineal de KCl (25 mM-1M) en buffer A.

La xilanasa mutada (Xyn11A-N9Y) también se purificó por cromatografía de intercambio aniónico pero cambiando el buffer A por uno de L-Histidina (L-Histidina 50 mM, NaCl 25 mM, PMSF 0.1 mM, pH 6.0). Las proteínas que interaccionaron con la resina fueron eluidas de la columna con un gradiente lineal de NaCl (25 mM-1M) en buffer A. para ambas cromatografías se utilizó una velocidad de flujo de 2.5 mL/min y se colectaron fracciones de 2.0 mL. Las fracciones con actividad xilanolítica fueron mezcladas y analizadas por SDS-PAGE al 10%.

6.3.4 Efecto del pH sobre la actividad xilanolítica

Para determinar el efecto del pH sobre la actividad xilanolítica, Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y purificadas se incubaron en buffer a diferentes pH y con xilana al 0.2% a 50°C. Se utilizó el buffer citratos-fosfatos 0.05 M a pH de 4-7 y el buffer fosfatos 0.1 M a pH de 7-8.

6.3.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Para medir el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las xilanasas, cada enzima purificada fue incubada en una solución de buffer citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.5 para Xyn11A-WT y buffer fosfatos 100 mM, pH 7.5 para Xyn11A-N9Y con xilana al 0.2% en un rango de temperaturas de 30°C a 75°C.

6.3.6 Termoestabilidad de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

La estabilidad térmica de las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y se determinó por la medición de la actividad xilanolítica residual a diferentes tiempos. La enzima purificada (Xyn11A-WT o Xyn11A-N9Y) se incubó a 50 y 60 °C en regulador citratos-fosfatos 50 mM, pH 6.5 para Xyn11A-WT y fosfatos 0.1 M, pH 7.5 para Xyn11A-N9Y. A diferentes intervalos de tiempo se tomó una alícuota de la enzima purificada para medir la actividad xilanolítica residual. A partir de los datos obtenidos se determinó la vida media ($t_{1/2}$) a las diferentes temperaturas.

6.3.7 Determinación de los parámetros cinéticos K_M y V_{max} de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

Los parámetros cinéticos K_M y V_{max} fueron determinados al medir la actividad xilanolítica a diferentes concentraciones de xilana, de 1 a 10 mg/mL y bajo

condiciones óptimas de temperatura y pH. Los valores de K_M y V_{max} fueron calculados a partir de la gráfica de recíprocos de Lineweaver-Burk.

6.4 SIMULACIONES MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR

6.4.1 Estructuras tridimensionales de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

El servidor I-TASSER (Zhang, 2008) se utilizó para obtener las estructuras tridimensionales de ambas xilanasas. I-TASSER nos permite generar automáticamente predicciones de alta calidad de estructuras 3D, así como la predicción de la función biológica de proteínas. El servidor predijo la estructura completa de la xilanasas nativa y mutada combinando “threading” y “ab initio” modelado. Cada secuencia de la proteína fue subida de forma independiente al servidor I-TASSER. El mejor modelo para utilizarse en análisis subsecuentes fue seleccionado después de validar las estructuras mediante gráficas de Ramachandran con el programa PROCHECK. Los programas PyMOL y VMD fueron utilizados para visualizar las proteínas.

6.4.2 Simulaciones mediante Dinámica Molecular

Todas las simulaciones de dinámica molecular fueron realizadas con GROMACS4 (Hess et al., 2008) usando un campo de fuerza OPLS-AA (Jorgensen y Tirado-Rives, 1988). El algoritmo Leap-frog fue utilizado para integrar las ecuaciones de movimiento de Newton. La proteína fue solvatada en una caja rectangular de agua SCP (Berendsen et al., 1981) con una distancia mínima de 1 nm de la proteína al borde de la caja. Para obtener una carga total neutra en el sistema, 4 Cl⁻ contraiones fueron adicionados. La estructura de Xyn11A-WT estuvo formada por 2175 átomos de la proteína y 12560 moléculas de agua. La estructura de Xyn11A-N9Y estuvo formada por 2179 átomos de la proteína y 12560 moléculas de agua. Durante la etapa de minimización de energía el algoritmo de descenso más empinado fue utilizado y la convergencia se alcanzó en 424 y 347 etapas para Xyn11A-WT y

Xyn11A-N9Y, respectivamente. Las simulaciones MD se llevaron a cabo con un tiempo de 2 fs en cada etapa bajo condiciones NPT para que el tamaño de la caja pudiera fluctuar y mantener la presión a un valor constante y las coordenadas del sistema completo se guardaron cada 250 pasos. El algoritmo PME (Essmann et al., 1995) se utilizó para las interacciones electrostáticas con una distancia de corte de 1 nm. Una distancia de corte de 1 nm se utilizó para calcular las interacciones de Van der Waals. El acoplamiento de la temperatura y presión se llevaron a cabo utilizando el algoritmo Nosé-Hoover (Nosé y Klei, 1983; Parrinello y Rahman, 1981) y Parrinello-Rahman (Nosé, 1984; Hoover, 1985), respectivamente. Después de la estabilización del sistema, la energía potencial se conservó en todos los casos durante las simulaciones de MD. Las simulaciones de Dinámica Molecular fueron desarrolladas por 50 ns a 300, 400 y 500 K para ambas proteínas. Las simulaciones nos dieron como resultado trayectorias, las cuales fueron sometidas a análisis usando las herramientas de GROMACS como RMSD, RMSF, Rg y SASA. Los análisis de estructura secundaria fueron realizados utilizando el programa DSSP (Kabsch y Sander, 1983). Los puentes de hidrogeno y salinos fueron obtenidos con las herramientas de VMD (Humphrey et al., 1996).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La demanda por enzimas de interés industrial va en aumento. Actualmente las industrias se interesan en enzimas que tengan una buena eficiencia en los procesos y además que sean fáciles de obtener y en buena cantidad. En este trabajo de doctorado utilizamos como modelo de estudio la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* y se abordaron dos problemáticas que se presentan en la industria a la hora de incorporar alguna enzima en algún proceso biotecnológico. La primera es que las enzimas que se utilizan a nivel industrial deben de ser obtenidas en buena cantidad para que los costos en los procesos no se incrementen. De aquí que la estrategia que nosotros utilizamos fue la expresión en un sistema heterólogo, *Pichia pastoris*, de la xilanasa Xyn11A y la producción a nivel biorreactor utilizando un medio de cultivo a base de sales y tratando de disminuir los tiempos de fermentación en comparación con las fermentaciones que se han reportado hasta el momento. Otro inconveniente que se tiene con las enzimas de interés industrial y que quisimos abordar en este trabajo es la poca disponibilidad de enzimas que cumplan con los requerimientos de los procesos biotecnológicos en cuanto a temperatura y pH. Este es el caso de la xilanasa de este estudio, ya que es una enzima mesofílica y activa a un pH cercano al neutro. Sin embargo, las condiciones necesarias para ser utilizadas en procesos de la pulpa y el papel son condiciones alcalinas y de altas temperaturas. Por lo que una estrategia que se ha seguido ya no es la búsqueda de enzimas termofílicas sino la mejora de las propiedades de las xilanasas mesofílicas que ya se conocen. Para realizar estas mejoras se han desarrollado un sin número de técnicas y enfoques. Nosotros en este trabajo utilizamos dos enfoques, un enfoque no racional o evolución dirigida con la técnica de PCR propensa a error y un enfoque racional mediante mutagénesis sitio-dirigida. Además, de los resultados que se obtuvieron de forma experimental, quisimos utilizar herramientas bioinformáticas para tratar de explicar los cambios ocurridos en la estructura de la proteína con la mutación que hizo que mejoraran las propiedades de la xilanasas, por lo que se realizaron simulaciones de dinámica molecular. Los resultados y discusión de cada una de las etapas del proyecto se presentan a continuación.

7.1 CULTIVO EN BIORREACTOR

7.1.1 Cinética de crecimiento de *P. pastoris*/pPICZ α -xyn11A en medio mínimo con glucosa y metanol a nivel matraz

Se ha reportado que las velocidades de crecimiento de *P. pastoris* en metanol son mucho menores en comparación con el crecimiento en glucosa (Cregg *et al.*, 1993; Inan *et al.*, 1999; Files *et al.*, 2001). De ahí la importancia que le dan muchos investigadores al cultivo de esta levadura en varias etapas, entre las cuales, la etapa de generación de biomasa es considerada esencial. Sin embargo, nosotros hicimos el crecimiento a nivel matraz en el medio mínimo en sales (MSM) con metanol o glucosa para comparar la diferencia en el crecimiento y la cantidad de biomasa obtenida con las diferentes fuentes de carbono.

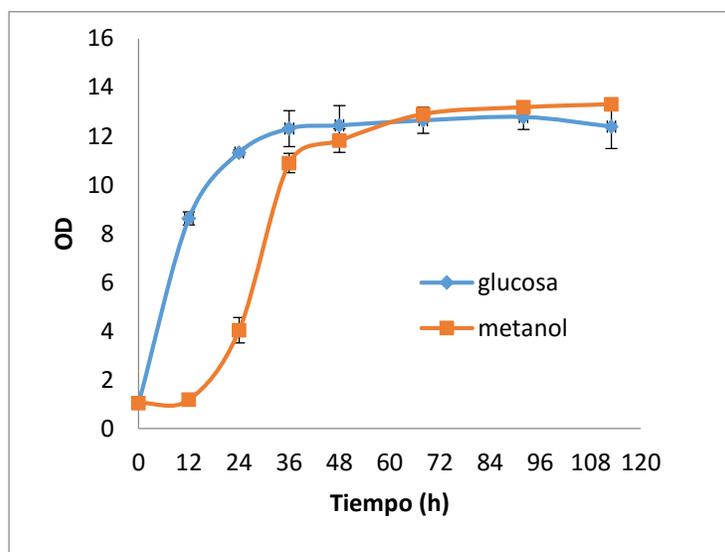


Figura 5. Cinética de crecimiento en matraz con medio mínimo en sales (MSM) y glucosa o metanol como fuente de carbono.

Se tomó muestra cada 12 h para la determinación del crecimiento y de la actividad xilanolítica en el medio con metanol y sólo de crecimiento en el medio con glucosa. En el medio con metanol se adicionó cada 12 h metanol absoluto para llevarlo a una concentración de 0.5% (v/v) en el medio de cultivo.

En la **Figura 5** observamos que aunque en el medio con metanol como fuente de carbono se prolonga más la fase de adaptación, se llega a la misma cantidad de biomasa. Este comportamiento en la cepa recombinante es de utilidad, ya que a diferencia con otras cepas recombinantes en las que no se puede alcanzar densidades celulares altas únicamente con el crecimiento en metanol, se puede predecir con buen nivel de confianza que se obtendrá la misma cantidad de biomasa creciendo en metanol y evitando con esto una etapa de cultivo en lote con glucosa como fuente de carbono. Repercutiendo esto de manera favorable en la disminución del tiempo total de fermentación y en los costos de operación de la misma.

Del sobrenadante de cultivo de la cinética con metanol se realizó la cuantificación de la actividad xilanolítica; sin embargo, no pudimos detectarla. Para descartar alguna equivocación de la cepa utilizada crecimos ésta en el medio rico BMMY y determinamos tanto el crecimiento como la actividad xilanolítica.

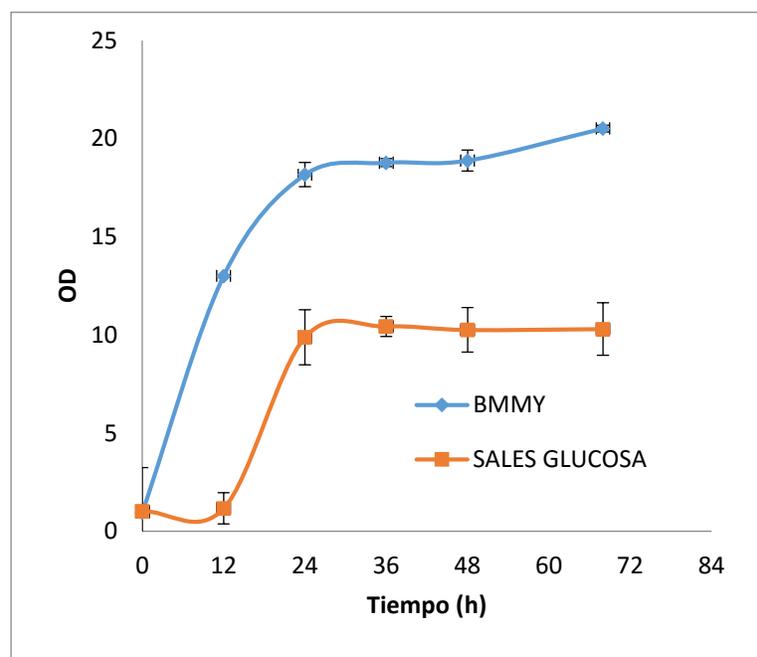


Figura 6. Cinética de crecimiento en matraz con medio rico BMMY con metanol y medio mínimo en sales (MSM) con glucosa.

En la **Figura 6** se puede observar mayor crecimiento en el medio rico en comparación con el medio mínimo en sales. Esto era de esperarse debido a la cantidad de peptona y de extracto de levadura en el medio rico.

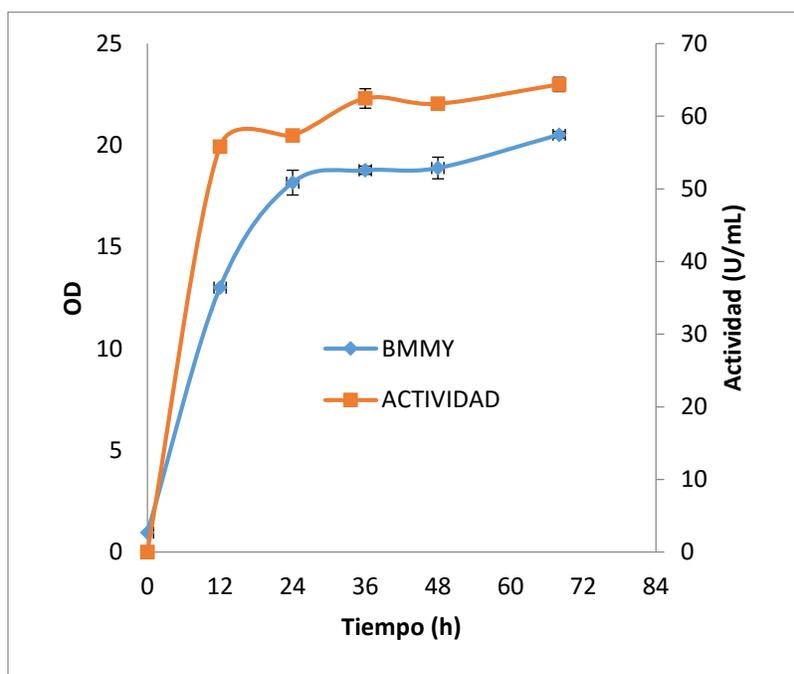


Figura 7. Cinética de crecimiento y cuantificación de actividad xilanólica en matraz con medio rico BMMY con metanol.

En cuanto a la detección de la actividad, esta se observó después de 12 h de incubación en presencia de metanol (**Figura 7**). Con esto se descartó cualquier equivocación al utilizar la cepa recombinante *P. pastoris/pPICZ α -xyn11Ay* atribuyendo la falta de actividad xilanólica en el medio mínimo en sales (MSM) a la degradación de esta proteína en el medio; así como, a la utilización de la misma como fuente de nitrógeno en el crecimiento en el matraz, ya que en estas condiciones no se controló el pH y por lo tanto no se adicionó hidróxido de amonio el cual es utilizado como fuente de nitrógeno.

Con esta base se realizaron dos fermentaciones en biorreactor, la primera fue en una sola etapa en lote alimentado con metanol y la segunda se realizó en dos etapas, una etapa en lote con glucosa y una etapa de alimentación con metanol,

esto con la finalidad de corroborar lo que se encontró en matraz pero ahora a nivel reactor y comparar los niveles de expresión de la xilanasa recombinante con las condiciones controladas.

7.1.2 Cultivo de *P. pastoris*/pPICZ α -xyn11A en biorreactor en 1 y 2 etapas

La producción extracelular de Xyn11A_{AOX1} se evaluó con células de *P. pastoris* conteniendo la construcción pPICZ α B-xyn11A mediante cultivo en lote alimentado, utilizando la forma comúnmente reportada en dos etapas y el método que nosotros propusimos en una etapa utilizando metanol como única fuente de carbono. La fermentación en dos etapas consistió de una etapa en lote con glucosa, seguido de una etapa de lote alimentado con metanol. La fermentación en una etapa consistió de una etapa en lote y lote alimentado utilizando solo metanol.

En ambas fermentaciones las condiciones de operación de temperatura y pH fueron mantenidas como las descritas en Materiales y Métodos (6.1.2). En cuanto a la agitación y el flujo de aire, estas fueron variando con la finalidad de mantener el oxígeno disuelto por arriba de 20%.

En la fermentación en dos etapas, después de 22 h de operación se observó el aumento del oxígeno disuelto indicando el agotamiento de la fuente de carbono a oxidar. Una vez que la glucosa fue consumida, se realizó el primer pulso de metanol con el objetivo de comenzar con la etapa de inducción y la producción de la xilanasa Xyn11A_{AOX1}. La solución de metanol fue alimentada por pulsos para mantener la concentración de metanol por debajo de 5 g/L durante la etapa de lote alimentado. Al término de la etapa de lote alimentado se obtuvo un peso seco de 19.5 g/L y una cantidad de proteína total de 1.15 g/L (**Figura 8a**). La máxima actividad xilanolítica de 57 U/mL fue detectada después de 33 h de cultivo.

En cuanto a la fermentación en una etapa, con metanol como única fuente de carbono, después de 26 h de operación en lote y cuando el peso seco era de 7 g/L,

se observó un aumento en la cantidad de oxígeno disuelto, indicando el agotamiento del metanol en el medio de cultivo. En este momento, la solución de metanol fue alimentada por pulsos y con esto mantener la concentración de metanol por debajo de 5 g/L. Después de 48 h de fermentación se obtuvo un peso seco, proteína total y actividad xilanólítica de 34.1 g/L, 1.16 g/L y 161.5 U/mL, respectivamente (**Figura 8b**).

Se puede observar que al realizar la fermentación en una etapa, es decir, utilizando sólo metanol como fuente de carbono, se produce principalmente la xilanasa recombinante que se encuentra bajo el control del promotor fuertemente inducible AOX1. En cambio al realizar la cinética generando la biomasa en una etapa de lote con glucosa y después realizando la inducción con metanol se observan varias bandas (**Figura 9**). Esto nos indica que aparte de la xilanasa se están produciendo y secretando al medio de cultivo otras enzimas, dificultando con esto la purificación de la misma además de la disminución de la cantidad de proteína correspondiente a nuestra xilanasa de interés.

Esta disminución en la cantidad de proteína se debe principalmente a la represión del promotor AOX1 causada por la glucosa y, aún después de su agotamiento, le toma tiempo a la levadura *P. pastoris* cambiar su maquinaria genética, metabólica y de síntesis para la producción de la alcohol oxidasa necesaria para la degradación del metanol en la segunda etapa de la fermentación. Además, al estar en presencia de glucosa *P. pastoris* utiliza su maquinaria para sintetizar otras enzimas dándole poca importancia a la síntesis de la alcohol oxidasa. En cambio, en el cultivo con metanol lo más importante para poder sobrevivir y crecer es la producción de la alcohol oxidasa, dejando a un lado la síntesis de otras enzimas que no participan en la ruta metabólica para la degradación de dicho compuesto, ya que al acumularse en la célula puede llegar a ser tóxico. De aquí que en los geles de poliacrilamida se observen pocas proteínas que son secretadas al medio de cultivo, siendo la banda más enriquecida la que corresponde a la xilanasa recombinante y cuya síntesis está bajo el control del promotor AOX1 de la alcohol oxidasa.

