

# Desarrollo de biocatalizadores hidrofóbicos y termotolerantes mediante técnicas de evolución dirigida

## Development of hydrophobic and thermotolerant biocatalysts by directed evolution techniques

*Julia Raquel Acero R. \*, Leonardo Ivan Mogollón G.\*\**

### RESUMEN

La evolución dirigida se presenta hoy como una de las alternativas más efectivas en el desarrollo y adaptación de biocatalizadores a los requerimientos industriales. Este trabajo muestra el desarrollo de biocatalizadores más hidrofóbicos y termotolerantes útiles en procesos de biorefinación. Para la Industria del Petróleo. Se presenta la obtención de una segunda librería del gen de la enzima Cloroperoxidasa por Error-Prone PCR (EP-PCR) y la selección de los mejores mutantes de acuerdo con el grado de hidrofobicidad, termorresistencia y estabilidad en medios orgánicos. Estas proteínas fueron más activas que las obtenidas en la primera librería y que la proteína nativa. Se demuestra que esta técnica de evolución dirigida es eficiente en la generación de variedades enzimáticas de interés industrial.

Palabras clave: Cloroperoxidasa, biocatalizadores, enzima, error-prone PCR, evolución dirigida

### ABSTRACT

Directed evolution has emerged as one of the most effective approaches in developing and adapting biocatalysts to industrial requirements. This work shows the development of hydrophobic and thermotolerant biocatalyst useful in biorefining processes for the Petroleum Industry. We generated a second library of Cloroperoxidase enzyme gene by Error-Prone PCR (EP-PCR) with the selection of the best mutants based on their hydrophobicity, thermoresistance and stability in organic media. These proteins were more active than the first library mutants and the wildtype enzyme. We demonstrated that this directed evolution technique is efficient in generating chimeric libraries of enzymes of industrial interest.

Key words: Cloroperoxidase, Biocatalysts, Enzyme, Error-prone PCR, Directed Evolution

### INTRODUCCIÓN

La ingeniería de proteínas se ha fundamentado primordialmente en estudios de la estructura y homología de sus secuencias para realizar las modificaciones que a nivel biofísico o bioquímicos se requieren para su aplicación en procesos industriales. Sin embargo, el conocimiento sobre la relación estructura-función de las proteínas es aún insuficiente para tal fin. Recientemente se ha desarrollado la evolución dirigida de proteínas como alternativa experimental para la ingeniería de proteínas. Esta

técnica busca imitar la evolución natural e identificar los diferentes mecanismos de adaptación de las proteínas, se fundamenta en la realización de ciclos sucesivos de diversificación de la secuencia (mutagénesis y recombinación) y selección de proteínas con propiedades nuevas o mejoradas. Por tanto, no requiere el conocimiento previo de la secuencia o predicción de la estructura de la proteína para su manipulación (Arnold *et al.*, 2001). El uso de esta tecnología en el mejoramiento

---

\* PhD., Instituto Colombiano del Petróleo, Ecopetrol, Km 7 Autopista Piedecuesta, Piedecuesta, Santander. Tels.: 6740286-6740266. Fax: 6445444. e-mail: jacero@ecopetrol.com.co

\*\* MSc. Instituto Colombiano del Petróleo - Ecopetrol. e-mail: lmogollo@ecopetrol.com.co

genético de diversas proteínas ha sido ampliamente reportada (Reetz y Jaeger, 1999; Arnold, 1996). La enzima Cloroperoxidasa (CPO, EC: 1.11.1.10), producida por el hongo *Caldariomyces fumago*, cataliza un gran espectro de reacciones útiles en el desarrollo de Bioprocesos para las industrias agroquímica, farmacéutica y de refinación (Mogollón *et al.*, 1997). Algunas reacciones son dependientes de halógenos e incluyen halogenación de  $\beta$ -dicetonas, halohidratación de compuestos olefínicos y modificación de petroporfirinas. Las restantes, independientes de halogenación, son epoxidación estereoselectiva de aléanos y oxidación de sulfures a sulfóxidos. Esta enzima también cataliza la oxidación de alcoholes a aldehidos, aldehidos a ácidos y aminas a compuestos nitrosos, entre otras (Pickard *et al.*, 1991).

