



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO FACULTAD
DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y
BIOTECNOLOGÍA**



CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Análisis Filogenético de Estructura y Genoma de enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniero Bioquímico, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Andrés Benjamin Garcés Cifuentes

Tutor: PhD. David Andrés Terán Mera

Ambato-Ecuador

Enero-2021

APROBACIÓN DEL TUTOR

David Andrés Terán Mera, PhD.

CERTIFICA

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación bajo la modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, de la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, 6 de enero de 2021

David Andrés Terán Mera, PhD.

C.I. 1716569726

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Garcés Cifuentes Andrés Benjamín, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Bioquímico, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Andrés Benjamín Garcés Cifuentes

C.I. 180419238-1

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para Constancia firman

.....

Presidente del tribunal

.....

PhD Liliana Cerda Mejía

C.I. 1804148086

.....

PhD William Calero Caceres

C.I 1714348859

Ambato, 7 de enero de 2021

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación de investigación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en líneas patrimoniales de mi Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este Proyecto dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Andrés Benjamín Garcés Cifuentes

C.I. 180419238-1

AUTOR

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Adela y Guillermo por su incondicional apoyo.

A mis hermanos Daniel, Alejandra y Paul, capaces de enseñar lo que ciertos docentes no.

A Belén y Jorge, por la guía de sus respectivas áreas profesionales.

A Myriam.

AGRADECIMIENTOS

“Un hombre va al conocimiento como va a la guerra: Bien despierto, con miedo, con respeto y con absoluta confianza. Así, al perder una batalla no volverá derrotado, sino con gloriosos recuerdos. Ir a la guerra o al conocimiento de cualquier otra forma es un error fatal. Cuando el hombre cumple estos cuatro requisitos, sus acciones pierden la torpeza de un necio. Si un hombre así fracasa, no habrá lamentaciones lastimosas, solo habrá perdido una batalla.”

-Louis Pauwels & Jacques Bergier

1971

Quiero agradecerle a mi tutor David Terán, a Liliana Cerda y a Mario García. He aprendido mucho más en los pocos meses de trabajo presencial con ellos que en mis primeros años de carrera. Su guía, apoyo, paciencia y amabilidad fueron invaluable, así como las lecciones aprendidas.

A mi familia, el fundamento de mi persona.

Agradezco también a varios compañeros y profesores, a través de quienes aprendí lo esencial del ámbito social y de mi propia naturaleza. Estén conscientes o no, muchos sirvieron de inspiración.

A todos aquellos quienes me reconocieron, me ofrecieron su amistad y ampliaron mis perspectivas, los que siguen aquí y los que partieron. Gracias.

También soy grato con mi persona. Por saber no rendirme y seguir adelante a pesar de mis demonios, a quienes también agradezco por enseñarme sobre mí mismo.

INDICE DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	iii
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iv
DERECHOS DE AUTOR	v
DEDICATORIA.....	vi
AGRADECIMIENTOS.....	vii
INDICE DE TABLAS.....	x
INDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPITULO I.....	15
1. MARCO TEÓRITO.....	15
1.1. Antecedentes Investigativos.....	15
1.2. Objetivos	21
CAPITULO II	22
2. METODOLOGÍA.....	22

2.1.	Materiales.....	22
2.2.	Análisis filogenético.....	26
2.3.	Análisis Estructural	31
2.4.	Análisis de interacción ligando-receptor	35
2.5.	Análisis de actividad enzimática.....	39
CAPITULO III.....		28
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
3.1.	Análisis Filogenético.....	28
3.2.	Análisis Estructural	37
3.3.	Análisis de interacción ligando-receptor	45
3.4.	Análisis de Actividad Enzimática	55
CAPITULO IV.....		57
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
4.1.	Conclusiones	57
4.2.	Recomendaciones.....	58
MATERIALES DE REFERENCIA.....		59
Referencias Bibliográficas		59
Anexos		71
Extracción de Plásmidos.....		71
Archivos adjuntos de SDS-PAGE.....		72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Equipos de laboratorio	22
Tabla 2 Reactivos químicos Grupo CEDIA.....	23
Tabla 3 Reactivos Laboratorio de Canje de Deuda.....	24
Tabla 4 Equipo Personal	25
Tabla 5 Alineamiento de Secuencias en mafft.....	27
Tabla 6 Alineamiento de Secuencias en Pymol	33
Tabla 7 Alineamiento de estructuras en PyMol	34
Tabla 8 Edición de archivos PDB y Configuración de sesión en Autodock Tools.....	36
Tabla 9 Preparación de Archivo de ligando	36
Tabla 10 Preparación de Macromolécula.....	37
Tabla 11 Parámetros de Grid.....	37
Tabla 12 Parámetros de docking	38
Tabla 13 BLAST NCBI.....	29
Tabla 14 Resultados de Análisis de Homología de PET hidrolasa y varias enzimas	32
Tabla 15 Reporte de Modelos	37
Tabla 16 Reporte de modelaje en SWISS-MODEL.....	39
Tabla 17 Cargas parciales y totales.....	47
Tabla 18 Coordenadas AutoGrid 4.2.6.....	48
Tabla 19 Parámetros de Docking	48
Tabla 20 Información de Conformación	49
Tabla 21 Resultados de Extracción de Plásmidos.....	55
Tabla 22 Pesos Iniciales y finales discos de PET.....	59
Tabla 23 Receta caldo de Lisogenia.....	71
Tabla 24 Receta medio sólido de Lisogenia.....	71
Tabla 25 Soluciones para Extracción de ADN por medio de lisis alcalina.....	72
Tabla 26 Concentración de gel necesaria para concentración de proteína.....	72
Tabla 27 Preparación de gel de corrido.....	73
Tabla 28 Preparación de gel de stacking.....	73

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Alineamiento de secuencias donde se visualiza el sitio activo desde la caja lipasa.	30
Figura 2 Árbol filogenético general, circular, sin raíz de la base de datos de Uniprot ...	33
Figura 3 Árbol filogenético general, sin raíz de la base de datos de NCBI para comparación de PETasa de <i>I. sakaiensis</i> con especies similares.	34
Figura 4 Resumen de reconstrucción de secuencia ancestral Nodo 0. En el eje y se encuentra la cantidad de microorganismos (N°MO) y en el eje x la respectiva clasificación.....	35
Figura 5 Resumen de reconstrucción de secuencia ancestral Nodo 16. En el eje y se encuentra la cantidad de microorganismos (N°MO) y en el eje x la respectiva clasificación.....	36
Figura 6 Triada Catalítica de PETasa. Enzima PETasa representada en estructura hélices α - hoja plegada β de color gris, residuos catalíticos representados en sticks de color blanco, verde naranja y azul de acuerdo a sus átomos.....	40
Figura 7 Residuos SD1 y SD2. Los residuos SD1 y SD2 están representados en sticks de color verde y azul. Enzimas representadas en estructuras de hélices α -hoja plegada β . PETasa de color gris, PbsA de color amarillo, DHL de <i>P. brachysporum</i> de color caramelo, DHL de <i>R. gummiphilus</i> de color celeste.	41
Figura 8 Representación de enzimas en forma de hélice α -hoja plegada β . La figura 8 ^a representa la enzima PETasa en colores rojo, amarillo y verde. La figura 8b representa la enzima PbsA en colores violeta, caramelo y celeste. La figura 8c representa la enzima DHL de <i>R. gummiphilus</i> de color violeta.	43
Figura 9 Representación de superficie de enzimas. La figura 9a representa la enzima PETasa en colores rojo, amarillo y verde. La figura 9b representa la enzima PbsA en colores violeta, caramelo y celeste. La figura 9c representa la enzima DHL de <i>P. brachysporum</i> en color celeste. La figura 9d representa a la enzima DHL de <i>R. gummiphilus</i> en colores violeta y verde.....	44
Figura 10 Complejo Proteína-Ligando DHL <i>P. brachysporum</i> Superficie Hidro-fóbica. Enzima representada en estructura hélice α -hoja plegada β . Monómero de PET	

representado en stick de color rojo. Residuos catalíticos representados en sticks de color gris, azul y rojo.....	50
Figura 11 Complejos Proteína-Ligando, Superficies Hidro-fóbicas. Enzimas representadas en estructura hélice α -hoja plegada β . Monómero de PET representado en stick de color rojo. Residuos catalíticos representados en sticks de color gris, azul y rojo.	51
Figura 12 PbsA-Ligando Complejo 1 Interacciones.....	52
Figura 13 DHL R. gummiphilus-Ligando Complejo 1 Interacciones	53
Figura 14 DHL P. brachysporum-Ligando Complejo 1 Interacciones	54
Figura 15 Cultivo E. coli rosetta pET21b(+)-Is-PETasa Ensayo N°1: 20 mM IPTG, 500 mL, 37°C, 24 h, 150rpm.	57
Figura 16 Cultivos E. coli rosetta pET21b(+)-Is-PETasa Ensayo N°2: 1 mM IPTG, volumen 1 L, 18 °C, 18 h, 180 rpm. Ensayo N°3: 1 mM IPTG, volumen 1 L, 37 °C, 2 h, 180rpm.	58

RESUMEN

Los estudios bioinformáticos realizados en el presente trabajo consistieron en análisis filogenético, modelaje de estructuras y docking molecular. En el análisis filogenético se alinearon más de 100 secuencias proteicas similares a la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Dicha información se utilizó para identificar secuencias similares que codifiquen para enzimas con posible actividad hidrolítica en PET. A través de este procedimiento se encontraron tres enzimas que cumplen con características similares. Las enzimas son Pbs de *Acidovorax delafieldii*, DHL de *Rizhobacter gummiphilus* y DHL de *Polyangium brachysporum*. El procedimiento de modelaje de estructuras se realizó para generar los modelos en 3D de las enzimas encontradas. Se utilizaron como molde diferentes enzimas cuya similitud fuera superior al 85 por ciento y su resolución de 1,8 Å. Como resultado se almacenaron archivos .PDB con de cada enzima estudiada. El procedimiento de docking molecular se basó en el uso de los modelos de enzimas en interacción con una molécula de PET para determinar su afinidad. Como resultado del ensayo se determinó la energía de fijación a través de un cálculo de cinética enzimática. Este valor es un buen indicador de afinidad enzima-sustrato.

