



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



**CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA β -XILOSIDASA RECOMBINANTE XynB2 BAJO
CONDICIONES DE MÁXIMA ACTIVIDAD**

Autor: Valentina García

Tutores: Dr. Jeff Wilkesman

Dra. Lellys Contreras

Bárbula, mayo 2013



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS
Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA



CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA β -XILOSIDASA RECOMBINANTE XynB2 BAJO CONDICIONES DE MÁXIMA ACTIVIDAD

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Carabobo

como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Química.

Autor: Valentina García

Tutores: Dr. Jeff Wilkesman

Dra. Lellys Contreras

Bárbula, mayo 2013

Universidad de Carabobo
Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología



Departamento de Química
Valencia - Venezuela

CERTIFICADO DE APROBACIÓN DEL
TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

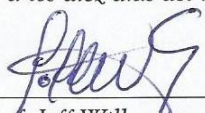
Los abajo firmantes, Miembros del Jurado designado por el Consejo de Departamento del Departamento de Química de la Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, hacemos constar que hemos revisado, evaluado y aprobado el siguiente Trabajo Especial de Grado:

***“CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA B-XILOSIDASA RECOMBINANTE
XynB2 EN CONDICIONES DE MÁXIMA ACTIVIDAD”***

Presentado por el Bachiller: Valentina García

C.I.: 19.000.472

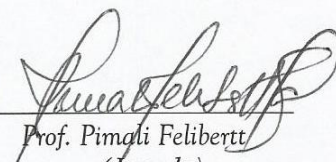
En Valencia, a los diez días del mes de abril del 2013.


Prof. Jeff Wilkesman
(Tutor)


Mariela Contreras
(Tutor)


Prof. Arnaldo Armado
(Jurado)




Prof. Pimeli Feliberti
(Jurado)

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC), según oficio N° CDCH-_____2013 de fecha mayo, 2013

Dedicatoria

*A mis padres, por ser la columna vertebral que me ha sostenido
durante toda mi trayectoria académica.*

Agradecimientos

A mis padres, piedras angulares durante mi carrera.

A mis tutores, sin cuya guía nada habría sido posible.

A los valiosos asistentes de laboratorio y compañeros tesisistas durante el proceso, gracias por ser generosos con sus conocimientos.

A mis amigos y seres queridos cercanos que me dieron aliento ante las dificultades.

A mis jurados, cuya participación ha sido invaluable en el aprendizaje.

¡Muchísimas gracias!

Resumen

CARACTERIZACIÓN ENZIMÁTICA DE LA β -XILOSIDASA RECOMBINANTE XynB2 BAJO CONDICIONES DE MÁXIMA ACTIVIDAD

Valentina García

Departamento de Química, FACYT, Universidad de Carabobo

La industria biotecnológica se ha expandido enormemente en los últimos años, y un área de especial interés la constituye la investigación de enzimas provenientes de organismos termófilos, debido a sus altas capacidades catalíticas en condiciones extremas. XynB2 es una β -xilosidasa proveniente del *Geobacillus stearothermophilus* que presenta atractivas aplicaciones catalíticas siendo hasta ahora la única enzima de este tipo con actividad de transglicosidasa. Aunque ha sido ampliamente caracterizada biofísica y bioquímicamente, no existen estudios detallados sobre la cinética de la hidrólisis de diversos sustratos aril- β -D-xilósidos en las condiciones de mayor actividad, cuyas características son de gran interés para una industria biotecnológica en crecimiento. Debido a ello el presente trabajo buscó caracterizar las propiedades enzimáticas en las condiciones de pH y temperatura donde exista mayor actividad. Primeramente se llevó a cabo la sobreexpresión de la enzima en *E. coli* C43 empleando el plásmido recombinante pJAVI91, el cual codifica la proteína con una cola de histidina (His-tag) en el codón de terminación, que facilita la purificación mediante cromatografía de afinidad con columna de Ni^{2+} . Posteriormente se empleó una cromatografía de exclusión molecular para eliminar trazas de otras proteínas presentes. Una vez purificada XynB2, se llevaron a cabo diversos ensayos enzimáticos para determinar la temperatura y pH de máxima actividad utilizando *p*-nitrofenil xilanopiranosido, *o*-nitrofenil xilanopiranosido y 4-metilumbeliferil xilopiranosido como sustratos. Se calcularon los parámetros cinéticos K_M , $V_{máx}$, k_{cat} y k_{cat}/K_M a las condiciones de máxima actividad, y se determinó que el sustrato de mayor afinidad resultó ser 4-metilumbeliferil xilopiranosido. También se evaluó la estabilidad térmica de la enzima y el $t_{1/2}$ empleando los diversos sustratos. Finalmente se estudió el efecto de la xilosa sobre la reacción de hidrólisis del *p*-nitrofenil xilanopiranosido, reportándose por primera vez una inhibición, la cual resultó ser de tipo competitiva con una K_i de 39 ± 12 mM.

Palabras clave: aril- β -D-xilósidos, catálisis enzimática, GH52, inhibición por sustrato, xilosidasa.

Abstract

ENZYMATIC CHARACTERIZATION OF THE RECOMBINANT B-XYLOSIDASE XynB2 UNDER MAXIMUM ACTIVITY CONDITIONS

Valentina García

Department of Chemistry, FACYT, University of Carabobo

The horizons of the biotechnology industry have expanded greatly in recent years and an area of particular interest is the investigation of enzymes from thermophilic organisms because of their high catalytic capabilities in extreme conditions. XynB2, a β -xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* and to date the only enzyme of this type displaying transglycosidase activity, offers attractive catalytic applications. Although it has been widely characterized biophysically and biochemically, there are no detailed studies on the kinetics of the hydrolysis of various aryl- β -D-xyloside substrates under most active conditions. This would be of great interest to the flourishing biotechnology industry. The objective of the present study is to characterize these enzymatic properties under maximal activity conditions (pH and temperature). The enzyme was expressed in *E. coli* C43 using the recombinant plasmid pJAVI91 which encodes the protein with a histidine tail (His-tag) at the stop codon facilitating purification using Ni affinity chromatography followed by molecular size exclusion chromatography to remove traces of other proteins. Enzymatic assays were carried out on the purified XynB2 to determine the temperature and pH of maximum activity using *p*-nitrophenyl xylanopyranoside, *o*-nitrophenyl xylanopyranoside and 4-methylumbelliferyl xylopyranoside as substrates. Calculation of K_M , V_{max} , k_{cat} and k_{cat}/K_M under maximum activity conditions indicated the preferred substrate to be 4-methylumbelliferyl xylopyranoside. The thermal stability of XynB2 was evaluated and its $t_{1/2}$ using the three substrates determined. Finally, the effect of xylose on the hydrolysis reaction of *p*-nitrophenyl xylanopyranoside was studied. We report for the first time inhibition in a competitive manner with a K_i of 39 ± 12 mM.

Keywords: aryl- β -D-xylosides, enzyme catalysis, GH52, substrate inhibition, xylosidase.

Índice

Capítulo I	19
1.-Planteamiento del problema	19
1.1-Introducción	19
1.2-Justificación	21
1.3-Objetivo general	22
1.4-Objetivos específicos	22
Capítulo 2	23
2.-Marco teórico	23
2.1-Antecedentes y características de XynB2	23
2.2-Bases teóricas	27
2.2.1-Clonación de ADN mediante métodos de ADN recombinante empleando vectores plasmídicos	27
2.2.2-Sobre-producción de proteínas recombinantes	28
2.2.3-Purificación de proteínas	29
2.2.4-Characterización de las proteínas mediante electroforesis	30
2.2.5-La naturaleza química de las enzimas	30
2.2.6-Estabilidad de las proteínas	31
2.2.7-La temperatura como agente desnaturalizante	32
2.2.8-Actividad enzimática	33
2.2.9-Factores que afectan la actividad enzimática	33
2.2.10-Cinética química	34
2.2.11-Orden de reacción	35

2.2.12-Tiempo de vida media o semivida ($t_{1/2}$).....	35
2.2.13-Catálisis enzimática	36
2.2.14- Inhibición enzimática	37
2.2.15- Espectroscopía de fluorescencia y UV-visible	40
Capítulo 3	42
3.- Materiales y métodos	42
3.1- Reactivos, materiales y equipos utilizados	42
3.2-Expresión de XynB2	44
3.3-Lisis celular de <i>E.coli</i>	45
3.4-Purificación de XynB2	45
3.5-SDS-PAGE	46
3.7-Actividad enzimática de XynB2	47
3.8- Determinación de los parámetros cinéticos, k_m y $V_{m\acute{a}x}$	48
3.9-Determinación del perfil de estabilidad térmico de XynB2 y la cinética de inactivación térmica.	49
3.10-Efecto de la xilosa como inhibidor enzimático	49
Capítulo 4	51
Resultados y discusión	51
4.1-Sobre-expresión y purificación de XynB2	51
4.2- Efecto del sustrato y del pH sobre la actividad de XynB2	55
4.3- Efecto del sustrato y de la temperatura en la actividad de XynB2,	58
4.4-Evaluación de los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M	61
4.5-Perfil de estabilidad térmico de XynB2 para cada sustrato	68

4.6-Cinética de inactivación térmica de XynB2 para cada sustrato.....	71
4.7-Estudios de inhibición por xilosa.....	74
Conclusiones	78
Recomendaciones	79
Bibliografía	80

Índice de Figuras

FIGURA 1: MECANISMO PROPUESTO PARA LA HIDRÓLISIS DEL ENLACE GLUCOSÍDICO CON RETENCIÓN DE LA CONFIGURACIÓN DEL CARBONO ANOMÉRICO	26
FIGURA 2. PROCESO DE CLONACIÓN EMPLEANDO UN VECTOR PLÁSMIDO	28
FIGURA 3. EFECTOS DE LA INHIBICIÓN COMPETITIVA SOBRE LA CINÉTICA ENZIMÁTICA. (A) REPRESENTACIÓN DE LINEWEAVER-BURK DE UNA REACCIÓN ENZIMÁTICA EMPLEANDO DISTINTAS CONCENTRACIONES DEL INHIBIDOR. (B) REPRESENTACIÓN GRÁFICA UTILIZADA PARA LA DETERMINACIÓN DE K_M Y K_I	40
FIGURA 4. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE (10%).A: MARCADOR DE PESO MOLECULAR. B: TIEMPO CERO DE CRECIMIENTO BACTERIANO. C: TIEMPO DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE UNA HORA Y VEINTE MINUTOS. D: TIEMPO DE CRECIMIENTO BACTERIANO DE TRES HORAS Y TREINTA MINUTOS. E: LISADO CELULAR DEL CULTIVO BACTERIANO. F: FRACCIÓN NO UNIDA A LA RESINA DE Ni^{2+} . G: FRACCIÓN CON LA PROTEÍNA XYNB2 ELUIDA DE LA COLUMNA CON Ni^{2+} UNIDO COVALENTEMENTE.....	51
FIGURA 5. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA SDS-PAGE (10%) EN CONDICIONES DESNATURALIZANTES CON EL ANÁLISIS DE LAS FRACCIONES DE S-300. (A) MARCADOR DE PESO MOLECULAR PROMEGA V849A. (B) FRACCIÓN 50, (C) FRACCIÓN 53, (D) FRACCIÓN 55, (E) FRACCIÓN 58, (F) FRACCIÓN 60.	53
FIGURA 6. (A)CROMATOGRAMA DE LA PURIFICACIÓN DE XYNB2 POR LA SEPHADEX (S-300) DONDE SE REFLEJA LA ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES ELUIDAS EN FUNCIÓN DEL TIEMPO. SE RECOLECTARON FRACCIONES DE 1ML/MIN. (B) FRACCIONES CERCANAS AL PICO DE MÁXIMA ABSORBANCIA.	54
FIGURA 7: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE XYNB2 EN FUNCIÓN DEL PH, EMPLEANDO P-NPX, O-NPX Y 4MUX COMO SUSTRATOS.....	56
FIGURA 8: REACCIONES DE HIDRÓLISIS PARA CADA SUSTRATO ARIL-B-D-XILÓSIDOS. (A) REACCIÓN DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR XYNB2 PARA EL P-NPX. (B) REACCIÓN DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR XYNB2 PARA EL O-NPX. (C) REACCIÓN DE HIDRÓLISIS CATALIZADA POR XYNB2 PARA EL 4MUX	57
FIGURA 9: ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE XYNB2 EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN, EMPLEANDO LOS ARIL-B-D-XILOSIDOS P-NPX, O-NPX Y 4MUX COMO SUSTRATOS.	59
FIGURA 10: DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE P-NPX CATALIZADA POR XYNB2 EMPLEANDO EL AJUSTE HIPERBÓLICO DE (A)MICHAELIS-MENTEN Y LINEALES DE (B)LINWEAVER-BURK, (C)EADIE-HOFSTEE Y (D)HANES-WOLF.	63
FIGURA 11: AJUSTE DE BOLTZMANN PARA EL ESTUDIO DEL PERFIL DE ESTABILIDAD TÉRMICO DE XYNB2, EMPLEANDO (A) 1 mM P NPX, (B) 1,25 mM O-NPX o (C) 0,075 mM 4MUX COMO SUSTRATO.	70
FIGURA 12: ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE INACTIVACIÓN TÉRMICA DE XYNB2 EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA DE REACCIÓN, EMPLEANDO P-NPX, O-NPX Y 4MUX COMO SUSTRATOS.	72

FIGURA 13: AJUSTE LINEAL DEL LN(%ACTIVIDAD ENZIMÁTICA RELATIVA) EN FUNCIÓN DEL TIEMPO EMPLEANDO (A) P-NPX, (B) O-NPX Y (C) 4MUX COMO SUSTRATO.	73
FIGURA 14: REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DE XILOOLIGOSACÁRIDOS A FRAGMENTOS DE XILOSA, CATALIZADO POR B-XILOSIDASAS (54).	75
FIGURA 15: EFECTOS DE LA INHIBICIÓN COMPETITIVA POR PRODUCTO FINAL SOBRE LA HIDRÓLISIS DE P-NPX, EMPLEANDO DIVERSAS CONCENTRACIONES DE XILOSA..	77

Índice de Tablas

TABLA 1. REACTIVOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS Y SU CORRESPONDIENTE FABRICANTE.	42
TABLA 2. MATERIALES Y EQUIPOS EMPLEADOS DURANTE EL DESARROLLO DE LOS EXPERIMENTOS Y SU CORRESPONDIENTE FABRICANTE.	43
TABLA 3. PURIFICACIÓN DE XYNB2 DEL EXTRACTO DE <i>E. COLI</i> C43, EMPLEANDO EL PLÁSMIDO PJAVI91.....	55
TABLA 4. PH DE MÁXIMA ACTIVIDAD DE XYNB2 EMPLEANDO LOS DISTINTOS PARA O-NPX, P-NPX Y 4MUX.	56
TABLA 5. VALORES DE PH DE MÁXIMA ACTIVIDAD REPORTADOS PARA DIVERSAS XYNB2 PROVENIENTES DE DISTINTOS ORGANISMOS TERMÓFILOS	58
TABLA 6. TEMPERATURA DE MÁXIMA ACTIVIDAD REPORTADA PARA LOS DISTINTOS SUSTRATOS ARIL-B-D-XILOSIDOS O-NPX, P-NPX Y 4MUX Y TEMPERATURA SELECCIONADA PARA LOS ENSAYOS ENZIMÁTICOS.....	60
TABLA 7. VALORES DE TEMPERATURA DE MÁXIMA ACTIVIDAD REPORTADOS PARA DIVERSAS XYNB2 PROVENIENTES DE DISTINTOS ORGANISMOS TERMÓFILOS	60
TABLA 8. COMPARACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS REACCIONES DE HIDRÓLISIS DE ARIL-B-D-XILÓSIDOS CALCULADOS MEDIANTE EL AJUSTE HIPERBÓLICO DE MICHAELIS-MENTES, Y LINEALIZACIONES DE EADIE-HOFSTEE, LINEWEAVER-BURK Y HANES-WOLF.	65
TABLA 9: ERRORES ABSOLUTOS Y RELATIVOS DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE LA HIDRÓLISIS DE LOS ARIL-B-D-XILÓSIDOS CALCULADOS MEDIANTE EL AJUSTE HIPERBÓLICO DE MICHAELIS-MENTES, Y LINEALIZACIONES DE EADIE-HOFSTEE, LINEWEAVER-BURK Y HANES-WOLF.	66
TABLA 10: PARÁMETROS CINÉTICOS PARA LA HIDRÓLISIS DE LOS DISTINTOS ARIL-B-D-XILOSIDOS POR XYNB2 A 40 °C REPORTADOS POR BRAVMAN Y COL.	67
TABLA 11: TEMPERATURA MEDIA DE DESNATURALIZACIÓN (T _M) DE XYNB2 PARA CADA UNO DE LOS DISTINTOS SUSTRATOS ARIL-B- D-XILÓSIDOS EMPLEADOS.....	69
TABLA 12: TIEMPO DE VIDA MEDIO (T _{1/2}) DE XYNB2 Y ORDEN DE REACCIÓN PARA LA HIDRÓLISIS CATALIZADA DE CADA UNO DE LOS SUSTRATOS ARIL-B-D-XILÓSIDOS.	72

TABLA 13: VALORES DE K_M ^{APARENTE} OBTENIDOS CON DISTINTAS CONCENTRACIONES DE XILOSA Y K_I RESPECTIVO PARA EL INHIBIDOR.

..... 76

Abreviaturas

- 4MUX:** 4-metilumbeliferil xilopiranosido
- BME:** β -mercaptoetanol
- CD:** Dicroísmo circular
- E. coli* C43:** *Escherichia coli* Cepa 43
- FTIR:** Infrarrojo por transformada de Fourier
- GH52:** Familia 52 de las glicosil hidrolasas
- IPTG:** Isopropil tiogalactósido
- LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani
- o*-NPX:** *o*-nitrofenil xilopiranosido
- p*-NPX:** *p*-nitrofenil xilopiranosido
- PMSF:** Fenilmetilsulfonilfluoruro
- SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- Tris:** Tris(hidroximetil)aminometano
- XynB2:** β -xilosidasa del *Geobacillus stearothermophilus*

Capítulo I

1.-Planteamiento del problema

1.1-Introducción

La lignocelulosa representa a una de las biomasas más ubicuas y de mayor aplicación tanto en la producción de combustibles alternativos como en la generación de compuestos químicos (1). Siendo el principal componente estructural de las paredes celulares de las plantas, la lignocelulosa está compuesta primordialmente por lignina, celulosa y hemicelulosa (2). Se prevé que los componentes degradables, como la celulosa y la hemicelulosa se conviertan en sustratos significativos para la bioconversión a etanol, otros alcoholes y moléculas de alto peso molecular (3).

Dentro de los constituyentes de la pared celular, el xilano es uno de los polímeros más abundantes. Se conoce además que muchos microorganismos tienen la capacidad de expresar enzimas que hidrolizan el xilano, (llamadas xilanasas) a carbohidratos más simples. El empleo de catalizadores enzimáticos se ha investigado extensamente para una gran variedad de importantes procesos químicos, desde la síntesis de fármacos y alimentos hasta en reacciones de biorremediación (4,5).

Entre los catalizadores las enzimas presentan una gran actividad catalítica, muestran una gran especificidad de sustrato y por lo general son muy activas a temperatura ambiente y presión atmosférica, sin embargo debido a que han evolucionado naturalmente en organismos vivos, cuyas condiciones de reacción difieren significativamente de las necesarias para llevar a cabo procesos industriales, a menudo su empleo es limitado (4).