Recientemente, los trabajos de Lowell Hager muestran el mejoramiento genético de la CPO. Su grupo mostró la expresión de tres mutantes de la enzima que fueron resistentes al suicidio catalítico por alilbenceno y activas en medios orgánicos (Rai *et al.*, 2000, Rai *et al.*, 2001). Las mutantes fueron obtenidas después de tres y cuatro ciclos de mutagénesis utilizando Error-prone PCR (EP-PCR), una técnica de evolución dirigida que ha mostrado ser eficiente en el mejoramiento genético de diferentes proteínas (Zhao *et al.*, 1999). Este trabajo tiene por objeto el desarrollo de biocatalizadores de mejor desempeño en medios orgánicos útiles en procesos de la industria del petróleo. Se describe la obtención del segundo ciclo de mutagénesis por EP-PCR de la enzima CPO y la selección de los mutantes de acuerdo con el grado de hidrofobicidad, termotolerancia y estabilidad en medios orgánicos.

## METODOLOGÍA

**Microorganismos:** La cepa de *Caldariomyces fumago* ATCC 16373 es la cepa nativa utilizada para la preparación de esferoplastos y expresión de proteínas mutantes. Las cepas denominadas CPO A-144, CPO A-1441 y CPO A-2745 son cepas de *C. fumago* que expresan CPO mutadas obtenidas en el primer ciclo de mutagénesis de este estudio. Las cepas CPO B-111 a CPO B-1064 son las cepas de *C. fumago* expresando las mutantes del segundo ciclo de mutagénesis. La cepa de *E. coli* JM109 fue utilizada para la clonación y selección inicial de los genes mutados.

**Error-prone PCR:** Se prepararon cuatro reacciones diferentes de 50  $\mu$ l conteniendo 5  $\mu$ l de 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4  $\mu$ M de cada uno de los primers (*CPO starty CPO end*), 5 ng de DNA molde (gen de la CPO mutante A-144) y 2,5 unidades de AmpliTaq Gold (ROCHE). En la primera reacción se adicionó 1,0 mM dATP, 0,2 mM dCTP, 0,2 mM dTTP y 0,2 mM dGTP. En las demás reacciones se modificó el nucleótido que va en concentración de 1 mM (dCTP, dGTP y dTTP, respectivamente). Las ampliificaciones se llevaron a cabo bajo los siguientes ciclos: denaturación inicial a 96°C por 3 min seguido de 20 ciclos así: denaturación 96°C, 30 s; anillaje 57°C, 60 s; extensión 72°C, 1 min 20 s. Para finalizar se realizaron 10 ciclos así: denaturación 96°C, 30 s; anillaje 52°C, 60 s; extensión 72°C, 1 min 20 s con extensión final a 72°C por 10 min. Primer *CPO start*. 5'-TTC TCT ATC GAT GTT CTC CAÀ GG-3'. Primer *CPO end*: 5'-GCG GAT CCT TAA AGG TTG CGG GCC-3'.

**Ligación de los fragmentos mutados en el vector pTHC:** Los fragmentos obtenidos por EP-PCR fueron purificados a través de electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión con elución de las bandas de 1,3 Kb correspondientes al gen de la CPO y purificación en columnas *QIAquick gel extraction kif* (Qiagen, Chatsworth, CA). Los fragmentos fueron posteriormente digeridos con las enzimas *Bam* HI y *Cla* I (PROMEGA) para clonación en el vector pTHC previamente digerido con las mismas enzimas. Para cada reacción de mutagénesis se realizaron cuatro reacciones de ligación con relaciones equimolares inserto:vector de 1:1, 3:1, 9:1 y 20:1 utilizando T4 DNA ligasa de GIBCO-BRL. Se transformaron células competentes de *E. coli* JM109 con selección en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml) y se evaluaron diversos transformantes por restricción con las enzimas *Bam* HI y *Cla* I, y con la enzima *Sph* I.

**Transformación en *C. fumago*:** Se utilizó el protocolo descrito en Rai *et al.* (2001). En resumen, se prepararon esferoplastos de *C. fumago* por tratamiento con Novozima 234 (Calbiochem) y se ajustó su concentración a  $1 \times 10^5$  esferoplastos/ml. Se realizaron cinco transformaciones utilizando 100  $\mu$ l de esferoplastos y diferente concentración de ADN de plasmido guardando siempre una relación 30% ADN de plasmido circular y 70% ADN de

plasmido linearizado con *Sph* I. Los transformantes fueron seleccionados en medio SGMS con higromicina 0,5 mg/ml. Los transformantes resistentes a higromicina (3-5 días) se sometieron a una segunda ronda de digestión con Novozima y selección en higromicina. Se recuperaron los transformantes y se plaquearon en cajas de PDA para evaluación de los mutantes.

## SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE MUTANTES

**Obtención de proteínas:** De los 250 transformantes de *C. fumago* aislados se obtuvieron proteínas mediante fermentación en medio Fructosa Sales (Rai *et al.*, 2000), en cajas de 24 pozos mantenidas en agitación y oscuridad durante 10-15 días, al término de los cuales las proteínas fueron cosechadas, separando el sobrenadante por centrifugación a 4°C.

**Actividad halogenasa sobre la molécula de Monoclorodimedona (MCD) en medio acuoso:** La cinética con MCD fue determinada según lo descrito en Rai *et al.* (2001). Brevemente, se pone en contacto la enzima mutante con 100 µl de buffer Fosfato 100 mM, 30 mM KCl pH 2.75. Se adiciona el sustrato MCD en una concentración final de 0,575 mM y peróxido a una concentración de 2 mM. El seguimiento de la cinética se realizó mediante el decremento del valor de la absorbancia a 278 nm cada 5 s, durante un minuto. De esta manera es posible expresar la actividad MCD como la pendiente en la gráfica de variación de la concentración de MCD en el tiempo.

**Actividad halogenasa sobre la molécula de Monoclorodimedona (MCD) en medios orgánicos.** La cinética MCD en medio orgánico fue determinada según lo descrito en Mogollón *et al.* (1998). Brevemente, la reacción se realiza en un sistema ternario microemulsionado STM (Tolueno 15%, Isopropanol 60% y fase acuosa 25%). Los demás parámetros, en condiciones idénticas a las reacciones en fase acuosa. La cinética fue determinada mediante el decremento del valor de la absorbancia a 278 nm cada 5 s durante 3 minutos.

**Ensayo de estabilidad:** Se determinó la estabilidad de los mutantes en el medio STM, comparando su actividad MCD en STM en los siguientes rangos de tiempo: 0-180 s, 10-60 s, 40-120 s, y 120-170 s.

**Resistencia a fase orgánica:** Se incrementó la concentración de la fase orgánica presente en el STM: Tolueno 25%, Isopropanol 50% y fase acuosa 25%. Los demás parámetros de la reacción se mantuvieron en forma idéntica a los descritos.

**Termorresistencia:** Se tomaron 150 µl de cada una de las proteínas y se llevaron a un baño termostático a 50°C. Se tomaron alícuotas de 10 µl en los siguientes tiempos 0, 20, 40, 60 y 80 minutos y se evaluó su actividad MCD en fase acuosa de acuerdo con lo descrito. Los datos son interpretados mediante la comparación de la actividad MCD remanente en cada uno de los tiempos evaluados comparada con la actividad inicial.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Obtención de mutantes y expresión en *C. fumago*:** El gen de la enzima CPO fue amplificado por PCR a partir de la mutante A-144 utilizando los primers *CPO start* y *CPO end*, respectivamente. El fragmento obtenido fue eluido, purificado y sometido a un segundo ciclo de mutagénesis utilizando la técnica de EP-PCR. La técnica consiste en aumentar las probabilidades de error de la enzima *Taq polimerasa* durante las reacciones de amplificación llevadas a cabo en condiciones subnormales (diferentes concentraciones de nucleótidos y MgCl<sub>2</sub>), con el fin de generar variedad en la secuencia del gen. Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación, las reacciones de EP-PCR dieron origen a bandas de aproximadamente 1,3 Kb correspondientes al tamaño del gen. Los fragmentos fueron purificados, digeridos con las enzimas *Bam* HI y *Cla* I y clonados en el vector pTHC (Rai *et al.*,