Finalmente, se realizaron ensayos de extracción de plásmidos, transformación de células y análisis cualitativo de actividad enzimática en la línea celular de *E. coli* (rosetta). La importancia de este estudio radica en el descubrimiento de actividad PETasa en proteínas ya conocidas, lo que ofrece más opciones biotecnológicas al tratamiento de desechos de plástico que es un problema ambiental que se ha vuelto progresivamente una prioridad a nivel mundial.

Palabras clave: Estudios Bioinformáticos, Análisis Filogenético, PET, *Ideonella sakaiensis*, PETasa, docking, extracción de plásmidos, transformación celular, análisis de actividad enzimática, tratamiento de desechos plásticos.

ABSTRACT

The bioinformatic studies presented on this work consisted of phylogenetic analysis, structure modeling and molecular docking. On the phylogenetic analysis, more than a hundred identified sequences similar to PETase from *Ideonella sakaiensis* were aligned with it. Said information was used to identify high homology sequences that codify for enzymes with possible PET hydrolytic activity. Through this procedure three enzymes were found that meet similar features. The enzyme Pbs from *Acidovorax delafieldii* (PbsA), DHL from *Rizhobacter gummiphilus* and DHL from *Polyangium brachysporum*. Protein structure modelling was performed using SWISSPROT. This needed since the three enzymes did not possess a crystallographic model present on any database. The templates used for the modelling reported are resolution higher than 1.8 Å. The molecular docking procedure was performed through AutodockTools. A PET monomer was used as ligand. As result the fixation energies of each enzyme were determined through enzymatic kinetics calculations. This value is a good indicator of substrate-enzyme affinity.

Finally, plasmid extraction, cell transformation and qualitative analysis of enzymatic activity were carried out in the *E. coli* (rosetta) cell line. The importance of this study lies in the discovery of PETase activity in already known proteins, which offers more biotechnological options for the treatment of plastic waste, which is an environmental problem that has progressively become a priority worldwide.

Keywords: Bioinformatic studies, phylogenetic analysis, PET, *Ideonella sakaiensis*, PETase, docking, plasmid extraction, cell transformation, enzymatic activity analysis, plastic waste management.

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRITO

1.1. Antecedentes Investigativos

Un polímero es una molécula de tamaño superior compuesta por muchas unidades repetidas más pequeñas (monómeros) entrelazadas [1]. A lo largo del último siglo se han producido plásticos de propiedades deseadas como durabilidad, plasticidad y/o transparencia para añadirlos a productos consumibles [2]. En el caso específico de los poliésteres, cuyas repeticiones están unidas por enlaces éster de carboxilato, (su uso es muy común debido a los resultados de sus mezclas con otras fibras) han eliminado la necesidad de almidonar y planchar ropa para conseguir superficies de telas libres de arrugas[1].

El tereftalato de polietileno (PET) es uno de los plásticos más utilizados por su tremenda demanda para la fabricación de envases y textiles [3]. El uso de plásticos PET ha incrementado drásticamente debido a su bajo costo, ligereza, procesabilidad y por ser biológicamente inertes. Sin embargo, su no degradabilidad provoca que el plástico se acumule en grandes cantidades que contaminan océanos y otros ecosistemas [4]. En el año 2016 se generaron 2,01 billones de toneladas de desperdicios residuales a nivel mundial. Latinoamérica y el Caribe generaron alrededor del 11 % del total de residuos. De forma general, alrededor del 37 % de los desechos municipales se disponen en forma de relleno sanitario mientras que un 33 % es abiertamente arrojado, especialmente en países en vías de desarrollo. Solamente un 19 % de los desechos es sometido a procesos de reciclaje y compostaje y un 11 % es tratado por medio de procesos de incineración[5].

La gestión inadecuada de desechos plásticos es de particular preocupación si contamina el ecosistema marino. Se ha calculado que, durante el 2010, de 4.8 a 12.7 millones de toneladas métricas de desechos sólidos de plástico entraron a los océanos. Dichos datos solo constan de las ciudades costeras [6].

En Ecuador se generaron 4,06 millones de toneladas métricas en el año 2016. A nivel nacional dentro del mismo año, el 41,46 % de los hogares reportaron clasificar los residuos generados. Dentro de estas estimaciones, el 34,08 % de los residuos clasificados correspondieron al plástico [7].

La luz del sol y otros efectos del clima causan la fragmentación de los desechos plásticos en partículas milimétricas y micrométricas conocidas como microplásticos y nanoplásticos [6], consideradas contaminantes del medio ambiente [8]. Se cree que dichos materiales se asientan en el suelo marino, y son comúnmente ingeridos por animales [9]. Estos materiales pueden absorber y concentrar contaminantes presentes en el océano y transferirlos a través de la cadena alimenticia hasta los seres humanos por medio de especies marinas consumidas como alimento [10]. En estudios recientes se ha comprobado el consumo de microplásticos por parte de anfípodos en profundidades de 7,000 a 10,890 m [11].

Los microplásticos y nanoplásticos ingresan a ecosistemas terrestres por su fuente primaria (manufactura) como material particulado de aplicaciones médicas, electrónicas, cubiertas y adhesivos, o de forma indirecta como material generado del desprendimiento de desechos más grandes [12][13][14]. Las fuentes directas de microplásticos y nanoplásticos en agricultura incluyen el material de la infraestructura de invernaderos, envolturas de aditivos y hojuelas de poliestireno además del uso de aguas tratadas [12][15].

El tereftalato de polietileno (PET) es utilizado principalmente para fabricación de botellas, que son desechadas tras su uso ya que está probado que bacterias pueden crecer y proliferar dentro de ellas [16]. Los desechos de PET particularmente, pueden filtrar residuos como el ftalado, antimonio y otros [17].

Dichos residuos producen efectos adversos en organismos vivientes cuya severidad depende del nivel de exposición, ruta y periodo. Dichos efectos incluyen efectos inmunológicos, neurológicos, metabólicos y carcinogénicos culminando en la muerte [16] [18] [19].

Actualmente procesos químicos y mecánicos para el tratamiento de desechos plásticos figura un alto costo de ejecución [20][21] y es necesario estudiar con mayor profundidad las alternativas de biorremediación[22][23].

Las enzimas capaces de descomponer PET en sus bloques fundamentales podrían proveer una solución ecológica a la acumulación de PET en el medio ambiente [24]. En los últimos diez años, un número de enzimas de origen bacteriano capaz de degradar poliésteres sintéticos, incluyendo PET, han sido identificados [24]. Dichas enzimas se clasifican como cutinasas, lipasas y esterases que en su mayoría han sido encontradas en actinomicetos termófilos del género *Thermobifida* en particular [25]. Otro ejemplo raro incluye a miembros de los hongos filamentosos *Fusarium oxisporum* y *F. solani*, que han demostrado crecer en medios minerales contenidos en envases de PET, aunque sus niveles de crecimiento no han sido especificados [26]. En el año 2016, *Ideonella sakaiensis* 201-F6 fue descubierta y aislada de fuentes de desechos de PET en Sakai, Japón. La información respecto a la actividad y estructura de la enzima PETasa indica una actividad mucho mayor en la degradación de PET que las otras enzimas [27].

El PET, también conocido como Dacrón®, es el polímero del ácido tereftálico con etilenglicol. Solía prepararse mezclando el diácido con glicol elevando la temperatura para separar el agua de la reacción. Pero una mejor ruta es un proceso de transesterificación. La temperatura del éster dimetílico del ácido tereftálico se eleva a 150°C con etilenglicol. El metanol se libera como gas, que es producido al finalizar la reacción. El producto fundido se hila en fibra de Dacrón o se funde en una película de Mylar® [1].

Durante la década de 1940, el temprano trabajo de Carothers y sus compañeros en Estados Unidos determinó la capacidad del ácido tereftálico para

producir poliésteres de alto peso molecular a través de la reacción con dioles [28]. Al mismo tiempo, los descubrimientos de Winfield y Dickson establecieron el rendimiento de los diácidos aromáticos en producir material cristalino con la capacidad de formación de fibras con un alto punto de fusión [1]. Desde entonces, el tereftalato de polietileno se ha convertido en la fibra de mayor producción a nivel mundial [29].

