

IDENTIFICACIÓN Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE ENZIMAS QUE INTERVIENEN EN LA MINERALIZACIÓN DEL PET

Braulio Alan Castro Solano¹, Mara Mile Vivanco Sosa¹ y Carolina Peña Montes^{1#}, ¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Veracruz. Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos UNIDA. Veracruz, Ver. MÉXICO CP 91897, # carolina.pm@veracruz.tecnm.mx.

Palabras clave: Enzimas, mineralización, PET

Introducción. El tereftalato de polietileno (PET) es utilizado en la fabricación de fibras textiles sintéticas y botellas de plástico¹. Al término de su vida útil, este producto termina en el medio ambiente pudiéndose fragmentar hasta etilenglicol y ácido tereftálico TPA². Siendo este último considerado un xenoestrógeno³. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue identificar enzimas de microorganismos que intervienen en la mineralización del PET como las citocromo P450 y expresar una de ellas en *E. coli*.

Metodología. Se realizaron análisis bioinformáticos en los genomas de bacterias y hongos, para identificar genes anotados de enzimas probables para la degradación de TPA. Se evaluó la degradación de TPA⁴ y la cinética de producción de enzimas oxigenasas por *Aspergillus*, utilizando TPA al 0.5 %p/v. Se determinó la actividad reductasa⁵ y proteína⁶. Se seleccionó el gen *phacA* de *Aspergillus* para la expresión heteróloga en *E. coli* utilizando el vector de expresión pET-22b(+). Las clonas positivas por PCR de colonia se cultivaron en LB con inducción para la expresión de PHACA con IPTG. Por último, se realizó la cinética de producción de enzimas oxigenasas determinando actividad reductasa y proteína. Asimismo, se obtuvo un modelo estructural para la enzima recombinante en el programa Robetta con el algoritmo RoseTTAFold.

Resultados. Se encontró anotado el gen *phacA* con un 100% de identidad en las bases de datos que contenían su genoma, se determinó una degradación de TPA de 56 % para *A. nidulans* a las 168 horas y 67.4 % para *A. terreus* a las 120 horas. Se obtuvo una actividad de 29.54 μ katal/mL a las 48 horas y 23.83 μ katal/mL a las 120 horas. La cinética de producción de la enzima mostró la máxima actividad a las 5 horas de la inducción (33.15 μ katal/mL) (Fig. 1).

El modelo estructural obtenido, se validó obteniendo un QMEANDisco Global 0.58 \pm 0.05, puntuación MolProbity 2.82 y Ramachandran favorable de 97.38 %. La estructura obtenida presenta la topología de una Fenilacetato 2-hidroxilasa enzima citocromo P450 monooxigenasa (Fig. 2).

Conclusiones.

Se planteó una ruta metabólica probable para la despolimerización y mineralización de PET a partir de la información obtenida en la literatura. El análisis bioinformático permitió la identificación de enzimas dioxigenasas en diferentes géneros de bacterias que llevan a cabo la mineralización del TPA. No se encontraron genes de enzimas para la mineralización de TPA en los genomas de hongos *Aspergillus* y *Alternaria*. Sin embargo, se identificaron genes que codifican para enzimas Citocromo P450 que degradan compuestos aromáticos. Se comprobó que los hongos del género *Aspergillus* tuvieron capacidad para crecer en presencia de TPA, presentando actividad enzimática. Se expresó en *E. coli* el gen *phacA* que codifica una citocromo P450 monooxigenasa en *A. nidulans* que está implicada en la mineralización de compuestos aromáticos.

Agradecimiento. A CONACYT por brindarme la beca con número de apoyo 760722 y por financiar el proyecto (A1S47929).

Bibliografía.

- ¹Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I and Yamaji H. (2016). *Science*. Vol (351):1196–1199.
- ²Castro, B.A., Peña, C., Valerio, G., Peralta, L.A., Sánchez, L.E. (2020). *Mineralización de políesteres contenidos en residuos plásticos*. Navarrete, F.E. Ave editorial. México. pp 111-126.
- ³Luciani, M.G., Moore, D.H., Goodson III, W.H. (2015). *Carcinogenesis*. Vol. 36(1): 168-176.
- ⁴Vázquez-Alcántara, L., Oliart-Ros, R. M., García-Bórquez, A., & Peña-Montes, C. (2021). Expression of a Cutinase of *Moniliophthorororeri* with Polyester and PET-plastic residues degradation activity. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e00976-21.
- ⁵Mingot, J.M., Peñalva, M.A and Fernández, J.M. (1999). *J. Biol. Chem.* Vol. 274(21): 14545-14550.
- ⁶Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.* Vol. 72(1): 248-25

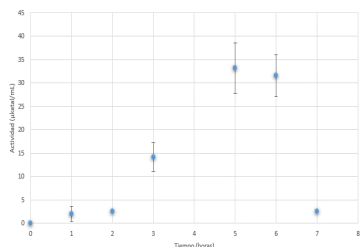


Fig. 1. Cinética de PHACA en *E. coli* BL21. Fig. 2 Modelo PHACA.