

OBTENCIÓN DE UNA VARIANTE DE LA CUTINASA MRCUT1 PARA LA DEGRADACIÓN DE POLIÉSTERES

Laura Vázquez Alcántara y Carolina Peña Montes*.
Técnicos de Nivel Nacional de México (UNIDA), Veracruz, Ver. C. P 2779.
carolina.pm@veracruz.tecnm.mx

Palabras clave: cutinasas, poliésteres, halotolerancia

Introducción. Las cutinasas son enzimas producidas por hongos fitopatógenos, las cuales son responsables de hidrolizar el poliéster natural llamada cutina, debido a su actividad, han tenido aplicación en industrias como alimentaria, detergentes, síntesis de aromas y en la actualidad se han utilizado para la degradación de poliésteres como PET, PES, PCL, entre otros (1). La mayoría de estas enzimas degradadoras no tienen la capacidad de mantener actividad en temperaturas, pH y concentraciones de sales altas, lo que limita su aplicación por ejemplo en la degradación de contaminantes de aguas residuales de la industria textil. Por esta razón se han realizado mutaciones en sus secuencias logrando modificar su estructura y sus propiedades. La enzima MRCUT1 ha sido previamente expresada y caracterizada, presenta actividad en un rango de temperatura de 30-40 °C, pH de 6-9 y en NaCl por debajo de 0.1% (2). En este trabajo se realizó el mejoramiento de la cutinasa recombinante de *Moniliphthora roreri* MRCUT1.

Metodología. La selección de aminoácidos diana para la modificación del gen de la cutinasa *mrcut1* se realizó utilizando las herramientas bioinformáticas Pymol, Raptor X, Robetta, I-Tasser, Avogadro, Caviar y HDOCK Server. Se realizó la síntesis de la variante del gen y se clonó en el vector pET22. La construcción pET22*vmrcut1* se utilizó para transformar *E. coli* BL21 para la expresión de la variante. Las clones transformadas se seleccionaron por crecimiento en medio LB con Ampicilina 100 µg/mL(3). Las clones positivas en una PCR de colonia se cultivaron con inducción para la expresión de la variante con IPTG. La expresión de la VMRCUT1 se determinó mediante análisis del perfil proteico, zimograma, western-blot y cuantificación de actividad de esterasa en el extracto crudo (EC) de la cepa recombinante que contiene el vector pET22*vmrcut1* (2). Se evaluó la actividad enzimática en presencia de diferentes concentraciones de NaCl (0.05 - 0.25 %) y temperaturas (30- 80 °C). Se determinó el número de tioles disponibles con el reactivo de Ellman. Finalmente, se determinó la degradación de microplásticos de diversos poliésteres por pérdida de peso, acidez titulable y SEM (2).

La actividad de esterasa fue determinada por la cuantificación de producción de *p*-nitrofenol (2).

Resultados. Se realizaron las siguientes modificaciones de aminoácidos: Arginina (R-74) por Cisteína (C-74) y Fenilalanina (F-89) por Cisteína (C-89) confirmando la generación de un puente disulfuro. Se obtuvo el perfil proteico en el extracto crudo de la cepa recombinante de *E. coli* con el gen de la variante *vmrcut1* (Figura 1) donde se observan señaladas las bandas de peso correspondientes con el valor teórico de la variante (19.28 kDa). El análisis de interacción proteína-proteína mostró la formación de dímeros, lo cual se relaciona con la disminución de actividad específica de VMRCUT1 con respecto a MRCUT1 (2).

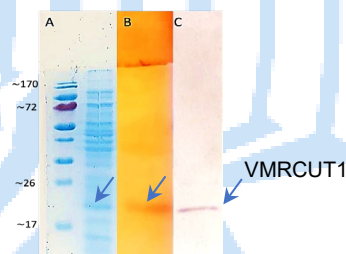


Fig. 1 Expresión de la variante VMRCUT1. Panel **A)** Perfil proteico del EC teñido con Comassie, **B)** Zimograma y **C)** Western blot.

La variante VMRCUT1 presentó actividad en un rango de temperatura (40- 80 °C) y concentración de NaCl (0.05-0.1%), en ambos casos se mejoró el rango de presencia de actividad con respecto a la enzima recombinante MRCUT1 reportada (2). En cuanto a la estabilidad a la temperatura, la variante fue estable en un rango de 30 a 80 °C durante 1 hora y en pH de 8-10 durante 3 h. Los resultados obtenidos de la degradación de poliésteres muestran una mayor degradación (29 %) para succinato de polietileno (PES), seguido de poliláctico (PLA) y policaprolactona (PCL). Además, se observó una mayor degradación de PET con respecto a la MRCUT1.

Conclusiones. Se obtuvo la variante VMRCUT1 mediante cambio de dos aminoácidos obteniéndose un puente disulfuro que le dio estabilidad a la enzima

e incrementó las interacciones hidrófobas claves para incrementar su tolerancia a pH alcalinos, así como su termo- y halotolerancia. En cuanto a la degradación de poliésteres por VMRCUT1 con respecto a MRCUT1, con la variante se incrementó para PES, PLA, PCL y PET; disminuyendo para BHET, PEN y PBGT.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada durante el Doctorado a LVA y el financiamiento del proyecto A1-S-46929.

Bibliografía.

1. Castro, D., Peña, C., y Farrés, A., 2010. Producción y características de cutinasas: una alternativa interesante para biocatálisis a nivel industrial. *Ciencias Químico-Biológicas*, 13 (1), 16-25.
2. Vázquez-Alcántara, L., Oliart-Ros, R. M., García-Bórquez, A., & Peña-Montes, C. (2021). Expression of a Cutinase of *Moniliophthora roreri* with Polyester and PET-plastic residues degradation activity. *Microbiology Spectrum*, 9(3), e00976-21.
3. Manual de pET system. Novagen. 11va ed. 1-80.

