BIER13

**Bioprospección de enzimas en una biblioteca metagenómica construida a partir de sedimentos costeros de Bahía Ushuaia**

González, J.; Musumeci, M.; Lozada, M. y Dionisi, H.

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR, CCT CONICET-CENPAT). Email: jgonzalez@cenpat-conicet.gob.ar

Las comunidades microbianas que habitan ambientes marinos extremos resultan de particular interés para la bioprospección de enzimas. Un ejemplo de este tipo de ambientes es la zona intermareal cercana a la Planta de Combustibles Orión, en Bahía Ushuaia, Tierra del Fuego. Estos sedimentos están expuestos a cambios bruscos de temperatura, humedad y salinidad, alta radiación UV-B, contaminación crónica por hidrocarburos y bajas temperaturas gran parte del año. Dada a la imposibilidad de cultivar la mayoría de los microorganismos marinos, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental hemos clonado grandes fragmentos de los genomas de estos microorganismos utilizando fósmidos como vector. Esta biblioteca metagenómica contiene aproximadamente 46.000 clones con insertos de 35-45 Kb. A fin de facilitar la prospección de los genes de interés, la biblioteca fue secuenciada utilizando la plataforma Illumina HiSeq 1500. El ensamblado de las lecturas generó un set de datos conformado por 105 scaffolds y 7 x 105 secuencias codificantes, la mayoría de ellas completas. Estos genes se encuentran fácilmente accesibles, dado que pueden ser amplificados a partir de los fósmidos de la biblioteca.

El análisis bioinformático de la biblioteca mostró que la misma contiene fragmentos genómicos de organismos procariotas pertenecientes a 28 phyla, siendo los más abundantes Proteobacteria, Actinobacteria y Planctomycetes. La anotación de las secuencias codificantes utilizando la herramienta BlastKOALA indicó la presencia de 1,4 x 105 secuencias correspondientes a enzimas putativas, de casi 2.000 códigos EC diferentes. En el caso de las peptidasas, se identificaron más de 8.000 secuencias pertenecientes a 79 familias (clasificación MEROPS) y 7 mecanismos de catálisis. Utilizando dominios pfam, se identificaron 342 secuencias correspondientes a la subunidad mayor de hidroxilasas de compuestos aromáticos. Además, la herramienta dbCAN identificó 248 secuencias de alginato liasas de 7 familias de polisacárido liasas, y 7 secuencias de fucoidanasas de la familia GH107 (clasificación CAZy).

En base a análisis de contexto genómico, estructura primaria y/o modelado de la estructura tridimensional, se seleccionaros secuencias con rasgos de potencial interés para su expresión heteróloga. Tres hidroxilasas de hidrocarburos aromáticos fueron amplificadas, clonadas y expresadas en *Escherichia coli*, como así también sus respectivas proteínas transportadoras de electrones. Estas enzimas catalizan la adición estereo-específica de dos oxhidrilos en anillos aromáticos y resultan de interés para la industria química dado que producen compuestos con una quiralidad específica (llamados cis-dihidrodioles) en una simple etapa, que son utilizados como intermediarios en la síntesis de distintos fármacos. Respecto a las CAZymas, se clonaron en *E. coli* 2 enzimas alginato liasas pertenecientes a la familia PL5, las cuales fueron purificadas y mostraron capacidad de degradar alginatos mediante ensayos de actividad enzimática, y se están clonando 4 enzimas fucoidanasas. Estas CAZymas, las cuales actúan, respectivamente, sobre enlaces internos de los polisacáridos alginatos y fucoidanos purificados a partir de algas pardas, resultan de interés para la producción de oligosacáridos con propiedades bioactivas, con menor viscosidad y mayor absorción que los respectivos polímeros.