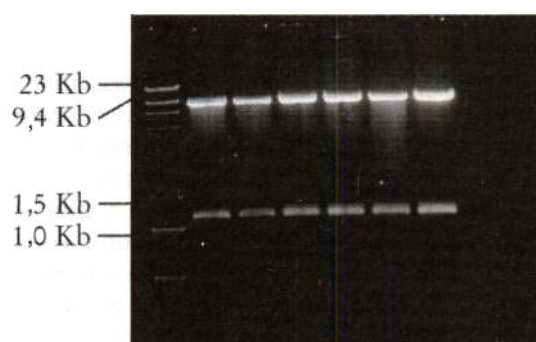


Figura 1. Análisis de restricción de los transformantes en *E. coli* con las enzimas *Bam* HI y *Cla* I

2000), vector apropiado para su selección en *E. coli* y posterior transformación en *C. fumago*. La transformación de células competentes de *E. coli* con el producto de las ligaciones en pTHC dio origen a una gran cantidad de transformantes resistentes a ampicilina, su análisis por restricción reveló la inserción de los genes mutados en el vector pTHC (véase figura 1).

Posteriormente, y con el fin de aumentar la variabilidad de genes a ser expresados en *C. fumago*, se realizaron mezclas de los transformantes en *E. coli*. Inicialmente se extrajo ADN de plásmido de las mezclas, se verificó la presencia de inserto por análisis de restricción con las enzimas *Bam* HI y *Cla* I que liberan el inserto, y con la enzima *Sph* I que lineariza los plásmidos recombinantes. Finalmente, este ADN fue utilizado para la transformación de esferoplastos en *C. fumago*. Para ello se utilizó una preparación de  $1 \times 10^5$  esferoplastos /ml, una concentración un poco más baja de lo reportado en los protocolos inicialmente descritos. Se procedió a realizar la transformación utilizando cinco preparaciones diferentes de ADN de plásmido (mezclas) guardando siempre una proporción de 70% de ADN linearizado (*Sph* I) y 30% ADN circular, con el fin de aumentar la eficiencia en la transformación y favorecer la integración de la secuencia en el genoma del hongo (Rai *et al.*, 2000). Las transformaciones dieron origen a colonias de *C. fumago* resistentes a la higromicina con crecimiento de colonias entre los tres y cinco días de incubación. Incubaciones más prolongadas darían origen a la aparición de colonias de *C. fumago* nativas (no transformantes) que poseen resistencia basal a la higromicina. Los transformantes fueron sometidos a una segunda ronda de tratamiento con Novozima y resistencia a higromicina con el fin de confirmar la presencia de los genes de cloroperoxidasa mutados. La segunda selección dio origen a colonias de *C. fumago* igualmente resistentes a higromicina (3-5 días); estas colonias fueron aisladas y propagadas en cajas de 24 pozos con medio PDA para su evaluación y selección.

**Selección y análisis de mutantes:** El diseño de los ensayos de selección de mutantes es una de las etapas más importantes del proceso de evolución dirigida (Zhao *et al.*, 1999; Moore y Arnold, 1996). Una librería de mutantes debe ser seleccionada para aquellas funciones que interesan; por tanto, los ensayos deben ser lo más cercanos posibles a las propiedades deseadas. En este caso, para la aplicación de la CPO en procesos de la industria

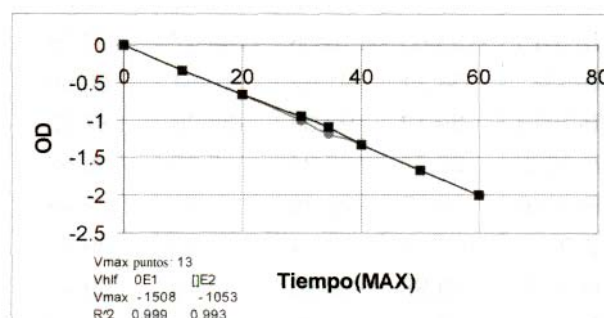
petrolera es importante evaluar la hidrofobicidad, estabilidad y termotolerancia de las enzimas mutadas en medios orgánicos.

## Fase 1

La primera selección de mutantes se realizó a partir de 250 colonias de *C. fumago* resistentes a higromicina. Los transformantes fueron crecidos en caldo fructosa sales, medio apropiado para la producción de la enzima cloroperoxidasa. En todos los casos se detectó actividad enzimática (halogenasa), y la concentración de proteínas estuvo en un rango entre 0,1 nM a 200 nM. Los ensayos de oxidación de MCD (acuoso y orgánico) se realizaron por triplicado; para el análisis de los datos y selección de mutantes se utilizaron los siguientes criterios: (i) comparación de las relaciones de actividad MCD en fase acuosa / actividad MCD en fase orgánica, y (ii) comparación de las relaciones de actividad específica de MCD en fase acuosa y fase orgánica.