Para llevar a cabo la purificación de algunas enzimas recombinantes, que provienen de organismos termófilos se aplica calor, lo cual, a pesar de las propiedades termófilas de la enzima, disminuyen notablemente su vida y estabilidad (6), en comparación con técnicas alternativas como la adición de una cola de histidina, las cuales al permitir purificar la enzima a bajas temperaturas redundan en que la enzima pura retenga toda su actividad (7).

La actividad enzimática de la XynB2 ha sido muy bien caracterizada (7,8,9,10), sin embargo todos los experimentos se han hecho a 40 °C y no a las temperaturas de máxima actividad (70-75 °C). En ese sentido este trabajo se enfocó en caracterizar la actividad enzimática de XynB2 sobre los tres sustratos tipo aril- β -D-xilósidos preferidos. Para cada sustrato se determinaron los perfiles de temperatura y pH de XynB2, la estabilidad térmica de XynB2 y los parámetros cinéticos de K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M de XynB2 a las condiciones de máxima actividad. Adicionalmente se estudió el efecto inhibitorio de la D-Xilosa sobre la actividad de XynB2.

Los datos obtenidos en este Trabajo Especial de Grado junto a lo reportado previamente permitió caracterizar aún más a XynB2 desde el punto de vista bioquímico, con miras a desarrollar en un futuro cercano estudios de modificación e inmovilización de XynB2, lo cual es de gran interés para el sector industrial teniendo en cuenta que XynB2 fue la primera β -xilosidasa reportada con función de glicosintetasa (11).

1.2-Justificación

La biotecnología es un área que ha crecido rápidamente en los últimos años, la secuenciación genética de una gran diversidad de especies ha generado nuevas potenciales aplicaciones en casi todos los campos de la industria química (6,12,13). El aprovechamiento completo de catalizadores enzimáticos es una de las grandes metas de la biotecnología aplicada a la producción, la gran estereoselectividad y regioespecificidad los vuelven extremadamente valiosos en la química fina, donde ambas cualidades son de vital importancia (14,15).

Emplear catalizadores biológicos no sólo aminora costos de manufactura al disminuir los tiempos de producción, sino que supone una alternativa más ecológica, ya que el catalizador no es un agente contaminante y es totalmente biodegradable (6). Para poder determinar la efectividad de un catalizador es necesario realizar un estudio previo, no sólo de sus parámetros cinéticos comunes sino de sus características operativas, que revelen la eficiencia del catalizador en el tiempo y en condiciones similares a las encontradas en un reactor industrial.

La necesidad de crear procesos cada vez más eficientes y amigables es lo que promueve la búsqueda de nuevos catalizadores más específicos, rápidos y estables. Las xilanasas son de gran interés en la industria agrícola, donde se emplean para maximizar la extracción de nutrientes de los alimentos (16); en la industria papelera para el blanqueamiento de la pulpa (17); en la producción de combustibles alternativos para llevar a cabo la degradación de la biomasa (2), y en la industria alimenticia, se emplean para clarificar jugos (18).

1.3-Objetivo general

Caracterizar enzimáticamente la β -xilosidasa recombinante XynB2 bajo condiciones de máxima actividad.

1.4-Objetivos específicos

- ✓ Sobre-expresar XynB2 en células de *Escherichia coli*.
- ✓ Purificar XynB2 por cromatografía de exclusión molecular y de afinidad.
- ✓ Determinar la temperatura y pH de máxima actividad mediante la cuantificación de la actividad enzimática de XynB2 sobre tres sustratos tipo aril- β -D-xilósidos.
- ✓ Cuantificar la actividad enzimática de XynB2 sobre tres sustratos aril- β -D-xilósidos a la temperatura y pH de máxima actividad.
- ✓ Estudiar la cinética de inactivación térmica de XynB2 sobre los tres aril- β -D-xilósidos empleados como sustratos.
- ✓ Evaluar el perfil de estabilidad térmica de XynB2 sobre los tres aril- β -D-xilósidos empleados como sustratos.
- ✓ Estudiar el efecto de la xilosa sobre la actividad enzimática sobre el sustrato preferido.

Capítulo 2

2.-Marco teórico

2.1-Antecedentes y características de XynB2

La compleja composición y estructura de la pared celular de las plantas, formada por celulosa (40-45%), hemicelulosa (30-35%) y lignina (20-23%) (19), constituye una barrera para la degradación enzimática. Sin embargo, existen bacterias capaces de producir complejos enzimáticos altamente eficientes para dicho propósito, que contienen numerosas celulasas y hemicelulasas. En la pared celular de las plantas las fibrillas de celulosas se encuentran atadas por ramificaciones de hemicelulosa (20), un polisacárido de bajo peso molecular.

La hemicelulosa es un polímero heterogéneo formado por pentosas (xilosa, arabinosa), hexosas (manosa, glucosa, galactosa), y azúcares ácidos. A diferencia de la celulosa, la hemicelulosa no es químicamente homogénea (21).

El xilano es el mayor componente de las hemicelulosas y el segundo polímero más abundante en la Tierra después de la celulosa. Está formado por una cadena principal de residuos de β -1,4-D-xilopiranosas con sustituciones frecuentes de acetil, arabinosil y glucopiranosil (22) y se encuentra unido a ligninas, celulosas y otros polímeros mediante enlaces covalentes y no-covalentes (18). Las principales enzimas encargadas de la degradación del xilano son la xilanasa (1,4- β -D-xilano xilano hidrolasa; EC 3.2.1.8), que hidroliza los enlaces β -1,4-xilosídicos internos del esqueleto del xilano; y la β -xilosidasa

(1,4- β -D-xilano xilohidrolasa; EC 3.2.1.37), la cual cataliza la hidrólisis de 1,4- β -D-xilanos, removiendo residuos de D-xilosa del extremo no reductor (23).

Las xilanasas presentan enormes posibilidades en la síntesis química para numerosas áreas, que incluyen la industria alimenticia, avícola, papelería, y en la producción de biocombustibles (2,16,17,18), sin embargo, actualmente las aplicaciones industriales de la enzima se ven limitadas por las severas condiciones de reacción que requieren, por ejemplo para llevar a cabo el blanqueamiento del papel se requiere de xilanasas activas a pH alcalino y altas temperaturas, además de completamente libres de cualquier otra actividad celulósica (17).

La ingeniería genética ha permitido el desarrollo de enzimas recombinantes de organismos que viven y se desarrollan en condiciones extremas. Tales organismos llamados extremófilos, han sido encontrados en lugares tan inhóspitos como aguas termales, áreas volcánicas, el océano profundo, e incluso en la Antártida. Recientemente, las investigaciones de dichos organismos han sido promovidas por el sector industrial, debido a las habilidades de dichos microorganismos para sobrevivir en condiciones extremas, que proveen una nueva rama de enzimas con aplicaciones bioquímicas interesantes (24).

Las β -xilosidasas hidrolizan xilooligosacáridos cortos a unidades de xilosa, forman parte de las exo-glucosidasas hidrolasas, siendo éstas las responsables por la degradación completa del xilano. El enlace glucosídico es uno de los más estables en la naturaleza, con una vida media de aproximadamente 5 millones de años. Las glucosidasas hidrolasas pueden acelerar la hidrólisis del enlace glucosídico en más de 1×10^{17} veces, convirtiéndose en los catalizadores más eficientes conocidos. La hidrólisis enzimática del enlace glucosídico puede ocurrir según dos mecanismos distintos, en ambos se requieren dos ácidos carboxílicos, que son conservados dentro de cada hidrolasa (8).

Se han estado realizando estudios sobre la XynB2 proveniente de *Bacillus stearothermophilus* T-6 desde hace más de diez años, a partir de los cuales se han determinado la estereoquímica involucrada en el transcurso de la hidrólisis, la temperatura óptima donde se observa la actividad enzimática máxima y el intervalo de pH óptimo (9). Los resultados de la hidrólisis del *p*-nitrofenil β -xilopiranosido han revelado que la catálisis ocurre vía retención de la configuración del carbono anomérico, y que la temperatura y pH óptimo se encuentran a 65 °C y pH 5,6-6,3, respectivamente (9).

Posteriormente, se realizaron análisis cinéticos más detallados de la familia 52 de las Glucosil-hidrolasas con la β -xilosidasa de *Geobacillus stearothermophilus*, empleando calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para medir las propiedades de enlace de la enzima a fragmentos de xilobiosa y xilotriosa. Se han medido las constantes cinéticas de XynB2 para la hidrólisis de un grupo de sustratos aril- β -D-xilanopiranosidos con diferentes grupos salientes. Otros estudios cinéticos revelaron que la ruptura del intermediario ocurre con un carácter típico de un ion carbonio en el estado de transición (**Figura 1**) y la hidrólisis del enlace procede con un carácter de ion oxocarbonio más bajo (10).

Se ha purificado y caracterizado también actividades β -xilosidasas de la familia 43, provenientes del *Geobacillus thermoleovorans*, empleando cromatografía de afinidad, gracias a la adición de una cola de histidina en el C-terminal de la proteína. Se han estudiado los parámetros cinéticos comunes empleando dos sustratos distintos por espectrofotometría (*p*-nitrofenil- β -D-xilanopiranosido y el *p*-nitrofenil- α -L-arabinofuranosido), demostrando que la enzima posee mayor afinidad por el *p*-NPX. Se realizaron estudios donde se prueba que la inhibición causada por arabinosa y xilosa es de tipo competitivo (25).

Mediante especímenes mutantes de la XynB2, se identificaron los residuos aminoácidos encargados de la actividad catalítica, siendo los responsables los grupos Glu³³⁵ y Asp⁴⁹⁵ (10).

La determinación de los parámetros biofísicos y bioquímicos de XynB2 empleando cromatografía de exclusión molecular, análisis cinéticos, titulación de calorimetría isotérmica, dicroísmo circular (CD), fluorescencia e infrarrojo con transformada de Fourier, han sido importantes datos al momento de considerar la enzima para aplicaciones industriales. Espectros de CD y FTIR permitieron dilucidar la estructura secundaria, manifestando la predominancia de hélices α y hojas β . Gracias a estudios de fluorescencia intrínseca y de CD se determinó que XynB2 presenta un pKa de $4,2 \pm 0,1$; con una conformación estable entre pH 6 y 9. A pesar de la enorme estabilidad que presenta la XynB2 a altas temperaturas, una vez que la enzima se desnaturaliza por factores químicos y térmicos a diferentes valores de pH, la actividad catalítica es irre recuperable. Los estudios enzimáticos que se realizaron en el mismo trabajo de investigación (7) indicaron que XynB2 exhibe la mayor actividad a 70 °C a pH 6,5. Empleando ultracentrifugación analítica y cromatografía de filtración en gel, se demostró que la proteína activa está conformada por un dímero hidratado (7).

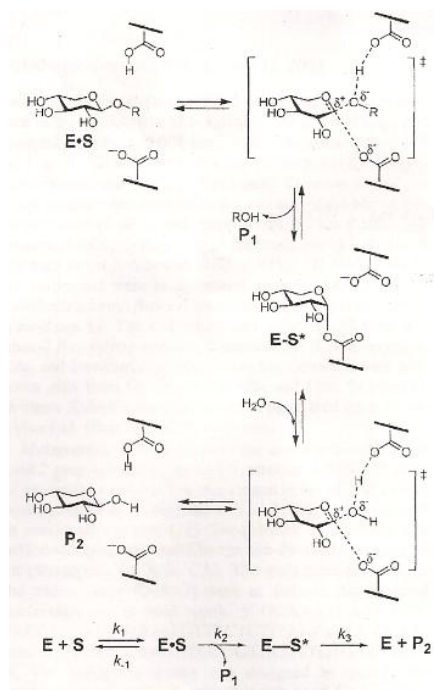


Figura 1: Mecanismo propuesto para la hidrólisis del enlace glucosídico con retención de la configuración del carbono anomérico (10).

2.2-Bases teóricas

2.2.1-Clonación de ADN mediante métodos de ADN recombinante empleando vectores plasmídicos

En la clonación de ADN se emplean diversas técnicas, denominadas tecnología del ADN recombinante. Cualquier molécula de ADN que haya sido compuesta por secuencias derivadas de diferentes fuentes se conoce como ADN recombinante (26). La ingeniería genética de plásmidos proporciona un método rápido y flexible para adicionar genes individuales a cualquier genoma de origen bacteriano (27).

La clave para clonar un fragmento de ADN de interés es unirlo a una molécula vector de ADN, que más tarde se replica dentro de una célula huésped, a medida que la célula se divide el vector se disemina junto con el material hereditario característico de la célula (**Figura 2**). Las herramientas biológicas empleadas para cortar y seleccionar el fragmento de ADN de interés en secuencias específicas se conocen como enzimas de restricción, y para adherir los fragmentos escindidos se utilizan otras enzimas llamadas ligasas (26).

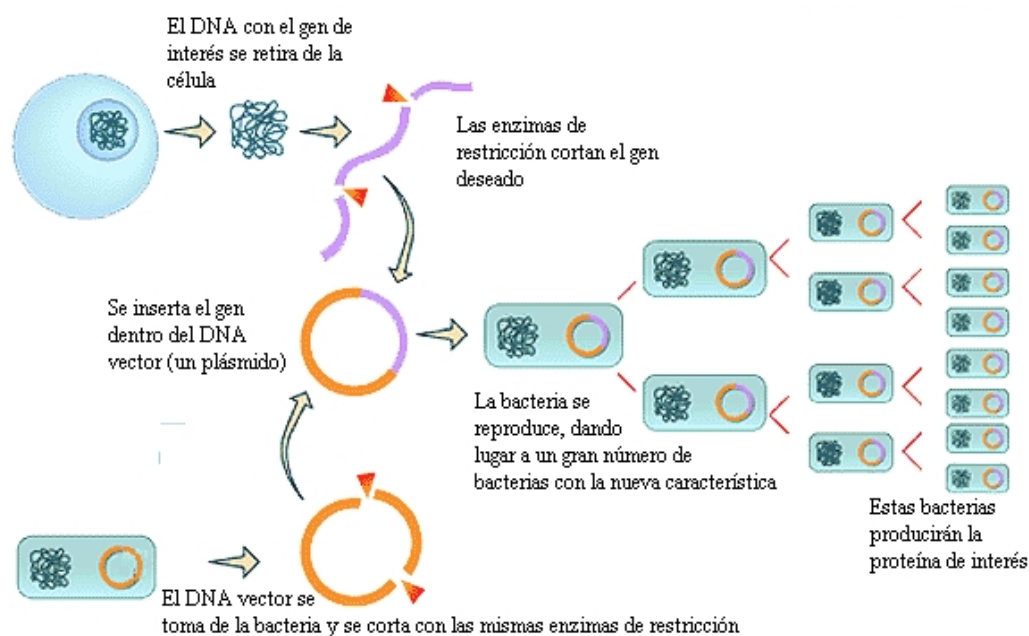


Figura 2. Proceso de clonación empleando un vector plásmido (28).

Los vectores más comunes son moléculas de ADN circular denominadas plásmidos. Dichos vectores deben poseer al menos tres características: un origen de replicación que les permite reproducirse en forma independiente del cromosoma del hospedador, algún tipo de marcador seleccionable que permita identificar con facilidad las células que contienen el vector, y finalmente deben poseer sitios independientes para la unión de una enzima de restricción o de varias de ellas, lo cual permite la inserción de los fragmentos de ADN en un punto específico dentro de un vector íntegro (26,28).

2.2.2-Sobre-producción de proteínas recombinantes

La transcripción de genes foráneos en bacterias como la *E. coli* es uno de los métodos empleados para la sobreproducción de proteínas de interés. La clonación de fragmentos de ADN implica un proceso de iniciación, en el cual se emplean secuencias específicas de ADN conocidas como promotores, dichas fracciones son reconocidas por la ARN

polimerasa, que comienza el proceso de transcripción. Los promotores más empleados son llamados promotores fuertes, que permiten controlar la actividad bajo ciertas condiciones.

Generalmente un vector de transcripción de *E. coli* contiene un promotor lac y el gen lacZ, el cual codifica la enzima β -galactosidasa. Cuando la bacteria se coloca en presencia de lactosa o un análogo de la lactosa como el isopropil tiogalactósido (IPTG) se induce la producción de la proteína β -galactosidasa, dicha característica permite replicar la proteína deseada simplemente reemplazando el gen lacZ por aquel que codifique la proteína de interés. Usualmente se emplea IPTG puesto que no se metaboliza, y por consiguiente la concentración no varía a medida que la célula se desarrolla (26,29).

2.2.3-Purificación de proteínas

La purificación es un preámbulo indispensable cuando se estudian las propiedades de una enzima. Las características particulares de cada proteína se aprovechan para el proceso de separación, tales como la solubilidad, la carga y el tamaño (26,30). Dentro de las técnicas más empleadas se encuentran la precipitación selectiva en presencia de determinados compuestos, la centrifugación, la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de afinidad, la cromatografía líquida de alta resolución, la filtración en gel, entre otras menos usadas (30).

El primer paso es homogeneizar el material biológico, de forma que se rompa la membrana celular y permita que las proteínas invadan el medio líquido. Esto es lo que comúnmente los investigadores denominan homogenato (29). El “cóctel” de proteínas y residuos celulares en el homogenato puede purificarse por medio de un proceso de cromatografía de exclusión molecular o filtración en gel, donde el combinado atraviesa una columna rellena de resinas porosas de diversas composiciones y el material biológico

es separado de acuerdo al tamaño. Otras técnicas como la cromatografía de intercambio iónico se basan en la carga para llevar a cabo la separación (29,30).

Como producto de las interacciones entre proteínas y otras moléculas, el empleo de compuestos anclados a matrices permite retener la proteína deseada, que son liberadas posteriormente eluyendo una solución amortiguadora que contenga un reactivo capaz de romper la interacción y desplazar la molécula (30).

2.2.4- Caracterización de las proteínas mediante electroforesis

La electroforesis en gel ha sido utilizada para la separación de proteínas por más de dos décadas (31). El desplazamiento que ocurre cuando a un grupo de moléculas cargadas se les aplica un campo eléctrico es lo que se conoce como electroforesis. Cuando la electroforesis se lleva a cabo en un gel o en otro medio de soporte, la matriz del soporte interfiere con el movimiento, como una especie de tamiz molecular. La migración dependerá del campo eléctrico, la carga, el tamaño, forma y estado de solvatación, además de la viscosidad de la solución (30).

Es una herramienta extremadamente útil para determinar parámetros como el peso molecular, punto isoeléctrico y número de cadenas polipeptídicas de las proteínas. Dentro de los diversos métodos que existen, la electroforesis en gel de poliacrilamida presenta numerosas ventajas como la transparencia, el hecho de que sea químicamente inerte, y la gran estabilidad que presenta en un amplio intervalo de pH, temperatura y fuerza iónica (29,30).

2.2.5- La naturaleza química de las enzimas

La mayoría de las enzimas son proteínas a excepción de un pequeño grupo de moléculas de ARN catalítico. El poder catalítico que poseen las enzimas proviene de la extraordinaria

estructura nativa, es decir de la conformación que adoptan producto de la secuencia de aminoácidos, lo que provoca que aumenten la velocidad de una reacción por factores de 10^3 a 10^{11} veces respecto a las reacciones no catalizadas.