Las botellas de PET pueden filtrar residuos como el ftalato, antimonio y otros [17]. A causa de la radiación solar y otros factores ambientales relacionados a alta temperatura, se cataliza la reacción de descomposición de PET que filtra pequeñas moléculas conocidas como microplásticos y nanoplásticos [16] [6], que son considerados contaminantes ambientales [8].

La Administración Nacional Oceánica y Atmosférica utiliza el parámetro de 5 mm de diámetro o menor para clasificarlos como microplásticos [30]. El término nanoplástico todavía se encuentra bajo debate. Algunos autores estiman el tamaño máximo de un nanoplástico a 1000 nm mientras que otros consideran que dicho material tiene un tamaño máximo de 100 nm [31]. Nanoplásticos de entre 1 y 100 nm pueden ser producidos por foto-degradación de recipientes de poliestireno y microplásticos, o pueden ser liberados directamente de fuentes domésticas e industriales [32][33][34].

Los procesos de degradación química son los únicos métodos aceptables para descomponer polímeros sintéticos de forma sostenible [35]. La depolimerización de PET puede resultar en la producción de monómeros o fragmentos de cadenas más largos que pueden involucrar al petróleo líquido y la producción de gases [36]. Dichos procesos como la hidrólisis ácida que involucra ácido sulfúrico produce residuos corrosivos peligrosos y grandes cantidades de sales inorgánicas y desechos acuosos [2]. Una alternativa que utilice ácido nítrico para la degradación de polvo de PET proveniente de botellas de plástico tardaría más[37]. Por otro lado, La hidrólisis alcalina requiere del uso de soluciones de

amonio [38] o hidróxido de potasio [39]. Dichos procesos requieren de un alto control de temperatura, concentración de solución alcalina y tiempo [40].

La hidrólisis neutra requiere de pH entre 3,5 y 4,0 [41] y es corrida a presiones de 1 a 4 MPa y temperaturas de hasta 300°C [42][43][44]. Además, la relación solución-sustrato varía entre 1:2 y 1:12 [2]. Sin embargo, este proceso no puede deshacerse de impurezas mecánicas dejadas tras dicho proceso, por lo que requiere de procesos de purificación como disolución en caprolactam o hidróxido de sodio [20][21] lo que aumentaría costos. Los polímeros sintéticos poseen una estructura base de carbono que es resistente a degradación hidrolítica y enzimática, de tal como que los microorganismos suelen ser incapaces de asimilar y mineralizar polímeros [45]. Por ende, la degradación de polímeros debe involucrar varios mecanismos incluyendo degradación foto-y termo-oxidativa para incrementar la cantidad de material de bajo peso molecular y la superficie de contacto[46][47] y experimentar un prolongado periodo de exposición ambiental y oxidación para que la biodegradación sea posible [47][48].

El peso molecular, la estructura molecular y morfología, hidrofobicidad, absorción de agua y superficie de los materiales de plástico tienen un impacto en su susceptibilidad a la biodegradación. Incluso los componentes de polietileno de bajo peso molecular sujetos a prolongados procesos de oxidación en condiciones aceleradas pueden ser solo parcialmente biodegradados [49].

Ideonella sakaiensis es capaz de utilizar PET como única fuente de carbono [27]. Dicha bacteria expresa una ruta enzimática completa para la biodegradación de PET con dos enzimas, PET hidrolasa (PETasa) y mono(2-hidroxietil) ácido tereftálico hidrolasa (MHETasa), con la habilidad para descomponer PET en monómeros no peligrosos para el ambiente como el ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol [50][51].

El genoma de *I. sakaiensis* 201–F 6 presenta un marco de lectura abierto, ISF 6_4831,

que codifica una lipasa que comparte el 51 % de su secuencia de aminoácidos y residuos catalíticos con una hidrolasa de *Thermobifida fusca* que exhibe actividad hidrolítica en PET [52].

Basándose en la clasificación de enzimas y la comprensión de su forma de actuar, se define a la recientemente descubierta enzima PETasa como una cutinasa. Hidroliza PET en ácido bis(2-hydroxyethyl) tereftálico, ácido mono(2-hydroxyethyl) tereftálico y ácido tereftálico. Los resultados de la Investigación de Kohen demuestran que PETasa de *I. sakaiensis* posee una preferencia catalítica a PET sobre esteres alifáticos a diferencia de las hidrolasas de *T. fusca*, y *F. solani*, [27] [53].

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Realizar el Análisis filogenético y estructural de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

1.2.2. Objetivos específicos

- Construir un árbol filogenético donde corresponda la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* con estructuras de esterasas y lipasas de origen filogenético cercano.
- Analizar las estructuras proteicas de enzimas con mayor similitud a PETasa de *Ideonella sakaiensis*.
- Generar una hipótesis sobre la evolución de las PETasas.

CAPITULO II

2. METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Recursos Tecnológicos

Tabla 1 Equipos de laboratorio

Equipo	Marca y Modelo	Ubicación
Cámara de flujo laminar	OPTIMAIR	Laboratorio de Canje de Deuda
Refrigerador	LG	Laboratorio de Canje de Deuda
Agitador Vortex	Labnet/Vx200	Laboratorio de Canje de Deuda
Ultra-refrigeración	Binder	Laboratorio de Canje de Deuda
Autoclave	HIRAYAMA/HV-110	Laboratorio de Canje de Deuda
Incubadora	Isotherm	Laboratorio de Canje de Deuda
Balanza	Adventurer Pro	Laboratorio de Canje de Deuda
Titulador potenciómetro	Mettler Toledo/G20	Laboratorio de Canje de Deuda
Balanza analítica	Mettler Toledo/Xpe204	Laboratorio de Canje de Deuda
Espectrofotómetro	Thermo Scientific evolution/201	Laboratorio de Canje de Deuda
Espectrofotómetro para placas	Fisher Scientific accSkan GO	Laboratorio de Canje de Deuda
Mini-PROTEAN Tetra Cell	BIO-RAD	Laboratorio de Canje de Deuda

2.1.2. Reactivos

Tabla 2 Reactivos químicos Grupo CEDIA

Reactivo	Estado	Ubicación			
Cloruro de Sodio 500g	Cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Etanol 100 % 2,5L	Abierto	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Extracto de levadura 500g	Cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Ortofosfato di-hidrogeno de potasio 500g	1 abierto	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Peroxisulfato de sodio anhidro 500g	Cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Polvo de agar 500g	Cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Peptona de caseina 500g v	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Triptona 1 Kg	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Nitrato de sodio 250g	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Ftalato monobásico de Potasio 100g	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Isopropil-B-1-D-Tiogalactosidasa (IPTG) 1g	1 abierto	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Chloramphenicol 5g	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Sulfato de Kanamicina de Streptomyces 5g	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			
Ampicilina 5g	cerrado	Laboratorio	de	Canje	de
		Deuda			

Tabla 3 Reactivos Laboratorio de Canje de Deuda

Reactivo	Código	Ubicación
Agar LB	230	Laboratorio de Canje de Deuda
Cloruro de Calcio di hidratado	670	Laboratorio de Canje de Deuda
Extracto de Levadura	120	Laboratorio de Canje de Deuda
Ácido Sulfúrico	560	Laboratorio de Canje de Deuda
Ampicilina	580	Laboratorio de Canje de Deuda
Azul brillante	615	Laboratorio de Canje de Deuda
Kanamicina	620	Laboratorio de Canje de Deuda
Cloranfenicol	660	Laboratorio de Canje de Deuda
Cloruro de Calcio	c62	Laboratorio de Canje de Deuda
D-Glucosa	710	Laboratorio de Canje de Deuda
DNS	740	Laboratorio de Canje de Deuda
Fosfato de ácido de potasio	180	Laboratorio de Canje de Deuda
Glicerol	820	Laboratorio de Canje de Deuda
Triptona	140	Laboratorio de Canje de Deuda
Triss	980	Laboratorio de Canje de Deuda
Ultra Pure Triss	1020	Laboratorio de Canje de Deuda
Dodecilsulfato sódico	-	Laboratorio de canje de Deuda
Acrilamida	-	Laboratorio de canje de Deuda
EDTA	-	Laboratorio de canje de Deuda
Acetato sódico	-	Laboratorio de canje de Deuda
Persulfato de Amonio	-	Laboratorio de canje de Deuda
TEMED	-	Laboratorio de canje de Deuda

2.1.3. Equipo Personal

Tabla 4 Equipo Personal

Equipo Personal	Laptop LENOVO LEGION Y520. Intel(R) Core (TM) i7-7700HQ CPU @2.80GHz
Sistemas Operativos	Windows 10 Home Single Language UBUNTU 20.04.1
Software Bioinformático	Aliview Avogadro AutoDockTools 1.5.6 Discovery Studio FigTree GRASP Jalview MAFFT NCBI Protein Data Bank (PDB) Pymol RAxML SeqScrub SWISS-MODEL Uniprot 1JFR
Documentos .PDB y .FASTA	6EQD BAB86909.2 P19833 WP_047194864.1 WP_085749752.1 WP_085749238.1

2.2. Análisis filogenético

2.2.1. Recopilación de secuencias similares de aminoácidos.

La secuencia de PET hidrolasa de *I. sakaiensis* se encuentra bajo el código A0A0K8P6T7 en la base de datos de Uniprot [54] y bajo el código 6EQD_A en la base de datos de NCBI[55]. Se copió la secuencia de aminoácidos a cada una de las bases de datos y se corrió BLAST en ambas páginas web ingresando a la página principal de Uniprot y escribiendo el código de identificación A0A0K8P6T7 en la barra de búsqueda de dicha página web. En la parte superior de la lista completa de alineamientos, se presionó el botón descargar y se seleccionó el formato .FASTA junto con el número total de secuencias alineadas a la enzima utilizada para este proceso. El archivo se guardó bajo el nombre 'blast_uniprot.FASTA'.