Hasta el momento, se han reportado varias estrategias de fermentación de *P. pastoris* para la producción de proteínas recombinantes, y en ellas siempre se incluyen varias etapas de crecimiento en diferentes fuentes de carbono o en mezcla de ellos, argumentando que con esto se evita una fuerte represión del promotor de la AOX y con esto se logra mayor cantidad de la proteína recombinante (Inan *et al.*, 1999; Cereghino y Cregg, 2000; Crowley *et al.*, 2000; Boze *et al.*, 2001; Almuzara *et al.*, 2002; Jahic *et al.*, 2006). Sin embargo, y de manera relevante en el desarrollo de este trabajo, se encontró que utilizando glucosa para la generación de biomasa y después el metanol como inductor se disminuye considerablemente la producción de la xilanasa recombinante y se observa gran cantidad de otras proteínas secretadas al medio de cultivo. Además, siguiendo estas estrategias, de varias etapas, reportadas en bibliografía, la biomasa máxima alcanzada es del orden de los 100 g/L obteniendo miligramos de proteína recombinante en periodos de tiempo de hasta 150 h de fermentación. En cambio, con la estrategia de fermentación en una sola etapa implementada en este trabajo con sólo 34 g/L de biomasa se obtuvieron 1.16 g/L de proteína total, pero siendo principalmente la xilanasa recombinante, en sólo 48 h.

Mellitzer *et al.*, 2012 reportaron la expresión de la xilanasa TIXynA con codones optimizados de *Thermomyces lanuginosus* en *P. pastoris* bajo el promotor AOX1; la levadura fue cultivada en lote alimentado utilizando dos etapas de fermentación, con glicerol y metanol como fuentes de carbono. En este estudio, se obtuvieron 1.2 g/L de TIXynA con una actividad específica de 115 U/mg después de 90 h de fermentación. Estos datos de biomasa y actividad específica son similares a los obtenidos en este trabajo, sólo que en este caso se obtuvieron con tiempos de fermentación de 48 h y utilizando metanol como única fuente de carbono.

Debido a la falta de reportes de cultivos en biorreactor expresando xilanasas en *P. pastoris*, los resultados obtenidos en este trabajo se compararon con aquellos reportes sobre expresión de xilanasa cultivadas en matraz o aquellos reportes de expresión de otras enzimas en biorreactor, todos bajo el promotor AOX1. Notablemente, la cantidad de 1.16 g/L de Xyn11A_{AOX1} es 8 veces mayor a la

reportada para la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* IOC-4145 (148 mg/L obtenido en 96 h de cultivo) (Damaso et al., 2003) y 6 veces mayor a lo reportado para la xilanasa de *Thermomyces lanuginosus* 195 (26 U/mL, obtenido en 120 h de cultivo) (Gaffney et al., 2009), ambos cultivados a nivel matraz. Con respecto a la expresión de otras enzimas en *P. pastoris* en biorreactor, se ha reportado la expresión de una calreticulina humana (CRT) bajo el promotor AOX1 siguiendo un protocolo de 4 etapas de cultivo, que consistió en una etapa en lote con glicerol, una de lote alimentado con glicerol, una fase de transición y una etapa de lote alimentado con metanol. Los autores obtuvieron una concentración de CRT y peso seco de 1.6 g/L y 85.9 g/L, respectivamente; sin embargo, estas cantidades fueron obtenidas después de 143 h de fermentación (Čiplýs et al., 2015).

Los resultados presentados hasta el momento sugieren que la utilización de metanol como única fuente de carbono en la fermentación en una sola etapa, puede afectar el cultivo de *P. pastoris* en dos formas. Primero, mejorando la síntesis de la enzima Xyn11A_{AOX1} en *P. pastoris* por el control del promotor AOX1, lo que resulta en la mayor secreción de Xyn11A_{AOX1} al medio de cultivo. Segundo, disminuyendo los tiempos de fermentación debido a que las fases de transición entre el cambio de fuentes de carbono no son requeridas en la estrategia que se propuso, por lo tanto, el costo global del proceso de producción puede ser reducido.

Estos resultados indican que realizando la fermentación en una etapa, se obtiene una mayor actividad xilanólítica y biomasa después de 48 h de fermentación, comparado con lo que se obtuvo al seguir el método tradicional de fermentación de dos etapas. Por esta razón, se decidió llevar a cabo la purificación y bioquímica caracterización de Xyn11A_{AOX1} obtenida del sobrenadante de cultivo de la fermentación utilizando metanol como única fuente de carbono.

7.1.3 Expresión extracelular de Xyn11A en *P. pastoris*

Para evaluar la expresión extracelular de Xyn11A_{AOX1} en *P. pastoris*, muestras del sobrenadante de la fermentación en una etapa removidas a diferentes tiempos fueron analizadas en geles de poliacrilamida al 10%. Se observaron dos bandas enriquecidas con un peso molecular de 45 kDa (**Figura 10a**). Con la finalidad de verificar que la xilanasas Xyn11A_{AOX1} secretada al sobrenadante de cultivo se encontraba catalíticamente activa, se procedió a realizar un zimograma para revelar actividad xilanolítica. Para esto, el sobrenadante con mayor actividad xilanolítica fue analizado en un gel de poliacrilamida al 10% nativo co-polimerizado con azul brillante de Remazol (unido a xilana) al 1% (**Figura 10b**). Se observan los halos característicos que denotan la actividad xilanolítica del sobrenadante de cultivo.

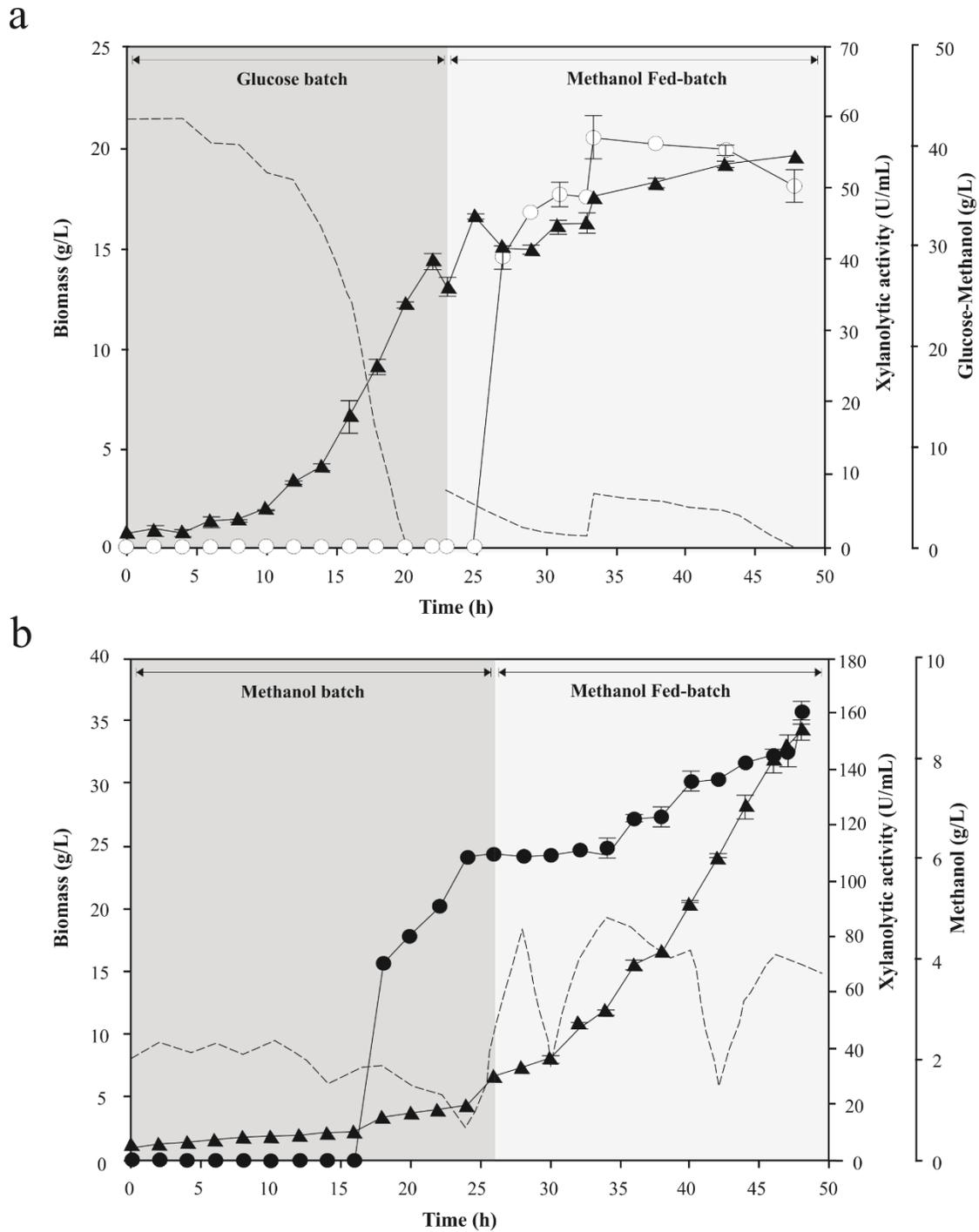


Figura 8. Crecimiento (triángulos), actividad xilanólítica (círculos) y concentración de metanol (líneas punteadas) de *Pichia pastoris*/pPICZ α B-xyn11A. a) Fermentación en dos etapas y b) Fermentación en una etapa.

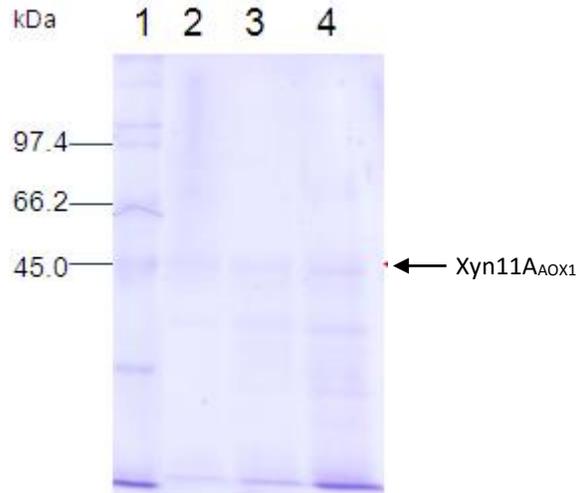


Figura 9. Análisis en SDS-PAGE de la expresión de proteínas en el sobrenadante de cultivo en biorreactor en lote alimentado con glucosa y metanol como fuentes de carbono. Línea 1) Marcador de peso molecular, 2-4) sobrenadante de cultivo de la etapa de inducción a 31, 33 y 46 h, respectivamente.

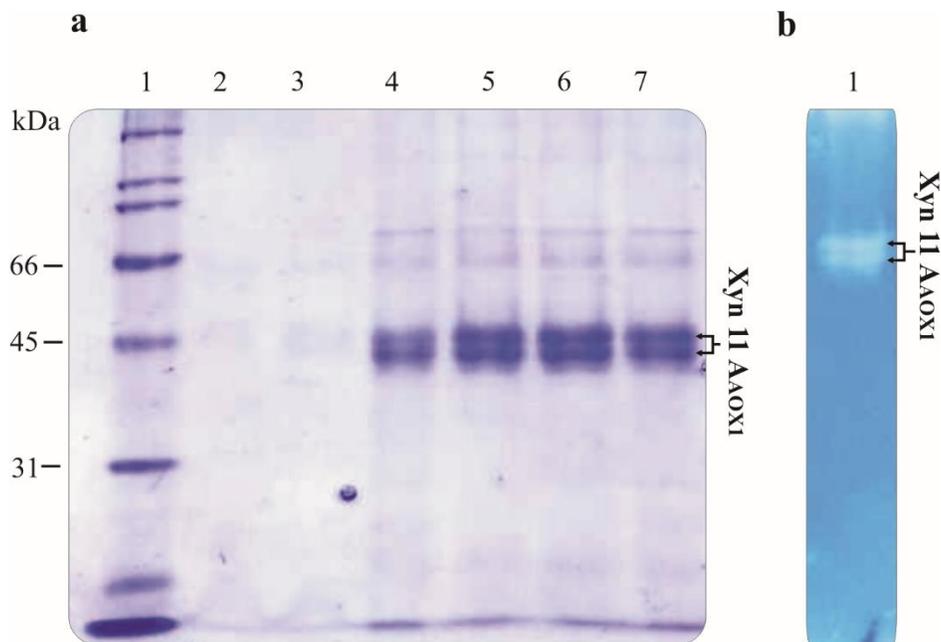


Figura 10. Análisis en SDS-PAGE. a) proteínas secretadas al sobrenadante de cultivo con metanol como fuente de carbono. Línea 1) marcador de peso molecular, 2-7) sobrenadante a 10, 18, 30, 44, 46, 48 h, respectivamente, b) Zimograma de xilanasa.

7.1.4 Purificación y caracterización bioquímica de Xyn11A_{AOX1}

Todas estas determinaciones se realizaron de acuerdo a lo reportado en Cayetano-Cruz, 2011. En la **Tabla 2** se presenta un resumen de la caracterización bioquímica de la xilanasa.

La degradación de la xilana fue observada por análisis de TLC. Los principales productos de la hidrólisis de la xilana fueron xilobiosa y xilohexosa, con una pequeña cantidad de xilotriosa, como se observa en la **Figura 11**. Después de 96 h no se detectó xilosa como producto de hidrólisis. Con estos resultados podemos decir que Xyn11A_{AOX1} es una xilanasa tipo endo sin actividad de β -xilosidasa debida a la ausencia de xilosa como producto. Lee et al. 2009 reportaron una xilanasa de *Laetiporussulphureus* sin actividad β -xilosidasa, y con xilobiosa y xilotetraosa como productos de hidrólisis de xilana.

Tabla 2. Comparación entre Xyn11A expresada en *E. coli* y Xyn11A_{AOX1} expresada en *P. pastoris*

Característica bioquímica	Xyn11A (<i>C. uda</i>)	Xyn11A _{AOX1}
Temperatura optima(°C)	55	50
pH optimo	6.5	6.5
K_M (mg/mL)	0.98	4.5
V_{max} (U/mg)	5.7	5000
Estabilidad térmica	35°C → 15.8 h ^a	40°C → 35 h ^a
Vida media ($t_{1/2}$)	45°C → 6.1 h ^a 55°C → 1.1 h ^a	50°C → 27 min ^b 60°C → 1.5 min ^b
Referencia	Amaya-Delgado et al., 2010	Este trabajo

^a vida media teórica calculada con $\ln A = \ln A_0 - kt$

^b datos experimentales de vida media

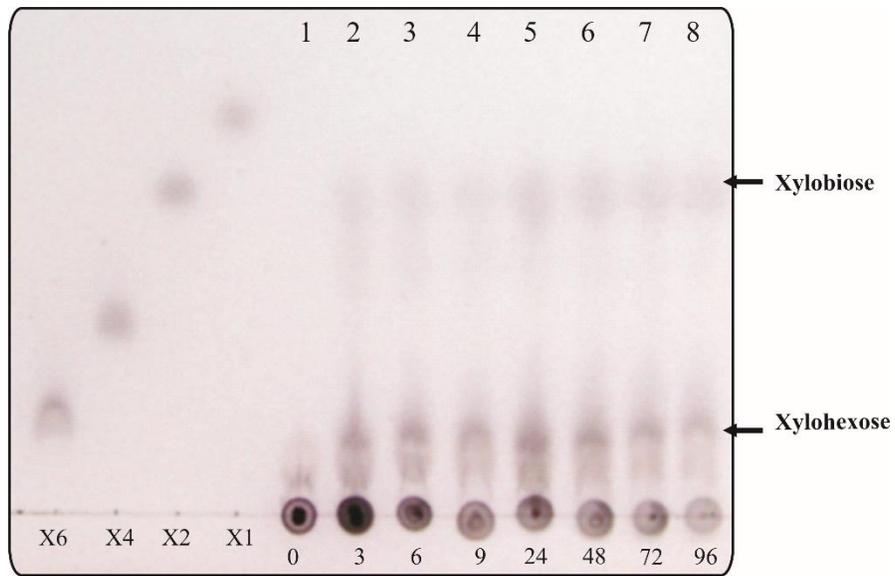


Figura 11. Análisis de TLC de los productos después de la hidrólisis de xilana por Xyn11A_{AOX}. Estándares de xilo-oligómeros: xilohexosa (X6), xilotetraosa (X4), xilobiosa (X2) y xilosa (X1). Líneas (1-8) diferentes tiempos de hidrólisis (0, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96 h) en buffer citratos-fosfatos, 50 mM, pH 6.5 a 40°C, respectivamente.

7.2 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR EVOLUCIÓN DIRIGIDA

7.2.1 Expresión del gen *xyn11A* y *xyn11A_mut* en *E. coli* BL21

Para la expresión en *E. coli* BL21 de *xyn11A* se utilizó el vector de expresión pET-38b(+). Por esta razón, lo primero que se realizó fue el cambio de los sitios de restricción de *Xba* I y *Pst* I a *Nhe* I y *Xho* I que flanquea al gen *xyn11A* para posteriormente poder realizar la clonación en pET-38b(+). Con los nuevos oligos en los que se cambió el sitio de restricción se amplificó el gen *xyn11A* (**Figura 12**). El producto de PCR fue purificado utilizando el kit “QIAquick® Spin Handbook” (QIAGEN) (**Figura 13**). Tanto el vector pET-38b(+) como el ORF fueron tratados con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Xho* I.

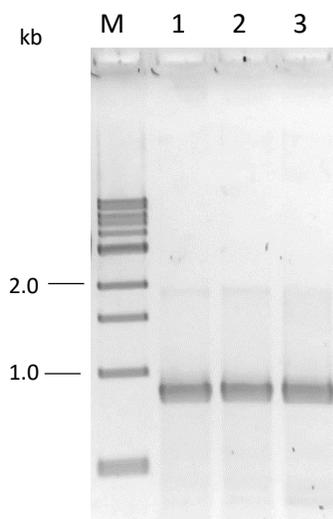


Figura 12. Análisis electroforético de productos de PCR. M: Marcador tamaño 1 kb, 1-3) 58.8 °C, 63 °C y 65 °C temperatura de alineamiento, respectivamente.

Se realizó la ligación del ORF y el vector, ambos con extremos cohesivos, con este material se transformó por choque térmico células de *E. coli* BL21, después del tiempo de recuperación de las células, estas fueron sembradas en cajas con medio LB con 30 µg/mL de Kanamicina e incubadas a 37 °C toda la noche. De las colonias que crecieron se escogieron 30 para realizar PCR colonia, extracción de pDNA y análisis de restricción. Varias clonas amplificaron el fragmento de 999 pares de bases por PCR colonia, el cual corresponde al gen *xyn11A* (**Figura 14**).

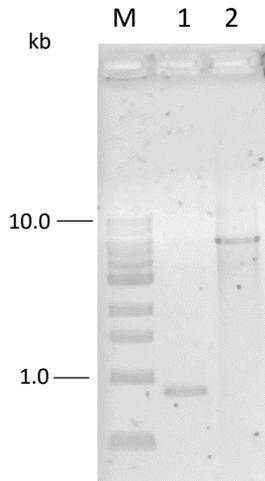


Figura 13. Análisis electroforético de productos purificados. M: Marcador tamaño 1 kb, 1) gen *xyn11A* y 2) vector pET-38b(+).