Estas moléculas existen en el interior de todos los seres vivos y en consecuencia, comparten muchas de las características alcanzadas a lo largo del proceso evolutivo, si una bacteria puede sobrevivir a temperaturas ambientales cercanas a 0 °C, las enzimas encargadas de realizar los procesos celulares en su interior deben ser activas a tal temperatura, igualmente si la bacteria puede resistir niveles de 50, 60 e incluso 70 °C (29,32,33).

2.2.6-Estabilidad de las proteínas

La estabilidad de las proteínas se genera mediante un equilibrio débilmente formado entre una variedad de fuerzas e interacciones no covalentes, que evitan la desnaturalización de las mismas en determinadas condiciones. Dentro de los factores que mantienen la conformación nativa de una proteína se encuentran las fuerzas electrostáticas, las fuerzas de Van der Waals o fuerzas de dispersión de London, que se originan de los dipolos permanentes y dipolos inducidos, influyendo en el plegamiento de las proteínas y generando a su vez los puentes de hidrógeno (34).

Otro parámetro importante es la influencia que ejercen por los puentes de hidrógeno, que contribuyen de cierta forma a la estabilidad proteica aunque en menor medida que las fuerzas de van der Waals, a pesar de ello proporcionan la base estructural para el patrón de plegamiento nativo de muchas proteínas. El efecto hidrófobo también es un participante importante en la estabilidad, la estructura que produce obliga a los grupos funcionales apolares a estar encerrados en el interior de la molécula lejos del solvente, por ende las interacciones con las moléculas de agua del exterior son mínimas (34).

Aunque las proteínas termófilas y mesófilas son homólogas, las últimas se desnaturalizan a temperaturas muy inferiores a las primeras, la razón de la increíble estabilidad térmica de las proteínas termófilas se debe a un conjunto de factores que las diferencian sólo ligeramente en apariencia, pero que le brindan una extrema resistencia al calor. Entre los efectos de mayor importancia están un mayor tamaño del centro hidrófobo, un aumento en la interfase entre las subunidades, y un centro más empaquetado, que genere un menor cociente de superficie-volumen (34).

2.2.7-La temperatura como agente desnaturalizante

Al proceso mediante el cual una proteína pierde la estructura cuaternaria, terciaria o secundaria y por ende pierde la actividad biológica que le caracteriza, se denomina desnaturalización. Las proteínas pueden desnaturalizarse por una variedad de razones, entre éstas la exposición a la luz ultravioleta, ácidos, bases, disolventes orgánicos, sales de metales pesados (35), sin embargo, para el presente estudio se tomará en cuenta principalmente la alta temperatura.

Al aumentar la velocidad de vibración molecular debido al incremento de la temperatura, las interacciones débiles se rompen y producen el despliegue de la proteína, el cual puede ser reversible o irreversible dependiendo de la especie proteica y de otras condiciones como el pH (36). El calentamiento origina fuertes cambios en la conformación y por lo tanto en la actividad catalítica de la proteína. La desnaturalización ocurre de la misma forma cooperativa que el plegamiento de la proteína, es decir, no quedan secciones de la proteína “parcialmente” plegadas, sino que al perder las interacciones estabilizadoras en una de las partes, la estructura completa pierde estabilidad y por lo tanto se desnaturaliza completamente (37).

2.2.8-Actividad enzimática

La unidad internacional de enzima o unidad de actividad enzimática (U) se define según la Comisión de Enzimas (EC), como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 micromol ($1\ \mu\text{mol}$) de producto en un minuto, en condiciones definidas. Otra definición relevante es la actividad específica, es decir el número de unidades de enzima por miligramo de proteína (U/mg prot) o por mililitro de disolución (U/mL). La actividad específica representa una medida de la pureza enzimática, siendo máxima y constante cuando la enzima es pura (29,38).

2.2.9-Factores que afectan la actividad enzimática

Aunque el enlace peptídico es metaestable, la degradación es demasiado lenta a pH neutro y temperaturas bajas, y son precisamente los residuos aminoácidos conectados mediante enlaces peptídicos que producen la actividad catalítica, gracias a la conformación que adoptan y la habilidad que poseen para modificar un sustrato sin verse alterados al final de la reacción. Por consiguiente todos aquellos factores que modifiquen las condiciones de los enlaces peptídicos y demás interacciones estabilizantes que alteren la conformación de la proteína perturbarán la actividad catalítica, entre ellos se encuentran el pH, la concentración de sustrato y la temperatura. Debido a la finalidad de este estudio se detallará el efecto de la temperatura.

Como en la mayoría de las reacciones químicas, la temperatura aumenta la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas, debido al aumento de energía cinética que experimentan las moléculas, incidiendo en el número de colisiones efectivas que se puedan producir. Sin embargo, a causa de la naturaleza biológica de las enzimas existe un punto (que varía para las diferentes enzimas) en el cual la temperatura comienza a descender por la desestabilización que sufre la conformación, producto de la desnaturalización (29,39).

La temperatura a la cual la actividad catalítica es máxima se llama temperatura óptima. Una vez superado el punto de inflexión, el aumento de velocidad de la reacción debido a la temperatura es contrarrestado por la pérdida de actividad catalítica debida a la desnaturalización térmica, induciendo un rápido decrecimiento de la actividad enzimática (29,39).

2.2.10-Cinética química

El estudio de la cinética química es el cálculo de la velocidad de cualquier reacción, basado en el conocimiento de las propiedades fundamentales de las moléculas reaccionantes y los factores que afectan la velocidad de reacción, incluidos la temperatura, la concentración de los reactivos, el estado físico y la actuación de sustancias catalizadoras e inhibidoras (40,41).

Determinar las velocidades de reacción, a través de las leyes de velocidad, permite además conocer los mecanismos bajo los cuales ocurre una reacción, y al comprender el mecanismo es posible controlar las condiciones óptimas de la reacción y aumentar la eficiencia de la misma, de hecho, éste es el objetivo final que se persigue durante la acción biológica de una enzima (41,42).

La relación entre la concentración de reactivos y la velocidad de la reacción se expresa mediante una ecuación conocida como ecuación de velocidad o ley de velocidad, regida también por una constante específica de reacción, k , la cual indica la proporcionalidad entre la velocidad de reacción y la concentración de los reactivos, a una temperatura dada (41). La ley de velocidad de reacción se determina experimentalmente, evaluando el cambio de concentración de una especie en función de tiempo.

La velocidad de la reacción se representa gráficamente como la tangente de la curva en un gráfico de concentración versus tiempo (42).

2.2.11-Orden de reacción

El orden de reacción gobierna la forma matemática de la ley de velocidad, dictando además la variación de la concentración de todas las especies con el tiempo. La molecularidad de una reacción se evidencia también a través del orden de reacción y se calcula experimentalmente. Por lo general, las enzimas exhiben un comportamiento de primer orden.

Dado que el orden de reacción elemental es equivalente a la molecularidad de una reacción, un mecanismo unimolecular es sinónimo de un orden de reacción igual a uno, donde la velocidad de la reacción depende únicamente de la concentración del reactivo.

Cuando se considera la conversión irreversible de la sustancia A en la sustancia B ($A \rightarrow B$), se asume que el equilibrio está muy desplazado hacia la derecha, por lo cual la reacción inversa tiene lugar tan sólo en un grado infinitesimal. La constante k de velocidad tiene unidades de $(\text{segundos})^{-1}$. Una k grande implica que la reacción es rápida. La ecuación 1, que surge de la integración de la expresión de velocidad, se emplea para demostrar que una reacción es de primer orden o para medir la constante de velocidad.

$$\ln \frac{[A]}{[A]_0} = -k_1 t \quad (1)$$

$$\text{ó } \frac{[A]}{[A]_0} = e^{-k_1 t} \quad (2)$$

Donde $[A]_0$ es la concentración de partida, cuando $t=0$. La ecuación nos indica que la concentración de A disminuye de manera exponencial con el tiempo (30).

2.2.12-Tiempo de vida media o semivida ($t_{1/2}$)

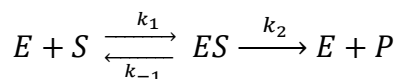
La vida media de una reacción se define como el tiempo necesario para que la concentración de un reactivo se disminuya a la mitad de su valor inicial. A medida que la

vida media es más prolongada, la reacción es más lenta. Tiene especial utilidad en procesos de primer orden y por lo tanto es una medida de considerable importancia práctica en los estudios de cinética enzimática (41,42).

$$[A]_t = \frac{1}{2} [A]_0 \quad (3)$$

2.2.13-Catálisis enzimática

Las enzimas son la maquinaria especializada de naturaleza proteica que permite que las reacciones ocurran a un ritmo que posibilite la vida. La característica más importante de la catálisis enzimática es la especificidad de la enzima a una reacción en particular. No todas las enzimas se restringen a una reacción. Algunas catalizarán una clase de reacciones (40). Una reacción simple con un sustrato y un producto, catalizado por una enzima se puede describir sencillamente de la siguiente forma:



Donde E equivale a la enzima libre, S al sustrato, ES representa el complejo enzima-sustrato y P es el producto de reacción (40). Asumiendo que las condiciones son tales que la reacción inversa entre E y P es desdeñable. La formación catalítica del producto, con regeneración de la enzima, será una reacción simple de primer orden, y a la velocidad de la reacción vendrá determinada únicamente por la concentración de ES y el valor de k_2 . La expresión más común para el cálculo de las velocidades de reacción enzimática es la siguiente:

$$v = \frac{k_2[S]_0[E]_0}{[S]_0 + k_m} \quad (6)$$

Donde $[S]_0$ representa la concentración de sustrato inicial y $[E]_0$ la concentración de enzima inicial. La velocidad máxima de la reacción es igual a $k_2[E]_t$. La ecuación 6 se conoce como ecuación de Michaelis-Menten para una reacción simple de dos pasos (40).

La ley de velocidad se puede describir mediante una ecuación similar a Michaelis-Menten, pero la k_2 de la ecuación se sustituye por la constante denominada k_{cat} , quedando la siguiente expresión:

$$v = \frac{k_{cat}[E]_t[S]}{[S] + k_m} \quad (7)$$

Como se sabe que $V_{m\acute{a}x}$ es igual a $k_{cat}[E]_t$ la ecuación 7 también puede escribirse de la siguiente manera

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{[S] + k_m} \quad (8)$$

La magnitud k_{cat} incorpora las constantes de velocidad de todas las reacciones entre ES y E + P (30). Un medio para facilitar la interpretación de la velocidad es a través de la linealización de la ecuación de Michaelis-Menten, de tal manera que no se obtenga una gráfica hiperbólica sino una relación lineal entre ambas variables. Tal recurso presenta una serie de ventajas cuando se estudia la cinética enzimática, ya que $V_{m\acute{a}x}$ y k_M pueden así determinarse con más facilidad (43).

2.2.14- Inhibición enzimática

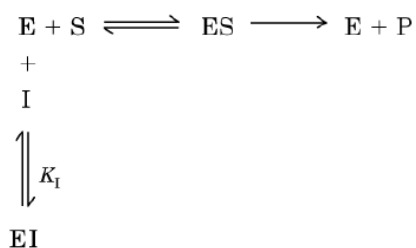
Un inhibidor es un compuesto natural o sintetizado químicamente que reduce la tasa de reacciones catalizadas por enzimas cuando se añaden a la mezcla de reacción. Existen muchos tipos de inhibición, los grupos más grandes los forman la inhibición reversible y la irreversible. La segunda es un tipo de inhibición que ‘envenenan’ a las enzimas, con

frecuencia son reactivos químicos que reaccionan con las enzimas formando enlaces covalentes y reduciendo la actividad a cero.

Una enzima inactivada por un inhibidor irreversible no puede ser reactivada mediante diálisis u otros procedimientos físicos, mientras que los inhibidores reversibles son compuestos que forman enlaces no-covalentes con la enzima y disminuyen la actividad enzimática como resultado. Estos tipos de inhibidores a su vez se clasifican en competitivos, no competitivos, y acompetitivos.

La inhibición competitiva es aquella donde el inhibidor se une a la enzima en el mismo sitio que el sustrato, generando un complejo abortivo y no productivo. La inhibición no competitiva por otro lado es aquella donde el inhibidor se une en un segundo lugar en la enzima (no el sitio activo), de tal forma que se modifica la k_{cat} , generando posiblemente un proceso catalítico no tan eficaz.

Finalmente la inhibición acompetitiva es aquella donde el inhibidor se une a otro sitio de la enzima (no el sitio activo) cuando el complejo enzima-sustrato ya ha sido formado, impidiendo que ocurra la catálisis. De los tres tipos de inhibición reversible, el más común es la inhibición competitiva y es la que generalmente se presenta en inhibiciones por efecto del producto. [44]. Las reacciones de inhibición competitiva se pueden describir de la siguiente manera:



Donde K_i es una constante de disociación para la unión del inhibidor.

Para una reacción simple de un solo sustrato, la ecuación 9 describe el efecto de un inhibidor competitivo en la velocidad inicial de una reacción, donde se observa claramente que la concentración del inhibidor no tiene efecto sobre la $V_{m\acute{a}x}$ de la enzima, pero altera la K_M . En presencia del inhibidor, la K_M aparente aumentará en un factor de $(1 + [I]/K_I)$. Para los estudios de este tipo de inhibición, las gráficas de Lineweaver-Burk proveen un diagnóstico útil, claramente observable en la sección a de la **Figura 3** (45).

$$V_o = \frac{V_{m\acute{a}x}}{1 + \left(\frac{K_M}{[S]}\right) \times \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (9)$$

Una vez calculadas las K_M^{ap} a distintas concentraciones del inhibidor I , puede determinarse K_I a partir de la pendiente de la recta, como se observa en la representación b de la **Figura 3**, y el valor verdadero de K_M a partir de la intersección de la recta donde $[I] = 0$ (30).

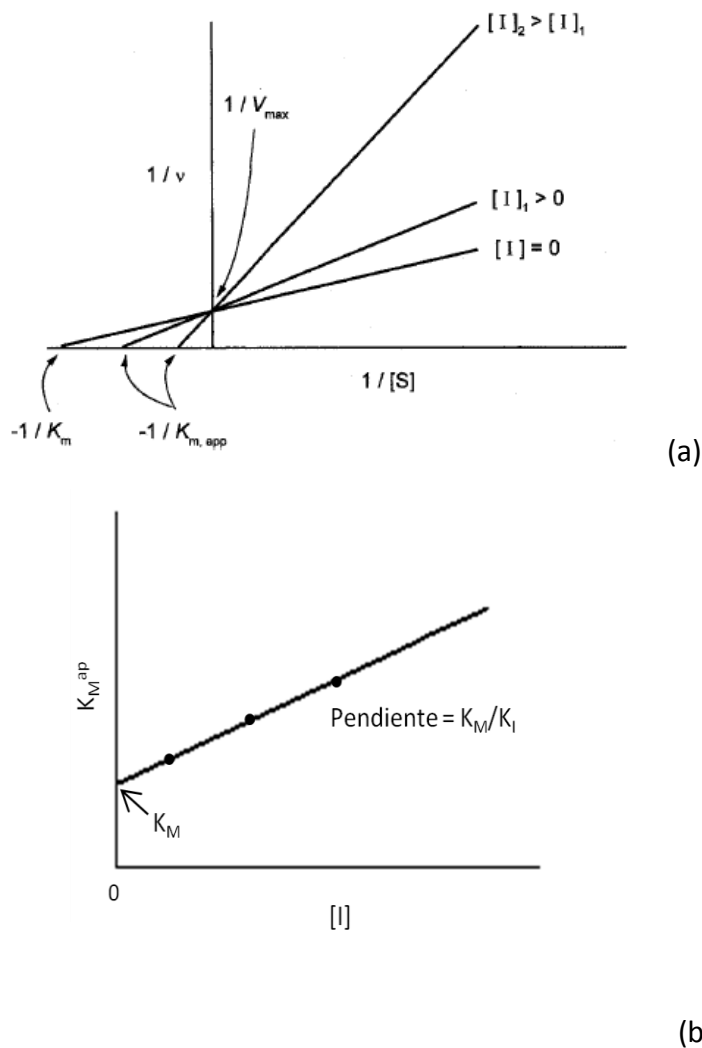


Figura 3. Efectos de la inhibición competitiva sobre la cinética enzimática. (a) Representación de Lineweaver-Burk de una reacción enzimática empleando distintas concentraciones del inhibidor. (b) Representación gráfica utilizada para la determinación de K_M y K_I . (30,45)

2.2.15- Espectroscopía de fluorescencia y UV-visible

La espectroscopía estudia la emisión, absorción y dispersión de la radiación electromagnética de átomos o moléculas (46). La espectroscopia se diversifica en numerosas ramas como la de microondas, de rayos X, de absorción atómica, infrarroja, entre otras. Para el presente trabajo se considera particularmente la espectroscopía ultravioleta-visible (UV-visible) y la de fluorescencia.

La más común de las dos técnicas, la espectrofotometría de ultravioleta UV-visible, mide la cantidad de luz absorbida desde dichas regiones en el espectro electromagnético en función de la longitud de onda, proporcionando información cualitativa y cuantitativa sobre la muestra (47).

Mientras que la fluorescencia es la emisión de luz producida cuando un fotón es absorbido por una molécula; tal emisión será de mayor longitud de onda (es decir, de menor energía) que la absorbida. La fluorescencia requiere una menor cantidad de muestra que la absorbancia para llevar a cabo el análisis, sin embargo es más complicada de realizar. En los análisis de macromoléculas, las medidas de fluorescencia pueden aportar datos sobre la conformación, los lugares de enlace, las interacciones con el disolvente, el grado de flexibilidad, también es posible llevar a cabo ensayos enzimáticos siguiendo la reacción con un sustrato que libere un fluoróforo o fluorocromo. (48)

Capítulo 3

3.- Materiales y métodos

3.1- Reactivos, materiales y equipos utilizados

Tabla 1. Reactivos empleados durante el desarrollo de los experimentos y su correspondiente fabricante.

Reactivo	Fabricante	Reactivo	Fabricante
4-metilumbeliferil xilopiranosido	Sigma-Aldrich	Fosfato ácido de potasio	Sigma-Aldrich
β -mercaptoetanol	Sigma-Aldrich	Glicerol	Promega
Ácido acético	Sigma-Aldrich	Glicina	Sigma-Aldrich
Ácido clorhídrico	Fisher	Imidazol	Sigma-Aldrich
Ácido fosfórico	Sigma-Aldrich	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido	Promega
Acrilamida	Fisher	Marcador de peso molecular V849A	Promega
Azul de bromofenol	Fisher	Medio Luria Bertani	Sigma-Aldrich
Azul de coomassie R-250	Fisher	Medio agar- Luria Bertani	LPHA Biosciences
Bisacrilamida	Promega	<i>o</i> -nitrofenil xilopiranosido	Sigma-Aldrich
Carbonato de sodio	Riedel-de-Haën	<i>p</i> -nitrofenil xilopiranosido	Sigma-Aldrich
Dodecil sulfato de sodio	Promega	Tris Base	Promega
Etanol	Sigma-Aldrich	Triton X-100	Promega
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo	Sigma-Aldrich	Xilosa	Sigma-Aldrich

Tabla 2. Materiales y equipos empleados durante el desarrollo de los experimentos y su correspondiente fabricante.

