

CARACTERIZACIÓN BIOINFORMÁTICA DE CYP450 ASOCIADAS A BIOCONVERSIÓN DE *d*-LIMONENO EN *Aspergillus niger*

KUCHURAK, Maria Jose. ^{a, b}; CHELALICHE, Anibal. S. ^{a, b}; VELÁZQUEZ, Juan. E. ^{a, b}; ZAPATA, P. ^{a, b}; FONSECA, Maria. I. ^{a, b}.

1. Universidad Nacional de Misiones. Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales. Instituto de Biotecnología Misiones “Dra. María Ebe Reca” (INBIOMIS) Laboratorio de Biotecnología Molecular. Misiones, Argentina.

2. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

*kuchurakmariajose@gmail.com

INTRODUCCIÓN

Los terpenoides constituyen uno de los grupos más diversos de metabolitos secundarios, con amplio valor en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. En particular, el *d*-limoneno ($C_{10}H_{16}$), un monoterpene abundante en aceites esenciales cítricos, puede ser bioconvertido en compuestos de mayor valor agregado como el α -terpineol ($C_{10}H_{18}O$), un terpenoide de gran interés comercial.

En este contexto, los hongos filamentosos, especialmente *Aspergillus niger*, han demostrado **capacidad para bioconvertir terpenos**; sin embargo, las enzimas responsables de dicho proceso no han sido completamente caracterizadas, limitando su aprovechamiento biotecnológico.

OBJETIVO

Identificar y caracterizar las familias enzimáticas candidatas involucradas en la bioconversión de *d*-limoneno a α -terpineol mediante la integración de herramientas bioinformáticas aplicadas al análisis comparativo de genomas de *A. niger*.

RESULTADOS

Se identificaron un total de **341 secuencias proteicas** en las vías de los terpenos, siendo **83 enzimas “core”** englobadas dentro de las **terpeno ciclasas**, y **258 enzimas accesorias** denominadas **“no core”**, dentro de las cuales se destacaron las **Citocromo P450 monooxigenasas**, por su potencial rol en **modificaciones estructurales de terpenos** (Figura 1, 2 y 3).

Familias de Citocromo P450 monooxigenasas

CYP5068C

- Dominios de mayor extensión
- Predominantemente citoplasmáticas
- Sin señales de direccionamiento