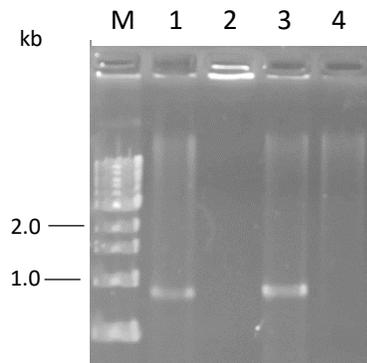


Figura 14. Amplificación por PCR colony del gen *xyn11A* de clonas candidatas. M: Marcador tamaño 1 kb, 1 y 3) clonas positivas

Se realizó la extracción de pDNA y el análisis de restricción digiriendo con *Nhe* I y *Xho* I para la liberación del inserto clonado. Sin embargo, en todas las digestiones no se observó liberación, por lo que se decidió digerir con la enzima *Avr* II que corta en un solo sitio el vector. Con esto pudimos observar el tamaño del plásmido que generamos y que correspondía al peso esperado de 6820 pb (**Figura 15**).

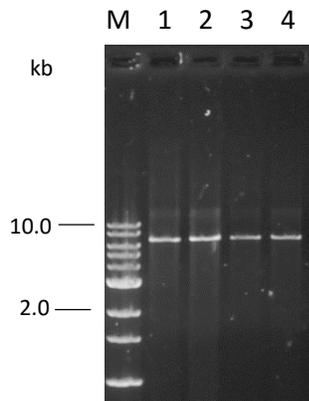


Figura 15. Análisis de restricción de pET-38b(+)-*xyn11A*. M: Marcador tamaño 1 kb, 1-4)pET-38b(+)-*xyn11A*/ *Avr II*.

Sabiendo que se había logrado obtener varias clonas candidatas que contenían la construcción pET-38b(+)-*xyn11A*, se realizó un ensayo de expresión de la xilanasas para detectar actividad en el sobrenadante y en la parte soluble. Después de seguir la metodología descrita en 6.3.2 y analizar ambas fracciones mediante DNS, se pudo detectar actividad xilanólítica. Además, se realizó el ensayo funcional mediante tinción con Rojo Congo, en donde se observaron halos de hidrólisis denotando actividad xilanólítica (**Figura 16**) y el sobrenadante de cultivo se analizó mediante geles de poliacrilamida al 10% (**Figura 17**).



Figura 16. Tinción con Rojo Congo de clonas conteniendo la construcción pET-38b(+)-*xyn11A*.

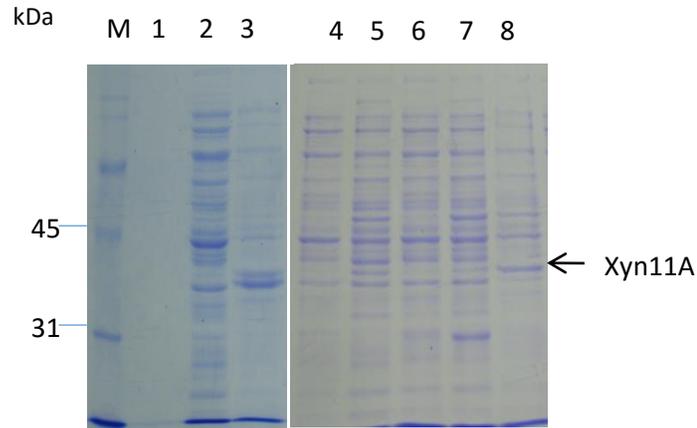


Figura 17. Análisis electroforético de SN, parte soluble y cuerpos de inclusión, SDS-PAGE 10%. M: marcador de PM, 1) SN de cultivo de clona 3, 2) fracción soluble de clona 3 después de inducción, 3) cuerpos de inclusión de clona 3, 6) fracción soluble de clona 1 antes de inducción, 7) fracción soluble de clona 1 después de inducción, 8) cuerpos de inclusión de clona 1

Escogimos la clona que presentaba la mayor actividad xilanolítica en sobrenadante de cultivo para realizar pruebas de termoestabilidad con el extracto crudo a 60 °C y 50 °C (**Figura 18 y 19**). La vida media ($t_{1/2}$) a 60 °C fue 7 min y a 50 °C fue 75 min.

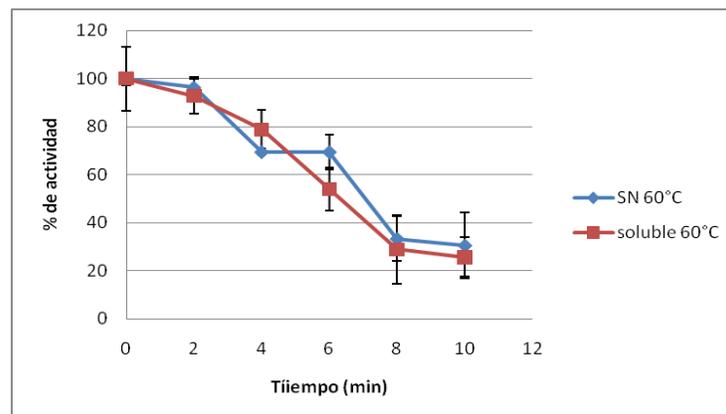


Figura 18. Estabilidad térmica de extracto crudo y parte soluble a 60 °C.

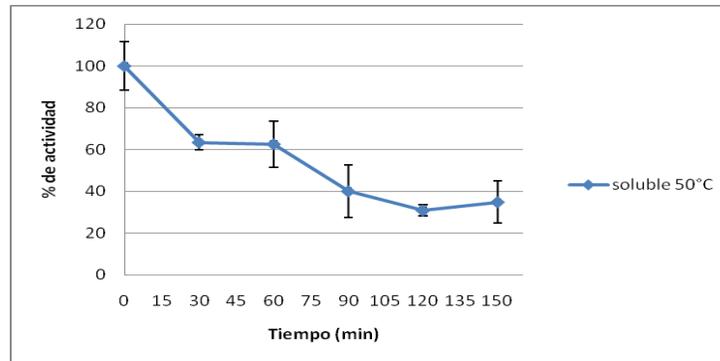


Figura 19. Estabilidad térmica de parte soluble a 50 °C.

Con este análisis obtuvimos los perfiles de estabilidad térmica de la xilanasasa sin mutar en el extracto crudo y parte soluble para tenerlo de referencia y poder comparar aquellas clonas en las que el gen *xyn11A* haya sido mutado y esta mutación se vea reflejada en una mayor termoestabilidad, lo cual es el objetivo de esta parte del proyecto.

Del mismo modo se realizó la amplificación (**Figura 20**), clonación y expresión del gen mutado *xyn11A_mutado* para comenzar con la selección de las clonas en las que se vea una mejora en la termoestabilidad. Se realizaron dos bibliotecas con una tasa de mutación media y alta siguiendo las especificaciones en el Kit para lograr ese número de mutaciones/kb y se secuenciaron 5 clonas de cada una de las bibliotecas para corroborar el número de mutaciones generadas en cada gen.

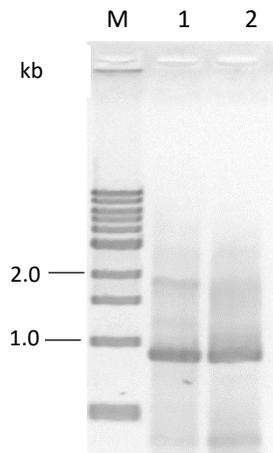


Figura 20. Análisis electroforético de productos de PCR. M: Marcador tamaño 1 kb, 1) gen *xyn11A* y 2) producto de PCR propensa a error.

7.2.2 Escrutinio de la biblioteca conteniendo el gen *xyn11A* mutado

En el escrutinio de la biblioteca que contenía el gen *xyn11A* mutado se analizaron 250 clonas de la biblioteca con tasa de mutación baja, encontrando que aquellas clonas que exhibieron actividad xilanolítica presentaron una $t_{(1/2)}$ de 7 min a 60°C, igual a la observada para la xilanasa sin mutar, que fue de 7 min.

De la biblioteca con una tasa de mutación media se analizaron 50 clonas y una de ellas presentó 1.5 veces la actividad xilanolítica de la enzima nativa (1.2 U/mL). En un principio se propuso realizar el escrutinio expresando la enzima en medio líquido; sin embargo, el número de clonas que se podían analizar por día era limitado. Por esta razón, se implementó otra estrategia que permitió el escrutinio masivo de las clonas de la biblioteca.

El escrutinio de las bibliotecas se realizó en placas de agar conteniendo xilana al 0.2%. Estas placas se incubaron como se describe en Materiales y Métodos 6.11. En cada placa se sembraron de 28 a 30 colonias. Después de dejar las colonias en presencia del IPTG 1 mM, para inducir la expresión de la xilanasa, las placas se tiñeron con Rojo Congo para observar los halos de actividad. El ensayo se realizó incubando las cajas a dos temperaturas, 50 y 70 °C. A 50 °C debido a que es la temperatura óptima a la que trabaja la xilanasa *Xyn11A*, y a 70°C porque es la temperatura a la cual la colonia control, transformada con el gen sin mutar, pierde la actividad. De esa forma, lo que se buscó fue seleccionar clonas que expresaran una xilanasa con actividad enzimática a mayor temperatura. En la **Figura 21** se pueden observar las cajas teñidas con Rojo Congo. En **a** se observan las clonas candidato incubadas a 50°C, donde se observan halos de hidrólisis en la mayoría de las colonias; sin embargo, también hay clonas en las que las mutaciones introducidas fueron tan drásticas que se perdió la actividad xilanolítica de la enzima. En el círculo se señala la clona utilizada como control positivo, es decir, *E. coli* transformada con pET-38b(+)-*xyn11A*. En **b** se muestran las mismas clonas que en **a**, pero esta placa se sometió a una temperatura de 70°C. Cabe resaltar que los

puntos que podrían ser confundidos con halos no lo son, sino que es el lugar en donde estaba la colonia y que el Rojo Congo no alcanzó a penetrar.

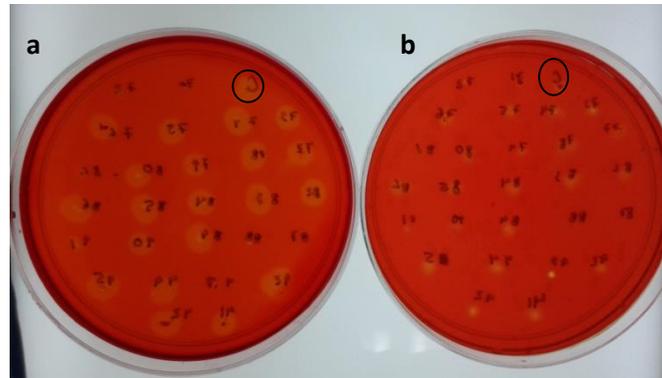


Figura 21. Escrutinio de biblioteca mutada por epPCR en medio sólido. Tinción con Rojo Congo. En círculo control positivo. A) Placa incubada a 50°C y B) placa incubada a 70°C.

De esta manera se analizaron 400 clonas pertenecientes a la biblioteca con el gen mutado. Se encontraron 9 clonas que al ser sometidas a una temperatura de 75°C en medio sólido y realizar la tinción con Rojo Congo se observó un pequeño halo de hidrólisis (**Figura 22**). Estas colonias se crecieron en medio líquido para la extracción de DNA plasmídico y la secuenciación del mismo.



Figura 22. Análisis de biblioteca mutada por epPCR en medio sólido. Tinción con Rojo Congo, clonas con presunta mejora. En círculo control positivo. Placa incubada a 75°C. Se muestran halos de hidrólisis de clonas con actividad xilanólítica a esta temperatura.

Después de la secuenciación identificamos 3 clonas con cambios en la secuencia nucleotídica, la clona 283 presentó 3 mutaciones, la clona 309 presentó 1 mutación y la clona 313 presentó 2 mutaciones. A partir de aquí, este trabajo se realizó en colaboración del M. en C. Alejandro Santiago Hernández quien continuó con la purificación y caracterización de la xilanasas de algunas clonas obtenidas mediante Evolución Dirigida.

Hasta el momento se ha terminado la purificación y caracterización de la clona 309 encontrando algunos datos interesantes y los cuales se resumen en la **Tabla 3**. De esta clona se encontró que la temperatura óptima de la xilanasas (Xyn11A-309) no cambió, se mantuvo en 50°C. En cuanto al pH óptimo, se observó un aumento de una unidad de pH. Así mismo, se observó un aumento en termoestabilidad a 50°C. Comparada con la xilanasas nativa, Xyn11A-309 tuvo un aumento de casi 7 veces en la vida media. También se observó un cambio en los parámetros cinéticos, pero lo más importante fue un aumento considerable en la actividad específica de esta proteína como se puede ver en el aumento de 8 veces en la velocidad máxima de la enzima.

Tabla 3. Comparación de las propiedades entre la xilanasas silvestre y la xilanasas 309 obtenida por Evolución Dirigida.

	Xyn11A-WT	Xyn11A-309
T óptima (°C)	50	50
pH óptimo	6.5	7.5
Termoestabilidad	60°C $t_{1/2}$ 8 min 50°C $t_{1/2}$ 7 h	60°C $t_{1/2}$ 6.5 min 50°C $t_{1/2}$ 48 h
K_M (mg/mL)	1.4	1
V_{max} (U/mg)	204	1667

7.3 MEJORAMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LA XILANASA POR MUTAGÉNESIS SITIO- DIRIGIDA

7.3.1 Selección del sitio de mutación

La proteína Xyn11A está compuesta por 289 aminoácidos y tiene un dominio catalítico del aminoácido 1 al 189, una región de unión (linker) del 190 a 205 y un dominio de unión a carbohidrato (CBD) del 206 al 289.

Para la selección del sitio de mutación se realizó una comparación estructural de xilanasas termofílicas y mesofílicas, basándonos en un estudio que se llevó a cabo con diferentes mutaciones en xilanasas, y donde se evaluó el efecto de cada una de ellas en las propiedades de las enzimas (Georis et al., 2000). Se realizó un alineamiento de los aminoácidos que corresponde al dominio catalítico de Xyn11A con los residuos de la xilanasas termofílica TfxA de *Thermomonospora fusca* (U01242) y las xilanasas mesofílicas XynA de *Thermomyces lanuginosus* (U35436, 1YNA), *Trichoderma harzianum* (A44593, 1XND), Xyn2 de *Trichoderma reesei* (U24191, 1XYP) y Xyl1 de *Streptomyces* sp. S38. En la **Figura 23** se puede observar la región en donde se llevó a cabo la mutación. Se buscó crear una interacción aromática como la que se presenta en la xilanasas termofílica TfxA (Y11-F16) o en la xilanasas termofílica XynA (W11-Y16), ya que se ha reportado que el cambio en un sólo aminoácido puede cambiar la conformación y estabilidad de la proteína. Además, se ha visto que esta interacción anillo aromático-anillo aromático tiene un gran aporte en la estabilidad de xilanasas.

```

          10      20      30      40      50      60      70
T_harzianum  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
EKRQTIQPGTGYSNNGYYSYWNDDGHAGVITYTNGGGGSFTVNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFGSGSYN
T_fusca      AHAAVTSNETGYHDGYFYSFWTDAPGTVSMELGPGGNYSTSWRNTGNFVAGKGWATGGR-RTVITYSASFN
T_lanuginosus  EKQRTPNSEGWHHDGYYSWWSDDGAQATYTNLEGGTYEISWGDGGLVGGKGNPGLNARAIHFEGVYQ
Streptomyces  -DTVITTNQTGTNNGYYSFWTDGGGSVSMNLASGGSYGTSWTNCGNFVAGKGWANGAR-RTVNYSGSFN
T_reesei     EKQRQTIQPGTYNNGYFHSYWNDDGGVITYTNGPGGQFVSNWSNSGNFVGGKGWQPGTKNKVINFGSGSYN
C_uda       ---AVTSNQTGNSGGYYSFWTDSQGTVSMELGSGGNYSTSWRNTGNFVAGKGWQTGSG-RACSYSGQFT

          80      90      100     110     120     130     140
T_harzianum  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
PNGNSYLSIYGWSRNPLIEYYIVENFGTYNPSTGATKLGVEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIIGTATFYQY
T_fusca      PSGNAYLTLYGWTRNPLVEYYIVESWGTYRPT--GYMGTVTTDGGTYDIYKTRYNAPSIEGTRTFDQY
T_lanuginosus  PNGNSYLAVYGWTRNPLVEYYIVENFGTYDPSSGATDLGTVECDGSIYRLGKTRVNAPSIDGTQTFDQY
Streptomyces  PSGNAYLTLYGWTANPLVEYYIVDNWGTYRPT--GTYKGTVTSDDGGTYDVYQTTTRVNAPSVEGKTFNQY
T_reesei     PNGNSYLSVYGWSRNPLIEYYIVGNFGTYNPSTGATKLGVEVTSDGSVYDIYRTQRVNQPSIIIGTATFYQY
C_uda       PSGNAYLTLYGWTTGPLIEYYIVDNWGTYRPT--GYMGTVNSDDGGTYDIYRTQRVNQPSIIQGTATFYQY

          150     160     170     180     190
T_harzianum  ....|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|...|
WSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWASHGLTL-GTMD-YQIVAVEGYFSSGSASITVS
T_fusca      WSVRQSKRTSGTITAGNHFDWARHGMHL-GTHD-YMIMATEEGYQSSGSSNVTL-
T_lanuginosus  WSVRQDKRTSGTVQTGCHFDWARAGLNVNGDHY-YQIVATEEGYFSSGYARITVA
Streptomyces  WSVRQSKRTGGSTITAGNHFDAWARYGMPL-GSFNYMIMATEEGYQSSGSSSISVS
T_reesei     WSVRRNHRSSGSVNTANHFNAWAQQGLTL-GTMD-YQIVAVEGYFSSGSASITVS
C_uda       WSVRQQKRTGGTITANHFNAWASKGMNL-GSHN-YQILATEGYQSSGSSNITVS

```

Figura 23. Alineamiento múltiple de xilanasas termofílicas y mesofílicas por Clustal W. Xilanasas de *Trichoderma harzianum* (A44593, 1XND), TfxA de *Thermomonospora fusca* (U01242), XynA de *Thermomyces lanuginosus* (U35436, 1YNA), Xyl1 de *Streptomyces* sp. S38 y Xyn2 de *Trichoderma reesei* (U24191, 1XYP). Residuos catalíticos (negritas).

7.3.2 Amplificación del gen *xyn11A* con la mutación N9Y y expresión en *E. coli* BL21

De acuerdo al alineamiento múltiple de la xilanasas Xyn11A de *C. uda* con secuencias de xilanasas termofílicas y mesofílicas, se propuso generar la mutación en el aminoácido 9, el cambio de una asparagina (N) por una tirosina (Y) en el gen *xyn11A*. Con esta finalidad se diseñaron los oligonucleótidos para amplificar los fragmentos con la mutación deseada por ensamblaje. Posteriormente, la construcción se clonó y se expresó en *E. coli* BL21, para de esta forma obtener la clona de *E. coli* BL21(DE3) que expresa la xilanasas Xyn11A con el cambio N9Y.

Los oligonucleótidos utilizados se presentan en la siguiente **Tabla 1**. Se utilizaron diferentes juegos de oligonucleótidos para obtener la mutación deseada.

Para comenzar a construir el gen con la mutación N9Y, se dividió el gen en dos regiones, una de 111 pb y otra de 783 pb. Para la amplificación de la región de 111 pb se utilizaron los oligonucleótidos Directo mutación N-Y y reverso 2. Este fragmento es el que contiene el cambio N11Y. Para la amplificación del fragmento de 783 pb se utilizaron los oligonucleótidos Directo F y Reverso Xho I (**Figura 24**). Ambos fragmentos fueron purificados a partir de gel de agarosa.

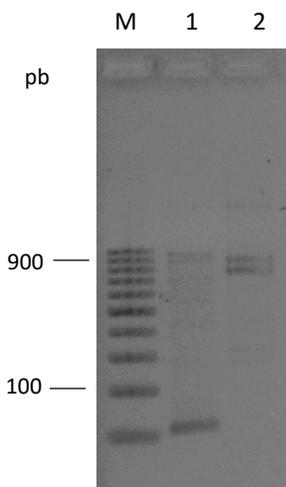


Figura 24. Amplificación de fragmentos por PCR para ensamble del gen.
1) Marcador de tamaño 100 pb, 2) amplificación de fragmento de 111 pb
y 3) amplificación de fragmento de 783 pb.