Equipo	Fabricante	Modelo
Balanza analítica	Ohaus	Adventurer
Campana de flujo laminar	Telster	Bio-II-A
Centrífuga refrigerada de multivelocidad	Eppendorf	5417R
Celda de electroforesis	BIO RAD	Mini-Protean III
Cromatógrafo	BIO RAD	BioLogic LP
Estufa	Medilow	2101273
Fluorímetro	PerkinElmer	LS55
Incubadora	Thelco Laboratory Incubator	3504
pH-metro	Thermo Orion	250A Plus
Espectrofotómetro Spectronic	Thermo	Genesys 10UV
Termobloque	Mylab	SLTS-100
Transiluminador	BIO-RAD	Universal Hood II
Tubos falcon	Sigma-Aldrich	15 y 50 mL
Vortex	Mylab	SLV-G
Resina Ni ²⁺	Pharmacia (General Electric)	Ni Sepharose High Performance
Resina Sepharosa	General Electric	Sephacryl S-300

3.2-Expresión de XynB2

Se empleó el plásmido pJAVI9I para transformar células competentes de *E. coli* C43 [23], introduciendo de esta forma la secuencia correspondiente al gen XynB2 de *Geobacillus stearothermophilus*, además de incluir un gen que permite la resistencia a la ampicilina y un marcador de histidina justo antes del codón de terminación (7).

Para el proceso de transformación bacteriana las células competentes de *E. coli* C43 mantenidas a -80 °C se descongelaron en frío y se agregó β -mercaptoetanol al 1% como antioxidante biológico. Las células se incubaron en hielo durante 10 min, con una agitación suave cada 2 min. Seguidamente, se añadió 4,5 μ L del plásmido pJAVI9I, dejándose en reposo en hielo durante 30 min (7).

Una vez completado el período de incubación, se realizó un choque térmico durante 45 s a 42 °C para lograr que el plásmido entrara en las células. Se volvió a colocar en hielo por 2 min, se añadió 1 mL de medio LB (Luria Bertani) y se procedió a incubar a 37 °C durante 1 h en agitación a 200 rpm (7).

Se centrifugó el cultivo y el sedimento resultante se resuspendió en una solución de medio de cultivo LB, se sembró en un medio de agar-LB-ampicilina, luego se mantuvo en estufa a 37 °C durante una noche. Posteriormente la colonia se sembró en medio líquido LB (50 mL) con ampicilina, la cual se incubó toda una noche a 37 °C con agitación de 200 rpm, para formar el pre-inóculo (7).

Se emplearon 25 mL del pre-inóculo para inocular 600 mL de medio LB-ampicilina a una concentración final de ampicilina de 0,05 g/L. El crecimiento bacteriano se llevó a cabo con agitación constante a 200 rpm de agitación y a 37 °C. Se midió la absorbancia a 600 nm para seguir el crecimiento. Cuando la densidad óptica alcanzó un valor entre 0,4 y 0,6, se añadió 1mM del isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se continuó el

crecimiento bacteriano por una noche, aproximadamente durante 15 horas a 37 °C y 200 rpm de agitación, para finalmente recolectar las células mediante centrifugación a 6000 rpm durante 10 min, que se congelaron para su conservación a -20 °C (7).

La expresión de la proteína se evaluó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 10%.

3.3-Lisis celular de *E.coli*

El pellet obtenido durante la expresión de la XynB2 se descongeló en frío. Se resuspendieron las células en 50 mL de tampón de lisis, compuesto por NaCl 50 mM, imidazol 5 mM, Tris 20 mM (pH 8,0), Triton X-100 0,1%, β -mercaptoetanol (BME) 1 mM; y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, evitando la formación de burbujas.

Se realizó la lisis celular mediante 10 ciclos de sonicación, cada uno de 45 s de duración con 15 s de descanso en frío. El lisado celular se centrifugó a 12000 *g* por 60 min y el sobrenadante a obtener se mantuvo en hielo hasta iniciar la purificación de XynB2 (7).

3.4-Purificación de XynB2

Se hizo pasar el sobrenadante obtenido en la fase anterior a través de una resina con níquel enlazado covalentemente (Pharmacia) equilibrada con un tampón de lavado (NaCl 100 mM, imidazol 30 mM, Tris 20 mM, BME 1 mM). Se pasaron los 50 mL del sobrenadante resultante del lisado celular. Seguidamente se pasaron entre 10 y 20 volúmenes más de tampón de lavado. Se empleó el tampón de elusión (imidazol 500 mM, NaCl 500 mM, Tris 20 mM, BME 1 mM) para eluir la proteína XynB2 unida a la resina, recogiendo fracciones de 1 mL.

Se midió la absorbancia a 280 nm de las fracciones recogidas, se unieron aquellas con absorbancia entre 0,3 y ≤ 1 . El concentrado proteico se analizó en gel al 10% de SDS-PAGE y se sometió a una cromatografía de exclusión molecular (Sephacryl S-300) para disminuir trazas de impurezas que aún se encontraban presentes, empleando un tampón Tris 50 mM pH 7,0 con NaCl 150 mM, y se recolectaron fracciones de 1 mL/min. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% se comprobó la pureza de la muestra obtenida. Las fracciones con menos impurezas y una banda mas enriquecida de XynB2 se concentraron, se midió la absorbancia a 280 nm y con el coeficiente de extinción molar de la proteína ya purificada ($133850 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) (7), se calculó la concentración de la proteína en las fracciones purificadas y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

3.5-SDS-PAGE

Para comprobar la pureza de la proteína extraída, se realizaron corridas electroforéticas en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El sistema que se utilizó es el Mini-Protean III (Bio-Rad Laboratories, USA). Se empleó el método descrito por Laemmli (49), en donde se utilizan dos geles con diferente composición, el gel separador formado por 10% (p/v) de acrilamida en tampón Tris-HCl (pH 8,8) y SDS, el cual se preparará primero y una vez polimerizado se añadió el gel concentrador, que contiene un 4% (p/v) de acrilamida, disuelto en tampón Tris-HCl (pH 6,8) y SDS.

Las fracciones obtenidas durante cada paso de la expresión y purificación se diluyeron en un tampón de carga con una composición de Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), glicerol (20%), SDS (4%), 2-mercaptoetanol (10%) y azul de bromofenol (0,004%). La corrida se llevó a cabo 120 V. El gel se tiñó con una solución colorante de azul de Coomassie R-250. Se empleó el marcador de peso molecular Promega V849A, cuyo intervalo va de 10 a 225 KDa, (**Anexo A** muestra el patrón de bandas) sin embargo, la composición proteica no viene especificada por el fabricante.

3.6-Determinación de la cantidad de proteína

La cuantificación de la concentración de proteínas totales en las muestras se realizó con el método de Bradford, se realizó una curva de calibración, en la cual se utilizó como patrón una solución de suero de albúmina bovino (BSA) a 100 µg/mL. La curva de calibración se construyó entre 0 y 100 µg/mL (50). También se midieron las absorbancias de la proteína purificada 280 nm y se empleó el coeficiente de extinción molar de la proteína ($133850 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)(7) para cuantificar la cantidad de XynB2 presente.

3.7-Actividad enzimática de XynB2

La actividad enzimática de XynB2 se midió a partir de la liberación de *p*-nitrofenol proveniente del *p*-nitrofenil xilopiranosido (*p*-NPX), de *o*-nitrofenol proveniente del *o*-nitrofenil xilopiranosido (*o*-NPX) y del 4-metilumbeliferona proveniente del 4-metilumbeliferil xilopiranosido (4MUX), la relación molar para cada uno de ellos es de uno con respecto a la concentración de producto. De los dos primeros sustratos se midió la absorbancia del nitrofenol liberado a 420 nm después de 5 minutos de reacción, el coeficiente de extinción molar fue de $7,61 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para *p*-NPX y $1,92 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para *o*-NPX. La enzima se inactivó adicionando 300 µL de Na_2CO_3 1 M. Las concentraciones del sustrato se variaron dependiendo de las características de cada ensayo, ya que en algunos casos la concentración de sustrato debía ser constante y en otras variar.

En el caso del 4-metilumbeliferil xilopiranosido, se realizaron los ensayos empleando una longitud de onda de 365 nm y registrando el espectro de emisión a 450 nm, el coeficiente de extinción molar fue $3,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. En el caso del 4MUX, la reacción se medía a cada segundo. Se utilizaron 5 min de reacción en ambos casos para alcanzar la

velocidad constante y obtener una curva hiperbólica que sigue la cinética de Michaelis-Menten.

El porcentaje de actividad relativa que reflejan las gráficas se calculó en base a la ecuación 10, donde la unidad de actividad enzimática, U, se definió como $\mu\text{mol}/\text{min}$ (7).

$$\% \text{ Actividad enzimática relativa} = \frac{U_{\text{Muestra}}}{U_{\text{Muestra de mayor actividad}}} \times 100 \quad (10)$$

Para el seguimiento del proceso de purificación de XynB2 (**Tabla 3**) se calculó la actividad enzimática total midiendo la actividad enzimática en una alícuota de cada fracción y multiplicándola por el volumen total de la fracción. Los parámetros de actividad específica, rendimiento y grado de purificación se calcularon según las siguientes ecuaciones:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad enzimática total, U}}{\text{Proteína total (mg)}} \quad (11)$$

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{Actividad enzimática total, U fracción}}{\text{Actividad enzimática total, U Lisado}} \times 100 \quad (12)$$

$$\text{Purificación} = \frac{\text{Actividad específica fracción}}{\text{Actividad específica del lisado}} \quad (13)$$

3.8- Determinación de los parámetros cinéticos, K_M y $V_{\text{máx}}$

Primeramente se determinan la temperatura y pH a los cuales la enzima presenta mayor actividad, evaluando la actividad de 40 a 85 °C cada 5 °C para el caso de la temperatura y de 2,00 a 11,00 unidades de pH cada 0,50 unidades, todas las demás condiciones de reacción se detallan en el **Anexo B** y **Anexo C** respectivamente.

Para el cálculo de los parámetros cinéticos se midió la velocidad inicial para diversas concentraciones de sustrato (ver **Anexo D**, **Anexo E** y **Anexo F** para p-NPX, o-NPX y 4MUX respectivamente) y se empleó la ecuación 8 descrita en el capítulo 2, utilizando diversas linealizaciones se minimizaron las desviaciones, para calcular K_M y $V_{m\acute{a}x}$. Los métodos empleados para llevar a cabo las linealizaciones fueron Lineweaver-Burk, Hanes-Woolf y Eadie-Hofstee, además se realizó una regresión no lineal usando el programa OriginPro 8, con un ajuste hiperbólico conforme a una cinética de primer orden de Michaelis-Menten.

3.9-Determinación del perfil de estabilidad térmico de *XynB2* y la cinética de inactivación térmica

Para evaluar el perfil de estabilidad térmico se dejó incubar la proteína a cada temperatura (desde 40 a 85 °C, cada 5 °C) durante 30 min antes de agregar 0,0028 nmol de proteína al medio de reacción, se dejó actuar por 5 min a la temperatura de máxima actividad, para finalmente medir la actividad por espectrofotometría o por fluorescencia (las condiciones de reacción se detallan en el **Anexo G**). La cinética de inactivación térmica se realizó incubando la enzima durante 5 h a 65 °C (temperatura de mayor actividad) y tomando 0,0028 nmol de enzima cada 30 min, para evaluar la actividad con los diversos sustratos (ver **Anexo G**) y finalmente calcular el porcentaje de actividad relativo.

3.10-Efecto de la xilosa como inhibidor enzimático

La constante de inhibición K_i para la xilosa se determinó usando sólo ensayos espectrofotométricos, donde la velocidad se mide en ausencia y en presencia del monosacárido (a distintas concentraciones: 50, 100 y 250 mM), siguiendo la ecuación 9 se calculó la K_M^{ap} para cada concentración, luego se graficaron los datos obtenidos en función de la concentración del inhibidor como muestra la **Figura 3**, y mediante regresión lineal se calculó la K_M y K_i a partir de la pendiente e intercepto (30,45). Las muestras se

incubaron por 10 min a 25 °C, luego se llevaron a 65 °C y la reacción se inició con la adición de 0,0028 nmol la enzima (25) empleando distintas concentraciones de sustratos (descritas en el **Anexo H**).

Capítulo 4

Resultados y discusión

4.1-Sobre-expresión y purificación de XynB2

Se realizó la sobre-expresión de la XynB2 empleando el plásmido recombinante pJAVI91. El tiempo de replicación de las células en el medio líquido de LB fue lento, más de 5 h para alcanzar una absorbancia de 0,4 a 600 nm, sin embargo, la expresión de la enzima resultó altamente eficiente, como muestra la **Figura 4**.

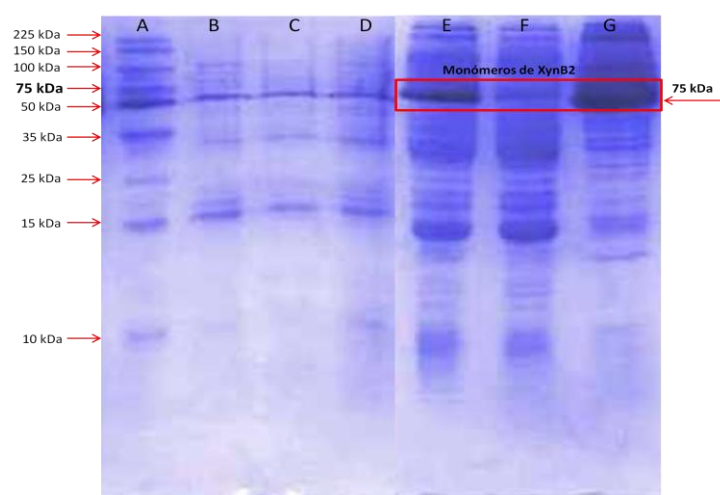


Figura 4. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%) empleando una tinción con azul de Coomassie. A: Marcador de peso molecular. B: Tiempo cero de crecimiento bacteriano. C: Tiempo de crecimiento bacteriano de una hora y veinte minutos. D: Tiempo de crecimiento bacteriano de tres horas y treinta minutos. E: Lisado celular del cultivo bacteriano. F: Fracción no unida a la resina de Ni^{2+} . G: Fracción con la proteína XynB2 eluida de la columna con Ni^{2+} unido covalentemente.

Al detallar los carriles B, C y D no se observa la presencia del monómero de XynB2 durante las primeras tres horas del cultivo, sin embargo una vez que se agrega el inductor IPTG y se deja actuar durante una noche completa, se denota una banda recrecida observable en carril E de la **Figura 4**, a la misma altura de 75 kDa en el marcador de peso molecular, lo cual corresponde con el peso molecular de XynB2 calculado en estudios

anteriores (7), que la clasifican como una proteína de 150 kDa formada por dos homodímeros de 75 kDa, que en condiciones desnaturalizantes se separan e inactivan de forma irreversible.

La diferencia principal entre el protocolo aplicado en este trabajo (propuesto originalmente por Contreras) y aquellos anteriormente reportados (8,9,10) para XynB2 provenientes del *Geobacillus stearothermophilus*, es la utilización de una cola de histidina (HisTag) que permite la separación de la enzima usando una columna de Ni^{2+} unido covalentemente a la resina, en lugar de emplear calentamiento, evitando la degradación térmica de la enzima en el proceso.

Previamente se ha reportado que la proteína una vez eluida con imidazol de la columna de Ni^{2+} aún puede presentar impurezas provenientes de otras proteínas que interaccionan y son retenidas por la columna, lo cual es comprobable en el carril G de la **Figura 5**, donde se observan bandas distinguibles de la proteína, sin embargo también es notable que muchas de las bandas presentes en el lisado ya no se encuentran visibles en la fracción eluida de la columna de Ni^{2+} , además si se observa el carril F constituido por la fracción no unida a la resina, es evidente que no aparece una banda clara y recrecida en el lugar donde se espera observar a XynB2, por lo cual se puede ver que la pérdida de la enzima en el proceso de purificación es muy poca.

Otra razón de la presencia de dichas proteínas foráneas podría ser la saturación de la columna de Ni^{2+} , ya que los volúmenes de cultivo empleados fueron de 750 mL, lo que podría generar una purificación menos eficiente, sin embargo al tratarse de caracterización cinética y no biofísica la pureza de la proteína no necesariamente tiene que ser un impedimento para evaluar los parámetros cinéticos, especialmente si el propósito final es la optimización de la inmovilización, la cual requeriría la menor cantidad de pasos posibles con miras a una aplicación biotecnológica asequible.

4.1.1-Purificación de XynB2 con Sephadex (S-300)

Como se puede observar en el carril G de la **Figura 4**, la fracción obtenida de la columna de Ni^{2+} todavía presenta impurezas, que al interaccionar con la columna de Ni^{2+} se quedan adheridas y son eluidas junto con la proteína. Para mejorar el nivel de purificación se empleó también una columna de exclusión molecular Sephacryl S-300. En la **Figura 5** se presentan la electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 10% de las fracciones seleccionadas 50, 53, 55 58 y 60 que abarcaban el pico de absorbancia en el cromatograma mostrado en la **Figura 6**.

Sin embargo como aún se observan bandas de impurezas presentes hasta la fracción 58, se decide concentrar la proteína a partir de la fracción 60 hasta la 65, donde se observa una menor presencia de proteínas foráneas y una mayor concentración de XynB2, cuyo monómero presenta un peso molecular de 75 kDa. Con el valor de la absorbancia de todas las fracciones unidas se calculó la concentración usando el coeficiente de extinción molar de la proteína.

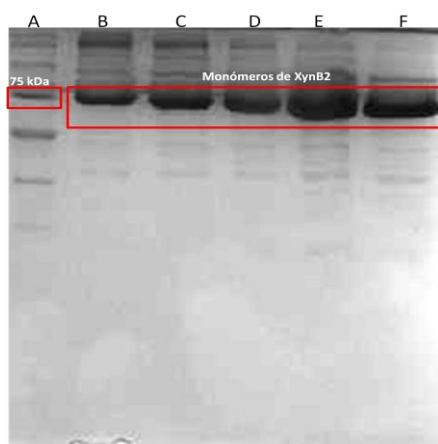


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (10%) en condiciones desnaturalizantes, empleando una tinción con azul de Coomassie con el análisis de las fracciones de S-300. (A) Marcador de peso molecular Promega V849A. (B) Fracción 50, (C) Fracción 53, (D) Fracción 55, (E) Fracción 58, (F) Fracción 60.