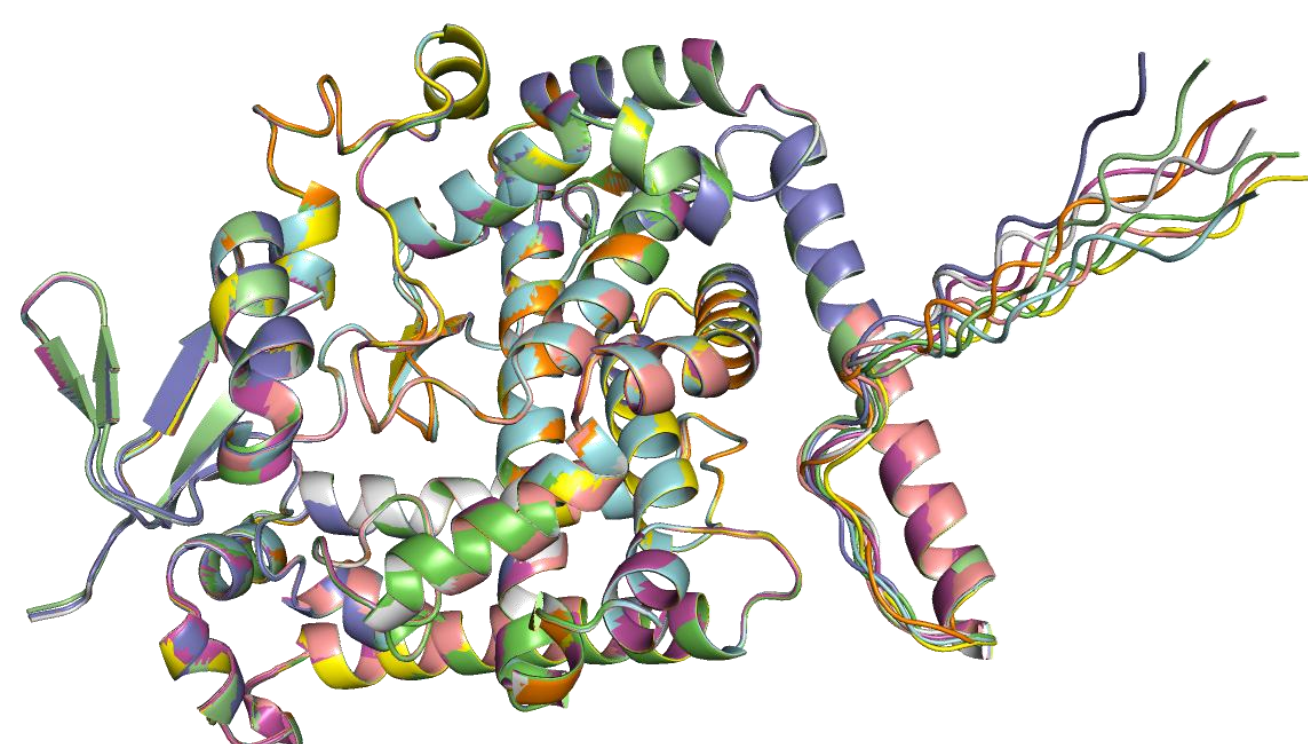


Figura 1. Alineamiento estructural de 9 citocromos pertenecientes a la familia CYP5068C

CYP65AN

- Dominios de extensión media
- Localización citoplasmática
- Asociación parcial a membrana

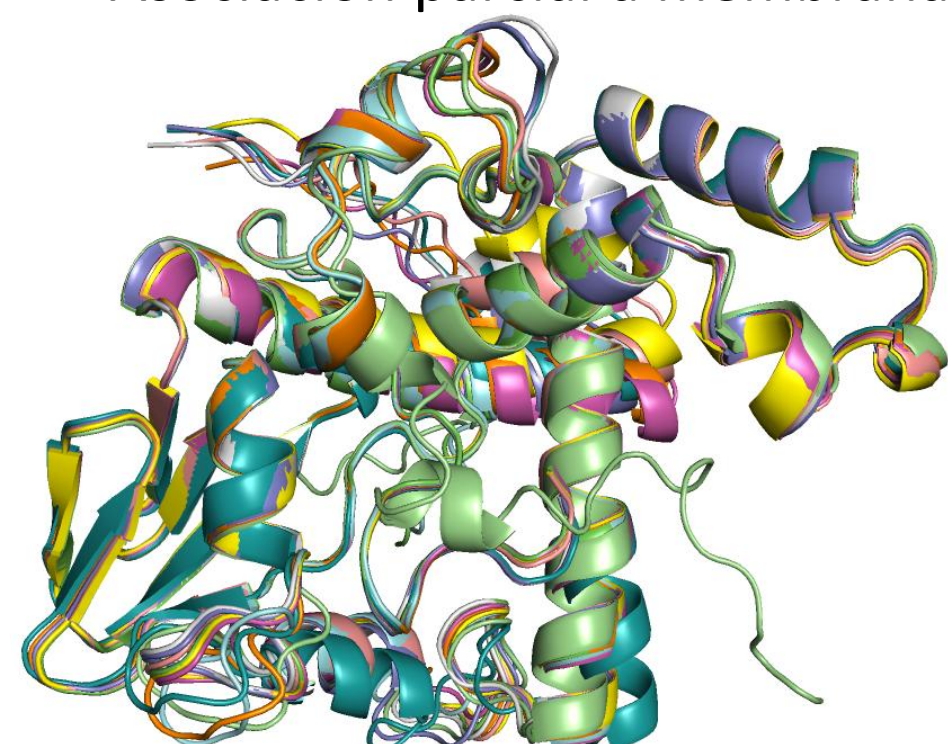


Figura 2. Alineamiento estructural de 10 citocromos pertenecientes a la familia CYP65AN

CYP5182A

- Dominios de extensión media
- Localización preferente en retículo endoplasmático
- Presencia de péptido señal y dominios transmembrana