Para realizar un BLAST en la página de NCBI, se ingresó a blast.ncbi [56], donde se eligió la opción 'Protein BLAST' que se encuentra en el centro de la pantalla al lado derecho. Se pegó la secuencia de aminoácidos de la enzima PETasa que se encuentra bajo el código 6EQD_A, y se presionó el botón BLAST que se encuentra en el inferior de la pantalla. En el extremo superior derecho de la lista de secuencias se presionó el botón de descargar, y se eligió la opción 'secuencias alineadas' para descargar todos los resultados del BLAST bajo el nombre 'blast_ncbi.FASTA'.

2.2.2. Alineamiento de secuencias

Los archivos 'blast_ncbi.FASTA' y 'blast_uniprot.FASTA' se alinearon por medio de MAFFT [57], escribiendo los comandos descritos en la siguiente tabla:

Tabla 5 Alineamiento de Secuencias en mafft

Paso	Comando	Descripción
1	'cd /mnt/c/users/desktop'	Incluirá dirección en directorio.
2	'mafft'	EL programa solicitará el nombre del archivo a alinear.
3	'blast_uniprot.FASTA'	Ingresará el nombre del archivo de entrada localizado en directorio.
4	'blast_uniprot_aligned.FASTA'	Ingresará archivo de salida. Aparecerá lista de formatos para archivo de salida.
5	'3'	Equivale a .FASTA/sorted.
6	'1'	Lista de estrategias para generar archivo. 1 equivale a estrategia automática.
7		Si se utilizarán argumentos adicionales. Presionar tecla 'Enter' si no se elegirá ninguno.
8		Presionar tecla 'Enter' nuevamente para correr el programa.

2.2.3. Depuración de secuencias

Para configurar apropiadamente a los archivos .FASTA para su uso en otras aplicaciones, se ingresó a la página web SeqScrub[58], se presionó el botón 'Choose File' y se seleccionó el archivo 'blast_ncbi_aligned.FASTA', se eligió la opción 'Don't check databases- just remove characters from headers:' en el panel derecho. Se presionó la tecla 'Submit'. En la parte inferior de la página se seleccionó la opción 'Select all ouptup' o 'cleaned se- quence' y se presionó el botón 'Save Output'. El documento .FASTA se renombró como 'blast_ncbi_aligned_depured.FASTA'. Se repitió el mismo procedimiento con el archivo 'blast_uniprot_aligned.FASTA' y se renombró al archivo de salida como 'blast_uniprot_aligned_depured.FASTA'.

2.2.4. Construcción de árbol filogenético

Para crear un árbol filogenético con los datos provenientes de la base de datos de NCBI se utilizó la herramienta Simple Phylogeny de la página de EMB-EBI[59]. Se siguieron los pasos descritos en la siguiente lista:

1. Presionar el botón 'Load'
2. Cargar archivo 'blast_uniprot_aligned_depured.FASTA'.
3. Elegir formato de documento.
4. Presionar botón 'Submit'
5. Copiar texto bajo el botón 'View Phylogenetic Tree'
6. Abrir documento nuevo en Notepad
7. Pegar Texto.
8. Guardar documento bajo extensión '.TRE'

Se utilizaron los pasos descritos a continuación para el archivo 'blast_uniprot_aligned_depured.FASTA' dentro del programa RAxML[60]

1. Presionar botón 'Load Alignment'
2. Seleccionar archivo de alineación en extensión .FASTA
3. Seleccionar 'ML+Rapid Bootstrap'
4. Seleccionar número de repeticiones (100 por defecto)
5. Seleccionar destino de archivo de salida
6. Escribir nombre de archivo de salida
7. Presionar botón 'RUN'

2.2.5. Representación Gráfica de predicción de secuencias ancestrales

Se utilizó la herramienta GRASP[61] siguiendo los pasos descritos a continuación:

1. Presionar 'Register'
2. Llenar datos personales
3. Verificar registro de cuenta en correo personal.
4. Presionar botón 'New Reconstruction'
5. Presionar botón 'Select sequence alignment le'
6. Seleccionar archivo de secuencias alineadas y depuradas con extensión .FASTA
7. Presionar botón 'Select phylogenetic tree'
8. Seleccionar archivo con extensión .tre correspondiente
9. Seleccionar modelo evolucionario JTT
10. Seleccionar 'Save reconstruction'
11. Presionar 'Perform reconstruction'

Se realizaron reconstrucciones de secuencias ancestrales de cada base de datos de NCBI y Uniprot.

2.2.6. Manejo de resultados

Se cargó la reconstrucción de árbol filogenético en la página de GRASP y se presionó el botón 'Tree Vis Options', se eligió la opción 'Annotate Taxonomy', que importa toda la información taxonómica disponible de las bases de datos de NCBI y Uniprot Sobre los nodos de interés del árbol filogenético. Se eligió la opción 'Add joint reconstruction' y la opción 'View joint reconstruction'. Los sitios oscuros sobre el gráfico de orden parcial indican las áreas con variaciones en la secuencia raíz. Las secciones de color rojo indican ausencia de aminoácidos en la posición de secuencia raíz.

2.3. Análisis Estructural

2.3.1. Recopilación de archivos pdb

Se ingresó a la página de Protein Data Bank[62]. En la barra de búsqueda de la página se escribió el código 6EQD correspondiente a la enzima PETasa. Junto al encabezado del primer resultado se encontró el botón 'Download Files'. Se presionó el botón y se seleccionó la opción 'pdb file'. Se repitieron los pasos anteriores para la secuencia 1JFR correspondiente a una enzima lipasa de *Streptomyces exfoliatus*. El archivo P19833 correspondiente a la enzima lipasa 1 de la cepa TA144 de *Moraxella* fue descargado de SWISSPROT.

Se utilizaron los archivos .FASTA de BAB86909.2, P19833, WP_047194864.1, WP_08 5749752.1 y WP_085749238.1 para generar los modelos de PDB en SWISS-MODEL[63] siguiendo los siguientes pasos.

1. Presionar el botón "Upload FASTA sequence" para cargar el archivo .FASTA correspondiente a la proteína que se desea modelar.

2. Presionar el botón "Search for Templates" Tras unos segundos, aparecerá una lista de "moldes con sus respectivos porcentajes de identidad y valores de GMQE.
3. Seleccionar los "moldes" para la construcción de modelos.
4. Presionar el botón "Build Models". Aparecerán los resultados de comparación, estimación de calidad local y estimación de calidad global.
5. Elegir el modelo con el porcentaje de identidad más alto y el valor de QMEAN más cercano a cero.
6. Presionar el botón "descargar".

2.3.2. Alineamiento de modelos de proteínas

Para la preparación de la estructura de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* se utilizó Pymol[64], siguiendo los pasos descritos a continuación:

Tabla 6 Alineamiento de Secuencias en Pymol

'File'	Elegir archivo de extensión '.PDB'
'Display	Elegir 'Sequence'
'A'	Situado en panel derecho junto a nombre de archivo
'Remove waters'	Elimina moléculas de agua
'click izquierdo'	Seleccionar secuencia de aminoácidos
'A'	Junto a '(sele)'
'Rename	selection' Reemplazar con 'Biological_assembly'
'S'	Seleccionar 'Cartoon'
'C'	Seleccionar colores.

Dentro de la misma sesión se realizó el mismo procedimiento con los archivos .PDB de las enzimas de *Acidovorax delafieldii*, *Moraxella*, *Streptomyces exfoliatus*, *Rizhobacter gummiphilus*, *Polyangium brachysporum* y *Gammaproteobacteria*.

El alineamiento de las estructuras proteicas se cumplió a través de los siguientes pasos Se ajustó el color de cada modelo y se repitieron los pasos descritos en la tabla 7 para cada modelo seleccionado previamente. En la barra de entrada de comandos situada sobre las secuencias de aminoácidos de los modelos seleccionados se escribió el comando 'ray 2400,2400' para la renderización de una imagen prevista en el área de modelos seleccionados a su máxima resolución. Luego, se presionó el botón "File", 'Export Image As' y se eligió el formato 'PNG'. Se exportaron imágenes de cada proteína alineada con el modelo de PETasa.

Tabla 7 Alineamiento de estructuras en PyMol

Botón	Acción
'File'	Elegir archivo de extensión '.PDB'
'A'	Seleccionar 'Align'
'Align to selection'	Seleccionar 'Biological assembly'

2.4. Análisis de interacción ligando-receptor

Se utilizó el programa Autodock Tools 1.5.6[65] en el sistema operativo Ubuntu 20.04.1.