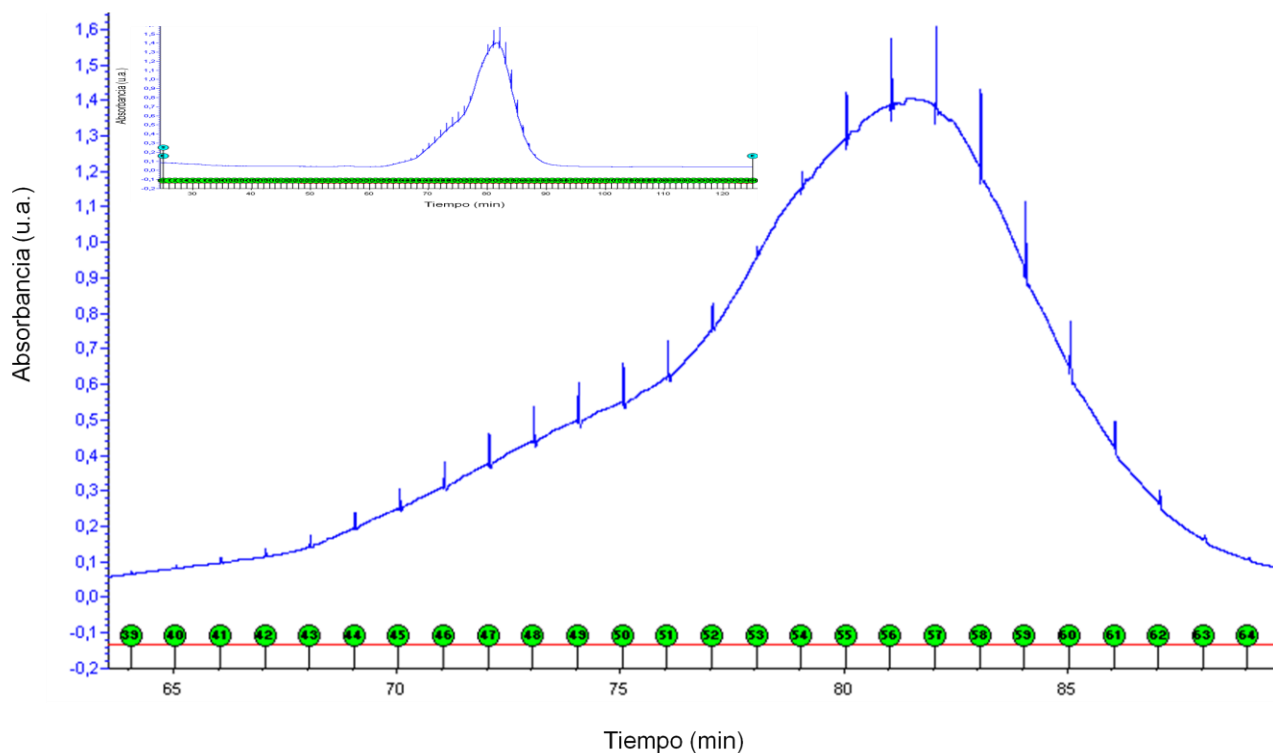


Figura 6. Cromatograma de la purificación de XynB2 por la Sephadex (S-300) donde se refleja la absorbancia de las fracciones eluidas en función del tiempo. Se recolectaron fracciones de 1mL/min. En la sección superior izquierda se detalla el cromatograma con todas las fracciones eluidas.

El método de purificación seguido mostró reducir notablemente el número de bandas presentes pertenecientes a otras proteínas que pudieron coeluir con XynB2, y aunque aún se aprecian pequeñas bandas de poca intensidad y una pequeña cola en el cromatograma, probablemente debido a una saturación de la columna, debido a la naturaleza de los ensayos cinéticos, es posible afirmar que se consiguió purificar adecuadamente a XynB2.

En la **Tabla 3** se detallan los valores de actividad enzimática obtenidos para una purificación de un cultivo de 750 mL, calculados a partir de las ecuaciones 11, 12 y 13, donde se observa que de los 50 mL de lisado obtenido de un cultivo de 750 mL se puede extraer hasta 9,9 mg de proteína con un rendimiento del 18,3 % con respecto a la actividad total presente en el lisado, logrando una proteína 8,33 veces más pura. La

purificación de la proteína es mayor a otros previamente reportados, donde se obtenía a XynB2 3,3 veces más pura empleando un método de calentamiento para separarla de otras proteínas presentes en el sobrenadante (9).

Tabla 3. Purificación de XynB2 del extracto de *E. coli* C43, empleando el plásmido pJAVI91.

<i>Fracción</i>	<i>Volumen (mL)</i>	<i>Actividad total^a (U)</i>	<i>Proteína total^b (mg)</i>	<i>Actividad Específica (U • mg⁻¹)</i>	<i>Rendimiento (%)</i>	<i>Purificación</i>
Lisado	50	720	453	1,6	100	1
Sobrenadante	47	517	361	1,43	72	0,89
No unido	43	38,3	306,2	0,12	5,3	0,075
Unido inespecíficamente	22	3,1	20,9	0,15	0,4	0,093
Fracción Columna Ni ²⁺	3	84	11,5	7,3	11,7	4,56
Sephacryl S-300	5	132	9,9	13,33	18,3	8,33

^a Actividad medida con 1 mM de *p*-NPX como sustrato. ^b Cantidad total de proteínas determinada por el método de Bradford.

4.2- Efecto del sustrato y del pH sobre la actividad de XynB2

El comportamiento de XynB2 en forma de campana, reflejado en la **Figura 7**, se ha observado en otras glicosil hidrolasas cuando se evalúa la actividad de la enzima en función del pH, (51-53), este comportamiento indica que la catálisis ocurre debido a la acción de dos residuos aminoácidos con grupos ionizables (los ácidos carboxílicos en Glu³³⁵ y Asp⁴⁹⁵) (8), los cuales emplean un mecanismo de retención del carbono anomérico, e incluye primeramente un paso de glicosilación, en el cual el residuo nucleofílico de la enzima es glicosilado con el azúcar del sustrato, y luego un paso de

deglicosilación, en el cual el intermediario glicosil-enzima antes mencionado sufre la hidrólisis para reconstituir la enzima libre (8), cuya reacción se detalla en la **Figura 1**.

A partir de este ensayo se determinó el intervalo de pH de máxima actividad para el grupo de los tres sustratos empleados, cuyas reacciones de hidrólisis se representan en la figura 8, y permitió establecer las condiciones de pH para ensayos posteriores, seleccionándose 65 °C como temperatura común a todos los ensayos siguientes, como lo señala la **Tabla 4**.

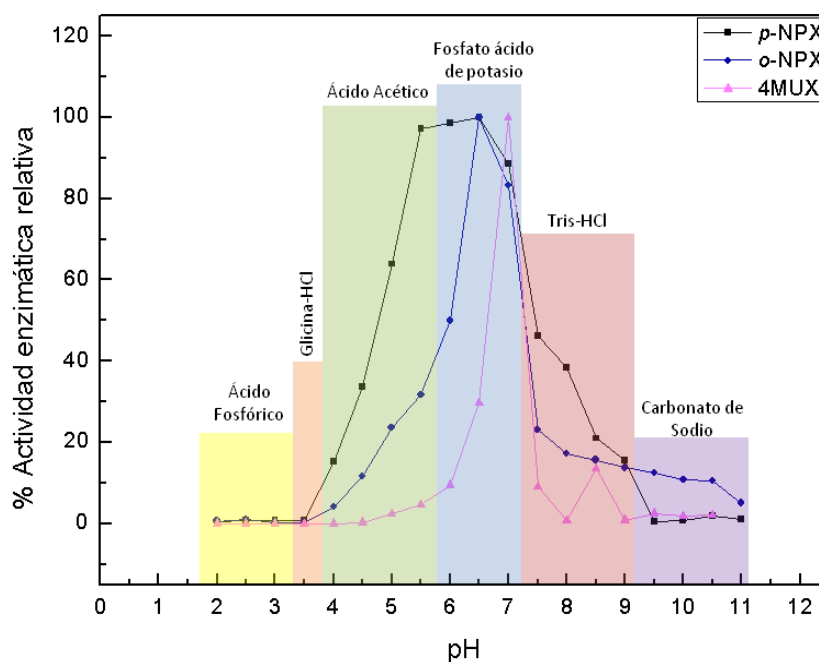


Figura 7: Estudio de la actividad enzimática de XynB2 en función del pH, empleando p-NPX, o-NPX y 4MUX como sustratos. Se empleó un tampón de ácido fosfórico para los valores de pH 2,00, 2,50 y 3,00; glicina-HCl para un valor pH de 3,50; ácido acético para los valores de pH de 4,00, 4,50, 5,00 y 5,50; fosfato ácido de potasio para los valores de pH 6,00, 6,50 y 7,00; Tris-HCl para valores de pH de 7,50, 8,00, 8,50 y 9,00; y carbonato de sodio para los valores de pH 9,50, 10,00, 10,50 y 11,00. Todos los tampones se emplearon a una concentración final de 0,05 M.

Tabla 4. pH de máxima actividad de XynB2 empleando los distintos para o-NPX, p-NPX y 4MUX.

Sustrato	p-NPX	o-NPX	4MUX
pH máxima actividad ($\pm 0,01$)	6,50	6,50	7,00
pH seleccionado	6,50		

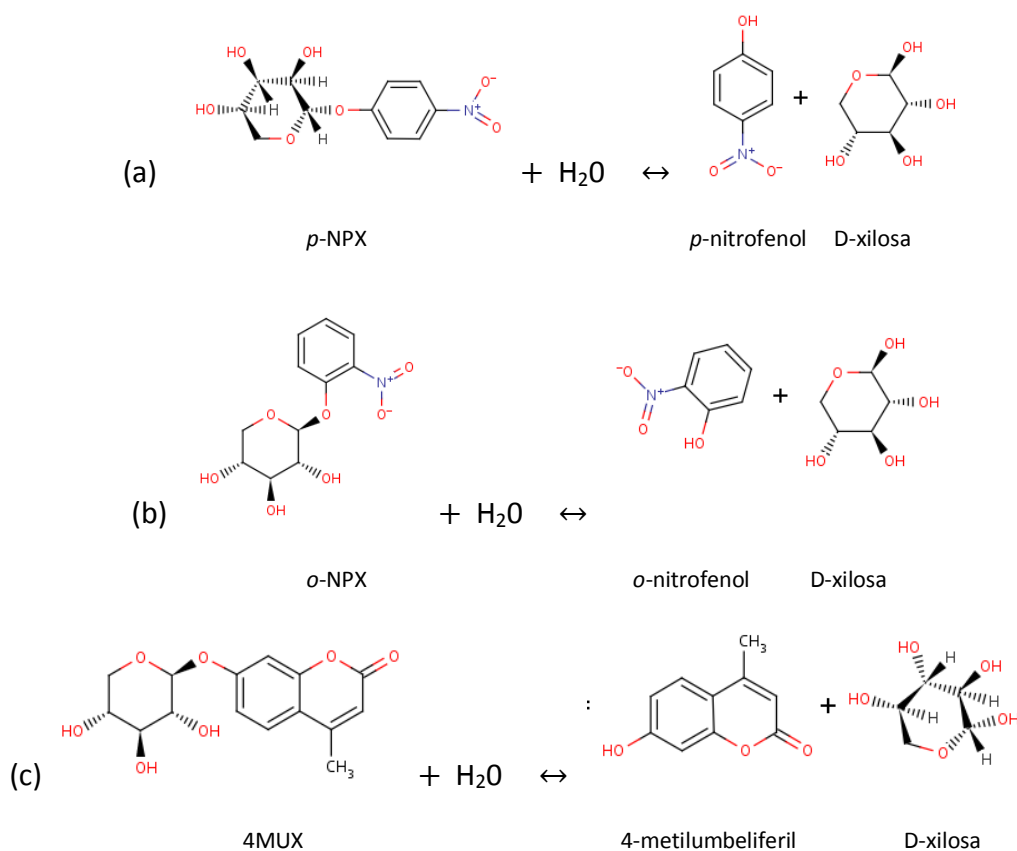


Figura 8: Reacciones de hidrólisis para cada sustrato aril-β-D-xilósidos. (a) Reacción de hidrólisis catalizada por XynB2 para el *p*-NPX. (b) Reacción de hidrólisis catalizada por XynB2 para el *o*-NPX. (c) Reacción de hidrólisis catalizada por XynB2 para el 4MUX (54).

El intervalo de pH que genera mayor actividad enzimática es bastante limitado, con caídas significativas de actividad con apenas 0,50 unidades de pH. Empleando *o*-NPX y *p*-NPX, el pH de máxima actividad se encuentra en 6,50, mientras que para 4MUX hay una actividad más alta a pH 7,00.

Estudios previos han determinado que a pH inferiores a 4,00 la enzima es insoluble (10), lo cual es notable debido a la ausencia completa de actividad debajo de dicho pH en la **Figura 7**. Otras XynB2 provenientes de distintos organismos termófilos, que se presentan en la **Tabla 5**, muestran una máxima a actividad a valores relativamente

cercanos pero siempre menores a los obtenidos en este trabajo, incluso en estudios realizados con la enzima recombinante provenientes de la misma bacteria, el *Geobacillus stearothermophilus*, se reportan valores inferiores a 6,5, sin embargo aún bastante cercanos lo cual sugiere que el proceso de purificación empleado no altera significativamente la estabilidad química de la enzima, lo cual en ocasiones sucede al interferir la His-Tag con el sitio activo de la enzima (55).

Tabla 5. Valores de pH de máxima actividad reportados para diversas XynB2 provenientes de distintos organismos termófilos (56-59).

Organismo	pH de máxima actividad
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	5,00
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	6,00
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	6,00
<i>Thermotoga maritima</i>	6,10

4.3- Efecto del sustrato y de la temperatura en la actividad de XynB2

Los resultados obtenidos de este ensayo que se resumen en la **Tabla 6**, igual que en el caso del pH se denota un comportamiento de campana claramente observable en la **Figura 9**, similar al de muchas enzimas, pero en el caso particular de la XynB2 por tratarse de una enzima termófila, el pico de máxima actividad se encuentra a valores mucho mayores de temperatura, donde otras enzimas provenientes de bacterias mesófilas ya se hubieran desnaturalizado. XynB2 presenta un máximo de actividad entre 65 y 70 °C, dependiendo del sustrato empleado. También se observa una fuerte caída en la actividad a partir de los 75 °C, lo cual se debe a una progresiva desnaturalización térmica de la enzima durante el tiempo de reacción (7,60).

La XynB2 proveniente del *Geobacillus stearothermophilus* a pesar de poseer una temperatura máxima de acción mayor a enzimas producidas por las bacterias mesófilas,

es menor al de otras glicosil hidrolasas provenientes de otros termófilos. Como se observa en la **Tabla 7**, algunas XynB2 pueden alcanzar temperaturas de máxima actividad de hasta 90 °C, como es el caso de la XynB2 producida por la *Thermotoga maritima* (59.)

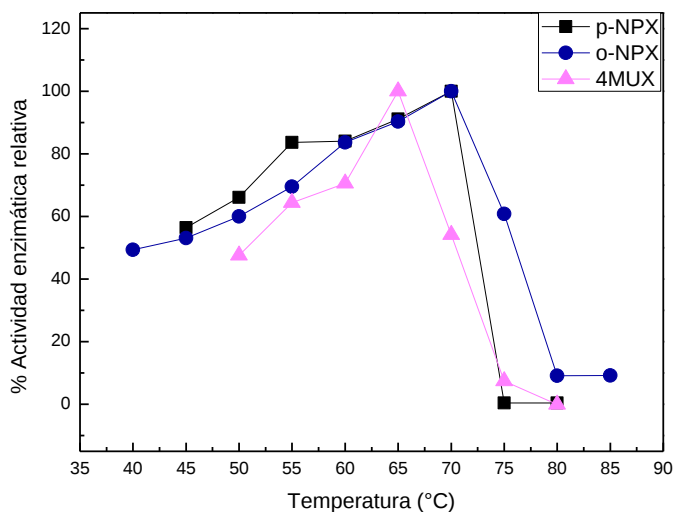


Figura 9: Estudio de la actividad enzimática de XynB2 en función de la temperatura de reacción, empleando los aril- β -xilósidos p-NPX, o-NPX y 4MUX como sustratos.

Todos los valores de concentración de producto liberado se calcularon a partir de un solo coeficiente de extinción molar para cada sustrato, sin tomar en cuenta las variaciones de pH y temperatura, y por lo tanto, las pequeñas diferencias existentes entre los valores de actividad reportados entre un sustrato y otro podrían deberse a los ligeros cambios que pueden sufrir los coeficientes de extinción molar de cada sustrato con los saltos grandes de temperatura y pH (46), que por supuesto alterara la relación entre ellos y la concentración de producto liberado, sin embargo, se observa una clara tendencia hacia el intervalo de mayor actividad.

A partir de este ensayo se determinó la temperatura máxima de actividad para cada sustrato, siendo para el *p*-NPX y *o*-NPX 70 °C y para el 4MUX 65 °C, seleccionándose para

los ensayos posteriores 65 °C como temperatura común para todos los sustratos, con el propósito de unificar los parámetros de análisis.

Los valores de temperatura de mayor actividad obtenidos concuerdan con las temperaturas necesarios para llevar a cabo el blanqueado de la pulpa de papel, que se encuentran entre 30-70 °C (1), por lo que el aprovechamiento biotecnológico de la xilosidasa es posible en este caso.

Tabla 6. Temperatura de máxima actividad reportada para los distintos sustratos aril-β-D-xilosidos *o*-NPX, *p*-NPX y 4MUX y temperatura seleccionada para los ensayos enzimáticos.

Sustrato	<i>p</i> -NPX	<i>o</i> -NPX	4MUX
Temperatura de máxima actividad			
	70	70	65
(T ± 1)°C			
Temperatura seleccionada		65	

Tabla 7. Valores de temperatura de máxima actividad reportados para diversas XynB2 provenientes de distintos organismos termófilos (56-59).

Organismo	Temperatura de máxima actividad °C
<i>Thermoanaerobacter ethanolicus</i>	75
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	70
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i>	70
<i>Thermotoga maritima</i>	90

4.4-Evaluación de los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M .

La amplia especificidad de XynB2 por diversas moléculas con distintos compuestos aglicona, permite determinar las constantes cinéticas de la enzima para la hidrólisis de varios sustratos aril- β -D-xilósidos e indagar sobre aquellos con mayor eficiencia catalítica, con el propósito de encontrar el sustrato preferente de la enzima, el cual pueda ser utilizado posteriormente para profundizar y ampliar las aplicaciones biotecnológicas de XynB2.

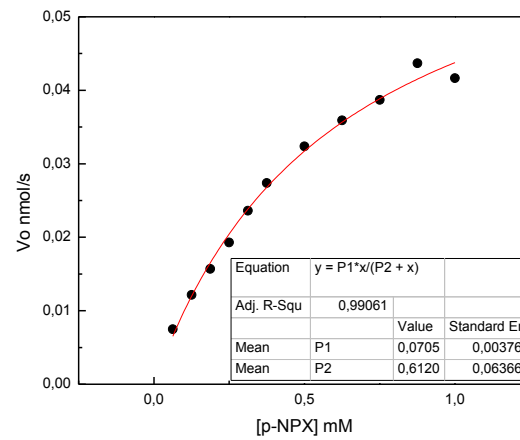
Las constantes de K_M y k_{cat} de XynB2 han sido determinadas para numerosos sustratos a 40 °C y pH 7,0, así como también la relación k_{cat}/K_M , sin embargo, tratándose XynB2 de una enzima proveniente de un organismo termófilo, se considera pertinente para comprender a cabalidad las cualidades catalíticas de la misma, estudiar dichas constantes bajo condiciones de temperatura que coincidan con las temperaturas de máxima actividad de la enzima, en éste caso 65 °C.