Para la PCR de ensamblaje se utilizó como DNA molde una mezcla de concentraciones equimolares de ambos fragmentos purificados, utilizando los oligonucleótidos Directo Nhe I y Reverso Xho I, los cuales son los oligonucleótidos que flanquean el gen y que contienen los sitios de restricción necesarios para la posterior clonación y expresión en el vector pET-38b(+). Este fragmento ensamblado se purificó (**Figura 25**) y clonó en el vector de clonación pDrive.

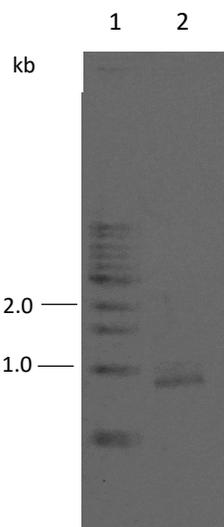


Figura 25. Gen *xyn11A* ensamblado y purificado. 1) Marcador de 1 kb, 2) gen purificado.

Después de crecer en medio sólido las células de *E. coli* DH5 α , previamente transformadas con la construcción, se escogieron clonas candidatas para la extracción de DNA plasmídico. El DNA plasmídico fue digerido con las enzimas de restricción *Nhe* I y *Xho* I para comprobar la presencia del inserto de interés. Las clonas que liberaron el inserto fueron enviadas a secuenciar (**Figura 26**).

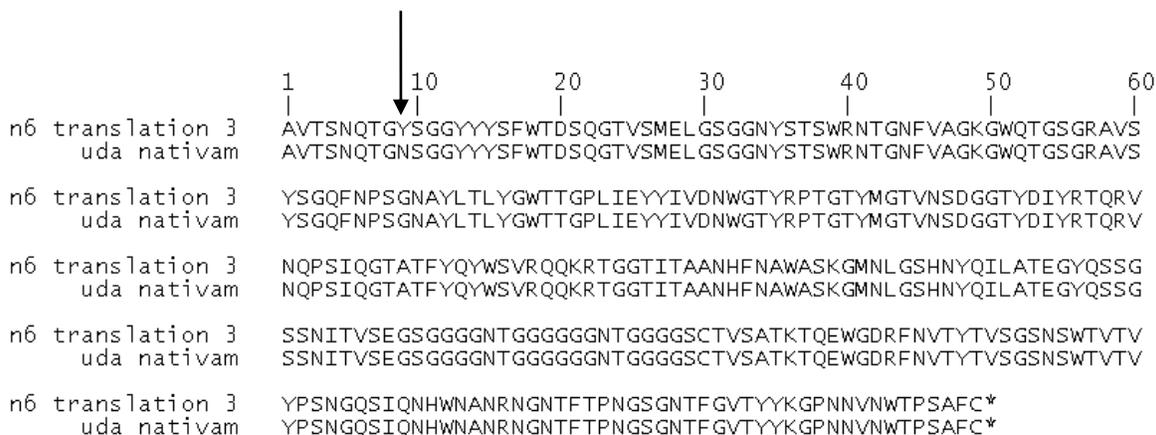


Figura 26. Alineamiento de aminoácidos, conformación de cambio en el aminoácido nueve, cambio de N (nativa) por Y (mutada), indicado con una flecha.

Después de haber corroborado mediante secuenciación la mutación N9Y en el gen, éste se subclonó en el vector de expresión pET-38b(+). La construcción obtenida se transfirió a células de *E. coli* BL21. De las clonas transformantes que crecieron,

se extrajo el DNA plasmídico y se corroboró la obtención de la mutación N9Y por análisis de restricción, digiriendo con las enzimas que flanquean el gen (**Figura 27**).

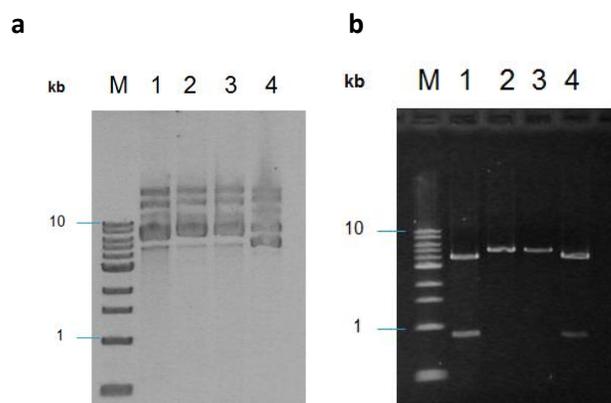


Figura 27. DNA plasmídico y análisis de restricción de pET-38b(+)-*xyn11A*. a) Extracción de DNA plasmídico clonas candidatas, b) Liberación de gen *xyn11A* de clonas candidatas.

7.3.3 Selección de clonas que expresan la xilanasa mutada en medio sólido

Confirmada la secuencia se realizaron ensayos de expresión en medio sólido con Rojo Congo para evaluar si el cambio del aminoácido tenía un impacto en la actividad xilanolítica a una alta temperatura. La metodología utilizada fue la descrita anteriormente en la sección (Materiales y métodos 6.3.2). Brevemente, en placas de medio 2TY conteniendo xilana como sustrato e IPTG para realizar la inducción y producción de la xilanasa se sembraron las colonias a analizar y el control positivo (clona conteniendo el gen sin mutación). De cada caja se realizaron duplicados. Una caja se incubó a 50°C y otra a 70°C.

Después de realizar la tinción con Rojo Congo, se observó el típico halo de hidrólisis que nos indicó presencia de actividad xilanolítica. En las placas incubadas a 50°C se observaron halos de hidrólisis tanto en la xilanasa sin mutación (Xyn11A-WT) como en las clonas que tienen la mutación (Xyn11A-N9Y). Interesantemente, en las placas que fueron incubadas a 70°C sólo observamos halo de hidrólisis en las clonas que tienen la mutación (**Figura 28**).

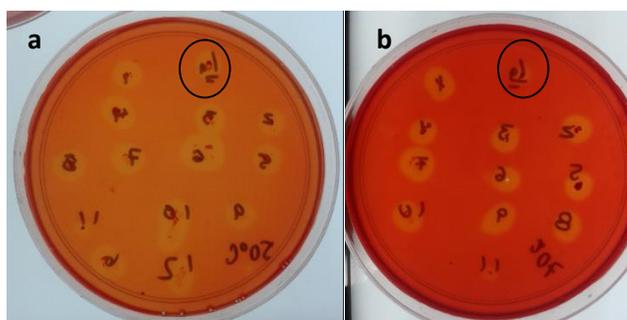


Figura 28. Análisis funcional con Rojo Congo clonas con mutación N9Y. a) incubadas a 50°C y b) incubadas a 70°. En círculo control positivo. Se observan halos de hidrólisis de clonas con actividad xilanolítica a cada temperatura.

Este análisis sugiere que las clonas que expresan la xilanasas Xyn11A con la mutación N9Y presentan activan a mayor temperatura que la xilanasas silvestre. Una vez que se obtuvieron las células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con construcciones pET-38b(+)-xyn11A ó pET-38b(+)-xyn11A(N9Y), se procedió a purificar y caracterizar ambas enzimas, con la finalidad de comparar sus propiedades catalíticas.

7.3.4 Expresión y purificación de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

La expresión de las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y se realizó en células de *E. coli* BL21 (DE3) por inducción con IPTG, como se describe en Materiales y métodos 6.3.3. Se separó la biomasa del sobrenadante. Se realizaron ensayos de purificación a partir del sobrenadante de cultivo de *E. coli* BL21 (DE3), y de la fracción soluble del lisado bacteriano células de *E. coli* BL21 (DE3). Esto debido a que aunque la proteína recombinante tiene péptido señal para localización en periplasma, no siempre es posible detectar buena cantidad de proteína en el sobrenadante de cultivo. La mayoría de esta proteína se queda anclada al periplasma pero las células se pueden tratar con un buffer alcalino y lisozima y obtener esta proteína.

Purificación de Xyn11A-WT a partir de fracción soluble. Primero se llevó a cabo la purificación de la xilanasa sin mutar (Xyn11A-WT). Se realizó un tratamiento al paquete celular para obtener la parte soluble, la cual fue dializada en el buffer bajo en sales, y el dializado se inyectó a la columna. Se utilizó una columna de intercambio aniónico UNOsphere Q, el procedimiento fue el siguiente. Primero, la columna se equilibró con buffer A (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 adicionado con KCl 25 mM, glicerol 5% y PMSF 0.1 mM). El siguiente paso consistió en inyectar la muestra dializada a purificar en la columna. Enseguida, la columna se lavó con buffer A para remover las proteínas que no se unieron. Para la etapa de elución, se realizó un incremento en la fuerza iónica utilizando para este fin KCl 1 M en el mismo buffer A. Se recolectaron fracciones de 2 mL y se determinó la cantidad de proteína y actividad xilanolítica de cada una de ellas. La **Figura 29** muestra el cromatograma de la purificación de Xyn11A. Se observó que la proteína eluyó en las primeras fracciones de la cromatografía, antes de realizar el gradiente salino. Lo cual sugiere que Xyn11A interacciona débilmente con la columna UNOsphere Q.

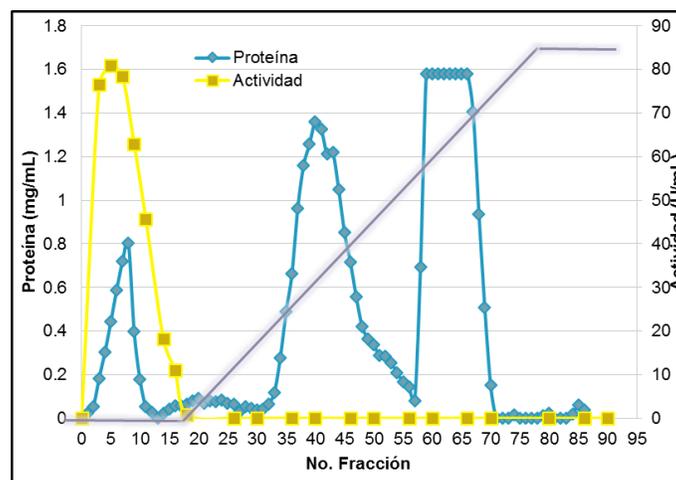


Figura 29. Purificación de la xilanasa Xyn11A silvestre por cromatografía de intercambio aniónico a partir de la parte soluble. Resina de intercambio aniónico UNOsphere Q, buffer de elución (%B) Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl (0-1 M).

Debido a que en las fracciones colectadas de la purificación no se observó la banda que corresponde a la xilanasa pura, es decir, no se logró purificar a homogeneidad la proteína (**Figura 30**), se llevó a cabo otra etapa de purificación, pero ahora a partir de sobrenadante de cultivo.

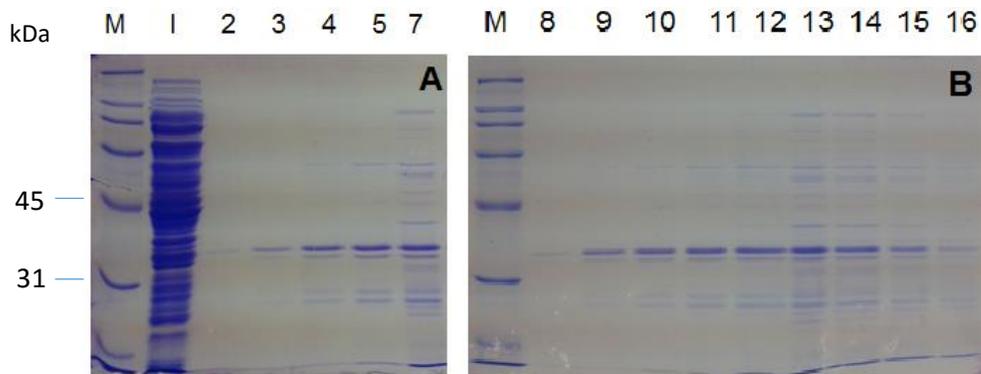


Figura 30. Análisis electroforético de fracciones con actividad xilanolítica por cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE 10%. Carril M: Marcador de PM, 1) parte soluble inyectada a la columna, 2-7) Fracciones que no se pegaron a la columna, 8-16) Proteínas eluidas en el gradiente.

Purificación de Xyn11A-WT a partir de sobrenadante de cultivo. El sobrenadante de cultivo se concentró utilizando un centrifón de 10 kDa de corte. El sobrenadante cultivo, concentrado y dializado, se cargó a la columna siguiendo la misma metodología previamente descrita. De la misma manera, la xilanasa eluyó en las primeras fracciones como se muestra en el cromatograma de la **Figura 31**.

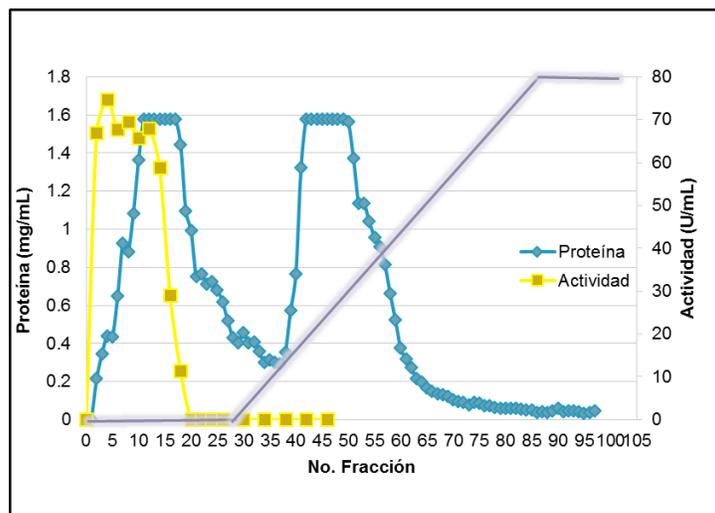


Figura 31. Purificación de la xilanas Xyn11A silvestre por cromatografía de intercambio aniónico a partir del sobrenadante de cultivo. Resina de intercambio aniónico UNOsphere Q, buffer de elución (%B) Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, KCl (0-1 M).

El resumen de la purificación de la xilanas Xyn11A-WT se presenta en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resumen de la purificación de la xilanasa Xyn11A-WT expresada en *E. coli*.

	Actividad (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Sobrenadante	120.81	4.52	26.73	100	1
Concentrado y Dializado	94.77	2.90	32.68	78.44	1.22
Cromatografía de intercambio aniónico	86.36	1.63	52.98	71.48	1.98

Las fracciones que presentaron la mayor actividad xilanólica se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. En la **Figura 32** se puede observar el patrón electroforético de varias fracciones que contienen la xilanasa Xyn11A-WT purificada (carriles 5-7).

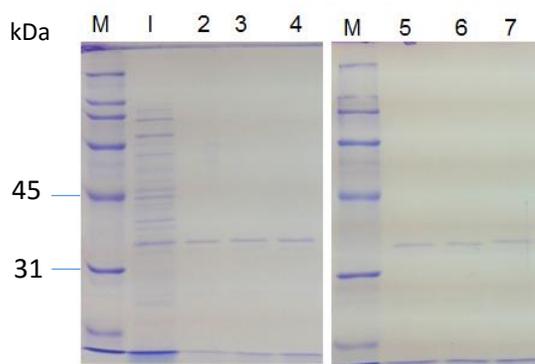


Figura 32. Análisis electroforético de fracciones con actividad xilanólica obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE 10%. Carril M: Marcadores de PM, 1) SN concentrado y dializado inyectado a la columna, 2-7) Fracciones con actividad xilanólica.

Las fracciones que contenían la xilanasa purificada se reunieron y se utilizaron para llevar a cabo la caracterización bioquímica de la enzima, en relación al pH y temperatura óptimos, termoestabilidad a 50 y 60 °C y efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad xilanólica de Xyn11A-WT.

La influencia del pH sobre la actividad de Xyn11A-WT en la hidrólisis de xilana se determinó a valores de pH de 4.5 a 8, a una temperatura de 50 °C. Se determinó un pH óptimo de 6.5 para la xilanasa Xyn11A-WT (**Figura 35a**). El efecto de la

temperatura sobre la actividad enzimática de Xyn11A-WT se evaluó en un intervalo de temperatura de 30°C a 80°C, a pH 6.5. La xilanasas Xyn11A-WT exhibió una temperatura óptima de 50°C (**Figura 35b**).

La estabilidad térmica de Xyn11A-WT se evaluó mediante la incubación de la enzima purificada a 50 y 60°C (**Figura 36**). La vida media ($t_{1/2}$) a 50 y 60 °C se muestra en la **Tabla 5**.

Tabla 5. $t_{1/2}$ de Xyn11A a las diferentes temperaturas

°C	$t_{1/2}$
50	7 h
60	8 min

Se determinaron los parámetros cinéticos K_M y V_{max} . Para esto se estudió la actividad enzimática de Xyn11A-WT a diferentes concentraciones de xilana (1 a 10 mg/mL). A partir de los datos experimentales se determinaron las constantes cinéticas, las cuales fueron evaluadas por el método de regresión lineal utilizando tres modelos: Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Woolf. El modelo que mejor se ajustó fue el de Hanes-Woolf (**Tabla 6**). Los valores estimados de K_M y V_{max} fueron 1.4 mg/mL y 204 U/mg, respectivamente.

Tabla 6. Modelos utilizados para la estimación de los parámetros K_M y V_{max} .

	Lineweaver-Burk	Eadie-Hofstee	Hanes-Woolf
K_M (mg/mL)	1.3	1.4	1.4
V_{max} (U/mg)	200.0	204.8	204.0
R^2	0.98	0.93	0.99

7.3.5 Expresión y purificación de Xyn11A-N9Y

La purificación de la xilanasa Xyn11A-N9Y, con cambio en el aminoácido 9 (N9Y), no se pudo purificar bajo las mismas condiciones que la xilanasa silvestre Xyn11A-WT, es decir utilizando buffer Tris-HCl pH 7.5 en la cromatografía de intercambio aniónico; ya que el análisis por SDS-PAGE de las fracciones que presentaban actividad xilanolítica mostró varias bandas contaminantes. Por lo anterior, se llevó a cabo una purificación por cromatografía de intercambio catiónico con buffer de fosfatos pH 7, pero el resultado fue el mismo que utilizando buffer Tris-HCl pH 7.5. Por este motivo, se llevó a cabo la cromatografía por intercambio aniónico pero ahora en buffer de Histidina 50 mM, pH 6. Se utilizó una columna de intercambio aniónico UNOsphere Q.

En la **Figura 33** se presenta el cromatograma de la purificación con el buffer de Histidina 50 mM, pH 6. La xilanasa no interaccionó con la resina y fue colectada en las primeras fracciones. Durante el gradiente salino fueron eluidas las proteínas contaminantes. El resumen de la purificación de la xilanasa recombinante Xyn11A-N9Y se presenta en la **Tabla 7**.

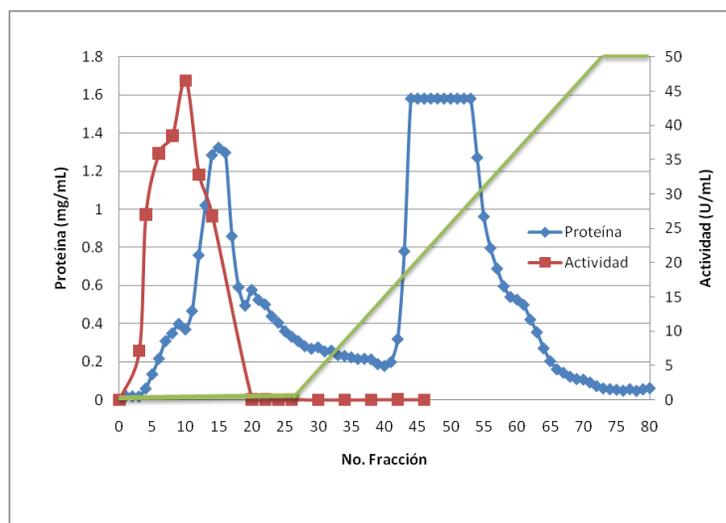


Figura 33. Purificación de la xilanasa mutada por cromatografía de intercambio aniónico a partir de sobrenadante de cultivo. Resina de intercambio aniónico UNOsphere Q, buffer de elución (%B) Histidina 50 mM, pH 6.