2.4.1. Preparación de documento .PDB de sustrato

Se abrió el archivo .PDB de un monómero de PET en el programa Avogadro. Tras su lectura se seleccionó la opción 'Auto Optimization Tools' y se configuró el campo de energía de la molécula en MMFF94 en 4 pasos. El resultado fue guardado en formato .mol2.

2.4.2. Edición de archivo PDB

Se configuraron los archivos de la estructura de PETasa de *I. sakaiensis* junto con las estructuras de Lipasas y DHL seleccionadas previamente por medio de los pasos descritos en la **tabla 8**:

Tabla 8 Edición de archivos PDB y Configuración de sesión en Autodock Tools

Botón	Acción
'File'	Presionar 'Read Molecule', cargar archivo de extensión '.PDB'.
'Edit'	Presionar 'Bonds', luego 'Build by distance'.
'Color'	Seleccionar 'By atom type'. 'All geometries' Seleccionar 'Ok'.
'File'	Seleccionar 'Browse Commands'.
'Pmv package' Module'	Seleccionar 'deleteCommands' y 'selectionCommands' 'Load Presionar 'Dismiss'.
'File'	seleccionar 'Select From String'. Seleccionar las cadenas no correspondientes a 'Biological assembly'
'Delete'	Seleccionar 'Delete AtomSet'
'Edit'	'Hydrogens', 'Add'. Elegir 'Polar Only' y 'noBond'Order'. 'Ok'
'File'	'Save', 'Write Pdb'.

2.4.3. Preparación de archivos de ligando

Se siguieron los pasos descritos en la **tabla 9**. Dicho archivo se guardará bajo la extensión '.pbdq' propia del programa Autodock Tools.

Tabla 9 Preparación de Archivo de ligando

Botón	Acción
'Ligand'	Seleccionar 'Input Molecule', y 'Read Molecule'.
'Ligand'	Seleccionar 'Define Rigid Root', luego
'Automatically'. 'Ligand'	'Rotatable Bonds', 'Set Number of Active Torsions'.
'Fewest atoms'	'most atoms'.
'Dismiss'	para cerrar panel de Ligando.
'Ligand'	'Write PDBQ'. Escribir nombre de documento de salida. 'Save'

2.4.4. Preparación de documento de macromolécula

Se siguió el protocolo descrito en la **tabla 10**:

Tabla 10 Preparación de Macromolécula

Botón	Acción
'Grid'	Seleccionar 'macromolecule'. 'Choose Macromolecule'
'Save'	Seleccionar secuencia principal.
'Save'	Especificar nombre de archivo de salida

2.4.5. Preparación de archivo de parámetros de Grid

Se siguieron los pasos descritos en la **tabla 11**.

Tabla 11 Parámetros de Grid

Botón	Acción
'Grid'	Choose Macromolecule.
'Grid'	'Set Map Types'
'Choose Ligand'	de lo contrario, 'Read Formatted Ligand File'
'Choose Flexres'	'Accept'
'Grid'	'Set Gridbox'
'File'	'Center', 'View'. Configurar opciones a conveniencia 'Close Saving current values'
'Grid'	'Write GPF'. Escribir nombre de archivo de parámetros.
'Grid'	'Edit GPF', si parámetros se encuentran en orden presionar 'Ok'

2.4.6. AutoGrid

Para el proceso de ejecución de AutoGrid se definió la ubicación del archivo ejecutable de Autogrid4 y la ubicación del documento GPF configurado tras la preparación de parámetros.

2.4.7. Preparación del archivo de parámetros de docking

Tabla 12 Parámetros de docking

Botón	Acción
Docking	“Macromolecule”, “Select rigid Filename”, seleccionar ubicación de macromolécula preparada.
Docking	“Macromolecule”, “Select Flexible Filename”
Docking	“Ligand”, “Choose Ligand”, seleccionar ligando preparado
Docking	“Search Parameters”, “Genetic Algorithm Parameters”, seleccionar número máximo de evaluaciones, “Close”
Docking	“Set Docking Run Parameters”, seleccionar número máximo de retrocesos, formato de salida, “Close”
Docking	“Output”, especificar nombre del archivo .DPF, “Save”.
Run	“Start Autodock”, “Launch”

2.5. Análisis de actividad enzimática

Se realizaron con la enzima PETasa y con las enzimas de similitud estructural encontradas a través de los procedimientos anteriores. La construcción de los plásmidos necesarios para la expresión de los genes de las enzimas de mayor similitud fue solicitada a través de la página web de Addgene[66].

2.5.1. Extracción de plásmidos

Se utilizó el método descrito por Birnboim y Yamamoto [67][68][69] bajo ciertas modificaciones. Previamente, se prepararon las siguientes soluciones detalladas en la **tabla 25**.

Además, se preparó 1 litro de medio líquido de lisogenia, detallado en la **tabla 23**. Se colocaron los reactivos en un recipiente de 1 litro de tapa azul y se vierte 1 litro de agua destilada, se homogeneizó invirtiendo la botella con la tapa cerrada y se sometió a esterilización estándar a 14 psi de presión y 121 °C de temperatura por una hora en autoclave comercial. El medio de lisogenia se almacenó bajo refrigeración a 4 °C una vez esterilizado y sellado con parafilm, para su posterior uso.

Se inocularon células de *E. coli* cepa K12 que contienen los plásmidos pET21b(+)- Is-PETasa Wild Type, pET21b(+)-Is-PETasa W185A y pET21b(+)-Is-PETasa W159F- S238H en 3 ml de caldo de lisogenia (LB) previamente hecho cada tipo, en un matraz Erlenmeyer de 50 ml para incubación a 37 °C en 150 rpm por 12 horas. Los contenidos se transfirieron a un microtubo de 1,5 ml para centrifugarse a 13000 g por un minuto. El sobrenadante fue desechado y el pellet se lavó con agua estéril libre de nucleasas para eliminar todo el caldo de cultivo. El pellet se resuspendió en 100 μ L de solución 1, se añadieron 450 μ L

de solución II y se agitaron por inmersión. Se añadieron 225 μL de solución III y se agitaron por inmersión. Inmediatamente la mezcla se incubó por 10 minutos en hielo, luego se centrifugó a 14000 g por 10 minutos. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a microtubo de 1,5 ml estéril y se suspendió en 700 μL de etanol absoluto. El tubo nuevo se centrifugó a 14000 g por 5 minutos. El sobrenadante se desechó. Se centrifugó a 14000 g por 5 minutos para asegurar la pureza de la muestra. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 50 μL de agua ultra pura libre de nucleasas. El procedimiento se realizó con cada cultivo celular de diferentes plásmidos. Acto seguido se realizó lectura para ADN plasmídico de las muestras en Nanodrop 2000. Se etiquetó a la solución de agua ultra pura con el plásmido pET21b(+)-Is-PETasa como "PETasa_WT", pET21b(+)-Is-PETasa W185A como "W185A", pET21b(+)-Is-PETasa W159F-S238H como "W159F-S238H".

2.5.2. Preparación de stocks de *E. coli* (rosetta)

Se utilizaron condiciones estériles dentro de la cámara de flujo laminar utilizando su respectivo protocolo estándar durante todo el procedimiento.

Primero, en una botella de tapa azul de 1 litro vertieron los reactivos listados en la **tabla 24** y se mezclaron en el mismo recipiente con 1 litro de agua destilada. Se homogeneizó la mezcla mediante agitación magnética a una temperatura de hasta 80 °C hasta que conseguir una mezcla cristalina. Luego, se sometió a esterilización estándar a 14 psi de presión y 121 °C de temperatura por una hora en autoclave comercial. Se dejó enfriar el medio por 5 minutos. Luego, con una micropipeta de 100-1000 μL , se vertieron 100 μL de cloranfenicol dentro de la botella de tapa azul. En seguida se vertió el medio en placas de petri de plástico, y se dejó reposar hasta que se solidifique.

Se preparó el stock de cultivos a partir de los tres cultivos líquidos de *E. coli* (Rosetta) previamente hechos y entregados por el Dr. Mario García, Se tomó un

aza y se sumergió en cultivo líquido de lisogenia de *E. coli* (Rosetta), se sumergió un aza de plástico en uno de los cultivos madre. Se cortó el extremo del aza previamente sumergida y se la dejó caer en un tubo microbiológico de 15 ml de volumen con 5 ml de caldo de lisogenia estéril. Luego, con una micropipeta de 25 μL , se añadieron 5 μL de cloranfenicol. Este procedimiento se realizó por triplicado. Se cultivaron los 3 microtubos por 12 horas a 37 °C a 150 rpm.

Con una micropipeta de 1000 μL se tomó 1 ml de medio de cultivo y se lo vertió en un microtubo estéril de 1.5 ml. Luego, con la misma micropipeta (con diferente punta), se tomaron 300 μL de glicerol, y se vertieron en el tubo. Se repitió el mismo proceso 10 veces, hasta haber alicuotado 2 de los 3 cultivos stock. A partir de uno de los stock de *E. coli* (rosetta) se realizaron tres cultivos en medio sólido de lisogenia con cloranfenicol. Dichas alícuotas fueron rotuladas y selladas con parafilm, se colocaron en un recipiente con alcohol al 70 % a 4 °C por 10 minutos y luego se almacenaron a -80 °C.