Empleándose tres sustratos distintos, *p*-NPX, *o*-NPX y 4MUX se calcularon las constantes catalíticas reflejadas en la **Tabla 8**, se utilizaron tres métodos para llevar a cabo un ajuste lineal, Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee y Hanes-Wolf, además se realizó un ajuste hiperbólico de las velocidades versus las concentraciones de sustrato, con el propósito de observar el comportamiento de primer orden previamente reportado para la enzima (7), todas los ajustes se detallan en la **Figura 10**, únicamente se incluyeron los resultados gráficos de *p*-NPX, mientras que los resultados de 4MUX y *o*-NPX se detallan en el **Anexo I** y **Anexo J**. Examinando los valores de K_M obtenidos para los diversos sustratos es evidente que aquel con mayor afinidad por XynB2 es el 4MUX, siguiéndole de cerca el *p*-NPX y luego *o*-NPX, dicho de otra manera, se necesita menor concentración de 4MUX para alcanzar mitad de la velocidad máxima de la enzima.

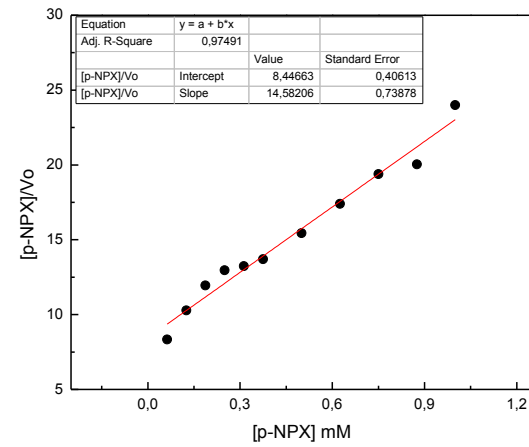
Si se analizan los valores en la **Tabla 8** y la **Tabla 9**, se observa que Hanes-Wolf ofrece los valores más cercanos a los expresados por el ajuste hiperbólico, asumiendo que el mismo representa los resultados experimentales sin manipulaciones matemáticas que modifiquen la tendencia, se toma entonces como el más exacto. Al realizar los ajustes por tres métodos distintos y observar los errores absolutos y relativos de cada método, es notable que el método que ofrece menor desviación con respecto a los valores del ajuste hiperbólico es sin duda alguna Hanes-Wolf, seguido muy de cerca por Eadie-Hofstee.

También es notable una menor exactitud en todas las linealizaciones en el caso de *o*-NPX, quizás debido a una mayor desviación estándar entre los valores obtenidos en la medición, que ocasionaran una dispersión considerable, provocando un ajuste hiperbólico menos preciso.

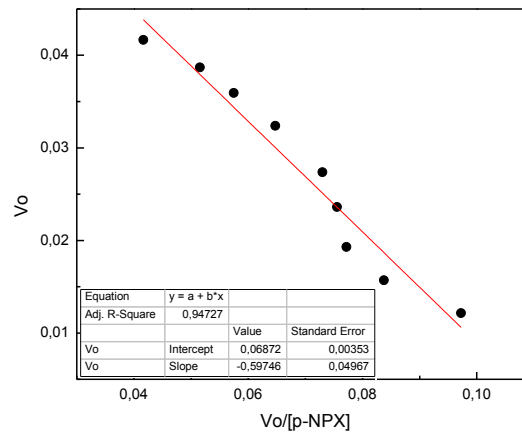
A pesar de que Lineweaver-Burk es el método más empleado a la hora de calcular parámetros cinéticos, es el método que presenta la menor precisión de todos, ya que al tratarse de una función recíproca, los valores de $[S]$ y V_0 menores forman los valores más grandes en la gráfica. Estos valores pequeños son los menos precisos pero la regresión lineal estándar le asigna una incertidumbre constante a todos los valores (45), por esta razón se decide aplicar tres linealizaciones en lugar de una.



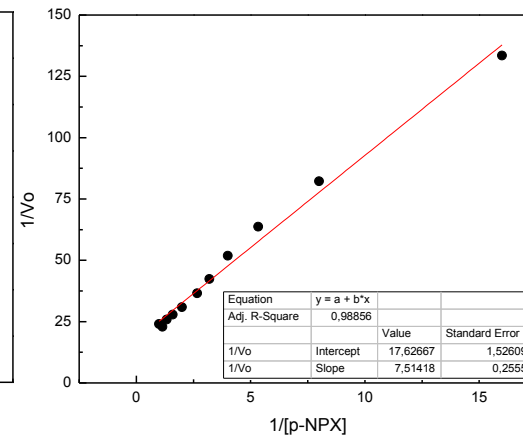
(a) Michaelis-Menten



(b) Lineweaver-Burk



(c) Eadie-Hofstee

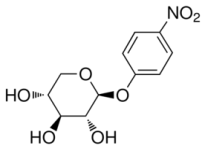
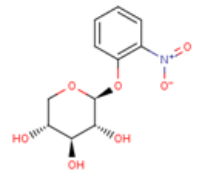
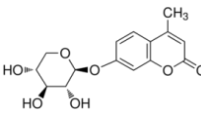


(d) Hanes-Wolf

Figura 10: Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de p-NPX catalizada por XynB2 empleando el ajuste hiperbólico de (a)Michaelis-Menten y lineales de (b)Lineweaver-Burk, (c)Eadie-Hofstee y (d)Hanes-Wolf.

Se han realizado estudios previos que detallan los parámetros cinéticos de XynB2 con los tres sustratos aril- β -D-xilósidos a 40 °C, cuyos resultados se exponen en la **Tabla 10**, sin embargo la tendencia de los valores de K_M son ligeramente diferentes, observándose una mayor afinidad por el sustrato *p*-NPX, seguido de 4MUX y finalmente *o*-NPX. En el presente trabajo el sustrato que presenta mayor afinidad por XynB2 es el 4MUX, seguido del *p*-NPX y posteriormente *o*-NPX. Dicha tendencia puede ser explicada por el efecto estérico que presentan las moléculas que provoca afinidades diferentes en el sitio activo de la biomolécula.

Tabla 8. Comparación de los parámetros cinéticos de las reacciones de hidrólisis de aril-β-D-xilósidos calculados mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Mentes, y linealizaciones de Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk y Hanes-Wolf.

Sustrato	Método	Fórmula	$K_M \pm \Delta sd$ (mM)	$V_{m\acute{a}x} \pm \Delta sd$ (nmol/s)	$k_{cat} \pm \Delta sd$ (s ⁻¹)	$k_{cat}/K_M \pm \Delta sd$ (mM ⁻¹ ·s ⁻¹)
 p-NPX	Hiperbólico	$V_o = V_{m\acute{a}x}[S]/(K_M + [S])$	0,61 ± 0,06	0,070 ± 0,004	25 ± 1	41 ± 4
	Lineweaver-Burk	$1/V_o = K_M/V_{m\acute{a}x}(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$	0,43 ± 0,01	0,057 ± 0,005	20 ± 2	47 ± 4
	Eadie-Hofstee	$V_o = -K_M(V_o/[S]) + V_{m\acute{a}x}$	0,60 ± 0,05	0,07 ± 0,03	24 ± 11	40 ± 18
	Hanes-Wolf	$[S]/V_o = (1/V_{m\acute{a}x})[S] + (K_M/V_{m\acute{a}x})$	0,58 ± 0,04	0,068 ± 0,003	24 ± 1	42 ± 4
 o-NPX	Hiperbólico	$V_o = V_{m\acute{a}x}[S]/(K_M + [S])$	4 ± 1	0,4 ± 0,1	159 ± 36	39 ± 13
	Lineweaver-Burk	$1/V_o = K_M/V_{m\acute{a}x}(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$	1,80 ± 0,04	0,21 ± 0,03	76 ± 11	42 ± 6
	Eadie-Hofstee	$V_o = -K_M(V_o/[S]) + V_{m\acute{a}x}$	2,6 ± 0,2	0,30 ± 0,02	107 ± 7	41 ± 4
	Hanes-Wolf	$[S]/V_o = (1/V_{m\acute{a}x})[S] + (K_M/V_{m\acute{a}x})$	2,9 ± 0,2	0,32 ± 0,02	115 ± 8	40 ± 4
 4MUX	Hiperbólico	$V_o = V_{m\acute{a}x}[S]/(K_M + [S])$	0,20 ± 0,04	0,57 ± 0,06	203 ± 21	1017 ± 230
	Lineweaver-Burk	$1/V_o = K_M/V_{m\acute{a}x}(1/[S]) + 1/V_{m\acute{a}x}$	0,21 ± 0,01	0,58 ± 0,06	208 ± 21	992 ± 113
	Eadie-Hofstee	$V_o = -K_M(V_o/[S]) + V_{m\acute{a}x}$	0,21 ± 0,02	0,59 ± 0,03	211 ± 11	1003 ± 108
	Hanes-Wolf	$[S]/V_o = (1/V_{m\acute{a}x})[S] + (K_M/V_{m\acute{a}x})$	0,21 ± 0,03	0,58 ± 0,05	207 ± 19	986 ± 172

Si se detalla las estructuras de *p*-NPX y 4MUX, se observa una similitud en la posición del enlace glucosídico, en ambos sustratos los grupos funcionales se encuentran en posiciones *para*, muy alejados del enlace hidrolizable, en el caso del 4MUX, la parte de la molécula constituida por la parte aglicona, es muy voluminosa debido a su doble anillo, y aunque se pudiera asumir primeramente el volumen como causa de impedimento estérico, al pensar en función del sustrato natural de XynB2, los xilooligosacáridos, se observa en una mayor similitud con el 4MUX, que con los dos sustratos más pequeños, quizás favoreciendo el posicionamiento en el sitio activo de la enzima y un acoplamiento más efectivo, mientras que *p*-NPX y *o*-NPX, al ser moléculas más pequeñas podrían entrar y salir del bolsillo catalítico sin formar un enlace efectivo con los grupos ionizables de los residuos aminoácidos responsables de la transformación.

Tabla 9: Errores absolutos y relativos de los parámetros cinéticos de la hidrólisis de los aril- β -D-xilósidos calculados mediante el ajuste hiperbólico de Michaelis-Mentes, y linealizaciones de Eadie-Hofstee, Lineweaver-Burk y Hanes-Wolf.

Linealizaciones	Sustratos	Errores Absolutos				Errores Relativos (%)			
		$V_{\text{máx}}$	K_M	K_{cat}	K_{cat}/K_M	$V_{\text{máx}}$	K_M	K_{cat}	K_{cat}/K_M
Lineweaver-Burk	<i>p</i> -NPX	-0,014	-0,186	-4,909	6,414	-19,498	-30,356	-19,498	15,591
	<i>o</i> -NPX	-0,233	-2,203	-83,064	2,562	-52,171	-55,064	-52,171	6,437
	4MUX	0,015	0,011	5,284	-25,794	2,596	5,263	2,596	-2,534
Eadie-Hofstee	<i>p</i> -NPX	-0,002	-0,012	-0,893	-0,665	-3,546	-1,961	-3,546	-1,617
	<i>o</i> -NPX	-0,146	-1,400	-52,071	1,405	-32,705	-35,000	-32,705	3,530
	4MUX	0,020	0,010	7,143	-14,456	3,509	5,000	3,509	-1,420
Hanes-Wolf	<i>p</i> -NPX	-0,002	-0,033	-0,687	1,144	-2,727	-5,358	-2,727	2,781
	<i>o</i> -NPX	-0,123	-1,088	-43,858	-0,195	-27,547	-27,190	-27,547	-0,490
	4MUX	0,010	0,010	3,468	-32,092	1,704	5,014	1,704	-3,153

Para *o*-NPX se observa la menor afinidad, posiblemente por la cercanía del grupo funcional en el fragmento aglicona al enlace glucosídico, la cual no sólo podría generar impedimentos estéricos sino también interacciones electrostáticas que dificulten el posicionamiento correcto de la molécula en el sitio activo, recordando que el mismo está

formado por dos grupos carboxílicos, uno de ellos cargado negativamente como lo muestra la **Figura 1**.

Tabla 10: Parámetros cinéticos para la hidrólisis de los distintos aril- β -D-xilosidos por XynB2 a 40 °C reportados por Bravman y col. (8).

Sustratos	<i>p</i> -NPX	<i>o</i> -NPX	4MUX
K_M (mM)	0,13	0,46	0,35
K_{cat} (s ⁻¹)	18	73	80
K_{cat}/K_M (s ⁻¹ .mM ⁻¹)	140	159	230

Los valores de k_{cat} obtenidos en este trabajo (**Tabla 8**) indican que el compuesto que favorece mayormente la generación de producto es el 4MUX, seguido con valores considerablemente menores de *o*-NPX y *p*-NPX, en ese orden, dicha constante señala simplemente la facilidad con la cual el complejo ES se convierte en producto, es decir la segunda reacción que ocurre una vez se ha formado el complejo ES, dichos datos se correlacionan con los bajos valores de K_M .

Si se evalúa a los sustratos en función de su constante de especificidad k_{cat}/K_M , sobresale el 4MUX como el sustrato con la mayor eficiencia catalítica, limitada solamente por la presencia de sustrato en el medio de reacción, ya que la k_{cat} es muy alta. En el caso de *o*-NPX y *p*-NPX las relaciones entre sus constantes de Michales-Menten y las constantes catalíticas son prácticamente equivalentes.

Se observan diferencias entre los valores reportados por Bravman en el 2003 y los resultados obtenidos en el presente trabajo, las cuales podrían explicarse gracias al aumento en 25 °C empleado para llevar a cabo las reacciones, que imprimiría una mayor energía cinética a las moléculas, produciendo que los productos de la reacción se liberaran

mucho más rápido del complejo ES, consecuentemente provocando valores de k_{cat} mayores.

4.5-Perfil de estabilidad térmico de XynB2 para cada sustrato

Evaluar el perfil de estabilidad térmico permite observar gráficamente la caída de actividad que sufre la proteína cuando es expuesta a ciertas temperaturas por un período de tiempo determinado (en este ensayo 30 min), pero además es posible calcular la temperatura media de desactivación para cada sustrato aril- β -D-xilósido. Para llevar a cabo el cálculo de la temperatura media de desactivación se realizó un ajuste de Boltzmann, que correspondía con la tendencia que los resultados exhibían, dichas gráficas están expuestas en la **Figura 11**.

La pérdida de actividad catalítica causada por la temperatura se debe a la desnaturalización de la enzima, proceso que químicamente es bastante complejo cuando se considera el gran tamaño molecular de las proteínas y la complejidad de su estructura tridimensional, en el caso particular de XynB2 se ha confirmado que la constituye un homodímero, cuyos monómeros en conjunto tienen un peso molecular de 150.000 Da, cuya desnaturalización térmica es irreversible (7) y conlleva a una pérdida de actividad asociada, ya que una vez que la enzima se expone a temperaturas cada vez mayores ocurre un proceso de desplegamiento y descompactación de la proteína que consecuentemente ocasiona daños irreversibles al sitio activo, formado por residuos aminoácidos de ambos monómeros (7,8).

Los resultados expuestos en la **Tabla 11** revelan que XynB2 en presencia del *o*-NPX posee una T_m ligeramente mayor que las calculadas para la enzima en presencia de *p*-NPX y 4MUX, resultado que podría indicar que dicho sustrato la vuelve relativamente más termo-estable, lo cual ha sido observado en otras enzimas (61,62), donde la presencia del sustrato puede estabilizar o incluso desestabilizar a la enzima, en la mayoría de los casos

el fuerte enlace del ligando a la conformación nativa resulta en una sensibilidad reducida de la enzima a la desnaturalización inducida por calor, posiblemente como una consecuencia de un cambio conformacional (61).

También se ha reportado que el enlace de un ión metálico incrementa la estabilidad térmica de algunas enzimas, debido a la cancelación de las cargas de repulsión alrededor del sitio activo, lo cual podría aplicarse también al caso de XynB2, cuyo sitio activo a pH neutro está conformado por dos ácidos carboxílicos de cargas distintas y al encontrarse unidos a una molécula, las cargas son estabilizadas y es menos probable que exista repulsión electrostática entre ellos, consecuentemente estabilizando la enzima.

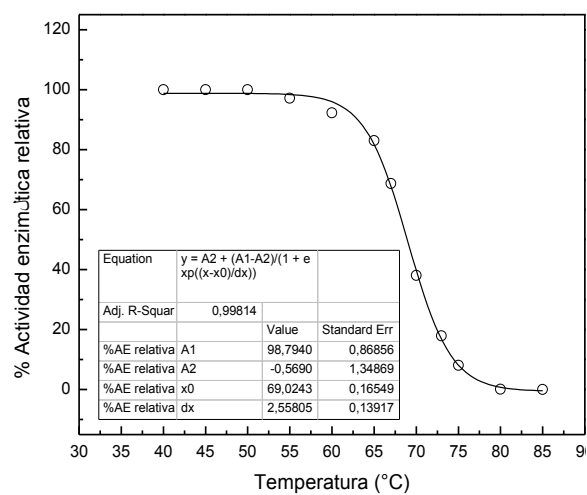
Desde un punto de vista biotecnológico, se podría utilizar la enzima a unos 5 °C por debajo de la temperatura media de desnaturalización para mantener un mayor número de enzimas activas por más tiempo, 65 °C coincide también con la temperatura de mayor actividad de XynB2 para la mayoría de los sustratos utilizados, por lo cual, el empleo de esta enzima termófila en procesos industriales sería muy acertado.

Tabla 11: Temperatura media de desnaturalización (T_m) de XynB2 para cada uno de los distintos sustratos aril- β -D-xilósidos empleados.

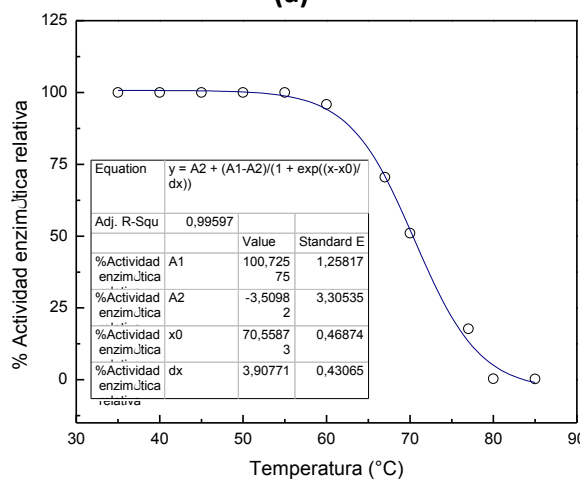
Sustrato	<i>p</i> -NPX	<i>o</i> -NPX	4MUX
$T_m \pm \Delta sd^{a,b}$ (°C)	69,0 $\pm$ 0,2	70,5 $\pm$ 0,5	69,0 $\pm$ 0,6

^a $\pm \Delta sd$ obtenido de $n=2$.

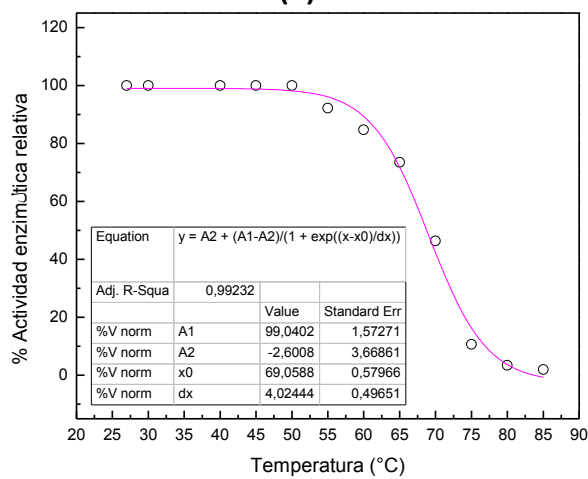
^b Desviaciones correspondientes al ajuste de Boltzmann.