Tabla 7. Resumen de la purificación de Xyn11A-N9Y expresada en *E. coli*.

	Actividad (U/mL)	Proteína (mg/mL)	Actividad específica (U/mg)	Rendimiento %	Factor de purificación
Sobrenadante	50.45	4.99	10.11	100	1
Concentrado y Dializado	36.36	3.28	11.08	72.07	1.1
Cromatografía de intercambio aniónico	30.17	1.25	24.14	59.8	2.4

Las fracciones que presentaron actividad fueron analizadas por SDS-PAGE, pero debido a la baja concentración de proteína no fue posible observarla por tinción con Azul de Coomassie, por lo que fue necesario concentrar las fracciones con Centricón de 10 kDa de corte. En la **Figura 34** se muestra el perfil electroforético de la xilanasa Xyn11A-N9Y purificada.

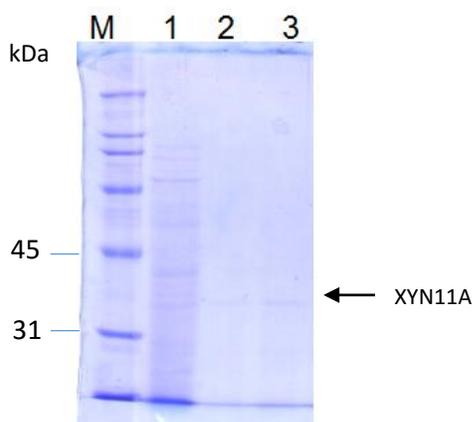


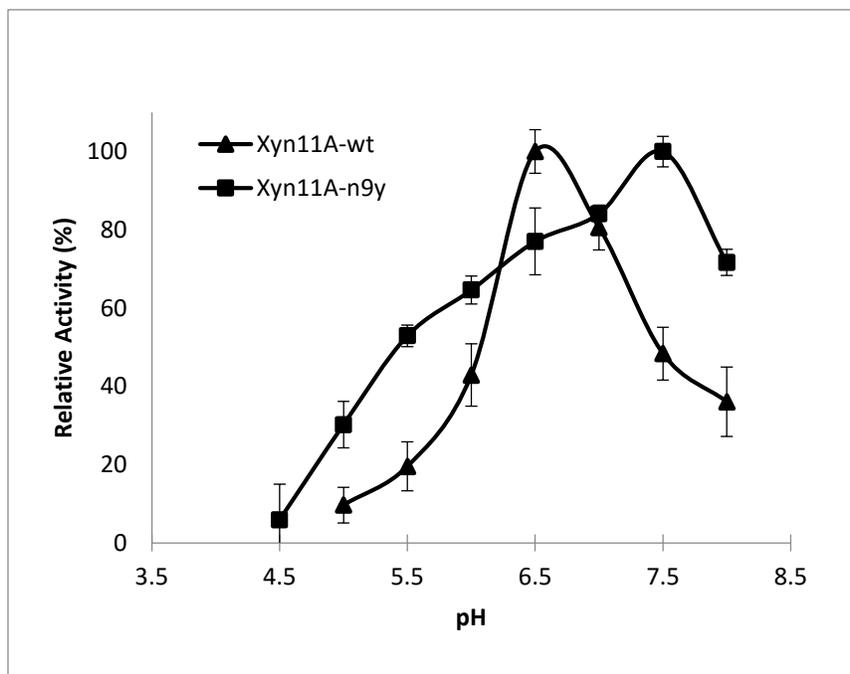
Figura 34. Análisis electroforético de xilanasa mutada purificada por cromatografía de intercambio aniónico, SDS-PAGE 10%. Carril M: Marcador de PM, 1) SN concentrado inyectado a la columna, 2) xilanasa purificada y 3) xilanasa purificada concentrada con Centricón.

Una vez que se logró purificar la xilanasa Xyn11A-N9Y se inició la caracterización bioquímica. La temperatura óptima fue de 60°C y el pH óptimo de 7.5 (**Figura 35**).

Se realizó el análisis de termoestabilidad determinando una vida media ($t_{1/2}$) de 90 min a 60°C y de 116 h a 50°C (**Figura 36**). También se determinó el efecto de la concentración de xilana en la actividad de la enzima, incubando la xilanasa Xyn11A-N9Y purificada en concentraciones de xilana de 0 a 10 mg/mL y se determinaron

los parámetros cinéticos K_m y V_{max} . Se obtuvo una K_m de 0.8 mg/mL y una V_{max} de 71 U/mg.

a



b

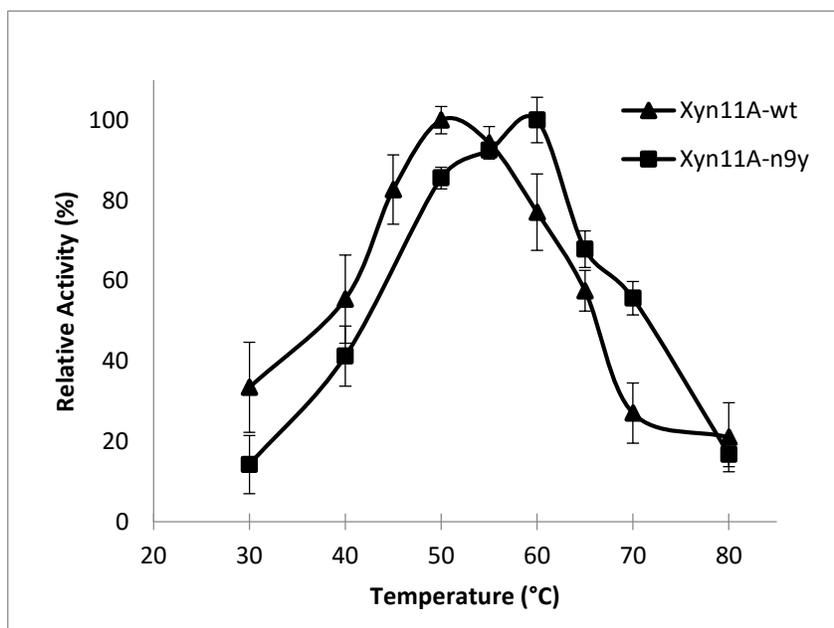


Figura 35. Caracterización bioquímica de Xyn11A-WT and Xyn11A-N9Y. A) Efecto del pH sobre la actividad xilanólítica (buffer citratos-fosfatos 50 mM, xilana al 0.2%, pH 4.5-7 o buffer fosfatos 0.1 M, xilana al 0.2%, pH 6.5-8), B) Efecto de la temperatura sobre la actividad xilanólítica (30 -80°C).

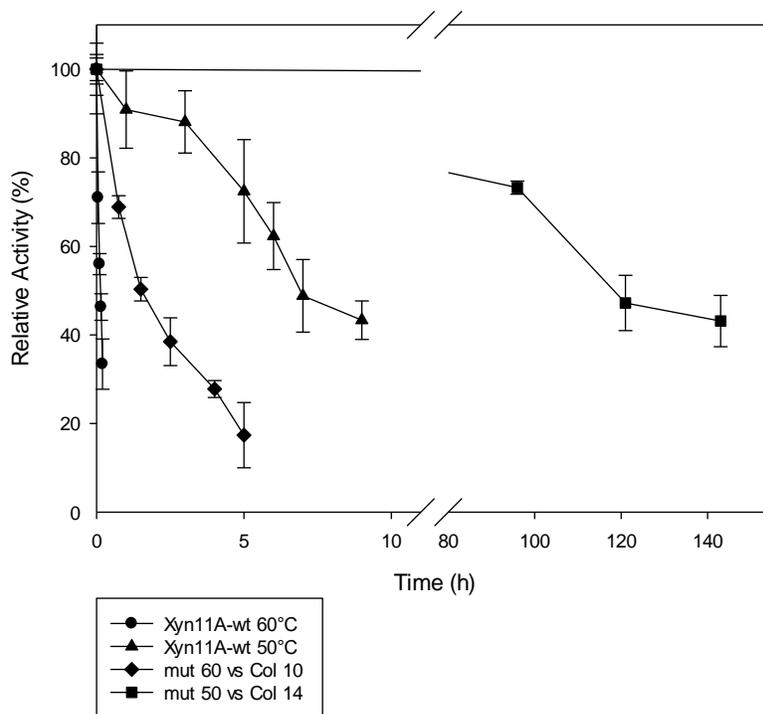


Figura 36. Estabilidad térmica de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y. La enzima purificada se incubó a 50 y 60 °C en buffer citratos-fosfatos, pH 6.5 para Xyn11A-WT y buffer fosfatos pH 7.5 para Xyn11A-N9Y.

En la **Tabla 8** se presenta la comparación de las propiedades bioquímicas y parámetros cinéticos de la xilanasa silvestre y la xilanasa con el cambio en el aminoácido 9.

Tabla 8. Comparación de las propiedades entre la xilanasa silvestre y la xilanasa mutada.

	Xyn11A-WT	Xyn11A-N9Y
T óptima (°C)	50	60
pH óptimo	6.5	7.5
Termoestabilidad	60°C $t_{1/2}$ 8 min 50°C $t_{1/2}$ 7 h	60°C $t_{1/2}$ 90 min 50°C $t_{1/2}$ 116 h
K_M (mg/mL)	1.4	0.80
V_{max} (U/mg)	204	71.0

La xilanasa Xyn11A-WT mostró la máxima actividad a pH 6.5, mientras que en Xyn11A-N9Y incrementó en una unidad de pH óptimo. Xyn11A-WT presentó un intervalo estrecho en donde retiene más de 50% de actividad (6.0 a 7.5). Mientras que Xyn11A-N9Y presentó un amplio intervalo en el cual presenta más del 50% de actividad (5.5-8.0) (**Figura 35a**).

La xilanasa Xyn11A-WT presentó un pH óptimo similar a la xilanasa Xyn11A expresada en *E. coli* (Amaya-Delgado et al., 2010) y *P. pastoris* (Cayetano-Cruz et al., 2016), y otras xilanasas obtenidas de diferentes microorganismos como *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582 (Sinma, 2011) y la xilanasa recombinante de *Chaetomium thermophilum* expresada en *P. pastoris* (Ghaffar, 2011). Xyn11A-N9Y mostró pH óptimo similar al de la xilanasa de *Staphylococcus* sp. SG-13 (Gupta et al., 2000), y al de la xilanasa de *Paenibacillus curdlanolyticus* con actividad óptima a pH 7.5 (Sudo et al., 2010).

En cuanto a la temperatura óptima, observamos un incremento en 10°C en la xilanasa Xyn11A-N9Y. Xyn11A-WT mostró más del 50% de actividad en un intervalo de temperaturas de 40 a 65°C, mientras que Xyn11A-N9Y de 45 a 70°C (**Figura 35b**).

La temperatura óptima de la xilanasa Xyn11A-WT es similar a la temperatura óptima reportada para la xilanasa recombinante en *P. pastoris* de *Schizophyllum commune* (Song et al., 2013) y *Aspergillus niger* (Guo, 2013). La xilanasa Xyn11A-N9Y tuvo temperatura óptima similar a la xilanasa XIn-1 purificada, caracterizada de *Aspergillus niger* B03 (Dobrev et al., 2009). Asimismo, se reportó la expresión de una xilanasa de *Paenibacillus campinasensis* en *E. coli*, con actividad óptima a 60°C (Ko et al., 2010).

Respecto a la termoestabilidad, pudimos observar que debido al cambio en un solo aminoácido la vida media de la xilanasa mutante incrementó 16 veces a 50°C (**Figura 36**). La termoestabilidad a 60°C de Xyn11A-N9Y fue mayor a la reportada para las xilanasas PhX20 ($t_{1/2}$ de 10 min) de *Pseudozyma hubeiensis* (Adsul et al., 2009) y Xyn2 ($t_{1/2}$ de 25 min) de *Trichoderma reesei* (He et al., 2009). Pero menor a lo reportado para la xilanasa de *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582 ($t_{1/2}$ de 3 h) (Sinma et al., 2011).

Con respecto a los parámetros cinéticos, como podemos ver en la **Tabla 7**, hubo una disminución en la K_M de Xyn11A-N9Y, lo cual significa mejor afinidad por el sustrato. El valor de V_{max} de Xyn11A-N9Y disminuyó 2.8 veces comparado con el valor de Xyn11A-WT. Se ha reportado que cuando se realizan cambios en aminoácidos de una proteína, se debe evaluar el efecto rigidez/flexibilidad causado por la mutación. Una mayor rigidez en la estructura de una proteína puede estar relacionado a una mayor termoestabilidad pero también se puede reflejar en el cambio en los valores de los parámetros cinéticos (Zhang et al., 2006; Yang et al., 2007; Song et al., 2012).



7.4 SIMULACIONES MEDIANTE DINÁMICA MOLECULAR

7.4.1 Estructuras tridimensionales de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

Se obtuvieron las estructuras completas de ambas proteínas utilizando el servidor I-TASSER. Cada secuencia se subió al servidor de forma independiente. I-TASSER nos permitió generar automáticamente la predicción de estructuras tridimensionales (3D) de alta calidad, ya que ambas estructuras fueron validadas mediante mapas de Ramachandran, utilizando el programa PROCHEK, y obtuvimos un alto porcentaje de residuos que están presentes en regiones permitidas.

Como podemos ver en la **Figura 37**, el dominio catalítico de ambas proteínas está formado por 12 láminas β -plegada y una estructura α -hélice; mientras que el dominio de unión a sustrato (CBD) está formado por 4 láminas β -plegada. Es importante resaltar que la estructura del dominio catalítico de Xyn11A-N9Y no fue alterada por la mutación en el aminoácido 9, pero se observó un cambio en la localización de las láminas β -plegada del dominio de unión a sustrato.

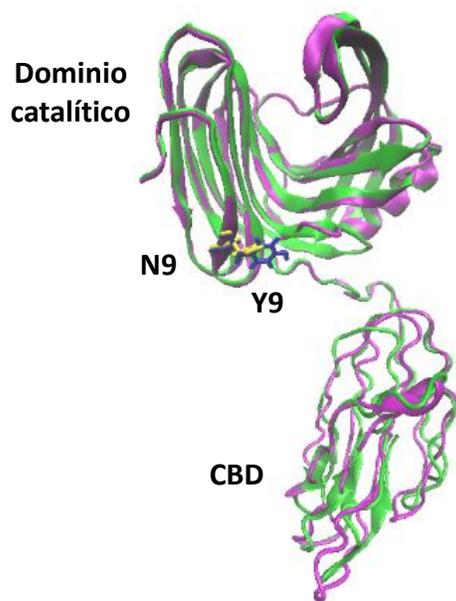


Figura 37. Modelos estructurales de las xilanasas. Estructuras superpuestas de Xyn11A-WT (verde) y Xyn11A-N9Y (morado). El dominio catalítico y CBD están indicados. La mutación en la posición nueve está indicada N (amarillo) y Y (azul).

Adicionalmente, obtuvimos los mapas de potencial electrostático de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y (**Figura 38**). Observamos que en el área donde se llevó a cabo la mutación hubo un cambio en el potencial electrostático, ya que Xyn11A-WT tiene una área negativa rodeada por una positiva, mientras que Xyn11A-N9Y tiene una superficie positiva mayor.

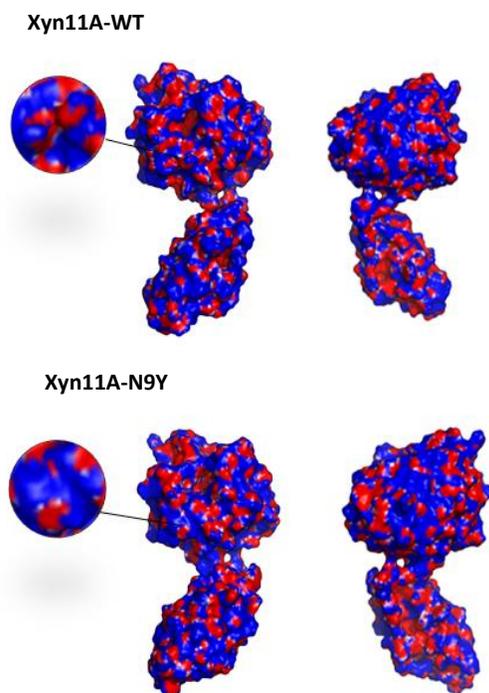


Figura 38. Mapas de potenciales electrostáticos de Xyn11A-WT and Xyn11A-N9Y, ampliación de la zona en donde se llevó a cabo la mutación.

7.4.2 Simulaciones mediante Dinámica Molecular y parámetros estructurales

Considerando que la mutación en un sólo aminoácido puede ser suficiente para modificar la conformación, estabilidad y funcionalidad de una proteína y después de comprobarlo experimentalmente con los valores obtenidos de la caracterización bioquímica de la xilanasa mutante y los cambios que se presentaron, se propuso complementar los datos experimentales con datos obtenidos realizando simulaciones mediante dinámica molecular. Se realizaron simulaciones con las

estructuras 3D de ambas proteínas, con el objetivo de comparar los cambios conformacionales que tiene cada proteína a diferentes temperaturas.

Las simulaciones se llevaron a cabo con el paquete de programas GROMACS, utilizando un campo de fuerza OPLS-AA para Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y. Se evaluaron los cambios conformacionales de ambas xilanasas a 300, 400 y 500 K durante 50 nanosegundos (ns). Una comparación de los parámetros estructurales de ambas xilanasas se muestra en la **Figura 39**. De las simulaciones realizadas se obtuvieron archivos de salida, que corresponden a cada una de las trayectorias de las proteínas a las diferentes temperaturas. Con estas trayectorias se realizaron diversos análisis y obtener los siguientes parámetros.

Valores de RMSD

Los valores RMSD (raíz de la desviación cuadrática media), muestra los cambios en los α -arboños, y es una medida y comparación de estructuras subsecuentes durante la simulación. Al inicio, los valores de RMSD aumentan en la simulación durante el periodo de equilibrio después del calentamiento del sistema. Podemos ver los valores de RMSD en la **Figura 39A-B**. Los valores de RMSD de Xyn11A-WT llegaron a 1.0 y 1.25 nm a 300 y 400 K, respectivamente. A 500 K, alcanzaron valores máximos de 2.0 nm; mientras que para Xyn11A-N9Y los valores de RMSD fueron de 0.8 y 1.2 nm a 300 y 400 K, respectivamente. A 500 K, los valores de RMSD fueron de 1.6 nm con un abrupto incremento a los 39 ns, obteniéndose valores de hasta 2.5 nm.

Como podemos ver en las gráficas de RMSD ambas proteínas muestran un comportamiento diferente a las temperaturas simuladas. Interesantemente, observamos que a 500 K la xilanasas mutante tiene valores menores de RMSD, lo cual nos indica una mayor estabilidad de la proteína a altas temperaturas.

Valores de radio de giro

Los valores de radio de giro (R_g) son un indicador de que tan compacta es una proteína. Los valores de R_g para Xyn11A -WT y Xyn11A-N9Y se muestran en la **Figura 39C-D**. Los valores iniciales de ambas proteínas fueron cercanos a 2.4 nm y se observó la disminución conforme avanzó el tiempo de simulación hasta llegar a valores mínimos de 2.1 nm. A 400 K, los valores en ambas proteínas tuvieron un comportamiento similar con valores promedio de 2.0 nm. Las diferencias más marcadas ocurrieron a 500 K, donde los valores de R_g de Xyn11A-WT fueron disminuyendo a lo largo de la simulación hasta alcanzar valores mínimos de 1.9; mientras que para Xyn11A-N9Y los valores fueron incrementando después de los 25 ns de simulación y se alcanzaron valores máximos de 2.9. Este comportamiento indica eventos de expansión y compactación de la proteína.