Se tomaron 3 placas de petri con medio de cultivo sólido de lisogenia más cloranfenicol. En cada placa se inoculó 1 ml del stock de *E. coli* (rosetta) y se esparció de manera uniforme con un aza de esparción. Luego, se rotularon y sellaron con parafilm. Dichas placas se incubaron a 37 °C por 48 horas.

2.5.3. Preparación de células competentes por medio de Cloruro de Calcio

Se utilizó el protocolo descrito por Cerda[70], bajo condiciones estériles durante la manipulación del material de vidrio y medios de cultivo mediante el uso de la cámara de flujo laminar.

Con un aza microbiológica de plástico, se tomó un inóculo de una placa con cultivo de *E. coli* (Rosetta), se cortó en un extremo y sumergió en un matraz Erlenmeyer de 500 ml de volumen con 100 ml de caldo de cultivo de lisogenia estéril. Se añadieron 50 $\mu\text{g/ml}$ cloranfenicol (volumen 1). Se mantuvo en

incubación a 37 °C y 150 rpm hasta llegar a su fase exponencial de crecimiento bacteriano (densidad óptica 0,3-0,5 a 600 nm)(2-3 horas). Se recogieron las células por centrifugación a 3900 g por 3 minutos a 4 °C, dentro del mismo matraz, se resuspendieron en 1/10 del volumen 1 en CaCl₂ 50 mM frío y se mantuvieron por 2 horas en hielo (0 °C). Tras este periodo se recogieron las células por centrifugación

a 3900 g por 3 minutos y se resuspendieron en 1/20 de volumen 1 en CaCl₂ 50 mM con 15 % de glicerol 50 mM frío y se mantuvieron en hielo por 4 horas. Se dividió el volumen final en 5 alícuotas de 1 ml dentro de microtubos estériles de 1.5 ml. A cada microtubo se le añadieron 300 μ L de glicerol, se colocaron en un recipiente con alcohol al 70 % a 4 °C por 10 minutos y luego se almacenaron a -80 °C.

2.5.4. Transformación de células

Se utilizó el método de choque térmico descrito por Cerda[70]. Se mantuvieron condiciones estériles por medio del uso de dos mecheros de alcohol encendidos a ambos lados del espacio de trabajo.

Se utilizó una alícuota de cada una de las células competentes de *E. coli* (rosetta), "PETasa_WT", "W185A "W159F-S238H". Con una micropipeta de 20 μ L, se añadieron 5 μ L de cada solución. Se mantuvo al microtubo cerrado durante 5 minutos en un recipiente con hielo. Transcurrido este tiempo se colocó al tubo en termo bloque para realizar un choque térmico a 42 °C por 45 segundos, se transfirió rápidamente al recipiente con a hielo. Se añadieron 250 μ L de caldo de lisogenia y se incubó por 1 hora a 37 °C en 150 rpm. Transcurrido este tiempo se sembró en placas de cultivo sólido de lisogenia con cloranfenicol, dichos cultivos se incubaron a 37 °C por 12 horas.

2.5.5. Inducción de producción de enzima por método IPTG.

Se prepararon 10 ml de caldo de lisogenia y se inocularon con una pequeña alícuota de *E. coli* rosetta transformadas con el plásmido pET21b(+)-Is-PETasa. El cultivo se dejó a temperatura ambiente por 12 horas hasta llegar a fase exponencial ($OD_{600}=0,4$) y fue trasladado a hielo y se inoculó IPTG hasta una concentración final de 1 mM partiendo del volumen total. Se incubó a 18°C durante 18 horas en agitación. Paralelamente se incubó otro cultivo con IPTG 1mM a 37°C durante 3 horas en agitación. Se transfirieron los medios incubados a tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 5000 g por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet se suspendió en buffer SBD para luego ser centrifugado nueva- mente a 5000 g por 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se repitió la resuspensión en buffer SBD y centrifugado dos veces más. Tras desechar el sobrenadante, se resuspendió al pellet en buffer STE en un volumen 3 veces igual al peso del pellet en relación *g/ml*.

2.5.6. Análisis de expresión enzimática por medio de SDS-PAGE

Se utilizó el protocolo del manual de Biorad[71]. La **tabla 26** presentada en la sección Anexos describe la concentración de gel apropiadas para trabajar con el respectivo peso de la proteína en cuestión. Para el aislamiento de la enzima PET hidrolasa se utilizó una concentración de gel de 12 %. Se colocaron las placas de vidrio en el soporte de color verde, con la placa más pequeña en el área frontal, asegurándose que las placas se encuentren simétricas en su base para evitar derrames. A continuación, se prepararon las soluciones de geles de corrido y de stacking como describen las siguientes tablas. El SDS se colocó en último momento para evitar la polimerización prematura de los geles dentro de sus recipientes.

La **tabla 27** describe las concentraciones necesarias de los reactivos que se utilizaron para la preparación de la fase de corrido del gel de acrilamida. Se vertieron con micro- pipeta los reactivos listados en la tabla X en un tubo falcon de 15 ml. Tras añadir SDS en la solución de gel de la fase de corrido, se mezcló ligeramente agitando el tubo e inmediatamente se utilizó una micropipeta para verter la fase de corrido entre las dos placas de vidrio. Este paso se hizo muy despacio, y al terminar, se añadió alrededor de 1-1.5 ml de agua destilada encima de la fase de corrido para asegurar una superficie uniforme de dicha fase.

Tras 30 minutos de espera, se inclinó el soporte con las placas de vidrio para deshacerse del agua destilada que reposa sobre la fase de corrido. Dicha fase debe estar completamente solida dentro de las placas. La **tabla 28** describe las concentraciones necesarias de los reactivos que se utilizarán para la preparación de la fase de stacking del gel de acrilamida.

La preparación de la fase de stacking es igual a la preparación de la fase de corrido. Se tomó una micropipeta de 5 ml para verter la fase de stacking sobre la fase de corrido, se colocó la bincha sobre la fase de stacking inmediatamente después de su vertido. El tiempo de espera para que finalice la polimerización de la fase de stacking dura alrededor de 20 minutos. Tras este paso, el gel puede guardarse dentro de las placas de vidrio envuelto en plástico a 4 °C por varias semanas.

Para preparar el stock de Buffer de carga se añadieron 3.55 ml de agua MilliQ, 2.5 ml de glicerol 100 %, 2.0 ml 10 %, 1.25 μ L, Tris-HCL 0.5 M pH 6.8, 200 μ L Azul de bromo-fenol, 0.5 %. Finalmente, se añadieron 50 μ L de β -mercaptoetanol a 950 μ L.

Se colocó el gel con sus placas en el recipiente de mini-prep con la placa más pequeña hacia el interior del recipiente. Se colocó en la entrada de placa vacía el sustituto de placa hecho de plástico que incluye el kit mini-prep. Se vertió el buffer de carga entre las dos placas dentro del recipiente hasta que el nivel de la solución cubra los bordes superiores de la placa con el gel y se vertió más buffer

de carga hasta una cuarta parte del volumen total del recipiente. Se retiró la bincha que de forma a las celdas en la fase de stacking.

Preparación de muestras: Se tomaron 10 μL de muestra obtenida tras el método de inducción de producción de enzima por método IPTG. Se colocó la muestra con una micropipeta de 20 μL de volumen dentro de un microtubo de 1.5 ml. Se añadirán 5 μL de marcador. El microtubo con muestra y marcador se calentó a 95 °C por 4 minutos en un termociclador.

Con una micropipeta de 5 μL se colocaron muy despacio 2 μL de la mezcla de muestra más marcador en las celdas de la fase de stacking del gel, dejando una celda vacía entre cada celda llena. Se colocará la tapa del recipiente y se realizará el corrido de las muestras por una hora en 200V. El gel será retirado de las placas de vidrio y colocado en un recipiente de plástico. Será teñido con azul de coomasie por completo por 10 minutos y luego será desteñido lavado con agua y agitación bajo radiación microondas de forma intermitente hasta que las bandas de corrido sean claramente visibles a simple vista.

2.5.7. Método de análisis de actividad enzimática

Se pesaron 3 discos de PET de 5 mm. En microtubo ependorf se añadieron 200 μL de buffer Glicina, se añadieron 100 μL de buffer STE que fue tomado como blanco. En un segundo microtubo añadirán 200 μL de Buffer Glicina, 100 μL de sobrenadante (enzima + buffer STE) resultado de inducción por IPTG. Esta será la muestra 1. Se repetirá el paso con pellet (pellet celular +buffer STE) resultado de inducción por IPTG. Esta será la muestra 2. Se Sumergirá un disco de PET de 5 mm de diámetro en cada blanco y en muestras 1 y 2. Las muestras fueron incubadas a 37°C en agitación a 150 rpm para mantener homogeneidad en la solución, por 2 días. Luego, se secaron los discos de cada muestra en desecador por media hora para eliminar humedad para ser pesados. Se compararon pesos actuales vs pesos iniciales.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis Filogenético

3.1.1. Recopilación de secuencias similares a PETasa *Ideonella sakaiensis*

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la enzima PETasa con identificación A0A0K8P6T7 localizada en la base de datos de NCBI obtuvo alrededor de 100 coincidencias en el proceso de BLAST de la misma página, mientras que en el proceso de BLAST obtuvo 250 coincidencias, de las cuales una cantidad considerable corresponden a proteínas no identificadas de especies como *Streptomyces* y bacterias del orden actinomicetos. Dichas secuencias fueron guardadas en un documento con el nombre 'blast_uniprot.FASTA' y 'blast_ncbi.FASTA'.