(a)



(b)



(c)

Figura 11: Ajuste de Boltzmann para el estudio del perfil de estabilidad térmico de XynB2, empleando (a) 1 mM p NPX, (b) 1,25 mM o-NPX o (c) 0,075 mM 4MUX como sustrato.

4.6-Cinética de inactivación térmica de XynB2 para cada sustrato

Se seleccionó 65 °C de temperatura para realizar un estudio de la inactivación de la enzima mediante calentamiento constante, principalmente para evaluar la estabilidad de la proteína a lo largo del tiempo en su temperatura de máxima actividad, con el propósito final de evaluar cuanta actividad residual permanece luego de un período extenso de calentamiento con miras a un enfoque biotecnológico aplicado, posiblemente inmovilizando la enzima para examinar si mejora la actividad residual después de largos períodos de exposición.

En la **Figura 12** se observa la caída de actividad de XynB2, en presencia de los tres sustratos aril- β -D-xilósidos durante un período de calentamiento constante de 5 h. A simple vista se puede observar que la enzima mantiene una mayor actividad en presencia de *o*-NPX, lo cual corresponde con el estudio del perfil de estabilidad térmico y T_m calculadas, donde el sustrato que estabiliza mejor a la enzima es el *o*-NPX, presentando XynB2 una T_m de desnaturalización de $70,5 \pm 0,5$ °C.

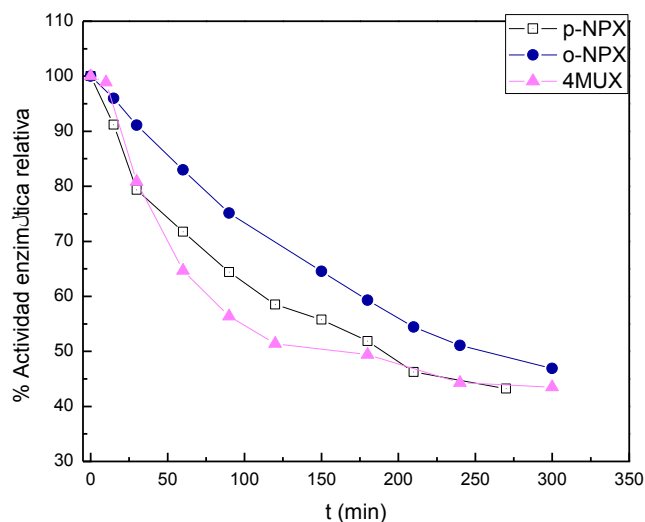


Figura 12: Estudio de la cinética de inactivación térmica de XynB2 en función de la temperatura de reacción, empleando p-NPX, o-NPX y 4MUX como sustratos.

Los valores de $t_{1/2}$ fueron calculados con la pendiente de la gráfica $\ln(\% \text{actividad enzimática relativa})$ en función del tiempo que se muestran en la **Figura 13**, los ajustes lineales corresponden a una reacción de primer orden, cuyos valores de $t_{1/2}$ describen de forma más apropiada el comportamiento y se ajustan a los valores experimentalmente observados. Los valores de $t_{1/2}$ son mucho más altos que los reportados para otras β -xilosidasas provenientes de termófilos (25).

Tabla 12: Tiempo de vida medio ($t_{1/2}$) de XynB2 y orden de reacción para la hidrólisis catalizada de cada uno de los sustratos aril- β -D-xilósidos.

Sustrato	p-NPX	o-NPX	4MUX
Orden de reacción	1er orden	1er orden	1er orden
$t_{1/2} \pm \Delta s d$ (min)	194 ± 16	261 ± 9	116 ± 10

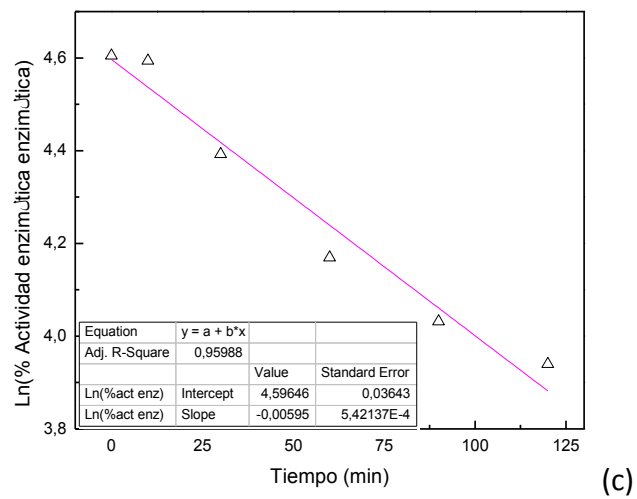
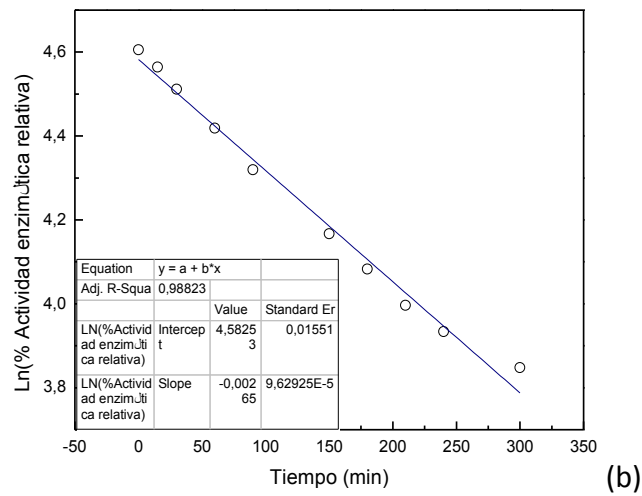
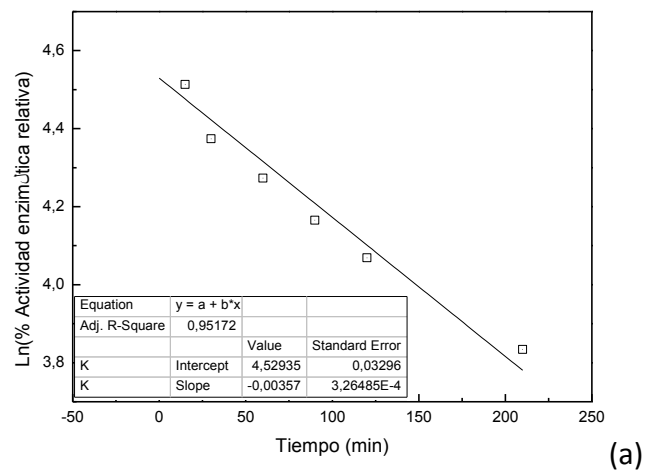


Figura 13: Ajuste lineal del Ln(%Actividad enzimática relativa) en función del tiempo empleando (a) p-NPX, (b) o-NPX y (c) 4MUX como sustrato.

El mayor $t_{1/2}$ se consiguió con el *o*-NPX como sustrato, seguido del *p*-NPX y finalmente el 4MUX. Como se acotó en la sección anterior, es muy probable que las ligeras variaciones en las temperaturas medias de desnaturalización T_m y los tiempos de vida media $t_{1/2}$ distintos, empleando diversos sustratos, se deba a la cualidad intrínseca de cada uno de estabilizar a la proteína contra la desnaturalización inducida por calor.

Es probable que siendo *o*-NPX el sustrato con menor afinidad por la enzima le lleve más tiempo romper el enlace glucosídico y por ende el tiempo de residencia en el sitio activo sea mayor, estabilizando mucho más la enzima en consecuencia.

4.7-Estudios de inhibición por xilosa

Se han realizado estudios previos de inhibición con diversos compuestos químicos como 1-desoxinojirimicina, δ -glucogalactona, glucosa, entre otros, con el propósito de explorar las propiedades del enlace enzimático que forma XynB2, y entender cuales estructuras adopta el sustrato en el estado fundamental y en el estado de transición adoptado durante la catálisis (8), la inhibición competitiva para XynB2 es la más reportada (10), casi siempre con valores de K_i mayores a 100 mM.

Sin embargo hasta los momentos no se ha reportado el efecto de la xilosa como inhibidor, considerando que se trata del producto directo de la reacción como se muestra en la **Figura 14** es pertinente evaluar su efecto y tipo de inhibición, ya que desde un punto de vista biotecnológico es necesario saber si se debe o no retirar el producto a medida que se genera para mantener un alto rendimiento.

Los resultados que se obtuvieron sobre las medidas de actividad a las diferentes concentraciones de xilosa ensayadas se detallan en la gráfica del panel (a) de la **Figura 15**. En ella se puede observar la intersección de las líneas en el eje $1/V_o$, un claro indicio de

una inhibición competitiva (44), ya que las velocidades máximas se mantienen cambiando únicamente la $K_{m, \text{aparente}}$.

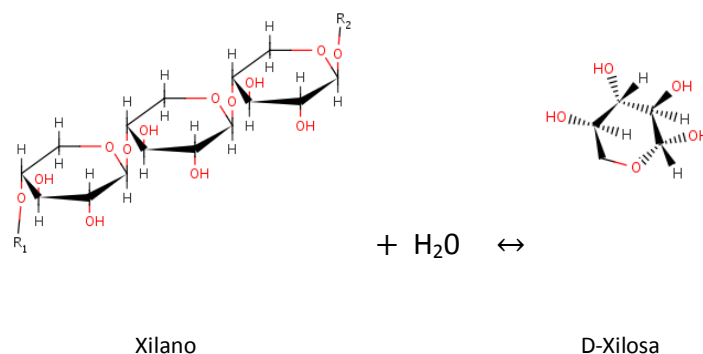


Figura 14: Reacción de hidrólisis de xilooligosacáridos a fragmentos de xilosa, catalizado por β -xilosidasas (54).

Dos tipos de conclusiones se pueden extraer del tipo de inhibición de producto final, siguiendo reglas establecidas con anterioridad por Cleland (63), primeramente que la inhibición competitiva se debe a las similitudes estructurales que presenta la molécula de xilosa a la del sustrato, que al unirse con el sitio activo de la enzima genera un compuesto no productivo, interceptando la reacción que puede tener XynB2 con el sustrato *p*-NPX.

La intercepción de la reacción ocurre porque el inhibidor, en este caso la xilosa, puede revertir parcialmente la secuencia de reacción, ya que el complejo Enzima-Producto es un intermediario normal; por lo cual, al incrementar desproporcionadamente la concentración del producto el equilibrio de la reacción se desplazará hacia la formación del complejo Enzima-Sustrato (64).

Se calcularon los valores de $K_{M, \text{aparente}}$ para cada concentración de xilosa y se graficaron en función de la misma como lo muestra la gráfica del panel c de la **Figura 16**,

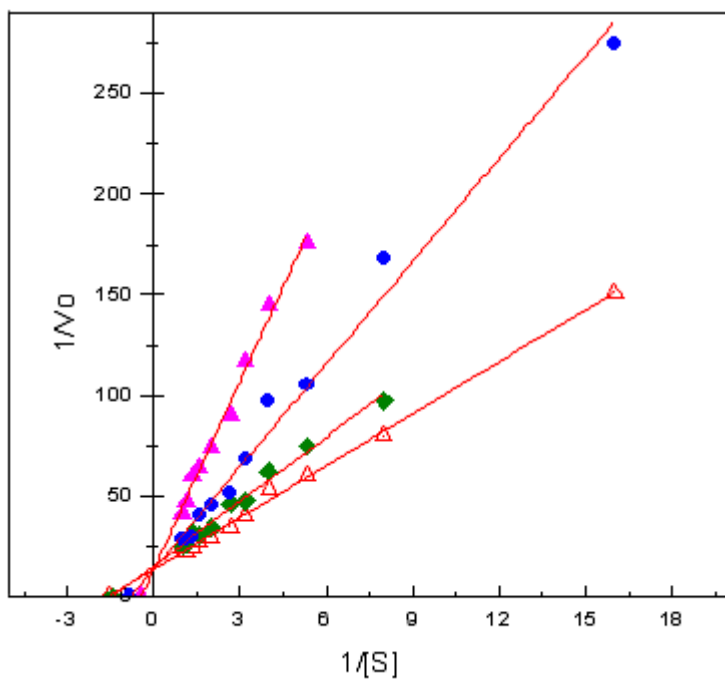
con el propósito de calcular la K_i . Asimismo todos los valores obtenidos se encuentran reportados en la **Tabla 13**. Tanto en la figura como en la tabla se observa que los valores de $K_M^{aparente}$ aumentan a medida que se incrementa la concentración de xilosa, lo cual es de esperarse en una inhibición competitiva.

Tabla 13: Valores de $K_M^{aparente}$ obtenidos con distintas concentraciones de xilosa y K_i respectivo para el inhibidor.

[Xilosa] mM	Sin Xilosa	50	100	250
$K_M^{aparente} \pm \Delta sd$ (mM)	$0,33 \pm 0,01$	$0,67 \pm 0,03$	$1,4 \pm 0,2$	$3128,55 \pm 0,06$
$K_i \pm \Delta sd$ (mM)	39 ± 12			

El valor de K_i de 39 ± 12 mM, refleja una inhibición moderada sobre la reacción de hidrólisis, lo que significa que a pesar de las similitudes estructurales del producto con el sustrato, la afinidad entre el producto y la enzima no es lo suficientemente alta para inhibir efectivamente la reacción, ya que las concentraciones de xilosa empleadas fueron bastante altas. Es posible también que debido a la alta concentración de xilosa, el encuentro efectivo entre una molécula de sustrato y de enzima fuese mucho menos probable, simplemente por la mayor proporción de producto en el medio de reacción.

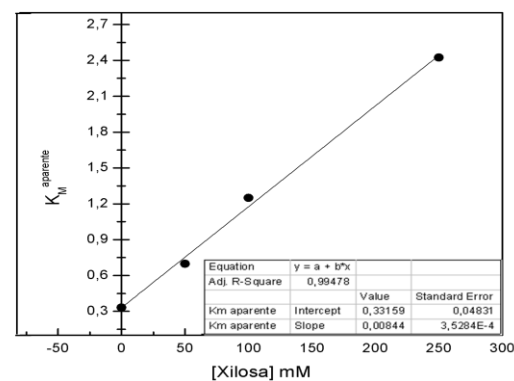
El alto valor de K_i obtenido también nos indica que la reacción al no ser inhibida con facilidad por la presencia de producto las aplicaciones biotecnológica de la enzima serian mucho más sencillas de llevar a cabo, ya que no sería necesario retirar el producto a medida que va ocurriendo la hidrólisis.



(a)

Equation	$y = a + b \cdot x$			
Adj. R-Square	0,99687	0,99111	0,98594	0,99238
		Value	Standard Error	
Sin Xilosa	Intercept	13,60323	0,83282	
Sin Xilosa	Slope	8,58887	0,14517	
50 mM Xilosa	Intercept	15,26072	1,13269	
50 mM Xilosa	Slope	10,66332	0,31923	
100 mM Xilosa	Intercept	13,61856	3,50267	
100 mM Xilosa	Slope	17,0095	0,612	
250 mM Xilosa	Intercept	12,90794	2,46159	
250 mM Xilosa	Slope	31,28552	0,91352	

(b)



(c)

Figura 15: (a) Efectos de la inhibición competitiva por producto final sobre la hidrólisis de *p*-NPX, empleando diversas concentraciones de xilosa: (Δ) Sin xilosa, ($\blacklozenge$) 50 mM, ($\bullet$) 100 mM y ($\blacktriangle$) 250 mM de xilosa (b) Valores de la pendiente e intercepto de las regresiones lineales de cada concentración. (c) Ajuste lineal de los valores de K_M aparente para el cálculo de K_i .

Conclusiones

- ✓ Se lograron purificar 9,9 mg de XynB2 de un cultivo de 750 mL, obteniendo una proteína 8,33 veces más pura que en el lisado celular.
- ✓ El pH de máxima actividad determinado para XynB2 en presencia de *o*-NPX y *p*-NPX fue de $6,50 \pm 0,01$, mientras que en presencia de 4MUX fue de $7,00 \pm 0,01$.
- ✓ La temperatura de máxima actividad determinada para XynB2 en presencia de *o*-NPX y *p*-NPX es de $70 \pm 1^\circ\text{C}$, mientras que en presencia de 4MUX fue de $65 \pm 1^\circ\text{C}$.
- ✓ Se ha confirmado que el sustrato β -aril-xilósido preferente de XynB2 es el 4MUX, cuya hidrólisis presenta la menor K_M , seguido por el *p*-NPX y finalmente *o*-NPX.
- ✓ La linealización con menor error relativo respecto a los valores obtenidos por el ajuste hiperbólico resultó ser Hanes-Wolf, así mismo presentó una menor desviación en la mayoría de los sustratos que Eadie-Hofstee y Lineweaver-Burk para el cálculo de los parámetros cinéticos de K_M , $V_{m\acute{a}x}$, K_{cat} y K_{cat}/K_M .
- ✓ XynB2 presenta $t_{1/2}$ considerablemente diferentes en presencia de distintos sustratos β -aril-xilósidos, siendo mayor al emplear *o*-NPX, seguido de *p*-NPX y finalmente 4MUX, con T_m de 261 ± 9 min, 194 ± 16 min y 116 ± 10 min respectivamente.
- ✓ Se reporta por primera vez el efecto inhibitorio de la xilosa sobre la actividad de XynB2. La inhibición fue del tipo competitiva con una K_i igual a 39 ± 12 mM.

Recomendaciones

- ✓ Debido a los diferentes tiempos de vida media obtenidos con distintos sustratos, se recomienda realizar estudios que profundicen sobre la cualidad intrínseca de cada uno de ellos para estabilizar térmica o químicamente a XynB2.
- ✓ Gracias a las enormes cualidades que posee XynB2 para catalizar la hidrólisis de diversos sustratos, se recomienda realizar la inmovilización de la enzima, con miras a un enfoque biotecnológico aplicado que permita el aprovechamiento de sus especiales características.
- ✓ Se recomienda al realizar estudios de cinética enzimática probar con varios tipos de linealizaciones, como la de Eadie-Hofstee y Hanes-Wolf, cuyos errores relativos son mucho menores a la linealización de Lineweaver-Burk y generan por ende valores con menor desviación.

Bibliografía

1. Brodeur G, Elizabeth Y, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Res.* 2011; 2011(787532): p. 17.
2. Dodd D, Cann IKO. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *Glob Change Biol Bioenergy.* 2009; 1(1): p. 2-17.
3. Somerville C. Biofuels. *Curr. Biol.* 2007; 17(4): p. R115-9.
4. Fang Y, Huang XJ, Chen PC, Xu ZK. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. *BMB reports.* 2011; 44(2): p. 87-95.
5. Arroyo M. Inmovilización de enzimas. Fundamentos, métodos y aplicaciones. *Ars Pharm.* 1998; 39(2): p. 23-39.
6. Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol.* 2003; 89(1): p. 17–34.
7. Contreras LM, Gómez J, Prieto J, Clemente-Jiménez JM, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. The family 52 beta-xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* is a dimer: structural and biophysical characterization of a glycoside hydrolase. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1748(12): p. 1924-34.
8. Bravman T, Belakhov V, Solomon D, Shoham G, Henrissat B, Baasov T, et al. Identification of the catalytic residues in family 52 glycoside hydrolase, a xylosidase from *Geobacillus stearothermophilus* T-6. *J Biol Chem.* 2003; 278(29): p. 26742-9.
9. Bravman T, Zolotnitsky G, Shulami S, Belakhov V, Solomon D, Baasov T, et al. Stereochemistry of family 52 glycosyl hydrolases: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus* T-6 is a retaining enzyme. *FEBS Lett.* 2001; 495(1-2): p. 39-43.
10. Bravman T, Zolotnitsky G, Belakhov V, Shoham G, Henrissat B, Baasov T, et al. Detailed kinetic analysis of a family 52 glycoside hydrolase: a β -xylosidase from *Bacillus stearothermophilus*. *Biochemistry.* 2003; 42(35): p. 10528-36.

