

Aislamiento, producción recombinante y evolución dirigida de nuevas enzimas hidrolíticas bacterianas adaptadas a bajas temperaturas.

Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias de la Ingeniería, Mención Química
Por:

Juan Pablo Acevedo Cox

Profesor guía: Juan Asenjo de Leuze

Santiago de Chile – Junio 2008

Tesis con restricción de acceso en línea, según petición de su autor.

Miembros de la Comisión: Bárbara Andrews Farrow, Carlos Jerez Guevara, Oriana Salazar Aguirre y Rafael Vicuña Errázuriz.

Resumen . .	4
Texto con restricción . .	5

Resumen

El uso de enzimas adaptadas/activas a bajas temperaturas tiene un alto potencial biotecnológico, debido principalmente a que permiten la reducción de costos energéticos en los procesos biotecnológicos. Las proteasas son enzimas proteolíticas de gran utilidad en la industria biotecnológica. Sus aplicaciones industriales involucran principalmente a la industria alimenticia, de detergentes y de cuero.

En este trabajo se aisló bacterias de origen marino antártico que producen enzimas proteolíticas extracelulares con alta actividad a bajas temperaturas. El DNA genómico de las mejores cepas se utilizó para realizar búsquedas de genes que codificaran para proteasas tipo subtilisinas, utilizando partidores híbridos consenso-degenerados de oligonucleótidos (CODEHOP). Esto permitió clonar y secuenciar fragmentos de DNA que codificaban para regiones internas de tres proteasas tipo subtilisinas diferentes. A partir de estos fragmentos se determinó la secuencia de los extremos 3' y 5' de los genes, mediante una técnica de “*genome walking*” desarrollada para este trabajo. Se encontraron tres marcos de lectura abiertos (ORF) de 2.253 pb (P4), 2.124 pb (P6) y 1608 pb (P7), que codificaban para proteasas tipo subtilisina. Estos genes se expresaron con el sistema pET22b(+)/*E. coli* BL21(D3E), mediante inducción con IPTG. Las proteasas se produjeron fusionadas a una cola de histidina en el extremo C-terminal, permitiendo su purificación por cromatografía de afinidad a níquel. La proteasa P6 presentó mayor actividad catalítica que la subtilisina comercial Carlsberg a bajas temperaturas (5-25°C).

Por otro lado, el sobrenadante del cultivo de la cepa antártica p13/1-4, correspondiente a la mejor productora de proteasa, se utilizó para purificar la enzima proteolítica mediante cromatografía. La proteasa se llamó T8, y se clonó un fragmento del gen de esta proteasa, mediante una estrategia que incluía un análisis de espectrometría de masa y diseño de partidores degenerados. La secuencia completa del gen se obtuvo mediante la técnica mejorada de “*genome walking*”, desarrollada en este trabajo. Actualmente, esta proteína tipo-subtilisina se encuentra en etapa de expresión recombinante.

Adicionalmente a este trabajo, se aisló el gen de una xilanasa adaptada a bajas temperaturas utilizando partidores CODEHOP y la técnica de *genome walking*. Este gen se expresó en el sistema pET22b(+)/*E. coli* BL21(DE3), produciendo la xilanasa L activa en el sobrenadante. Esta xilanasa recombinante se utilizó para desarrollar métodos de evolución dirigida tales como PCR propenso a error (*error-prone* PCR) y recombinación al azar (DNA *shuffling*). Esto permitió la obtención de una nueva variante de xilanasa con una constante catalítica (kcat) tres veces mayor que la xilanasa L original.

Durante este trabajo de tesis se desarrolló diferentes estrategias que permitieron la clonación, producción recombinante y evolución dirigida de diferentes enzimas hidrolíticas adaptadas a bajas temperaturas.

Texto con restricción

Tesis con restricción de acceso en línea, según petición de su autor.