Las cinéticas de oxidación de los transformantes fueron típicas de la enzima CPO en medio acuoso, esto es, reacciones rápidas con altas pendientes y desaparición completa del sustrato en un período de 2-30 segundos (véase figura 2).

La cantidad de proteína utilizada en cada caso fue determinada mediante una relación entre la actividad CPO en fase acuosa y la concentración de proteína. De los 250 transformantes evaluados, 165 (65%) tuvieron actividad en fase orgánica comparado con los transformantes del primer ciclo de mutagénesis donde tan sólo el 33% mostró actividad en fase orgánica. Esto puede indicar que en los transformantes del segundo ciclo, una sumatoria en las mutaciones fueron



**Figura 2.** Cinética de oxidación de MCD de los transformantes en medio acuoso.

favorables para el desarrollo de enzimas más hidrofóbicas. Los criterios utilizados fueron específicos para la selección de mutantes de la enzima CPO con hidrofobicidad mejorada, manifiesta en el incremento de la actividad MCD en sistema ternario microemulsionado (STM) y un decremento de la actividad MCD en sistema acuoso. De esta manera, fueron seleccionadas las cepas CPO-B1014, CPO-B1015, CPO-B532, CPO-B1013 y CPO-B1032 como los mejores mutantes del segundo ciclo de mutagénesis en cuanto a hidrofobicidad se refiere. Con estas cepas se realizaron las pruebas correspondientes a la fase 2 del proceso de selección.

**Fase 2**

Las cepas preseleccionadas fueron sometidas a un conjunto de pruebas más específicas como son: estabilidad, termorresistencia y actividad en concentraciones crecientes de fase orgánica en el medio.

**Estabilidad:** Para la determinación de la estabilidad de las proteínas seleccionadas, se realizaron ensayos de actividad MCD en STM. Las cinéticas fueron evaluadas hasta los 3 min. de reacción. Para cada mutante se calculó una actividad global en el período (180 segundos) y se comparó con la actividad en los siguientes intervalos de tiempo: 10-60 s, 40-120 s y 120-170 s. Como criterio de comparación se realizaron los mismos ensayos para otros mutantes

**Tabla 1.** Estabilidad de las proteínas mutantes del segundo ciclo de mutagénesis.

Muestra	Actividad CPO en STM			
	0-180 s	10- 60 s	40-120 s	120-170 s
B-1014	-81.41	-144.42	-110.09	32.37
B-1015	-195.63	-210.36	-169.47	-137.75
B-532	-34.21	-91.62	19.54	-50.69
B-1013	-39.12	-93.33	-32.08	87.23
B-1032	-38.77	-102.34	-5.25	-36.52
B-1046	-18.37	-28.38	-7.80	22.48
B-231	-104.85	57.54	-77.83	-39.79
B-1034	-69.98	-28.50	-0.45	59.41
B-421	0.45	21.35	1.23	1.17
B-412	-17.97	27.78	11.87	-43.32

del segundo ciclo: CPO-B1046, CPO-B231, CPO-B1034, CPO-B421, CPO-B412. Los resultados aparecen en la tabla 1. Los resultados mostraron que las proteínas mutantes preseleccionadas como las más activas en fase orgánica también fueron más estables en este medio comparado con los reportes de las enzimas del primer ciclo de mutagénesis (Rai *et al.*, 2001). La proteína nativa tiene una estabilidad de dos segundos en el STM, mientras que las mejores mutantes del segundo ciclo mantuvieron su actividad durante los 180 segundos evaluados.

**Termorresistencia:** La termorresistencia fue evaluada como la actividad MCD en medio acuoso remanente en cada proteína después de su exposición a una temperatura de 50°C durante diferentes períodos de tiempo (20, 40, 60 y 80 min.). La termorresistencia de las proteínas mutantes del primer ciclo mantuvieron entre el 8% y el 42% de su actividad, y la CPO nativa mantuvo el 50% de su actividad. Los mejores resultados fueron obtenidos para las proteínas del segundo ciclo, CPO-B1015 y CPO-B532, que mantuvieron el 100% de su actividad (véase figura 3).

