



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

Estudios funcionales de proteasas secretadas por bacterias antárticas



Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica y Bioinformática

CHRISTIAN MANUEL ALEJANDRO PERALTA FIGUEROA
CONCEPCIÓN-CHILE
2015

Profesor Tutor: Marta Bunster Balocchi
Profesores co-tutores: Gerardo González Rocha
José Martínez Oyanedel
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

RESUMEN

Las proteasas son enzimas capaces de hidrolizar enlaces peptídicos, por lo que estas enzimas se aplican en distintos procesos biotecnológicos en donde se requiera hidrolizar proteínas. Tanta es su importancia a nivel comercial que se estima que las proteasas abarcan cerca del 60% del mercado mundial de enzimas. Sin embargo, las proteasas comerciales usadas actualmente, provenientes de organismos mesófilos, presentan una actividad óptima a temperaturas cercanas a 60°C, siendo ineficientes al ser aplicadas a temperatura ambiental.

Debido a este problema, se ha planteado reemplazar estas enzimas, por otras que actúen eficientemente a temperaturas menores. En este punto, surge la microbiología antártica, como nueva fuente de proteasas con propiedades únicas. Estas enzimas, llamadas también “enzimas psicrófilas”, o “psicrozimas”, presentan una temperatura óptima de catálisis que puede oscilar entre 20°C y 45°C, una constante catalítica, k_{cat} , de dos a ocho veces superior que las enzimas comunes, así también como una mayor termosensibilidad.

En esta tesis, se planteó la caracterización de proteasas provenientes de bacterias aisladas en la Isla Rey Jorge, Antártica. De un trabajo previo, se seleccionaron dos cepas, identificadas como *Flavobacterium* sp. y *Pseudoalteromonas issachenkonii*, las cuales secretaban un extracto con actividad proteolítica, que presentaba características que sugerían la presencia de enzimas psicrófilas. Por esto, se propuso purificar y caracterizar estas proteasas, comparando su eficiencia a 25°C frente a proteasas usadas actualmente en biotecnología.

A partir de cultivos bacterianos, se purificaron las proteasas mediante precipitación con sulfato de amonio y cromatografía de intercambio aniónico, siendo posteriormente identificadas por espectrometría de masas. Estas enzimas fueron caracterizadas funcionalmente mediante ensayos con azocaseína como sustrato, evaluando temperatura y pH óptimo de catálisis, estabilidad enzimática frente a

temperatura, energía de activación, efecto de inhibidores, y determinación de constantes catalíticas, entre otras cosas.

Con estos ensayos, se identificaron y caracterizaron dos proteasas, llamadas O1 y H2. O1, identificada como metaloproteasa M43, presentó una temperatura óptima de catálisis de 35°C, un pH óptimo en el rango 7,5-10,0, una energía de activación de 27,6 kJ mol⁻¹ y un valor de k_{cat} de 180 s⁻¹. La proteasa H2, identificada como serino proteasa S8, presentó una temperatura óptima de 40°C, pH óptimo en el rango 9,5-10,5, energía de activación de 47,9 kJ mol⁻¹, y un valor de k_{cat} de 174 s⁻¹.

Al ser comparados estos parámetros con las proteasas usadas actualmente en biotecnología, las proteasas H2 y O1 presentaron características que lleva a clasificarlas como enzimas psicrófilas, remarcando su eficiencia a bajas temperaturas, y su potencial uso industrial. Es por esta razón que a futuro, se propone evaluar la efectividad de estas enzimas en varios sustratos usados en la industria, así también como diseñar métodos de producción a mayor escala, utilizándose el trabajo de esta tesis como base para la aplicación biotecnológica de estas dos proteasas de bacterias antárticas.