En los resultados del proceso de BLAST de las páginas de NCBI y Uniprot, reportados en la **tabla 13**, se encontró que las enzimas diene lactona hidrolasa de *Polyangium brachysporum* y *Rizhobacter gummiphilus* poseen un porcentaje de identidad de 66.79 % y 81.30 % respectivamente. Además, la enzima poly-(tetrametileno succinato) depolimerasa (PbsA) de *Acidovorax delafieldii* registra un porcentaje de identidad de 82 %. Con dichos resultados, tras su alineamiento en MAFFT se construyó un árbol filogenético re- presentado en las **figuras 2 y 3** que coloca a la enzima PETasa muy cerca del grupo de la depolimerasa de *Acidovorax delafieldii*.

Tabla 13 BLAST NCBI

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
Chain A, Poly(ethylene terephthalate) hydrolase [Ideonella sakaiensis]	612	612	100 %	0.0	100.00 %	6EQD_A
PBS(A) depolymerase [Acidovorax delafieldii]	416	416	87 %	9e-144	82.06 %	BAB86909.1
Dienelactone hydrolase family protein [Rhizobacter gummiphilus]	362	362	82 %	8e-123	81.30 %	WP085749752 : 1
Dienelactone hydrolase family protein [[Polyangium] brachysporum]	363	363	88 %	7e-123	66.79 %	WP047194864,1
Alpha/beta hydrolase [Gammaproteobacteria bacterium HGW-Gammaproteobacteria-11]	259	259	94 %	9e-82	47.35 %	PKM29547.1

3.1.2. Alineamiento de secuencias



Figura 1 Alineamiento de secuencias donde se visualiza el sitio activo desde la caja lipasa.

Los archivos 'blast_uniprot.FASTA' y 'blast_ncbi.FASTA' fueron alineados con el programa MAFFT, sus resultados fueron guardados en nuevos documentos bajo el nombre 'NCBI_sequences_DB_aligned.FASTA' y 'uniprot_sequences_DB_aligned.FASTA'. Las secuencias alineadas de mayor homología fueron visualizadas por medio de Jalview [72][73] como puede verse en la **figura 1**.

3.1.3. Depuración de secuencias

Los documentos bajo el nombre de 'NCBI_sequences_DB_aligned.FASTA' y 'uniprot_sequences_DB_aligned.FASTA' fueron subidos a la página SeqScrub, donde caracteres como ': , ; ()' fueron removidos de las identificaciones de cada secuencia. Los archivos .FASTA resultantes fueron descargados y nombrados como 'blast_uniprot_aligned_depured.FASTA' y 'blast_NCBI_aligned_depured.FASTA'.

Debido a la gran similitud de la enzima PETasa con las enzimas PbsA, DHL de *P. brachysporum* y DHL de *R. gummiphilus*, se formuló la hipótesis de posible actividad PETasa en dichas enzimas, por tanto, se tomó en consideración la comparación de sus sitios activos. Las enzimas de mayor homología a la enzima PETasa se reportan en la **tabla 14**.

Tabla 14 Resultados de Análisis de Homología de PET hidrolasa y varias enzimas

Enzima	ID GenBank	Fuente	N_de a.a.	% Ident.
PBSA	BAB68909.1	<i>Acidovorax delafieldii</i>	304	82,06
DHL	WP_085749752.1	<i>Rhizobacter gummiphilus</i>	298	81,30
DHL	WP_047194864.1	<i>Polyangium brachysporum</i>	292	66,79
DHL	WP_42197250.1	<i>Streptomyces</i>	300	51,30
α/β Hydrolase	PKM29547.1	<i>Gammaproteobacteria</i>	308	47,35
Lipasa	Q56008	<i>Moraxella sp. TA144</i>	319	—
Lipasa	P19833	<i>Streptommyces sp. M11</i>	310	—

Se ha reportado que la cepa BS-3 de *Acidovorax delafieldii* es capaz de utilizar PBS en estado de emulsión como única fuente de carbono y energía [74]. Además, es capaz de degradar PBSA sólido en dos pasos [75].

Posterior revisión bibliográfica proporcionó pruebas sobre la alta homología que la enzima PbsA posee con lipasas de *Moraxella* y *Streptomyces* pertenecientes a la familia Neisseriaceae y Actinomycetes [76].

Consecuentemente, se tomaron en consideración a las enzimas lipasas de dichas bacterias en las siguientes comparaciones de secuencias y análisis de estructuras.

3.1.4. Construcción de Árboles Filogenéticos

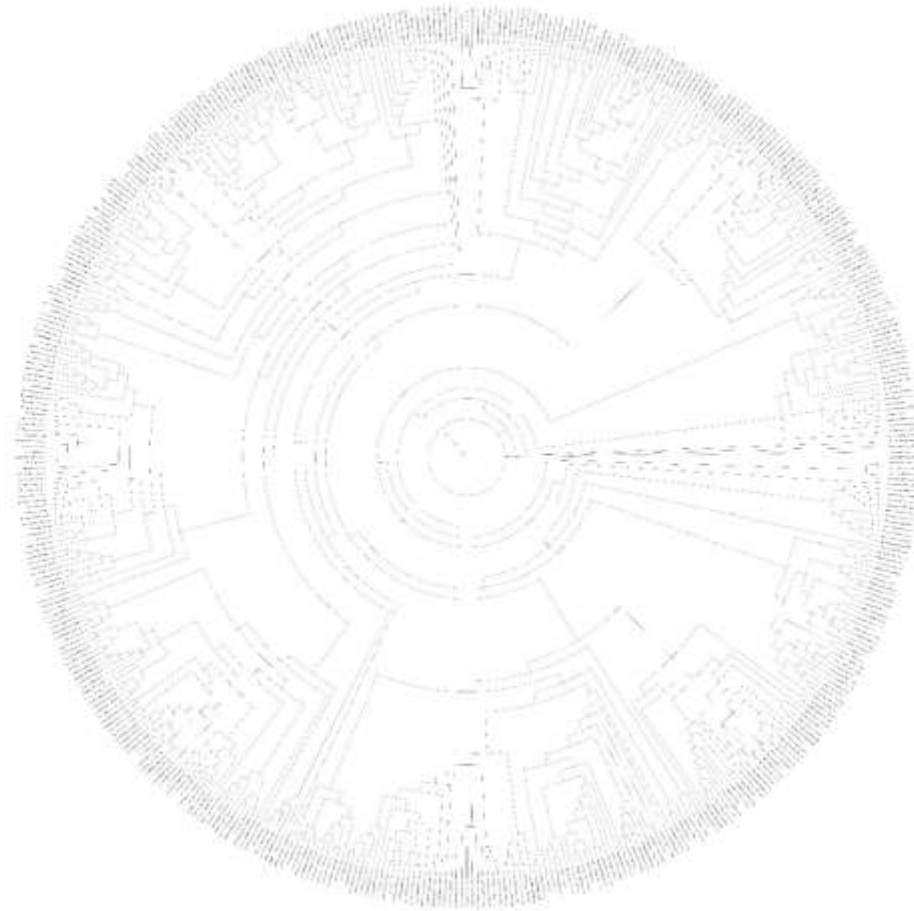


Figura 2 Árbol filogenético general, circular, sin raíz de la base de datos de Uniprot



Figura 3 Árbol filogenético general, sin raíz de la base de datos de NCBI para comparación de PETasa de *I. sakaiensis* con especies similares.

Los árboles filogenéticos generados de las bases de datos de NCBI y Uniprot difieren en la presencia de pocas enzimas. Uniprot presenta más enzimas hipotéticas. De acuerdo a la construcción de los árboles filogenéticos, los parientes más antiguos de PETasa son α/β hidrolasa de *Gammaproteobacterium* y α/β hidrolasa de *Actinomadura sp.*. Dicha relación no toma en cuenta el genoma completo de los microorganismos, contempla la similitud de los sitios conservados de las estructuras de cada enzima. Los sitios no conservados indican el número posible de cambios que sufrió la enzima ancestral para desarrollar la función de hidrólisis de PET.

