



## APLICACIÓN DE CUTINASAS RECOMBINANTES EN LA DEGRADACIÓN DE POLICAPROLACTONA

**Magdalena Sánchez-Sánchez**, Carolina Peña-Montes y Amelia Farrés-González. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Avenida Universidad, 3000, México D.F., 04510. Correo electrónico: [carolpm@unam.mx](mailto:carolpm@unam.mx)

*Palabras clave: cutinasa, policaprolactona, degradación*

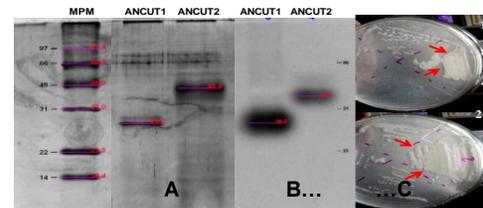
**Introducción.** La poli-caprolactona (PCL) se utiliza como aditivo o para la generación de plásticos, además para la realización de prótesis médicas (1). Se ha reportado el uso de polímeros sintéticos y biodegradables como sustratos de enzimas como las cutinasas (2). En el grupo de trabajo se han estudiado dos cutinasas: ANCUT1 y ANCUT2. Los genes de estas dos enzimas se han aislado, clonado y expresado exitosamente en *Pichia pastoris* (3, 4).

En el presente proyecto se trabajó con las cutinasas recombinantes y se evaluó el potencial de estas enzimas en la degradación de poliésteres, empleando como modelo al polímero PCL.

**Metodología.** Se realizó la expresión de las enzimas de acuerdo a lo descrito en el manual del sistema de expresión ("Easysselect manual", Invitrogen). Se prepararon geles SDS-PAGE de acuerdo a Laemmli, se evaluó actividad de esterasa en zimogramas y cuantitativamente utilizando acetato de  $\alpha$ -naftilo ( $\alpha$ -NA) como sustrato (5). La proteína se midió por Bradford de acuerdo al protocolo del proveedor (BioRad). Se prepararon cajas con el medio BMG y PCL para obtener un ensayo preliminar de hidrólisis. La reacción de hidrólisis se llevó a cabo en viales con 50 mg de películas de PCL, buffer (fosfafos, 50 mM, pH 7) y la enzima (ANCUT1 ANCUT2). La determinación de condiciones óptimas, se realizó variando pH (7,8 y 9) y temperatura (T) (30, 40, 50 y 60°C). El grado de degradación de las películas se determinó restando el peso inicial del peso final después de la reacción y por microscopía electrónica de barrido (SEM).

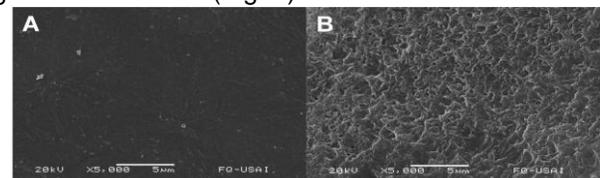
**Resultados.** Las cutinasas en el extracto crudo de las clonas se observaron en geles SDS-PAGE, así como su actividad "in situ" en zimograma (Fig. 1). Se realizó un ensayo preliminar para ver si las clonas recombinantes que contenían las cutinasas ANCUT1 y ANCUT2 podían degradar PCL, para lo cual se crecieron e indujeron con metanol en cajas. Las dos clonas presentaron halos de hidrólisis después de 168 horas (h) (Fig.1). Se observó que el control (cepa silvestre de *P. pastoris*) no desarrolló halos.

Los extractos crudos concentrados (1:5) de ANCUT1 y ANCUT2 se utilizaron para la reacción de hidrólisis de las películas de PCL.



**Fig. 1.** Panel A: Perfil proteico de extractos crudos de *P. pastoris* recombinante en SDS-PAGE teñido con plata. Panel B: Zimograma con actividad de esterasa utilizando  $\alpha$ NA. Panel C: Evaluación preliminar de degradación de PCL con ANCUT1 (1) y ANCUT2 (2).

Se encontró por pérdida de peso, que ANCUT1 degrada a las 24 h casi el 44% de PCL y el 72% a las 72 h. La cutinasa ANCUT2 por el contrario, únicamente pudo degradar el 5 % de PCL después de 72 h. Posterior a la optimización de las condiciones de pH y T con ANCUT1, se presentó una mayor degradación (49%) a pH 9 y 40°C a 24 h. En el caso de ANCUT2 no se observó un aumento. Los análisis de SEM confirmaron la degradación de PCL (Fig. 2).



**Fig. 2.** Fotografía de degradación de PCL por SEM después de 24 h con ANCUT1, (A) 0 h y (B) 24 h.

**Conclusiones.** La cutinasa ANCUT1 es una alternativa interesante para aplicarse en la degradación de poliésteres, dado que en este ensayo modelo mostró que puede degradar eficientemente la PCL. La optimización de la degradación mostró un aumento usando tiempos más cortos.

**Agradecimiento.** Colegio de Profesores de la Facultad de Química y Sección 024 de la AAPAUNAM por la cátedra otorgada y proyecto PAPIIT-UNAM (IN217414).

### Bibliografía.

1. Hsien-Yi L, Hsuan-Ting, Yi-You H. (2010). *Artif Organs*. 34: 648-653.
2. Sulaiman S, Yamato S, Kanaya E, Kim JJ, Koga Y, Takano K, Kanaya S. (2012). *Appl. Environ. Microbiol.* 78(5):1556-62
3. Morales-García, S. (2015). Tesis de licenciatura. En revisión. Facultad de Química, UNAM.
4. Solís-Báez, I. (2015). Tesis de licenciatura. En revisión. Facultad de Química, UNAM.
5. Karpushova A, Brümmer F, Barth S, Lange S, RD Schmid. (2005). *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 59-69.