

Tabla de Contenido

1. Propósito.....	1
2. Introducción	1
2.1 Situación energética actual a nivel mundial	1
2.2 El potencial de la energía a partir de Biomasa.....	2
2.3 Biocombustibles: El Isobutanol	4
2.4 Producción biológica de biocombustibles: Biocombustibles de 3era generación.	8
2.5 Biosíntesis de isobutanol: Ruta de la valina y Ruta de Ehrlich.	10
2.6 Regulación de la ruta de la valina.	13
2.7 Acetolactato Sintasa.....	15
2.8 Softwares para modelamiento enzimático por diseño racional.....	17
3. Objetivos	21
3.1 General.....	21
3.2 Específicos	21
4. Metodologías.....	22
4.1 Acetolactato sintasa candidata para mutagenesis.	22
4.2 Definir mutación a realizar.	22
4.3 Extracción de DNA genómico del microorganismo.....	22
4.4 Análisis filogenético del microorganismo	22
4.4 Amplificación del gen <i>ilvK</i>	23
4.5 Ligación en vector pET22b mediante Gibson Assembly	23
4.6 Transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	23
4.7 Producción de la proteína recombinante.....	24
4.8 Purificación de la proteína recombinante	24
5. Resultados y Discusiones	26
5.1 Elección del microorganismo para trabajar.	26
5.2 Definir la mutación a realizar.	27
5.3 Extracción del DNA genómico del microorganismo, amplificación del 16S DNA y amplificación del gen <i>ilvK</i>	29
5.4 Ligación del gen <i>ilvK</i> en vector pET22b y transformación de <i>E. coli</i> BL21 (DE3).....	32
5.5 Producción de la proteína recombinante.....	37
5.6 Purificación de proteína recombinante.	39
5.6 Resultados de Secuenciación	40

6. Conclusiones y Recomendaciones	44
7. Bibliografía.....	45
8. Anexos.....	48
Anexo N°1: Secuencia nucleotídica gen <i>ilvK</i> (1680bp)	48
Anexo N°2: Secuencia aminoacídica enzima acetolactato sintasa.....	49
Anexo N°3: Mapa vector pET22b	50
Anexo N°4: Diseño de partidores	51
Anexo N°5: DNA & Protein Ladders.	51
Anexo N°6: Resultados de las secuenciaciones de los DNA 16S (DIFF1) y el inserto (DIFF6).	52

Índice de ilustraciones

Figura 1. Historial del consumo energético mundial y proyecciones.	1
Figura 2. Matriz energética Chilena.	2
Figura 3. Procesos de conversión, productos y aplicaciones.....	3
Figura 4. Diferentes métodos de producción de biocombustibles a partir de biomasa.	5
Figura 5. Factores que influyen en la evaluación de los biocombustibles.....	5
Figura 6. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biobutanol y Bioetanol comparados con el Petróleo.....	6
Figura 7. Escenarios de competitividad de los biocombustibles Biodiesel y BTL comparados con el Diésel Crudo.	6
Figura 8. Comparación de los costos de producción después de la corrección con densidades energéticas de los escenarios seleccionados.....	7
Figura 9. Rutas de biosíntesis de valina y leucina.....	11
Figura 10. Ehrlich Pathway.	12
Figura 11. Ruta de síntesis de biobutanol.....	13
Figura 12. A Estructura cristalizada de una ALS de <i>K. pneumoniae</i>	16
Figura 13. Estructura 3D de un monómero de la enzima acetolactato sintasa visualizada en el software UCSF Chimera.....	18
Figura 14. Visualización de la secuencia aminoacídica de la enzima acetolactato sintasa.	19
Figura 15. Selección de un aminoácido de interés candidato para mutagenesis.	19
Figura 16. Selección del rotámero del aminoácido a insertar en la estructura.....	20
Figura 17. Aminoácidos que componen el sitio activo de la enzima acetolactato sintasa de <i>K. pneumoniae</i> y su interacción con el cofactor TPP donde posteriormente se une el ligando.....	26
Figura 18. Electroforesis del DNA genómico de la cepa ATCC y TM.....	30
Figura 19. Amplificación del 16S DNA a la cepa <i>K. pneumoniae</i> ATCC, <i>K. pneumoniae</i> TM, <i>E. coli</i> (Control positivo) y control negativo.	31
Figura 20. PCR gradiente para la amplificación del gen <i>ilvK</i>	32
Figura 21. Electroforesis del pET22b Backbone.....	33
Figura 22. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b- <i>ilvK</i> . Placa N°1.	33
Figura 23. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b- <i>ilvK</i> . Placa N°2.	34
Figura 24. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) sin quimiotransformar (control negativo).	34
Figura 25. Resultado de la siembra de las bacterias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) quimiotransformadas con el vector pET22b (control positivo).....	35
Figura 26. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°1.....	36
Figura 27. Resultado PCR colonia a cinco colonias de la Placa N°2.....	36
Figura 28. SDS PAGE de la primera electroforesis..	37
Figura 29. SDS PAGE de la segunda electroforesis.....	38
Figura 30. SDS PAGE de la electroforesis realizada con las fracciones obtenidas de la columna de cromatografía.....	39

Figura 31. Análisis BLAST hecho entre la secuencia del inserto y el DNA genómico de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700660.....	41
Figura 32. Ubicación del gen codificante de la enzima oxido-reductasa en el genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700660.....	42
Figura 33. Análisis de complementariedad entre los partidores IlvkEc_FW y IlvkEc_RV con las secuencias complementarias del inserto.....	42
Figura 34. Secuencia aminoacídica obtenida a partir de la traducción de la secuencia nucleotídica del inserto.....	43
Figura 35. Mapa del vector pET22b.....	50
Figura 36. Ladders utilizados en el presente trabajo de tesis.....	51
Figura 37. Ladder de proteína utilizado en el presente trabajo de tesis.....	52

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales productos de la conversión de Biomasa	4
Tabla 2. Aporte de América Latina a la producción mundial de algarofitas en toneladas/año	9
Tabla 3. Aporte de América Latina a la producción mundial de algas productoras de ficocoloides en toneladas/año	9
Tabla 4. Exportaciones chilenas de algas y sus derivados entre 1998 y 2001.	10
Tabla 8. Moléculas intermediarias de la ruta de biosíntesis de valina y las enzimas que catalizan las reacciones.....	10
Tabla 9. Enzimas pertenecientes a la ruta de biosíntesis de valina y distintos microorganismos de donde provienen	14
Tabla 10. Valores de R para enzimas AHAS y ALS y los respectivos organismos de origen.....	17
Tabla 11. Resultados del Molecular Docking de las mutaciones.....	28
Tabla 12. Tabla resumen de los partidores utilizados en el presente trabajo de tesis.	51