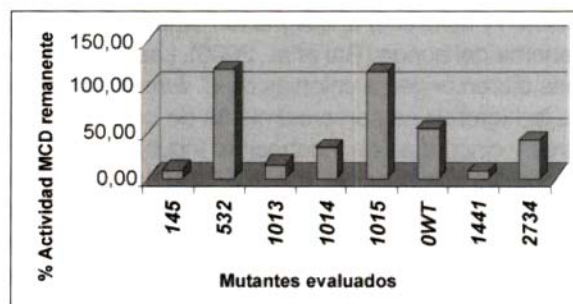


Figura 3. Termorresistencia. Porcentaje de actividad MCD remanente después de 80 min de exposición a 50°C. Las proteínas del primer ciclo son la A145,1441 y 2734. Las proteínas del segundo ciclo son B532,1013,1014 y 1015. WT: corresponde a la proteína nativa.

**Actividad en concentraciones crecientes de fase orgánica:** Para estimar el efecto del incremento en la concentración de la fase orgánica en el medio de reacción, se aumentó la concentración de tolueno en el medio (STM), de 15% a 25%. Para el análisis de los resultados se tomaron tres pendientes de generación de producto (oxidación) medidas en el intervalo de 0 a 270 s. El incremento de la fase orgánica en el medio de reacción implica condiciones de reacción más severas, requiriéndose mayor

hidrofobicidad y estabilidad de las enzimas. Los resultados indican que las enzimas seleccionadas en el segundo ciclo muestran una alta reactividad en el medio orgánico comparadas con las enzimas del primer ciclo y con la enzima nativa. Estos resultados deben ser corroborados con el cálculo de constantes catalíticas y actividad específica. Las evaluaciones realizadas hasta el momento indican que los mejores mutantes del segundo ciclo (CPO B-532, B-1013, B-1014, B-1015) son entre 80 y 200 veces más activas en medio orgánico que la enzima nativa (véase tabla 2).

Estudios similares muestran evidencia de que un incremento en el número de aminoácidos apolares en la superficie de las enzimas mejora su desempeño en medios orgánicos (Arnold *et al.*, 2001). En este caso, de las sustituciones reportadas para las proteínas del primer ciclo, la sustitución de la Cisteína 29 resultó clave en el incremento de la actividad MCD en fase orgánica (Rai *et al.*, 2000). Ahora bien, como las proteínas del segundo ciclo provienen de la mutante A-144, se espera que en las proteínas del segundo ciclo permanezca la mutación en la Cisteína 29 y además presenten algunas sustituciones de aminoácidos apolares en la superficie de las enzimas.

Las proteínas del segundo ciclo evaluadas fueron CPO B-532, B-1013, B-11014, B-1015. Las protei-

ñas del primer ciclo evaluadas fueron CPO A-145, A-1441 y A-2734. La muestra WT es la proteína nativa.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La ingeniería de proteínas busca entender las bases moleculares e interacciones estructura-función, así como la creación de nuevas proteínas para aplicaciones particulares. Son pocos los reportes en la obtención de enzimas con funciones estrictamente nuevas; la mayoría de estudios se centra en la modificación y optimización de las funciones existentes en la proteína nativa. La enzima Cloroperoxidasa, por su parte, resulta promisorio para el desarrollo de diversos procesos biotecnológicos; sin embargo, algunas de sus propiedades pueden ser modificadas con el fin de ampliar su espectro de aplicación. Este estudio muestra que el proceso de evolución dirigida de la CPO por EP-PCR es efectivo en la búsqueda y desarrollo de características mejoradas de la enzima como son su estabilidad, hidrofobicidad y termorresistencia. Ensayos complementarios de cada mutante permitirán determinar de manera cuantitativa las variaciones en estos parámetros.

El hecho de que la proporción de mutantes con actividad en fase orgánica fue mayor en el segundo ciclo de mutagénesis que en el primero, sugiere que una sumatoria de mutaciones puntuales puede ser responsable por el desarrollo de las nuevas propiedades. Este efecto acumulatorio ha sido verificado en otras enzimas donde sustituciones puntuales de aminoácidos no ejercen efecto en el mejoramiento de su actividad, pero la acumulación de múltiples mutaciones durante varias generaciones de mutagénesis aumentaron drásticamente su actividad en medios orgánicos (Moore y Arnold, 1996).

