

CARACTERIZACIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ANCUR1 DE ASPERGILLUS NIDULANS EN ESCHERICHIA COLI.

Diego-Amayol Adriana Guadalupe, González Ramírez, Karla Fernanda y Farrés, Amelia, Facultad de Química, UNAM, CDMX C.P. 04510, adrianadiego98@gmail.com, farres@unam.mx.

Palabras clave: tereftalato de polietileno, cutinasas, degradación enzimática.

Introducción. El tereftalato de polietileno (PET), debido a su abundancia y uso desmedido, es una preocupación global por su lenta o nula degradación natural (1). Actualmente, se buscan alternativas para su degradación en las cuales sea posible hidrolizar el PET en sus dos componentes, ácido tereftálico y etilenglicol, permitiendo una economía circular y sustentable (2). Las enzimas cutinolíticas se han empleado para degradar PET. *Aspergillus nidulans* codifica 4 genes para cutinasas, una de ellas es ANCUR1, que ha demostrado tener actividad esterasa degradadora de poliésteres (3). Dado que su producción es relativamente baja, se han buscado sistemas de expresión heterólogos. En este trabajo se explora *E. coli* como sistema de expresión heterólogo y como una potencial vía para obtener altos rendimientos en la producción de ANCUR1.

Metodología. Se construyó el vector pET22-ANCUT1. Se verificó la presencia de ANCUR1 por PCR y con él se transformó *E. coli Rosetta*. Se evaluaron diferentes condiciones de inducción y las seleccionadas fueron: inductor (IPTG 1mM), tiempo de inducción (3 h) y temperatura (22°C). Se esperaba la extracción de ANCUR1 de periplasma, por las características del vector. Se evaluó también la presencia de ANCUR1 en el medio extracelular, y al encontrarla, se emplearon diversas concentraciones de glicina (0.3% y 1.2%) para incrementar su secreción al medio extracelular.

Resultados.

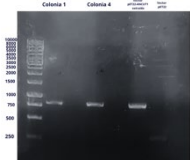


Fig. 1. Transformación de *E. coli* rosetta con el plásmido pET22-ANCUT1. Gel de agarosa 1%. Presencia del inserto del gen de ANCUR1 en las colonias 1 y 4. Control (+): Vector pET22-ANCUT1 extraído. Control (-): Vector pET22 vacío.

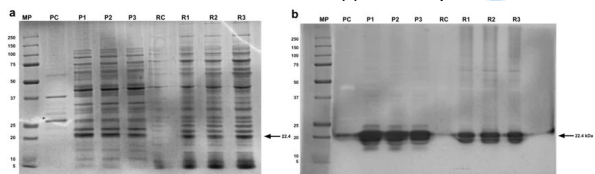


Fig. 2. a) Perfil proteico de ANCUR1 a las 3h de inducción con IPTG (1mM). PM: marcador de peso, PC y RC: Periplasma y restos celulares control respectivamente, P1,P2,P3 y R1, R2 y R3:

Periplasma y restos celulares muestras respectivamente. b) Zimograma de actividad de ANCUR1 a las 3 h de inducción con IPTG (1mM). PM: marcador de peso, PC y RC: Periplasma y restos celulares control, P1,P2,P3 y R1, R2 y R3: Periplasma y restos celulares muestras.

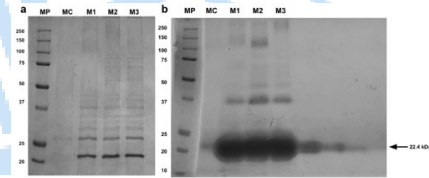


Fig. 3. Evaluación de la presencia de ANCUR1 en medio extracelular. a) Perfil proteico de ANCUR1 a las 3 h de inducción con IPTG (1mM). PM: marcador de peso, MC: Medio extracelular control, M1,2 y 3: Medio muestras. b) Zimograma de actividad de ANCUR1 a las 3 h de inducción con IPTG (1mM). PM: marcador de peso, MC: Medio extracelular control, M1,2 y 3: Medio muestras.

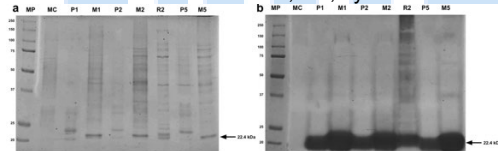


Fig. 4. Evaluación de diferentes concentraciones de glicina en el incremento de secreción de ANCUR1 al medio extracelular. a) Perfil proteico de ANCUR1 a las 3h de inducción con IPTG (1mM), con y sin glicina. PM: marcador de peso, MC: Medio extracelular control, P1 y M1: Periplasma y medio ANCUR1 sin glicina. P2, M2 y R2: Periplasma, medio y restos celulares ANCUR1 glicina (0.3%), P5 y M5: Periplasma y medio ANCUR1 glicina (1.2%).

Tabla 1.

Comparación de actividad volumétrica y actividad específica en medio extracelular sin y con glicina.

Muestra	Actividad volumétrica (U/mL)	Actividad específica (U/mg)	Proteína (mg)
Medio control	20.07	669.48	0.029
Medio ANCUR1 sin glicina	789.06	12,191.9	0.064
Medio ANCUR1 (glicina 0.3%)	1,710.15	22,109.05	0.0739
Medio ANCUR1 (glicina 1.2%)	2,910.64	32,431.3	0.0937

Conclusiones. La cutinasa ANCUR1 de *A. nidulans* se expresa extracelularmente en *E. coli* Rosetta, y los niveles de secreción se favorecen con el uso de glicina a una concentración de (1.2%).

Agradecimiento. PAIP 5000-9095, PAPIIT IN 201921 PAEP, CONACYT CVU 1225554 (DA) 929805 (RKF)

Bibliografía.

- Young, J., Yu, O., Dong, K., Gyeong, E., Jae, S. (2021) Elsevier. Vol (195): pág1-pág2.
- Kawai, F., Kawabata, T., Oda, M. (2020). ACS. 8, 24, 8894-8908.
- Bermúdez, E., Peña, C., Martins, I., Pais, J., Silva, C., Sánchez, S. & Farrés, A. (2019). Appl Microbiol Biotechnol.