11. Ben-David A, Bravman T, Balazs YS, Czjzek M, Schomburg D, Shoham G, et al. Glycosynthase activity of *Geobacillus stearothermophiles* GH52 β -xylosidase: efficient synthesis of xylooligosaccharides from α -D-xylopyranosyl fluoride through a conjugated reaction. *ChemBiochem*. 2007; 8(17): p. 2145-51.
12. Lee KY, Park JM, Kim TY, Yun H, Lee SY. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies. *Microb Cell Fact*. 2010; 9(94).
13. Llop-Tous I, Ortiz M, Torrent M, Ludevid MD. The Expression of a Xylanase Targeted to ER-Protein Bodies Provides a Simple Strategy to Produce Active Insoluble Enzyme Polymers in Tobacco Plants. *PLoS One*. 2011; 6(4): p. e19474.
14. Khalil EM, De Angelis J, Cole PA. Indoleamine Analogs as Probes of the Substrate Selectivity and Catalytic Mechanism of Serotonin N-Acetyltransferase. *J Biol Chem*. 1998; 273(46): p. 30321-7.
15. Kao YH, Lerner L, Warner TG. Stereoselectivity of the Chinese hamster ovary cell sialidase: sialoside hydrolysis with overall retention of configuration. *Glycobiology*. 1997; 7(4): p. 559-63.
16. Silversides FG, Scott TA, Korver DR, Afsharmanesh M, Hruby M. A Study on the Interaction of Xylanase and Phytase Enzymes in Wheat-Based Diets Fed to Commercial White and Brown Egg Laying Hens. *Poult Sci*. 2006; 85(2): p. 297-305.
17. Khonzue P, Laothanachareon T, Rattanaphan N, Tinnasulanon P, Apawasin S, Paemanee A, et al. Optimization of Xylanase Production from *Aspergillus niger* for Biobleaching of Eucalyptus Pulp. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2011; 75(6): p. 1129-34.
18. Subramaniyan S, Prema P. Biotechnology of Microbial Xylanases: Enzymology, Molecular Biology and Application. *Crit Rev Biotechnol*. 2002; 22(1): p. 33-64.
19. Bhat MK, Hazlewood GP. Enzymes in Farm Animal Nutrition: Enzymology and other characteristics of cellulases and xylanases. 1st ed.: Oxfordshire: CABI Publishing; 2001.
20. Moraïs S, Barak Y, Hadar Y, Wilson DB, Shoham Y, Lamed R, et al. Assembly of Xylanases into Designer Cellulosomes Promotes Efficient Hydrolysis of the Xylan Component of a

- Natural Recalcitrant Cellulosic Substrate. MBio. 2011; 2(6): p. e00233-11.
21. Saha BC. Hemicellulose bioconversion. J Ind Microbiol Biotechnol. 2003; 30(5): p. 279-91.
 22. Sunna A, Gibbs MD, Bergquist PL. A novel thermostable multidomain 1,4- β -xylanase from 'Caldibacillus cellulovorans' and effect of its xylan-binding domain on enzyme activity. Microbiology. 2000; 146(Pt 11): p. 2947-55.
 23. Bravman T, Mechaly A, Shulami S, Belakhov V, Baasov T, Shoham G, et al. Glutamic acid 160 is the acid-base catalyst of beta-xylosidase from Bacillus stearothermophilus T-6: a family 39 glycoside hydrolase. FEBS Lett. 2001; 495(1-2): p. 115-9.
 24. Schiraldi C, De Rosa M. The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. Trends Biotechnol. 2002; 20(12): p. 515-21.
 25. Wagschal K, Chamroeun H, Lee CC, Robertson GH, Orts WJ, Wong DWS. Purification and Characterization of a Glycoside Hydrolase Family 43 β -xylosidase from Geobacillus thermoleovorans IT-08. Appl Biochem Biotechnol. 2009; 155: p. 304–313.
 26. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, et al. Biología Celular y Molecular. 5th ed. Buenos Aires: Panamericana; 2005.
 27. Sibley MH, Raleigh EA. A versatile element for gene addition in bacterial chromosomes. Nucleic Acids Res. 2011; 2011: p. 1-12.
 28. Watson JD, Baker TA, Bell SP, Gann A, Levine M, Losick R. Biología molecular del gen. Quinta ed. Madrid: Editorial médica Panamericana; 2005. p. 696-697
 29. Lehninger A, Nelson D, Michel C. Principios de Bioquímica. Segunda ed. Barcelona: Ediciones Omega S.A; 1993. p. 139 –140.
 30. Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG. Bioquímica. Tercera ed. Madrid: Pearson Education; 2002. p. 166, 233-235, 420-427.
 31. Zhu Z, Lu JJ, Liu S. Protein separation by capillary gel electrophoresis: A review. Anal Chim Acta. 2012; 709: p. 21-31.
 32. Demirjian DC, Morís-Varas F, Cassidy CS. Enzymes from extremophiles. Curr Opin Chem

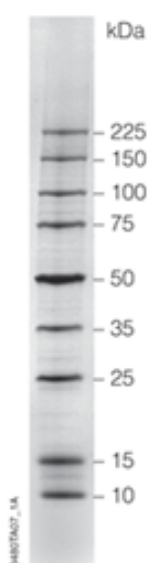
- Biol. 2001; 5(2): p. 144-51.
33. Van den Burg B. Extremophiles as a source for novel enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 2003; 6(3): p. 213-8.
34. Voet D, Voet JG. *Fundamentos De Bioquímica: la vida a nivel molecular.* Segunda ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2009. p 313-15.
35. Acuña F. *Química Orgánica.* Primera ed. San José: Editorial Universidad Estatal a Distancia; 2006. p. 312.
36. Uversky VN, Permiakov EA. *Methods in protein structure and stability analysis: Luminescence spectroscopy and circular dichroism, Volumen 3.* 1st ed. Nueva York: Nova Science Publishers; 2007. p. 6-7.
37. Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Bioquímica.* Sexta ed. Barcelona: Editorial Reverté; 2008. p. 56.
38. De Arriaga M, Soler J, Busto F, Cadenas E. *Cinética Enzimática: Manejo de Datos.* Primera ed. León: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo; 1979.
39. Peña A, Arroyo A, Gómez A, Tapia R. *Bioquímica.* Segunda ed. México: Limusa; 2004. p. 201.
40. Castellan G. *Fisicoquímica.* Segunda ed. México: Pearson Educación; 1998. p. 841, 882-883, 893.
41. Kotz JC, Treichel PM, Weaver GC. *Química y reactividad química.* Quinta ed. México: Thomson; 2003. p. 603, 609, 620, 626-627.
42. Chang R. *Physical chemistry for biosciences* California: Univesity sciences books; 2005. p. 324.
43. Teijón J. *Bioquímica estructura.* Primera ed. Madrid: Editorial Tébar; 2001. p. 273.
44. Leskovac V. *Comprehensive Enzyme Kinetics* New York: Editorial Springer; 2003. p. 73-79.

45. Mikkelsen SR, Cortón E. Bioanalytical Chemistry. Primera ed. New Jersey. John Willey & Sons, Inc. 2004. p. 26-29, 34.
46. Hollas JM. Modern Spectroscopy. Cuarta ed. Nueva York: John Wiley & Sons; 2004. p. 32.
47. Skoog DA, West DM, Holler JF, Crouch SR. Fundamentos de química analítica. Octava ed. México: Paraninfo Thomson Learning. 2005. p. 727,781.
48. Freifelder D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular Barcelona: Reverté; 1981. p. 459-460.
49. Laemmli UK. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): p. 680-685.
50. Walker, J. The Protein Protocols Handbook. Segunda ed. New Jersey: Humana Press Inc. 2002; p. 15-17.
51. Vallmitjana M, Ferrer-Navarro M, Planell R, Abel M, Ausin C, Querol E. Mechanism of the family 1 beta-glucosidase from *Streptomyces* sp: catalytic residues and kinetic studies. *Biochemistry*. 2001; 40(1): p. 5975-5982.
52. Malet C, Planas A. Mechanism of *Bacillus* 1,3-1,4-beta-D-glucan 4-glucanohydrolases: kinetics and pH studies with 4-methylumbelliferyl beta-D-glucan oligosaccharides. *Biochemistry*. 1997; 36(1): p. 13838-13848.
53. Moracci M, Capalbo L, Ciaramella M, Rossi M. Identification of two glutamic acid residues essential for catalysis in the beta-glycosidase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Protein Eng*. 1996; 9(1): p. 1191-1195.
54. Schomburg, D. The Comprehensive Enzyme Information System [sede web]. Wolfenbüttel: Schomburg, D, 1987 – [actualizada el 1 de enero de 2013; acceso 20 de enero de 2013]. Disponible en: <http://www.brenda-enzymes.info>.
55. Reece RJ. Analysis of Genes and Genomes. Primera ed. Manchester: John Wiley & Sons, Ltd. 2004; p. 276.
56. Shao W, Wiegel J. Purification and characterization of a thermostable beta-xylosidase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *J Bacteriol*. 1992; 174(18): p.5848-5853.
57. Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A, Kawamura Y. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillus stearothermophilus* strain. *J Bacteriol*. 1990; 172(12): p. 6669-72.

58. Shao W, Xue Y, Wu A, Kataeva I, Pei J, Wu H, Wiegel J. Characterization of a novel beta-xylosidase, XylC, from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77(3): p. 719-26.
59. Xue Y, Shao W. Expression and characterization of a thermostable beta-xylosidase from the hyperthermophile, *Thermotoga maritima*. *Biotechnol Lett.* 2004; 26(19): p. 1511-5.
60. Nanmori T, Watanabe T, Shinke R, Kohno A, Kawamura Y. Purification and properties of thermostable xylanase and beta-xylosidase produced by a newly isolated *Bacillusstearothermophilus* strain. *J Bacteriol.* 1990; 172(12): p. 6669-72.
61. Lejeune A, Vanhove M, Lamotte-Brasseur J, Pain RH, Frère JM, Matagne A. Quantitative analysis of the stabilization by substrate of *Staphylococcus aureus* PC1 beta-lactamase. *Chem Biol.* 2001; 8(8): p. 831-42.
62. Correlation between conformational stability of the ternary enzyme-substrate complex and domain closure of 3-phosphoglycerate kinase. Varga A, Flachner B, Gráczér E, Osváth S, Szilágyi AN, Vas M. *FEBS J.* 2005; 272(8): p.1867-85
63. Bar-Tana J, Cleland WW. Rabbit muscle phosphofructokinase. II. Product and dead end inhibition. *J Biol Chem.* 1974; 249(4): p. 1271-6.
64. Frey P, Hegeman AD. *Enzymatic Reaction Mechanisms*. Primera ed. New York: University Press, Inc; 2007. p. 25- 27.

Anexos

Anexo A. Patrón de bandas del marcador de peso molecular Promega V849A en un gel de poliacrilamida SDS-PAGE.



Anexo B. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación de la temperatura de mayor actividad.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 7,50] mM	Tiempo de reacción min
p-NPX	1	0,0028	0,05	5
o-NPX	1,25	0,0028	0,05	5
4MUX	0,075	0,0028	0,05	5

Anexo C. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación del pH de mayor actividad.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón de diversos pH] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
p-NPX o-NPX 4MUX	1 1,25 0,075	0,0028	0,05	5	65

Anexo D. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación de los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M empleando p-NPX como sustrato.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 6,50] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
p-NPX	0,062 0,125 0,187 0,250 0,312 0,375 0,500 0,625 0,750 0,875 1	0,0028	0,05	5	65

Anexo E. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación de los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M empleando o-NPX como sustrato.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 6,50] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
o-NPX	0,125	0,0028	0,05	5	65
	0,187				
	0,250				
	0,312				
	0,375				
	0,500				
	0,625				
	0,750				
	1,250				
	1,500				
	1,875				
	2,000				

Anexo F. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación de los parámetros cinéticos K_M , k_{cat} y k_{cat}/K_M empleando 4MUX como sustrato.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 6,50] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
4MUX	0,010	0,0028	0,05	5	65
	0,0125				
	0,050				
	0,075				
	0,100				
	0,150				
	0,250				
	0,300				
	0,40				
	0,500				

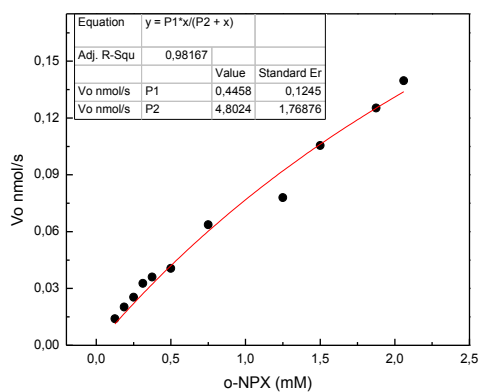
Anexo G. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación del perfil de estabilidad térmico y cinética de inactivación térmica.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 6,5] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
p-NPX	1	0,0028	0,05	5	65
o-NPX	1,25				
4MUX	0,075				

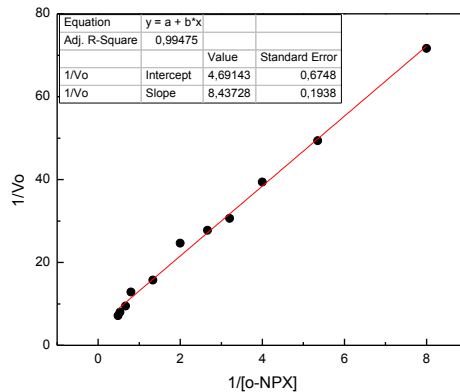
Anexo H. Condiciones de reacción durante el análisis de actividad enzimática para la determinación del efecto de la xilosa sobre la reacción de hidrólisis empleando p-NPX como sustrato.

Sustrato	[Sustrato] mM	XynB2 nmol	[Tampón pH 6,50] mM	Tiempo de reacción min	Temperatura de reacción (T ± 1)°C
p-NPX	0,062	0,0028	0,05	5	65
	0,125				
	0,187				
	0,250				
	0,312				
	0,375				
	0,500				
	0,625				
	0,750				
	0,875				
	1				

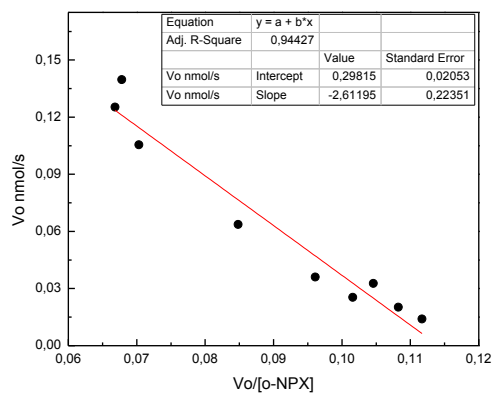
Anexo I. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de *o*-NPX catalizada por XynB2 empleando el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten (a) y lineales de Lineweaver-Burk (b), Eadie-Hofstee (c) y Hanes-Wolf (d).



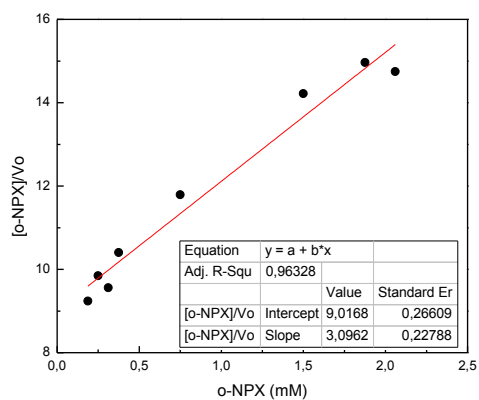
(a) Michaelis-Menten



(b) Lineweaver-Burk

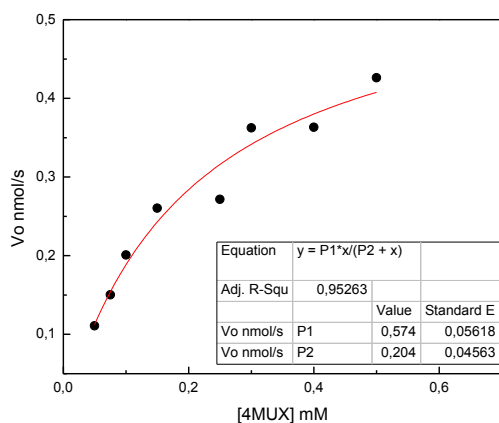


(c) Eadie-Hofstee

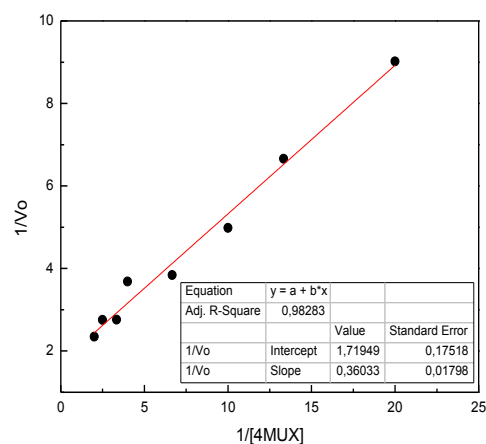


(d) Hanes-Wolf

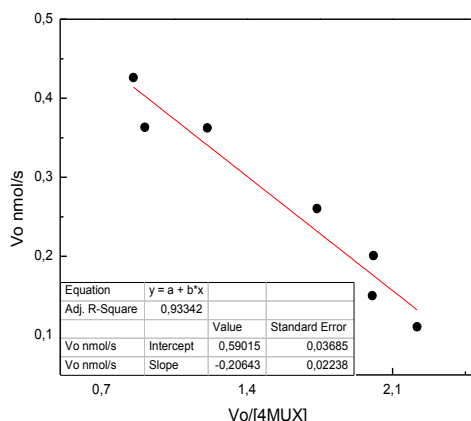
Anexo J. Determinación de los parámetros cinéticos de la reacción de hidrólisis de 4MUX catalizada por XynB2 empleando el ajuste hiperbólico de Michaelis-Menten (a) y lineales de Lineweaver-Burk (b), Eadie-Hofstee (c) y Hanes-Wolf (d).



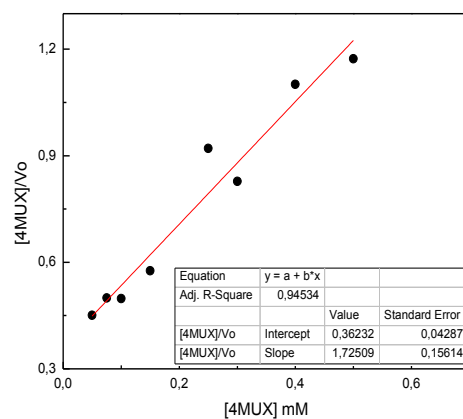
(a) Michaelis-Menten



(b) Lineweaver-Burk



(c) Eadie-Hofstee



(d) Hanes-Wolf