En cuanto a la termorresistencia, se determinó que las proteínas B-1015 y B-532 mantienen el 100% de su actividad después del tratamiento térmico. La CPO nativa, por su parte, sólo mantiene un 50% de su actividad original, y las proteínas del primer ciclo mantienen en el mejor de los casos el 40% de su actividad original (mutante A-2734). En este sentido, estudios de adaptación térmica muestran diferencias en cuanto a secuencia, estructura y función de las enzimas en diferentes ambientes, por lo cual ha sido difícil asignar cambios específicos en sus secuencias en este tipo de adaptaciones.

**Tabla 2.** Actividad de las proteínas mutantes en STM con 25% de tolueno.

Muestra	Actividad MCD/STM	Proteína (nM)	Actividad MC /STM/ Proteína (nM)
B-145	-52,94	0,91	-58,47
B-532	-39,90	0,31	-128,86
B-1013	-56,93	0,68	-83,72
B-1014	-43,26	0,42	-102,65
B-1015	-64,30	0,31	-209,80
A-1441	-36,54	10,62	-3,44
A- 2734	5,17	0,85	6,10
WT		120,00	-0,83

Como complemento, y por la naturaleza del sistema de expresión en *C. fumago* (Rai *et al.*, 2000; Rai *et al.*, 2001), las proteínas mutadas son coproducidas con la enzima nativa en una concentración que puede alcanzar el 30% de la concentración de proteína presente en el producto de fermentación. Por ello es necesario realizar estudios complementarios de separación y caracterización de las proteínas mutadas utilizando cromatografía de exclusión, así como realizar la secuenciación de los genes mutados con el fin de identificar los residuos importantes en el desarrollo de la termorresistencia e hidrofobicidad de la enzima Cloroperoxidasa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ecopetrol y al Instituto Colombiano del Petróleo (ICP) por el apoyo técnico y económico para el desarrollo de este estudio. La primera fase del estudio se desarrolló como parte de un convenio de cooperación técnica entre el ICP y la Universidad de Illinois, bajo la supervisión del doctor Lowell Hager del Departamento de Bioquímica de esa Universidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arnold, F. H., Wintrode, P. C., Miyazaki, K. & Gershenson, A. 2001. How enzymes adapt: Lessons from directed evolution. *Trends in Biochem. Sci.* 26:100-106.
- Arnold, F. 1996. Directed evolution: Creating biocatalysts for the future. *Chemical Engineering Science* 23:5091-5102.
- Mogollón, L., Rodríguez, R., Larrota, W., Ortiz, C. & Torres, R. 1998. Biocatalytic removal of nickel and Vanadium from petroporphyrins and asphaltenes. *Appl Biochem and Biotechnol.* 70-73: 765-777.
- Mogollón L., Rodríguez, R., Larrota, W., Ortiz, C. & Torres, R. Fraccionamiento y desmetalización biocatalítica de asfaltenos de crudo Castilla. 1997. *Ciencia, Tecnología y Futuro.* 3:109-121.
- Moore, J. C., Arnold, F. H. 1996. Directed evolution of para-nitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nature Biotechnol.* 14: 458-467.
- Pickard, M. A., Kadima, T. A. & Carmichael, R. D. 1991. Chloroperoxidase, a peroxidase with potential. *J. Ind. Microbiol.* 7: 235-242.
- Rai, G. P., Sakai, S., Flórez, A. M., Mogollón, L., Hager, L. 2001. Directed Evolution of Chloroperoxidase for Improved Epoxidation and Chlorination Catalysis. *Adv. Synth Catal.* 343: 1-8.
- Rai, G. P., Zong, I., Hager, L. 2000. Isolation of directed evolution mutants of Chloroperoxidase resistant to suicide Inactivation. *Isr. J. Chem.* 40: 63.
- Reetz, M. T., Jaeger, K. 1999. Superior biocatalysts by directed evolution. *Topics in current Chemistry.* 200:31-55.
- Zhao, H., Moore, J. C., Volkov, A. A. & Arnold, F. H. 1999. Methods for Optimizing Industrial Enzymes by Directed Evolution. En: *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology.* 2nd Ed. Demain, A. L., Davies, J. E. ASM Press, Washington, D.C., 597-604.