Valores de SASA

Los valores del área expuesta al solvente (SASA) en ambas proteínas mostraron comportamientos muy parecidos a 300 y 400 K (**Figura 39E-F**). El promedio de los valores de SASA fue cercano a 160 nm². A 500 K, se observó el mismo comportamiento con valores promedio de 180 nm². Como vemos los valores de SASA incrementaron a una mayor temperatura, pero no se observó una diferencia significativa entre los valores de ambas proteínas a las diferentes temperaturas.

Valores de RMSF

Los valores de RMSF (raíz de la fluctuación cuadrática media) nos permite detectar las regiones más móviles en una proteína. Evaluamos el movimiento a las 3 diferentes temperaturas (**Figura 39G-H**). Los valores de RMSF a 300 y 400 K de ambas proteínas tuvieron un comportamiento similar. Observamos valores menores para las regiones con estructura y valores mayores para los giros. A 500 K, los

valores de RMSF para la xilanasa mutante fueron menores en comparación con la xilanasa silvestre. Es importante hacer notar que en la región en donde se llevó a cabo la mutación (aminoácido 9) el movimiento de los residuos de esa región disminuyó. Los valores más altos de RMSF para los primeros 10 aminoácidos para Xyn11A-N9Y fueron de 0.9 nm, mientras que para Xyn11A-WT fueron de 1.5 nm. A esta misma temperatura también podemos observar que la región que comprende los aminoácidos 240 a 289 tiene un aumento en los valores de RMSF de Xyn11A-N9Y en comparación con la misma región de Xyn11A-WT. Esta región corresponde a parte del CBD.

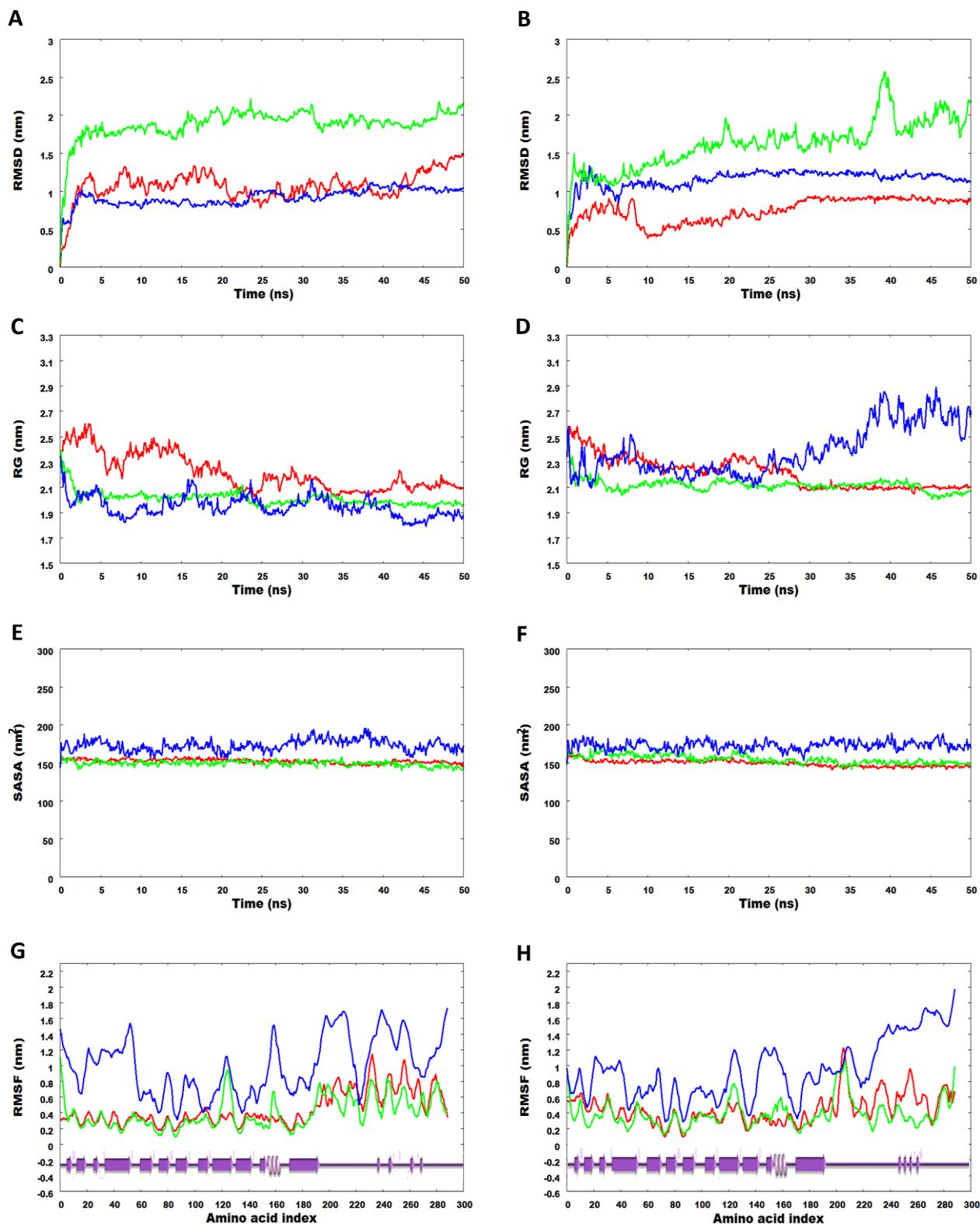


Figura 39. Análisis estructural de las simulaciones mediante dinámica molecular a 300 (rojo), 400 (verde) y 500 K (azul). Xyn11A-WT (A, C, E, G) y Xyn11A-N9Y (B, D, F, H). Evolución en el tiempo de α -carbonos RMSD (A, B), Radio de giro (C, D), valores de SASA (E, F), valores de RMSF en función del número de residuo (G, H).

7.4.3 Análisis de estructura secundaria

Para el análisis de la estructura secundaria se utilizó el programa DSSP. En la **Figura 40** se observa la evolución de las estructuras de las proteínas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y a lo largo de la simulación a las diferentes temperaturas. A 300 K, ambas proteínas mantienen su estructura en el dominio catalítico (1-189 aminoácidos). En el DBD (206-289 aminoácidos) de Xyn11A-WT observamos que se perdieron algunas láminas β -plegada y adoptaron estructuras desordenadas (**Figura 40A**). Por otra parte, en la xilanasa Xyn11A-N9Y no se observó pérdida de estructura, todas las láminas β -plegada permanecieron después de 50 ns de simulación (**Figura 40D**). A 400 K, en el dominio catalítico de ambas proteínas algunos residuos tienden a cambiar la conformación β -plegada por un giro o estructura desordenada (120-130 aminoácidos). Observamos que la α -hélice formada por los aminoácidos 150 a 160 en Xyn11A-WT (**Figura 40B**) permaneció hasta el final de la simulación, mientras que esta misma estructura en Xyn11A-N9Y se perdió después de los 10 ns (**Figure 40E**). En el CBD de Xyn11A-WT las estructuras β -plegadas permanecieron durante toda la simulación, pero en la xilanasa Xyn11A-N9Y algunas estructuras desordenadas adoptan conformaciones lámina β -plegada durante algunos ns de simulación.

A 500 K, ambas proteínas perdieron parcialmente la estructura secundaria. Pudimos observar similares cambios conformacionales en ambas proteínas, sugiriendo que todas las láminas β -plegada presentes en el CBD y la α -hélice presente en el dominio catalítico se perdieron a tiempos iniciales de simulación. Sin embargo, también hubo diferencias importantes, indicando que se presentó una pérdida mayor de las láminas β -plegada en Xyn11A-WT, mientras que para Xyn11A-N9Y ésta pérdida fue menor. En la proteína completa Xyn11A-WT, el 50% de las láminas β -plegada se perdieron después de 20 ns, y al final de la simulación sólo el 27% de estas estructuras permanecieron. En cambio en la proteína Xyn11A-N9Y después de 50 ns de simulación todavía el 50% de las estructuras β -plegadas estaban presentes. Cabe resaltar que la estructura β -plegada, donde se introdujo la mutación N9Y en la en la xilanasa Xyn11A-N9Y, permaneció sin perder la estructura

a lo largo de la simulación, no siendo así para la estructura correspondiente a la xilanasas Xyn11A-WT.

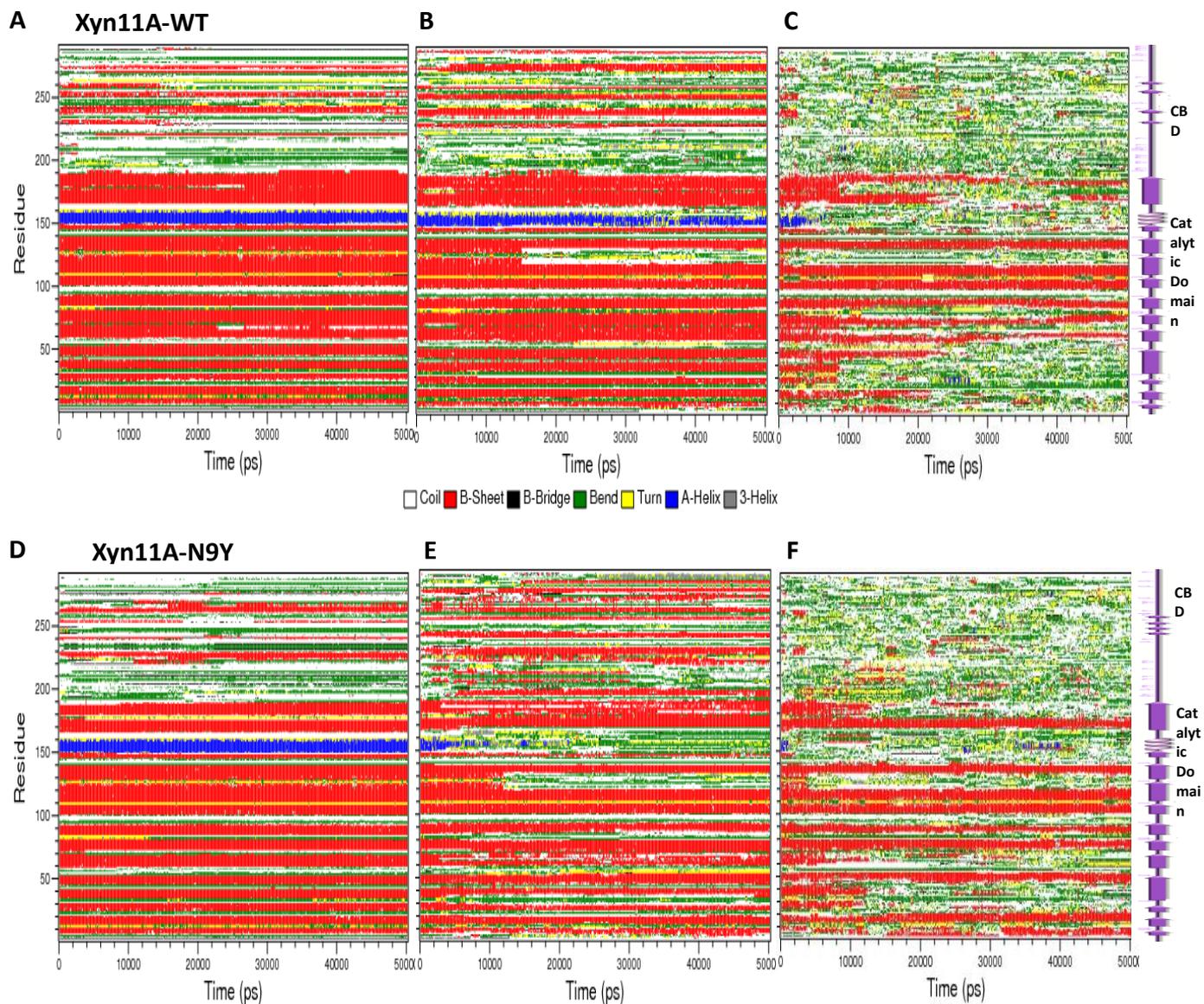


Figura 40. Evolución en el tiempo de la estructura secundaria de ambas xilanasas en las simulaciones por MD. A, B, C) Xyn11A-WT a 300, 400 y 500 K, respectivamente, D, E, F) Xyn11A-N9Y a 300, 400 y 500 K, respectivamente.

7.4.4 Estructuras representativas de Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y

Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y mostraron cambios conformacionales a las diferentes temperaturas a lo largo de la simulación. En la **Figura 41**, se muestran imágenes representativas de diferentes tiempos (0, 25 y 50 ns). Obtuvimos los espacios conformacionales de cada proteína en un mínimo energético local por la simulación a 300 K. A esta temperatura observamos, en ambas proteínas, una mayor movilidad en el CBD, no siendo así para el resto de la proteína. Esto concuerda con los valores altos de RMSF obtenidos.

A 400 K, el principal cambio conformacional observado fue la pérdida de la α -hélice presente en el dominio catalítico de Xyn11A-N9Y. En ambas proteínas, a esta temperatura, se observó el acercamiento entre el dominio catalítico y el CBD. Este acercamiento entre los dominios concuerda con los valores de RG obtenidos, en los que se observa una disminución en estos valores conforme avanza la simulación. Podemos decir que ambas proteínas sufren una compactación.

A partir de las imágenes obtenidas a 500 K, se puede interpretar que todas las láminas β -plegada del CBD se perdieron en ambas proteínas. Algo interesante que se observó fue que en la xilanasa Xyn11A-WT el dominio catalítico mostró una tendencia a acercarse al CBD, lo cual fue contrario a lo que se observó para Xyn11A-N9Y, que mostró una tendencia a alejarse. También se observó que las estructuras β -plegadas, compuestas por los residuos 60-90, se mantuvieron hasta el final de la simulación en ambas proteínas. En cambio las estructuras β -plegada compuestas por los residuos 1-50 de Xyn11A-WT conservaron la estructura sólo por 20 ns de simulación, diferente a Xyn11A-N9Y que conservó estas estructuras hasta el final de la simulación.

Con estos resultados podemos decir que la mutación que llevamos a cabo ayuda a mantener la estabilidad de la estructura β -plegada que la contiene, haciéndola más resistente a altas temperaturas.

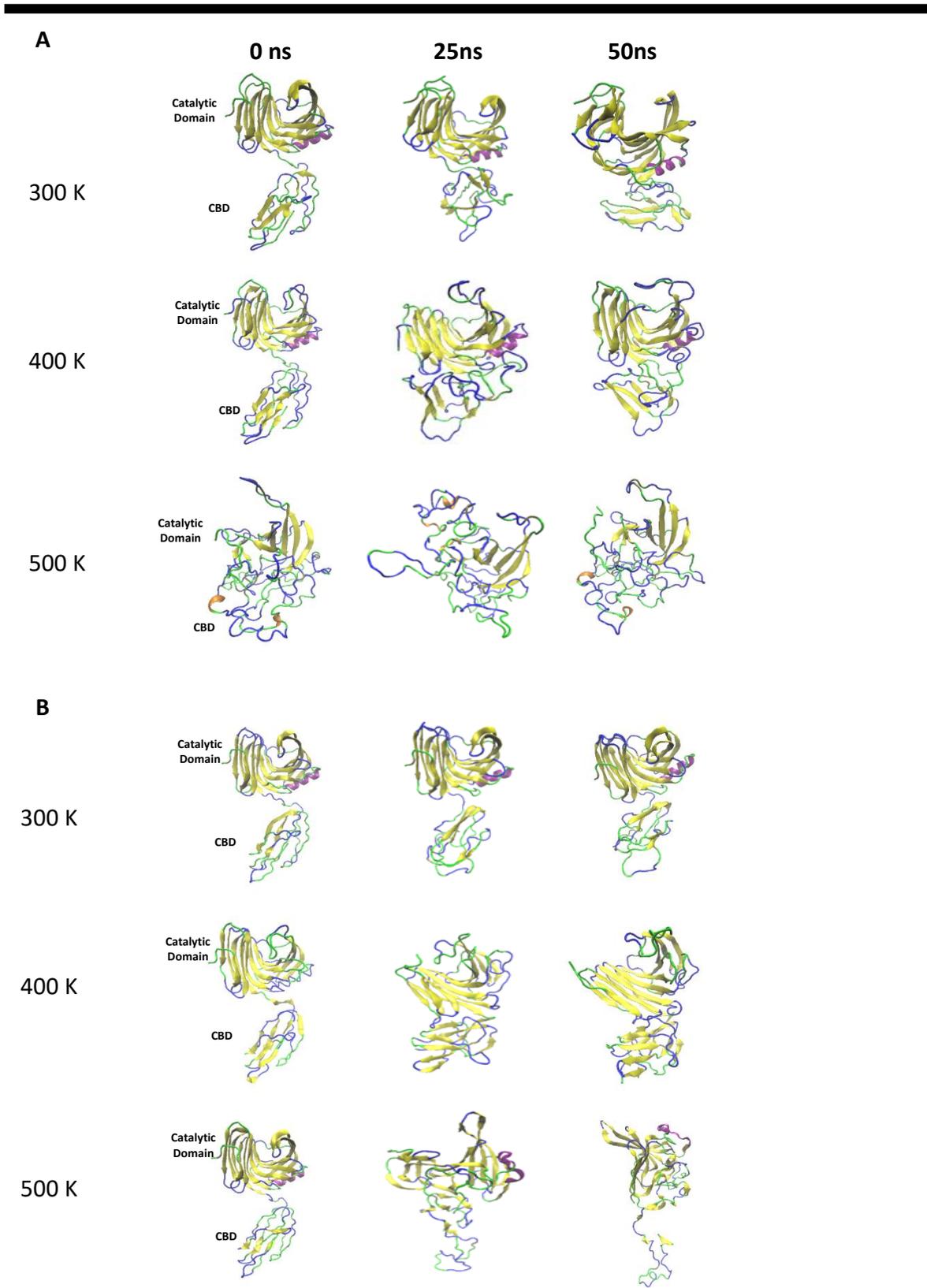


Figura 41. Imágenes representativas de la estructura de la proteína a diferentes tiempos de simulación y diferentes temperaturas como se indica. A) Xyn11A-WT y B) Xyn11A-N9Y

En estas estructuras sometidas a 500 K y después de 50 ns de simulación localizamos los aminoácidos que están involucrados en la hidrólisis de la xilana Y76, E85, Y87, Y168 y E174. Se observó que en Xyn11A-WT las estructuras β -plegada en donde originalmente se encontraban los residuos catalíticos perdieron su estructura (**Figura 42A**); sin embargo, en Xyn11A-N9Y estas estructuras β -plegada permanecieron después del tiempo de simulación. Por lo anterior, se puede decir que los residuos catalíticos se encuentran en estructuras ordenadas (**Figura 42B**). Debido a esto, la orientación y distancia entre estos residuos se conserva. Por lo que podemos esperar que Xyn11A-N9Y presente actividad xilanolítica y que la xilanasa Xyn11A-WT exhiba menor o nula actividad enzimática a temperaturas más altas, como lo que se observó experimentalmente.