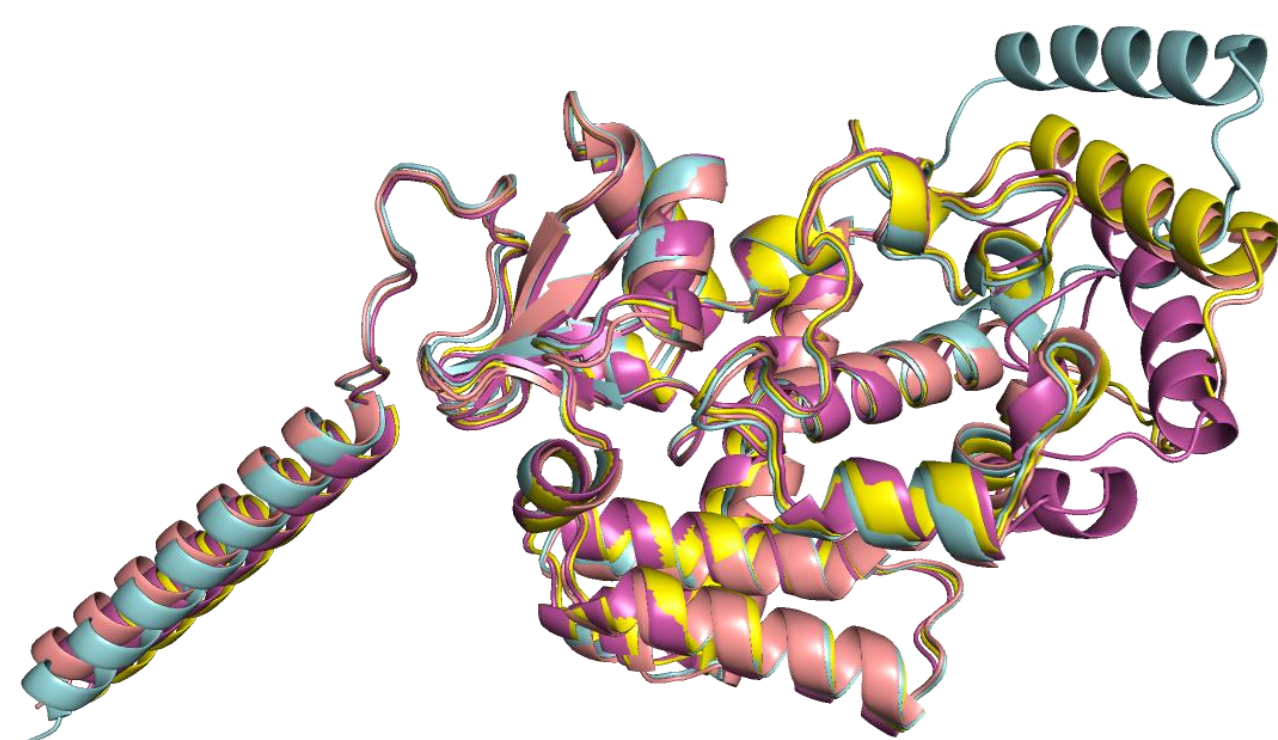


Figura 3. Alineamiento estructural de 4 citocromo pertenecientes a la familia CYP5182A

Los estudios de acoplamiento molecular evidenciaron diferencias en la afinidad de unión, la orientación del sustrato y la proximidad al centro catalítico entre las familias analizadas (Tabla 1).

En particular, las enzimas de la familia CYP5182A mostraron los perfiles de interacción más favorables con *d*-limoneno (Figura 4 y 5).

Tabla 1. Resultados del acoplamiento con VINA Docking de Hemo y *d*-limoneno de familia CYP5182A, representado por la Energía libre de Gibbs en kcal/mol, y distancia medida en ángstrom (Å). Fe: hierro, L: *d*-limoneno

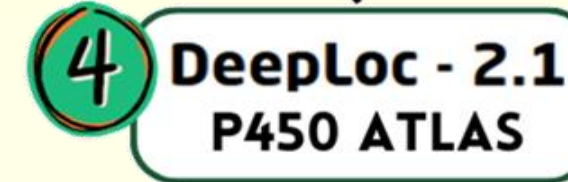
Número de modelado	Genoma	Familia	Sitio unión Hemo	Acoplamiento del Hemo	Acoplamiento de <i>d</i> -limoneno	Distancia en Å del Fe-L
13	GCA_029783905.1	CYP5182A	CYS 298	-3.313	-6.984	3.9
24	GCF_003184595.1	CYP5182A	CYS 298	2.311	-6.740	3.9
10	GCA_024862975.1	CYP5182A	CYS 298	-6.431	-6.221	4.1
16	GCA_029783925.1	CYP5182A	CYS 298	-4.084	-4.952	3.5

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis de 10 genomas de *A. niger* del NCBI

