

ESTUDIO ESTRUCTURAL Y FUNCIONAL DE LA CUTINASA RECOMBINANTE AN CUT1 DE *Aspergillus nidulans* PARA LA DEGRADACIÓN DE PET

Augusto Castro¹, Adela Rodríguez², Rogelio Rodríguez-Sotres¹ y Amelia Farrés.¹ Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, 04510.² Instituto de Química, UNAM, Ciudad de México, 04510 jaugusto_09roca@comunidad.unam.mx

Palabras clave: Cutinasa, Biodegradación, Poliéster

Introducción. Los residuos de plásticos se acumulan en diversos ecosistemas, provocando un severo problema en el medio ambiente. Uno de los plásticos más utilizados en la industria de alimentos es poli (etilen tereftalato) (PET) constituido por etilenglicol y ácido tereftálico. Los procesos químicos y termomecánicos son las estrategias principales para reciclarlo. Actualmente se emplea la biocatálisis como una alternativa. Existe una variante empleando una variante de cutinasa que puede despolimerizar PET amorfo hasta un 90% (1). Otras enzimas que degradan el PET deben mejorarse para lograr resultados similares, específicamente la actividad hacia PET semicristalino y la termoestabilidad (2). El sistema cutinolítico de *Aspergillus nidulans* incluye a la enzima AN CUT1 (3), que ha demostrado que degrada el PET por pérdida de peso y disminución de la cristalinidad. Sin embargo, el rendimiento de monómeros es bajo y requiere un tiempo de reacción prolongado. El objetivo de este trabajo es mejorar la actividad de AN CUT1 por creación de variantes. Se realizó un estudio *in silico* para analizar la interacción de la enzima con un oligómero de PET y se identificaron los residuos que están implicados en la unión del sustrato y la eficiencia catalítica. Los resultados deberían conducir al desarrollo de biocatalizadores con una actividad mayor que la enzima silvestre.

Metodología. Rodríguez-Sotres (2021) construyó un modelo 3D de la AN CUT1 utilizando AlphaFold 2.0. Se validó y se minimizó el modelo. Se estudió la interacción del ligando (3PET) mediante acoplamiento molecular con AutoDock Vina, dinámica molecular (DM) con Gromacs 5.1.4 para la enzima libre y con el ligando. Se calculó la entropía usando mecánica molecular y métodos semiempíricos QM (SQM) de MOPAC, para calcular la entalpía y determinar el ΔG de unión. Se seleccionaron los residuos de interés y se hizo mutagénesis sitio dirigidas para producir las enzimas recombinantes en *E. coli*.

Resultados. El 3PET interacciona con 19 residuos de la hendidura que soporta el sitio activo de la AN CUT1. Cada anillo aromático se encuentra en un subsitio de unión (Fig. 1). L171 y N73 son residuos que pertenecen

al punto de reconocimiento (PR) del sitio activo, durante la DM estos residuos están en contacto todo el tiempo con el 3PET. Se observó una conformación cerrada del PR. Esto condujo a evaluar DM con iones (Na, Ca y Mg) que tienen un efecto en la actividad y la termoestabilidad (4). Se observó una conformación abierta en presencia de Mg y sitios de unión para este ion. Esto correlaciona con otro trabajo que se presenta durante el congreso (5). Una doble mutante (LN) podría permitir una conformación abierta que se reflejaría con un incremento en la actividad enzimática. Por otro lado, se obtuvieron colonias positivas después de la mutagénesis sitio dirigidas que están en proceso de comprobación.

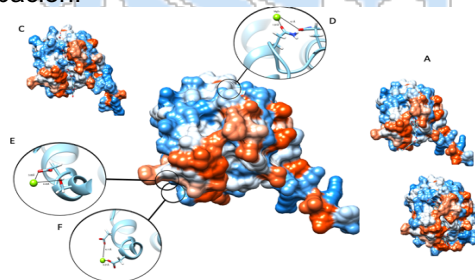


Fig. 1. Se observa la superficie hidrofóbica de la AN CUT1 (azul representa residuos hidrofílicos y rojo residuos hidrofóbicos), (A) conformación cerrada de AN CUT1, (B) conformación abierta de AN CUT1, (C) doble mutante de AN CUT1, (D-F) posibles sitios de unión a Mg^{2+} .

Conclusiones. Hay 3 sitios de unión potenciales para Mg que modifican la conformación de abierta a cerrada en el PR de la AN CUT1 y la interacción con el 3PET. La LN mejora la interacción con el 3PET sin la presencia de iones. Hasta el momento desconocemos si los iones tienen solo un efecto en la actividad enzimática, en la termoestabilidad o en ambos parámetros. Se requieren más experimentos para comprobar los resultados *in silico*.

Agradecimiento. PAIP 5000-9095, PAPIIT IN 201921 DGAPA, beca CONACYT 750551, PAEP.

Bibliografía. (1) Tournier, V, et al. (2020). Nature. Vol (580). 1-18. (2) Kawai, F, Kawabata, T y Oda M. (2019). Appl. Biochem. Biotechnol. Mini-review.1-16. (3) Bermúdez, E, et al. (2019) Appl Microbiol Biotechnol 103:3863-3874. (4) Castro, A, Rodríguez, R y Farrés, A. (2023). Catalysis. 13, 591. 1-24. (5) unamFrancoll.