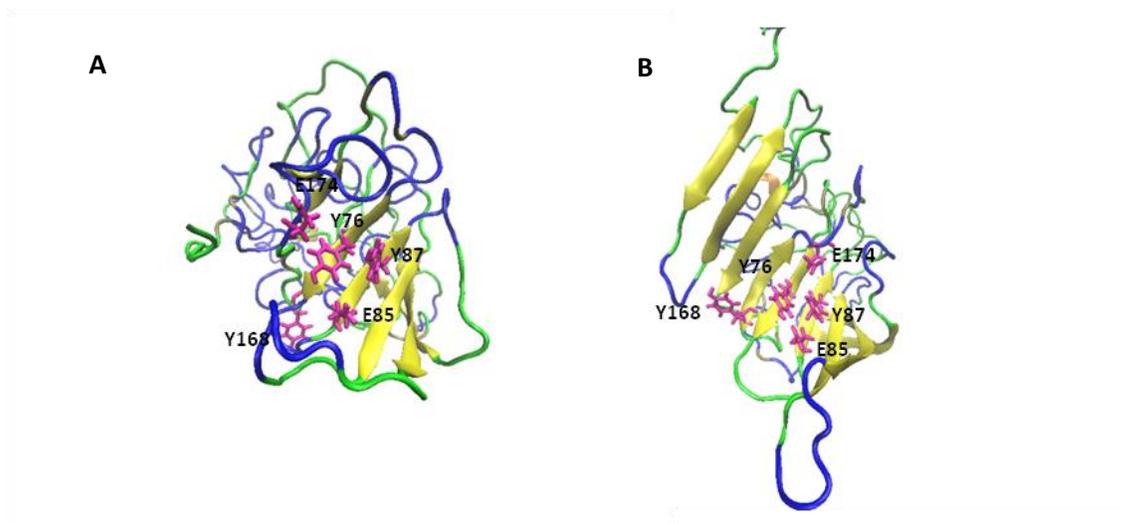


Figura 42. Residuos involucrados en la hidrólisis de la xilana en las estructuras después de 50 ns de simulación a 500 K. A) Xyn11A-WT, B) Xyn11A-N9Y

7.4.5 Distancia entre residuo 9 y 14

Se ha reportado que el aumento en termoestabilidad en una xilanasa puede estar relacionado con el aumento de una interacción anillo aromático-anillo aromático (Georis et al., 2000), pero no se ha realizado ningún análisis estructural. Por lo que,

lo primero que se realizó fue analizar la interacción entre los residuos 9 y 14 en ambas proteínas. Observamos que al realizar la mutación N9Y, la interacción aromática Y9-Y14 se encontraba en el arreglo clásico borde a cara (edge to face arrangement, **Figura 44**).

También no se ha reportado si debido a que la interacción entre anillos aromáticos es más fuerte, las distancias entre estos residuos es menor. Por lo que determinamos la distancia entre los dos residuos (9 y 14). A 300 K se encontró que la distancia fue de 0.64 y 0.51 nm para Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y, respectivamente. En la **Figura 43** se puede apreciar una clara disminución en la distancia entre los aminoácidos de Xyn11A-N9Y. A 400 K, ambas proteínas tienen una distancia promedio similar a lo largo de la simulación. A 500 K, se obtuvieron valores promedio de distancia de 0.94 y 0.86 nm para Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y, respectivamente.

Estos resultados muestran que el cambio de Asp por Tyr en el aminoácido 9 produce una interacción más fuerte entre los anillos aromáticos de los residuos Y9-Y14 causando la reducción en la distancia entre estos aminoácidos.

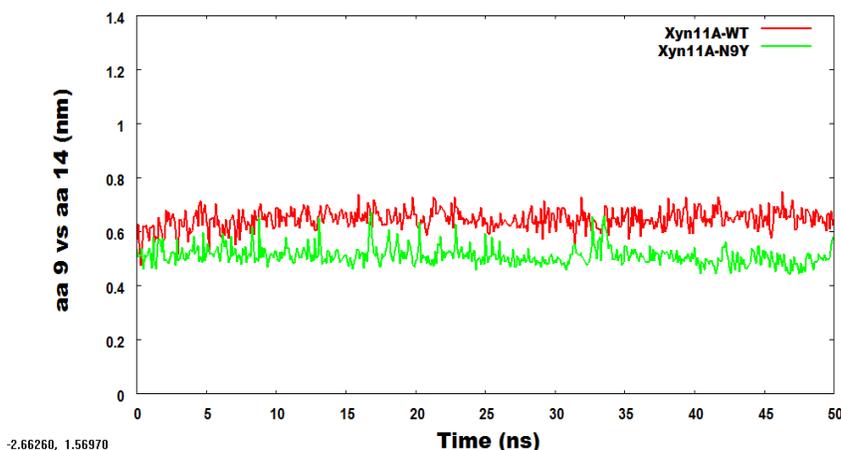


Figura 43. Evolución de las distancias entre los residuos 9 y 14 en Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y a 300 K.

Burley y Petsko en 1989 reportaron que la interacción entre anillos aromáticos es de tipo cuádrupolo-cuádrupolo y debido a los pares aromáticos entálpicamente

favorables en las proteínas, sugirieron que están involucrados en la estabilización de la estructura terciaria de la proteína y juegan un importante papel en la termoestabilidad (Burley y Petsko, 1989; Meyer et al. 2003). Serrano et al. 1991 reportaron que la interacción aromática contribuye entre -0.6 y -1.3 kcal/mol a la estabilidad de la proteína. Meyer et al. 2003 reportaron que la estabilización predominante parece derivar del efecto hidrofóbico no clásico junto con fuerzas de London.

Se observó que en Xyn11A-N9Y los anillos aromáticos de los residuos 9 y 14 estaban en el arreglo “edge to face”, también conocido como arreglo T. Se ha reportado que la orientación perpendicular “edge to face” es la más favorecida (Singh y Thornton, 1985). Este arreglo es favorecido debido a la interacción entre los átomos cargados positivamente en el borde (“edge”) de un anillo y los electrones π y los átomos con carga negativa parcial de la cara (“face”) del otro anillo (Burley y Petsko, 1989 y Serrano et al. 1991). Aunque las interacciones π - π son consideradas como débiles podemos ver que estas son más fuertes que las interacciones amino-anillo aromático que ocurre entre la asparagina y tirosina en la xilanasa nativa.

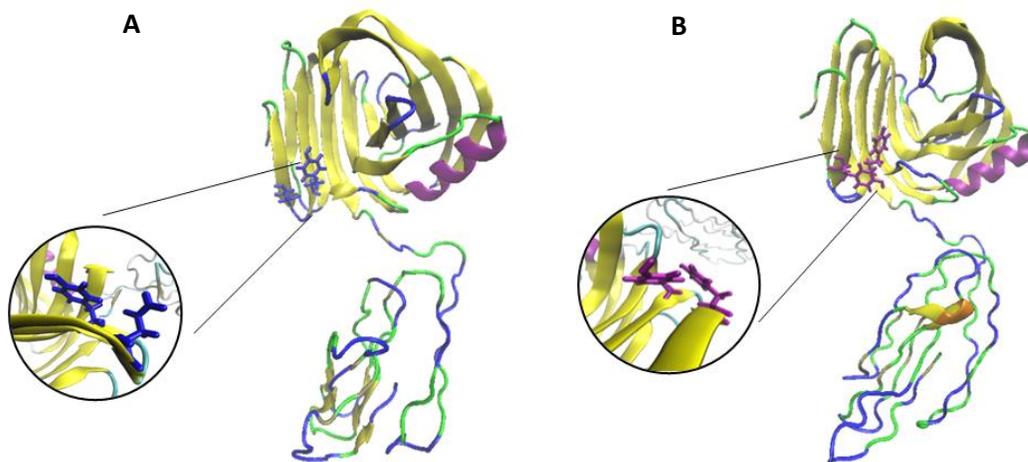


Figura 44. Estructuras tridimensionales mostrando la interacción entre residuos 9 y 14. A) Interacción N9-Y14 (Xyn11A-WT) y B) Interacción Y9-Y14 (Xyn11A-N9Y).

7.4.6 Puentes salinos

Se ha reportado que las interacciones electrostáticas como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes salinos son importante para mantener la estructura 3-D de las proteínas. Los puentes salinos son las fuerzas principales en la estabilización de la estructura (Raghav et al., 2012). Los puentes salinos se localizaron entre los residuos de carga opuesta y con una distancia de corte de 6 Angstroms. Encontramos diferencia entre el número de puentes salinos formados a las diferentes temperaturas en ambas proteínas. En la **Tabla 9** se muestran los residuos involucrados en el puente salino a las diferentes temperaturas. La mayoría de éstos se forman entre residuos de D y R. De forma interesante observamos un mayor número de puentes salinos en la xilanasa mutante. Algunos de ellos sólo se observaron a 500 K (D90-K141, D108-R57 y D222-K49).

La mutación N9Y, más allá de la formación de la interacción π - π , produce un incremento en puentes salinos, los cuales sólo se encontraron en la xilanasa Xyn11A-N9Y a altas temperaturas. Aparentemente, estos tres puentes salinos adicionales tienen un efecto en el plegamiento y estabilidad estructural de la proteína.

Tabla 9. Puentes salinos formados en Xyn11A-WT (WT) y Xyn11A- N9Y (N9Y) en las simulaciones a 300, 400 y 500 K.

Residuo	300 K		400 K		500 K	
	WT	N9Y	WT	N9Y	WT	N9Y
D90-R138	✓	✓	✓	✓	✓	✓
D90-R142	✓	✓	✓	✓	✓	
D108-R138			✓	✓		✓
D108-R142	✓		✓	✓	✓	
D113-R96	✓	✓	✓	✓	✓	
D222-R57		✓	✓			
E85-R119		✓	✓	✓		✓
E219-R223			✓			
E188-R57			✓	✓		✓
D222-R223		✓		✓		
E188-R223		✓				
D90-K141						✓
D108-R57						✓
D222-K49						✓

VIII. CONCLUSIONES

➤ **Cultivo en biorreactor**

1. Se logró implementar una estrategia de cultivo en biorreactor en una sola etapa, utilizando metanol como única fuente de carbono, la cual permitió la expresión extracelular de la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* en *Pichia pastoris*, con un alto grado de pureza.
2. Se observó que al utilizar metanol como única fuente de carbono se redujeron las etapas de cultivo, por lo que el tiempo de fermentación se acortó a 48 h y se logró alcanzar buena cantidad de biomasa pero, además, alta producción de la xilanasa recombinante.
3. Se encontró que es posible implementar una estrategia de cultivo en biorreactor en una sola etapa, utilizando metanol como única fuente de carbono, y empleando un medio de cultivo mínimo en sales para el cultivo de *P. pastoris*, lo cual sin duda representa un beneficio para reducir los costos en alguna aplicación industrial.

De manera general, se puede concluir que se estableció una metodología que permite producir la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* en *Pichia pastoris* con un buen balance entre el medio simple, utilizado metanol como única fuente de carbono, tiempo de fermentación corto y buena cantidad de xilanasa producida.

➤ **Mejoramiento de las propiedades de la xilanasa por evolución dirigida**

1. La Evolución Dirigida de la xilanasa Xyn11A de *Cellulomonas uda* por métodos de PCR propensa a error, para la generación de mutaciones aleatorias, permitió la obtención de una xilanasa mutada que presenta mayor termoestabilidad que la xilanasa silvestre.

-
2. Se implementó una metodología que permite el rápido escrutinio de bibliotecas de xilanasas mutantes, en medio sólido y tinción con rojo Congo para revelar la actividad xilanolítica.

➤ **Mejoramiento de las propiedades de la xilanasas por mutagénesis sitio-dirigida**

1. Por métodos de Mutagénesis Sitio-Dirigida se logró obtener la xilanasas Xyn11A-N9Y, que presenta una mutación en el residuo 9 (N9Y) de la Xyn11A (Xyn11A-WT) de *Cellulomonas uda*.
2. Las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y se expresaron extracelularmente en *E. coli*, utilizando el vector pET-38b(+), con péptido señal para localización en periplasma.
3. Las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y se purificaron y caracterizaron bioquímicamente, encontrándose un incremento de 10°C en la temperatura óptima (60 a 70 °C), y un incremento de una unidad en el pH óptimo (pH 6 a 7) en la xilanasas Xyn11A-N9Y; sin embargo, también se vio afectada la velocidad máxima de Xyn11A-N9Y en 2.8 veces.

➤ **Análisis de las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y por dinámica molecular**

1. El análisis de las xilanasas Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y por métodos de dinámica molecular a 300, 400 y 500 K permite concluir que la mutación N9Y altera el comportamiento global de la enzima, reflejándose en un incremento en la estabilidad de la estructura 3-D de la xilanasas Xyn11A-N9Y, atribuida principalmente a la interacción π - π , y al mayor número de puentes salinos formados, que son estables bajo estrés térmico.
2. Se observó que la estabilidad estructural de la xilanasas Xyn11A-N9Y se mantiene principalmente en el dominio catalítico, donde se encuentran los residuos para llevar a cabo la hidrólisis de la xilana.

De manera general, se puede concluir que la conservación del dominio catalítico, en las simulaciones a diferentes temperaturas, podría explicar la detección de actividad xilanolítica en la xilanasa Xyn11A-N9Y a mayor temperatura que la xilanasa silvestre Xyn11A-WT. Este estudio es útil para tratar de entender la relación entre estructura-función de ambas proteínas.

IX. PERSPECTIVAS

En el desarrollo de este proyecto comprobamos que mediante el uso de metodología de ingeniería de proteínas podemos mejorar las propiedades de la xilanasa Xyn11A. En este proyecto se hicieron sólo las pruebas iniciales para la mejora de la xilanasa de interés.

Con respecto a la evolución dirigida, aún quedan un sin número de técnicas que se pueden aplicar para la mejorar aún más las propiedades bioquímicas de la xilanasa Xyn11A. También se podrían realizar ciclos sucesivos de mutagénesis aleatoria o aplicar otras metodología de recombinación, como la del “DNA shuffling”. Por lo que, ahora que contamos con un gen que codifica para una xilanasa con aumento de 10 °C en la temperatura óptima y un gen con mejora de la actividad específica, el DNA de estos genes se puede cortar, mezclar y ensamblar para generar un sinnúmero de combinaciones, expresar estos genes en *E. coli* y utilizar el método de escrutinio e identificar clonas con mejora tanto en temperatura como en actividad. Además de caracterizarlas bioquímicamente sería interesante realizar ensayos de especificidad a sustrato utilizando variedad de estos para analizar si no hubo algún cambio en la actividad enzimática.

En relación al mejoramiento de enzimas por Mutagénesis Sitio-Dirigida, también quedaron pendientes algunas propuestas por aplicar. Se ha reportado que las xilanasas termofílicas tienen el motivo o “motif” GPGG aproximadamente en el aminoácido 30, se encontró que en esta posición la xilanasa Xyn11A tenía los aminoácidos GSGG por lo que también se propone generar la mutante con el cambio en el aminoácido 31 (S31P) y generar la doble mutante Xyn11A (N9Y, S31P), para analizar los cambio que producen las mutaciones de forma individual y en conjunto.

Los estudios de todas las mutantes generadas pueden ser complementados con estudios estructurales y simulaciones mediante dinámica molecular, para tratar de explicar los cambios observados experimentalmente con los datos generados durante las simulaciones. Algo interesante que también podríamos realizar, ya que

contamos con las estructuras tridimensionales de la xilanasa Xyn11A-WT y Xyn11A-N9Y es el acoplamiento de estas enzimas con el sustrato (estudios de “docking”)

Por otro lado, se pueden empezar a hacer pruebas en aplicaciones industriales, quizá la xilanasa mejorada (Xyn11A-N9Y) aún no es apta para ser utilizada en la industria de la pulpa y el papel, pero puede ser utilizado directamente el sobrenadante de cultivo para el tratamiento de alimentos de ganado o algún otro proceso en el que no se requiera que la enzima trabaje a altas temperaturas. Además de ser utilizada de forma individual en algún proceso biotecnológico. Las xilanasas variantes Xyn11A-N9Y y 309 podrían ser utilizadas en conjunto con otras enzimas que tenemos en el laboratorio (lacasa, xilanasa termofílica y celulasa) y analizar el efecto sinérgico de las mezclas de enzimas en la degradación de algún sustrato.

Así mismo, se pueden optimizar las condiciones de cultivo de la cepa *P. pastoris/pPICZ α B-xyn11* y probar diferentes concentraciones de metanol en el medio de cultivo para analizar si al aumentar la concentración de metanol logramos aumentar la concentración de la proteína en el sobrenadante de cultivo. También en las fermentaciones que realizamos se observó que el oxígeno era el reactivo limitante al alcanzar densidades celulares por arriba de 30 g/L en peso seco, por lo que si se quieren alcanzar densidades celulares mayores se tiene que adicionar oxígeno puro cuando sea requerido durante la fermentación.

Las bases sentadas para generar mutaciones aleatorias por evolución dirigida, así como para realizar mutaciones puntuales y generar los genes ensamblados con la o las mutaciones pueden ser utilizados perfectamente para aplicarlos en cualquier enzima que sea de interés y mejorar alguna de sus propiedades.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.G. Adsul, K.B. Bastawde, D. V. Gokhale, Biochemical characterization of two xylanases from yeast *Pseudozyma hubeiensis* producing only xylooligosaccharides, *Bioresour. Technol.* 100 (2009) 6488–6495. doi:10.1016/j.biortech.2009.07.064.
- [2] C. Almuzara, O. Cos, M. Baeza, D. Gabriel, F. Valero, Methanol determination in *Pichia pastoris* cultures by flow injection analysis, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 413–417.
- [3] L. Amaya-Delgado, T. Mejía-Castillo, A. Santiago-Hernández, J. Vega-Estrada, F.G.S. Amelia, B. Xoconostle-Cázares, et al., Cloning and expression of a novel, moderately thermostable xylanase-encoding gene (Cfl xyn11A) from *Cellulomonas flavigena*, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 5539–5545. doi:10.1016/j.biortech.2010.02.057.
- [4] F.H. Arnold, P.L. Wintrode, K. Miyazaki, A. Gershenson, F.H. Arnold, P.L. Wintrode, How enzymes adapt : lessons from directed evolution, *Trends Biochem. Sci.* 26 (2001) 100–106.
- [5] P. Bajpai, Biological bleaching of chemical pulps, (2004). doi:10.1080/07388550490465817.
- [6] K.B. Bastawde, Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 8 (1992) 353–368.
- [7] Q.K. Beg, M. Kapoor, L. Mahajan, G.S. Hoondal, Microbial xylanases and their industrial applications: a review, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56 (2001) 326–338. doi:10.1007/s002530100704.
- [8] H.J.C. Berendsen, J.P.M. Postma, W.F. Van Gunsteren, J. Hermans, Interaction models for water in relation to protein hydration, in: *Intermol. Forces*, D. Reidel Publishing Company, (1981): pp. 331–338.
- [9] P. Biely, Microbial xylanolytic systems, *Trends Biotechnol.* 3 (1985) 286–290. doi:10.1016/0167-7799(85)90004-6.
- [10] H. Boze, L. Celine, C. Patrick, R. Fabien, V. Christine, C. Yves, et al., High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*, *Process Biochem.* 36 (2001) 907–913.
- [11] S.K. Burley, G.A. Petsko, Electrostatic interactions aromatic oligopeptides contribute to protein stability, *Trends Biotechnol.* 7 (1989) 354–359.
- [12] M. Cayetano-cruz, A. Itzel, P.D.L. Santos, Y. García-huante, A. Santiago-hernández, P. Pavón-orozco, et al., High level expression of a recombinant xylanase by *Pichia*

pastoris cultured in a bioreactor with methanol as the sole carbon source : Purification and biochemical characterization of the enzyme, *Biochem. Eng. J.* 112 (2016) 161–169.