Confirmación las familias a las que correspondían

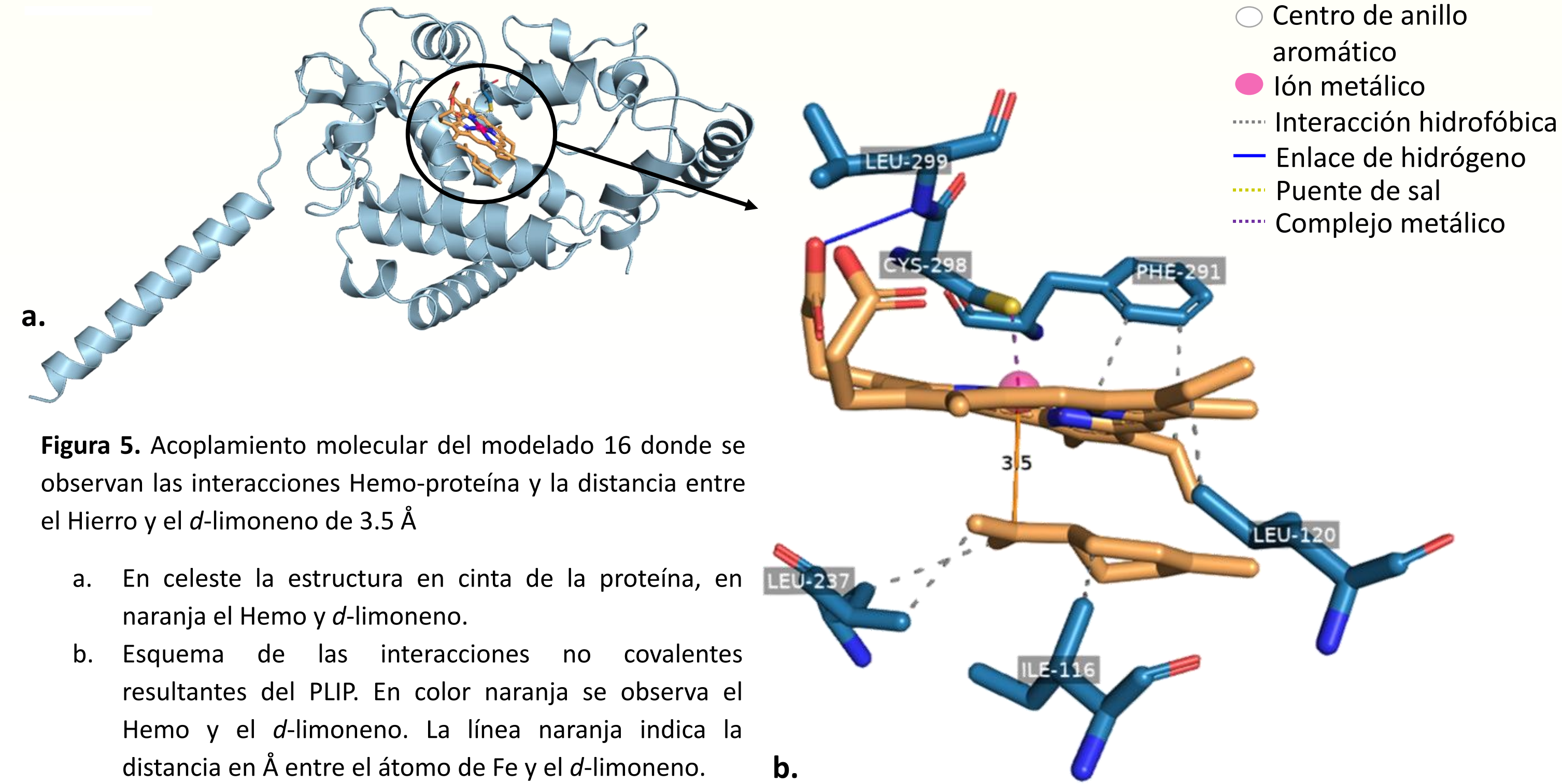
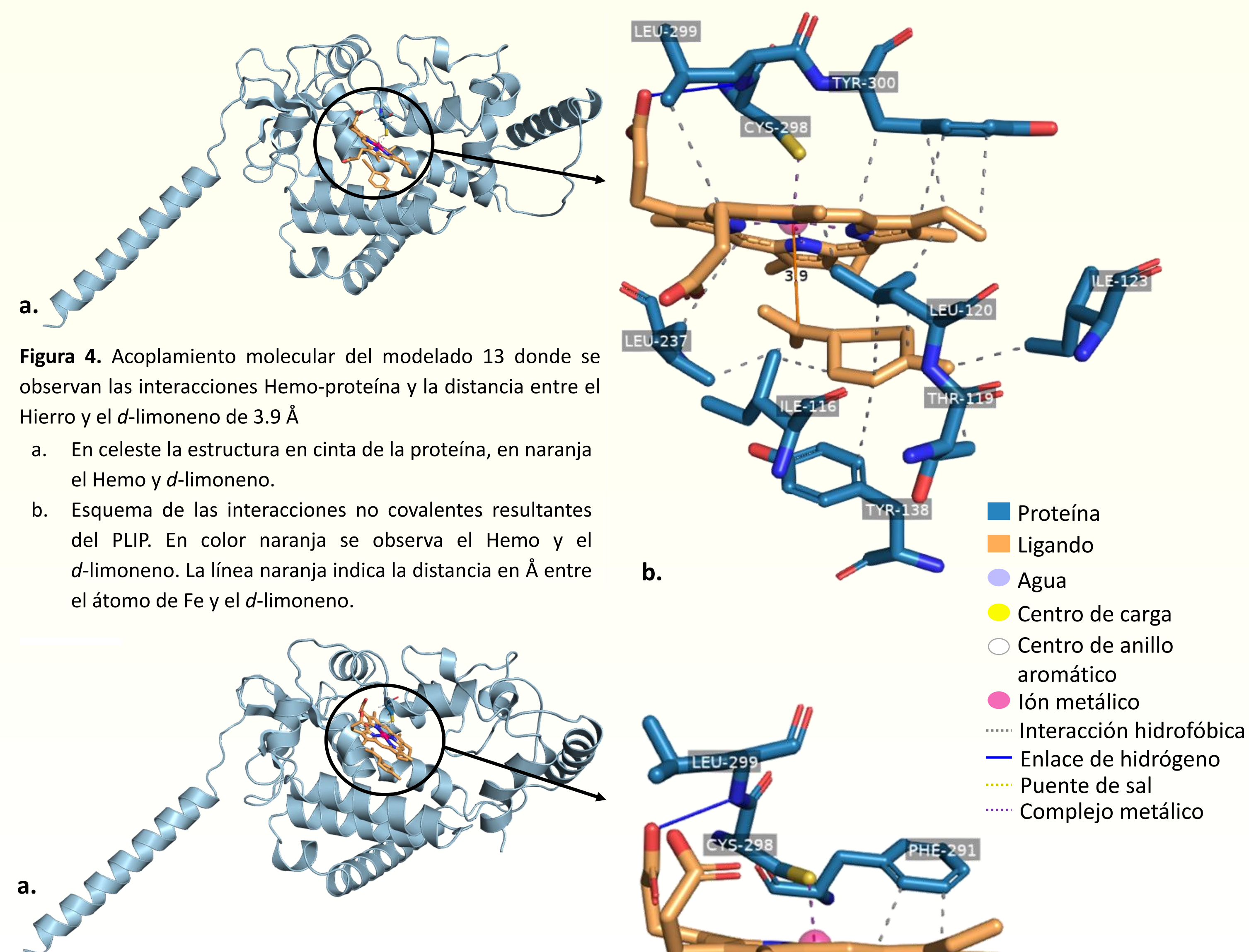
Predicción de su estructura
Realización del acoplamiento molecular proteína-hemo y *d*-limoneno



Identificación los grupos de genes biosintéticos de metabolitos secundarios

Predicción de su localización subcelular
Clasificación de las enzimas

Análisis de las interacciones no covalentes



CONCLUSIÓN

En conjunto, el análisis genómico y la integración de las herramientas bioinformáticas evidenció una gran diversidad estructural y funcional de las citocromo P450 en *A. niger* presentes en las vías metabólicas de los terpenos, confirmando la existencia de perfiles diferenciales entre las **familias CYP5068C, CYP65AN y CYP5182A**.

A partir del análisis del acoplamiento molecular se logró observar que **la familia CYP5182A mostró los perfiles de interacción más favorables con el *d*-limoneno**, exhibiendo afinidades de unión entre -6.984 y -4.952 kcal/mol y distancias óptimas al centro catalítico (3.5 – 4.1 Å). Estos resultados permiten priorizar a esta familia como la candidata principal para futuros estudios y el desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas a la producción de compuestos aromáticos.