- [13] J.L. Cereghino, J.M. Cregg, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*., *FEMS Microbiol. Rev.* 24 (2000) 45–66. doi:S0168-6445(99)00029-7 [pii].
- [14] P.J. Chedrese, Recombinant DNA Technology, in: *Reprod. Endocrinol.* (2009): pp. 75–82. doi:10.1007/978-0-387-88186-7.
- [15] V. Chiruvolu, K. Eskridge, J. Cregg, M. Meagher, Effects of Glycerol Concentration and pH on Growth of Recombinant *Pichia pastoris* Yeasf, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 75 (1999).
- [16] E. Čiplys, E. Žitkus, L.I. Gold, J. Daubriac, S.C. Pavlides, P. Højrup, et al., High-level secretion of native recombinant human calreticulin in yeast, *Microb. Cell Fact.* 14 (2015) 165. doi:10.1186/s12934-015-0356-8.
- [17] O. Cos, R. Ramón, J.L. Montesinos, F. Valero, Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review., *Microb. Cell Fact.* 5 (2006) 17. doi:10.1186/1475-2859-5-17.
- [18] M.P. Coughlan, G.P. Hazlewood, beta-1,4-D-xylan-degrading enzyme systems: biochemistry, molecular biology and applications, *Biotechnol. Appl. Biochem.* (1993) 259–289.
- [19] J.M. Cregg, T.S. Vedvick, W.C. Raschke, Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *Nat. Biotechnol.* 11 (1993) 905–910.
- [20] J. Crowley, B. McCarthy, N. Nunn, L. Harvey, B. McNeil, Monitoring a recombinant *Pichia pastoris* fed batch process using Fourier transform mid-infrared spectroscopy (FT-MIRS), *Biotechnol. Lett.* 22 (2000) 1907–1912.
- [21] V. Daggett, Protein Folding – Simulation, *Chem. Rev.* 106 (2006) 1898–1916.
- [22] C.T. Damaso, M.S. Almeida, E. Kurtenbach, O.B. Martins, N. Pereira, C.M.M.C. Andrade, et al., Pptimized expression of a thermostable xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*, 69 (2003) 6064–6072. doi:10.1128/AEM.69.10.6064.
- [23] M. Debnath, G.B. Prasad, P.S. Bisen, Recombinant DNA Pharmaceuticals, in: *Mol. Diagnostics Promises Possibilities*, Springer, 2010: pp. 33–53. doi:10.1007/978-90-481-3261-4.

-
- [24] G. Dobrev, B. Zhekova, G. Delcheva, L. Koleva, N. Tziporkov, I. Pishtiyski, Purification and characterization of endoxylanase Xln-1 from *Aspergillus niger* B03, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25 (2009) 2095–2102. doi:10.1007/s11274-009-0112-5.
- [25] U. Essmann, L. Perera, M.L. Berkowitz, T. Darden, H. Lee, L.G. Pedersen, A smooth particle mesh Ewald method, *J. Chem. Phys.* 103 (1995) 31–34.
- [26] D. Files, M. Ogawa, C.H. Scaman, S.A. Baldwin, A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C, *Enzyme Microb. Technol.* 29 (2001) 335–340.
- [27] R. Flier, Engineering yeast for high level expression, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3 (1992) 486–496.
- [28] L. Fothergill-Gilmore, Recombinant Protein Technology, in: *Protein Biotechnol.*, The Humana Press Inc, (1993): pp. 466–486.
- [29] M. Gaffney, S. Carberry, S. Doyle, R. Murphy, Purification and characterisation of a xylanase from *Thermomyces lanuginosus* and its functional expression by *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb. Technol.* 45 (2009) 348–354. doi:10.1016/j.enzmictec.2009.07.010.
- [30] A. Ghaffar, S. Afzal, K. Zahid, Heterologous expression of a gene for thermostable xylanase from *Chaetomium thermophilum* in *Pichia pastoris* GS115, *Mol. Biol. Rep.* 38 (2011) 3227–3233. doi:10.1007/s11033-010-9996-2.
- [31] N. Guo, J. Zheng, J. Tian, L. Wu, H. Zhou, Characterization and constitutive expression of an acidic mesophilic endo-1, 4- b - D -xylanohydrolase with high thermotolerance and catalytic efficiency in *Pichia pastoris*, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 2095–2103. doi:10.1007/s11274-013-1374-5.
- [32] S. Gupta, B. Bhushan, G.S. Hoondal, Isolation , purification and characterization of xylanase from *Staphylococcus* sp . SG-13 and its application in biobleaching of kraft pulp, *J. Appl. Microbiol.* 88 (2000) 325–334.
- [33] J. He, B. Yu, K. Zhang, X. Ding, D. Chen, Expression of endo-1, 4-beta-xylanase from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris* and functional characterization of the produced enzyme., *BMC Biotechnol.* 9 (2009) 56. doi:10.1186/1472-6750-9-56.
- [34] B. Henrissat, A. Bairocht, New families in the classification of glycosyl hydrolases based amino acid sequence similarities, *Biochem. J.* 788 (1993) 781–788.
- [35] B. Hess, S.- Uppsala, E. Lindahl, GROMACS 4 : Algorithms for highly efficient , load-balanced , and scalable molecular simulation, *J. Chem. Theory Comput.* 4 (2008) 435–447.

-
- [36] K. Hida, J. Hanes, M. Ostermeier, Directed evolution for drug and nucleic acid delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1562–1578. doi:10.1016/j.addr.2007.08.022.
- [37] W.G. Hoover, Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions, *Phys. Rev.* 31 (1985) 1695–1697.
- [38] W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten, VMD : Visual Molecular Dynamics, *J. Mol. Graph.* 14 (1996) 33–38.
- [39] I. Ilizaliturri-Flores, J. Rosas-Trigueros, B. Zamora-López, J. Correa-Basurto, C. Benítez-Cardoza, A. Zamorano, Molecular dynamics of proteins: towards function identification via stability, in: *Mol. Dyn. Theory, Kinet. Implement*, Nova Science Publishers, (2012): pp. 1–24.
- [40] M. Inan, U.V. Chiruvolu, U.K.M. Eskridge, G.P. Vlasuk, S. Brown, M.M.M. U, Optimization of temperature – glycerol – pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb. Technol.* 24 (1999) 438–445.
- [41] M. Inan, M.M. Meagher, Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOXI) promoter of *Pichia pastoris*, *Pap. Biochem. Eng.* 92 (2001) 585–589.
- [42] M. Jahic, A. Veide, T. Charoenrat, T. Teeri, S.-O. Enfors, Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*., *Biotechnol. Prog.* 22 (2006) 1465–1473. doi:10.1021/bp060171t.
- [43] M. Jahic, F. Wallberg, M. Bollok, P. Garcia, S. Enfors, Temperature limited fed-batch technique for control of proteolysis in *Pichia pastoris* bioreactor cultures, *Microb. Cell Fact.* 11 (2003) 1–11.
- [44] T.W. Johannes, H. Zhao, Directed evolution of enzymes and biosynthetic pathways, *Curr. Opin. Microbiol.* 9 (2006) 261–267. doi:10.1016/j.mib.2006.03.003.
- [45] W.L. Jorgensen, J. Tirado-rives, The OPLS potential functions for proteins. Energy minimizations for crystal of cyclic peptides and crambin. Of t h e american chemical, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 1657–1666.
- [46] W. Kabsch, C. Sander, Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features, *Biopolymers.* 22 (1983) 2577–2637.
- [47] J. Kemmink, T.E. Creighton, The physical properties of local interactions of tyrosine residues in peptides and unfolded proteins, *J. Mol. Biol.* (1995) 251–260.

-
- [48] N. Kulkarni, A. Shendye, M. Rao, Molecular and biotechnological aspects of xylanases, *FEMS Microbiol. Rev.* 23 (1999) 411-456.
- [49] A.L. Kurtzman, S. Govindarajan, K. Vahle, J.T. Jones, V. Heinrichs, P.A. Patten, Advances in directed protein evolution by recursive genetic recombination: applications to therapeutic proteins, *Curr. Opin. Biotechnol.* 12 (2001) 361–370.
- [50] J.W. Lee, J.Y. Park, M. Kwon, I.G. Choi, Purification and characterization of a thermostable xylanase from the brown-rot fungus *Laetiporus sulphureus*, *J. Biosci. Bioeng.* 107 (2009) 33–37. doi:10.1016/j.jbiosc.2008.09.006.
- [51] L. Leggio, J. Jenkins, G. Harris, R. Pickersgill, X-ray crystallographic study of xylopentaose binding to *Pseudomonas fluorescens* xylanase A, *Proteins.* 41 (2000) 362–73.
- [52] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, L. Farr, R. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* 193 (1951) 265–275. doi:10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- [53] A. Mellitzer, R. Weis, A. Glieder, K. Flicker, Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Fact.* 11 (2012) 61. doi:10.1186/1475-2859-11-61.
- [54] E.A. Meyer, R.K. Castellano, F. Diederich, Interactions with arenes interactions with aromatic rings in chemical and biological recognition, *Angew. Chemie.* 42 (2003) 1210–1250.
- [55] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31 (1959) 426–428.
- [56] S. Nosé, A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble, *Mol. Phys.* 52 (1984) 255–268.
- [57] S. Nosé, M.L. Klein, Constant pressure molecular dynamics for molecular systems, *Mol. Phys.* 50 (1983) 1055–1076.
- [58] M. Parrinello, A. Rahman, Polymorphic transitions in single crystals: A new molecular dynamics method, *J. Appl. Phys.* 52 (1981) 7182–7190. doi:10.1063/1.328693.
- [59] J. Pastor, O. Gallardo, J. Sanz-aparicio, P. Diaz, Xylanases: molecular properties and applications, Springer (Ed.), *Ind. Enzym.*, (2007): pp. 65–82.
- [60] B.T. Porebski, A.A. Nickson, D.E. Hoke, M.R. Hunter, L. Zhu, S. McGowan, et al., Structural and dynamic properties that govern the stability of an engineered fibronectin type III domain, *Protein Eng. Des. Sel.* 28 (2015) 67–78. doi:10.1093/protein/gzv002.

-
- [61] P.K. Raghav, Y.K. Verma, G.U. Gangenahalli, Molecular dynamics simulations of the Bcl-2 protein to predict the structure of its unordered flexible loop domain, *J. Mol. Model.* 2 (2012) 1885–1906. doi:10.1007/s00894-011-1201-6.
- [62] C. Roodveldt, A. Aharoni, D.S. Tawfik, Directed evolution of proteins for heterologous expression and stability, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15 (2005) 50–56. doi:10.1016/j.sbi.2005.01.001.
- [63] E. Sabini, G. Sulzenbacher, M. Dauter, I. Dauter, P.L. Jmgensen, M. Scholein, et al., Catalysis and specificity in enzymatic glycoside hydrolysis : a B conformation for the glycosyl-enzyme intermediate revealed by the structure of the *Bacillus agaradhaerens* family 11 xylanase, *Chem. Biol.* 6 (1999) 483–492.
- [64] J. Sambrook, *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2001).
- [65] L. Serrano, M. Bycroft, A.R. Fersht, Aromatic-aromatic interactions and protein stability cycles investigation by double-mutant, *J. Mol. Biol.* 218 (1991) 465–475.
- [66] J. Singh, J.M. Thornton, The interaction between phenylalanine rings in proteins, *FEBS Lett.* 191 (1985) 1–6.
- [67] K. Sinma, K. Khucharoenphaisan, V. Kitpreechavanich, S. Tokuyama, Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Saccharopolyspora pathumthaniensis* S582 isolated from the gut of a termite, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75 (2011) 1957–1963. doi:10.1271/bbb.110353.
- [68] L. Song, B. Siguiier, C. Dumon, S. Bozonnet, M.J.O. Donohue, Engineering better biomass-degrading ability into a GH11 xylanase using a directed evolution strategy, *Biotechnol. Biofuels.* 5 (2012) 1–16.
- [69] J. Stulke, W. Hillen, Regulation of carbon catabolism in bacillus species, *Annu. Rev. Microbiol.* 54 (2000) 849–80.
- [70] M. Sudo, M. Sakka, T. Kimura, K. Ratanakhanokchai, K. Sakka, Characterization of *Paenibacillus curdlanolyticus* intracellular xylanase Xyn10B encoded by the xyn10B gene, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 2358–2360. doi:10.1271/bbb.100555.
- [71] V.I. Tishkov, V.O. Popov, Protein engineering of formate dehydrogenase, *Biomol. Eng.* 23 (2006) 89–110. doi:10.1016/j.bioeng.2006.02.003.
- [72] H. Verli, A. Calazans, R. Brindeiro, A. Tanuri, J.A. Guimara, Molecular dynamics analysis of HIV-1 matrix protein : Clarifying differences between crystallographic and solution structures, *J. Mol. Graph. Model.* 26 (2007) 62–68. doi:10.1016/j.jmngm.2006.09.009.

-
- [73] R. Verma, E. Boleti, A.J.T. George, Antibody engineering : Comparison of bacterial , yeast , insect and mammalian expression systems, *J. Immunol. Methods.* (1998) 165–181.
- [74] L. Viikari, A. Kantelinen, J. Sundquist, M. Linko, Xylanases in bleaching : From an idea to the industry, *FEMS Microbiol. Rev.* 13 (1994) 335–350.
- [75] L.W. Wagner, N.H. Matheson, R.F. Heisey, K. Schneider, Use of a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris*, *Biotechnol. Tech.* 11 (1997) 791–795.
- [76] T. Willemsen, U.B. Hagemann, E.M. Jouaux, S.C. Stebel, J.M. Mason, K.M. Müller, et al., Protein Engineering, in: *Mol. Biomethods Handb.*, Humana Press Inc., (2008): pp. 587–629.
- [77] K.K. Wong, L.U. Tan, J.N. Saddler, Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications., *Microbiol. Rev.* 52 (1988) 305–317.
- [78] H.M. Yang, B. Yao, K. Meng, Y.R. Wang, Y.G. Bai, N.F. Wu, Introduction of a disulfide bridge enhances the thermostability of a *Streptomyces olivaceoviridis* xylanase mutant, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 34 (2007) 213–218. doi:10.1007/s10295-006-0188-y.
- [79] J. Yin, G. Li, X. Ren, G. Herrler, Select what you need : A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes, *J. Biotechnol.* 127 (2007) 335–347. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.07.012.
- [80] W. Zhang, M.M. Meagher, Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *Pap. Biochem. Eng.* 5 (2000) 275–287.
- [81] X. Zhang, H. Ruan, L. Mu, G. He, X. Tang, Q. Chen, Enhancement of the thermostability of β -1,3-1,4-glucanase by directed evolution, *J. Zhejiang Univ.* 7 (2006) 1948–1955. doi:10.1631/jzus.2006.A1948.
- [82] Y. Zhang, I-TASSER server for protein 3D structure prediction, *BMC Bioinformatics.* 8 (2008) 1–8. doi:10.1186/1471-2105-9-40.
- [83] M.J. Zoller, New recombinant DNA methodology for protein engineering, *Curr. Opin. Biotechnol.* 3 (1992) 348–354.

ANEXOS

1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE LOWRY

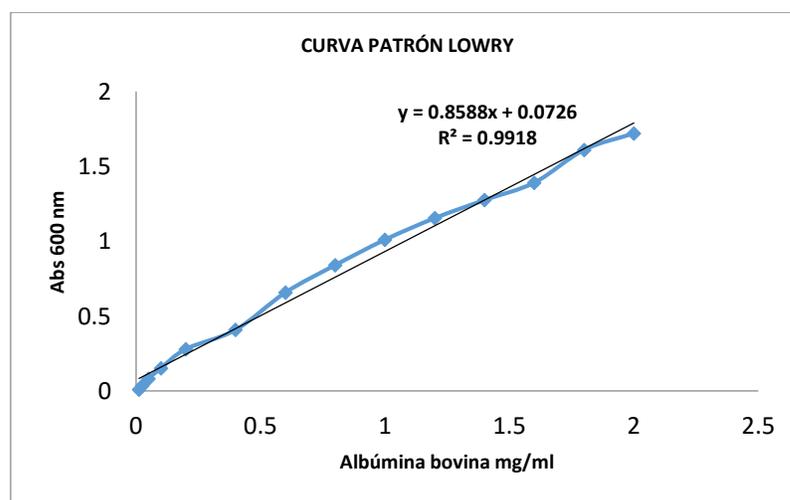
Para la cuantificación de la proteína, a 200 µl de muestra se le adicionaron 2.5 mL de reactivo C, se agitó y se esperaron cinco minutos. Posteriormente, se adicionaron 0.25 mL de reactivo D, se agitó y se dejó reposar 30 min. Se leyó la Absorbancia a una longitud de onda de 600 nm. Para saber la concentración de proteína en la muestra se construyó una curva estándar con 12.5, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 y 2000 µg/mL de albúmina sérica bovina. Las determinaciones de proteína se hicieron por triplicado.

Reactivo A: 0.5 g de Sulfato cúprico, 1 g de Citrato de sodio y 100 mL de agua.

Reactivo B: 20 g de Carbonato de sodio, 4 g de Hidróxido de sodio y 1000 mL de agua.

Reactivo C: 50 mL de Reactivo B y 1 mL de Reactivo A

Reactivo D: Reactivo de Folin-Ciocalteu y Agua 1:1



2. CEPAS

Pichia pastoris X-33: (fenotipo silvestre, mut⁺, esta cepa es isogénica a la cepa auxotrófica para histidina GS115, Invitrogen, en la cual se revirtió su auxotrofia, ref. *Pichia protocols*).

E. coli DH5α: F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻m_K⁺), λ⁻.

E. coli BL21 (DE3): fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5.

3. MEDIOS

Medio Luria-Bertani (LB)

10 g de NaCl

10 g de peptona

5 g de extracto de levadura

Adicionar agua desionizada para un volumen final de 1 L.

Esterilizar en autoclave por 15 min.

Agar LB

Medio LB

Agar, 20 g/L

Medio YPD/agar YPD

10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua

Adicionar 20 g de agar para cajas de medio YPD

Esterilizar en autoclave por 15 min

Adicionar 100 mL de 10X D

10X D (20% de glucosa)

200 g de glucosa en 1 L de agua. Esterilizar en autoclave por 15 min.

Medio 2TY

5 g de NaCl
16 g de peptona
10 g de extracto de levadura
Adicionar agua desionizada para un volumen final de 1 L.
Esterilizar en autoclave por 15 min.

Agar 2TY

Medio 2TY
Agar, 20 g/L

Medio BMMY

En 700 mL de agua disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona
Esterilizar en autoclave por 15 min
Adicionar 100 mL de buffer fosfato de potasio 1 M, pH 6.0, 100 mL de 10X YNB, 2 mL 500X B y 100 mL de 10X M

10X YNB (13.4 base nitrogenada con sulfato de amonio)

Disolver 134 g de base nitrogenada con sulfato de amonio en 1 L de agua
Esterilizar por filtración

500X B (0.02% Biotina)

Disolver 20 mg de biotina en 1 L de agua
Esterilizar por filtración

10X M (5% de metanol)

Mezcla 5 mL de metanol en 95 mL
Esterilizar por filtración

Medio MSM

4 g/L de KH_2PO_4 ; 4 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.38 g/L de CaCl_2 ; 18.2 g/L de K_2SO_4 ; 9.4 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1 mL/L de PTM1; 40 g/L de glucosa o 2.5 g/L de metanol.

Solución PTM1

5.99 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 8 mL 10×NaI solución, 3 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.20 g/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 20.04 g/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 65.05 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 800 µL 100× H_3BO_3 solución concentrada, 19.2 mL 96.2% H_2SO_4 y 0.40 g/L de biotina

4. REGULADORES

Buffer TBE

Para un litro de solución stock 5X,
54 g de Tris base,
27.5 g de ácido bórico y
20 mL de EDTA 0.5 M,
pH 8.0 ajustado con HCl

Buffer de muestra para SDS-PAGE

Tris-HCl 0.5M, pH 6.8
Glicerol 30 %
SDS 2 %
Azul de bromofenol, 0.01%

Buffer de corrida para SDS-PAGE

Tris, 25 mM
Glicina 192 mM
SDS, 1 %
PH 8.3

Buffer citratos-fosfatos 50 mM

Ácido cítrico 0.1 M
Fosfato de sodio Monobásico 0.1 M
pH de 3.5 a 7.0

Buffer fosfatos 100 mM

NaH_2PO_4 0.2 M
 Na_2HPO_4 0.2 M
pH de 7.0 a 8.0

Buffer Tris-HCl

50 mM Tris-HCl
25 mM KCl
0.1 mM PMSF, pH 7.5

Buffer L-Histidina

50 mM L-Histidina
25 mM NaCl
0.1 mM PMSF, pH 6.0

Buffer de elución de DNA (EB)

Tris-HCl 10 mM, pH 8.0

EDTA 1 mM