3.1.5. Representación gráfica de secuencias ancestrales

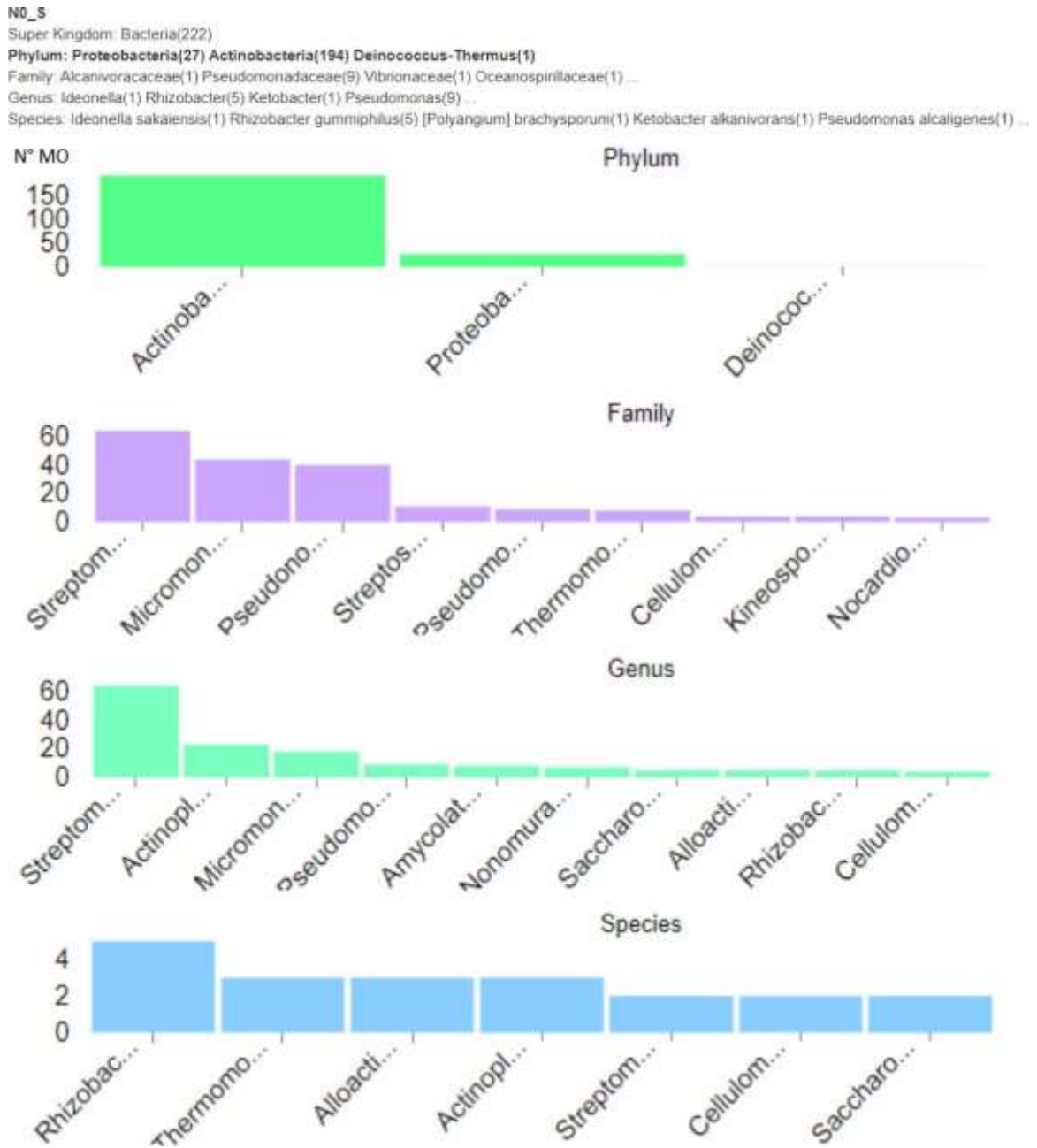


Figura 4 Resumen de reconstrucción de secuencia ancestral Nodo 0. En el eje y se encuentra la cantidad de microorganismos (NºMO) y en el eje x la respectiva clasificación.

La reconstrucción ancestral representada por la **figura 4** generada por GRASP indica la distribución de las enzimas homologas a la enzima PETasa. Su mayoría se ubica en el phylum de Actinobacterias, que, a la vez, se encuentran más alejadas dentro de la estructura del árbol filogenético.

N16

Super Kingdom: Bacteria(4)

Phylum: Proteobacteria(4)

Genus: Ideonella(1) Rhizobacter(2)

Species: Ideonella sakaiensis(1) Rhizobacter gummiphilus(2) [Polyangium] brachysporum(1)

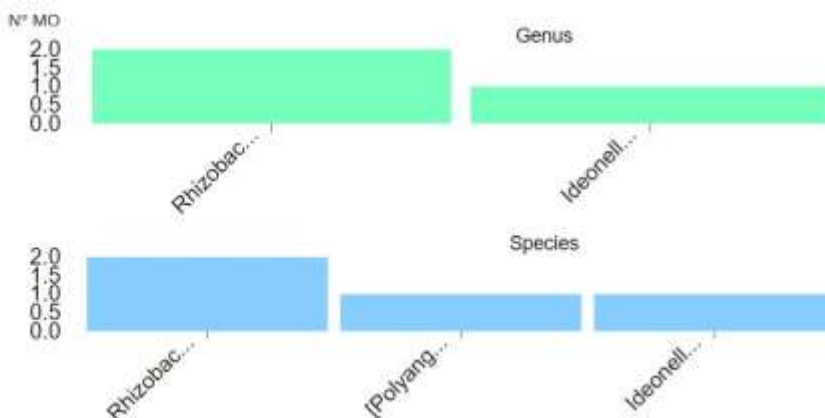


Figura 5 Resumen de reconstrucción de secuencia ancestral Nodo 16. En el eje y se encuentra la cantidad de microorganismos (N°MO) y en el eje x la respectiva clasificación.

La visualización de los resultados de la reconstrucción ancestral a partir de la base de datos de Uniprot indica en la **figura 5** la cantidad y el número de enzimas de mayor similitud a la enzima PETasa. Dicha reconstrucción excluye al genus *Acidovorax* por su ausencia en dicha base de datos.

3.2. Análisis Estructural

3.2.1. Recopilación de archivos .pdb

No se encontraron modelos validados de las enzimas PbsA de *A. delafieldii*, DHL de *R. gummiphilus*, DHL de *P. brachysporum* ni α/β hidrolasa de *Gammaproteobacteria* dentro de los repositorios de uniprot y RCSB PDB, por lo que la homología de estructuras fue calculada a través del servidor de homología de SWISS-MODEL[77] [78] que utiliza el mecanismo de modelaje ProdMod3.

ProdMod3 es un mecanismo de modelaje comparativo basado en OpenStructure [79]. La búsqueda de estructuras proteicas evolutivamente relacionadas con PbsA y DHL de *R. gummiphilus* fue realizada a través BLAST [80], mientras que para la secuencia objetivo DHL de *P. brachysporum* se realizó la búsqueda por medio de HHblits [81]. Todas las búsquedas se realizaron en el repositorio de SWISS-MODEL [82]. Las entradas seleccionadas con mejor calificación de media Q y GMQE se reportan en la **tabla 15**.

Tabla 15 Reporte de Modelos

Description	Modelo	Built with	Oligo- State	Ligands	GMQE	QMEAN
PbsA (<i>A. Delafieldii</i>)	01	ProMod3 3.0.0	Monomer	None	0.79	-0.45
DHL (<i>R. gummiphilus</i>)	03	ProMod3 3.0.0	Monomer	None	0.75	-1.51
DHL (<i>P. brachysporum</i>)	02	Promod3 3.0.0	Monomer	None	0.73	-0.35

SWISS-MODEL se apoya sobre la función de media Q, que utiliza el potencial estadístico del valor de la media para generar estimaciones de calidad global y por residuo. Las estimaciones de calidad local son mejoradas por medio de limitaciones de distancia por pares que representan la información ensamblada de todas las estructuras de molde [77]. Dicho parámetro es un estimador compuesto basado en diversas propiedades geométricas que proveen estimaciones tanto de la estructura completa como de cada residuo [83]. La media Q provee un grado estimado de "natividad" de las características estructurales observadas a escala global. Indica si el modelo es comparable con lo que se esperaría de estructuras experimentales de tamaño similar. Si el valor de media Q es entre 0 y -4.0, indica un buen acuerdo entre la estructura generada y estructuras experimentales de tamaño similar. La calidad es más alta mientras el valor se acerque más a cero [77].

Los valores de GMQE y media Q de cada modelo generado son reportados en la tabla 15. El parámetro de GMQE provee una estimación de calidad que combina propiedades del alineamiento secuencia objetivo-molde y el método de búsqueda de molde. la calificación de dicho indicador se expresa como un número entre 0 y 1, reflejando la precisión de los modelos construidos con el alineamiento y molde además de la cobertura del objetivo. Mientras más alto el puntaje, más confiable es el modelo [83].

Tabla 16 Reporte de modelaje en SWISS-MODEL

Description	Template	Identity	Found by	Method	Resolution	Similarity	Range	Coverage
PbsA (A. Delafieldii)	6eqd.1.A	82.06	BLAST	x-ray	1.70A	0.56	43- 303	0.86
DHL (R. gummiphilus)	6scd.1.A	52.51	BLAST	x-ray	1,35.A	0.46	30- 292	0.89
DHL (P. brachysporum)	6ane.1.A	67.82	HHblits	x-ray	2.02A	0.51	31- 296	0.88

3.2.2. Alineamiento de modelos de proteínas

En función a la alta identidad de secuencia de PETasa a otras cutinasas homologas, la localización de la triada catalítica es fácilmente localizable [84]. Dicha triada catalítica es representada en las figuras 3.2.2, donde los aminoácidos S160-D206-H237 que la conforman aparecen coloreados en base al tipo de elemento. La apertura superficial localizada sobre la serina nucleofílica de la triada es el sitio de unión al sustrato [84]. Dicho sitio activo es más amplio que el de otras cutinasas, lo que podría ser uno de los factores que expliquen por que la enzima PETasa podría acomodar sustratos grandes como el PET [84].

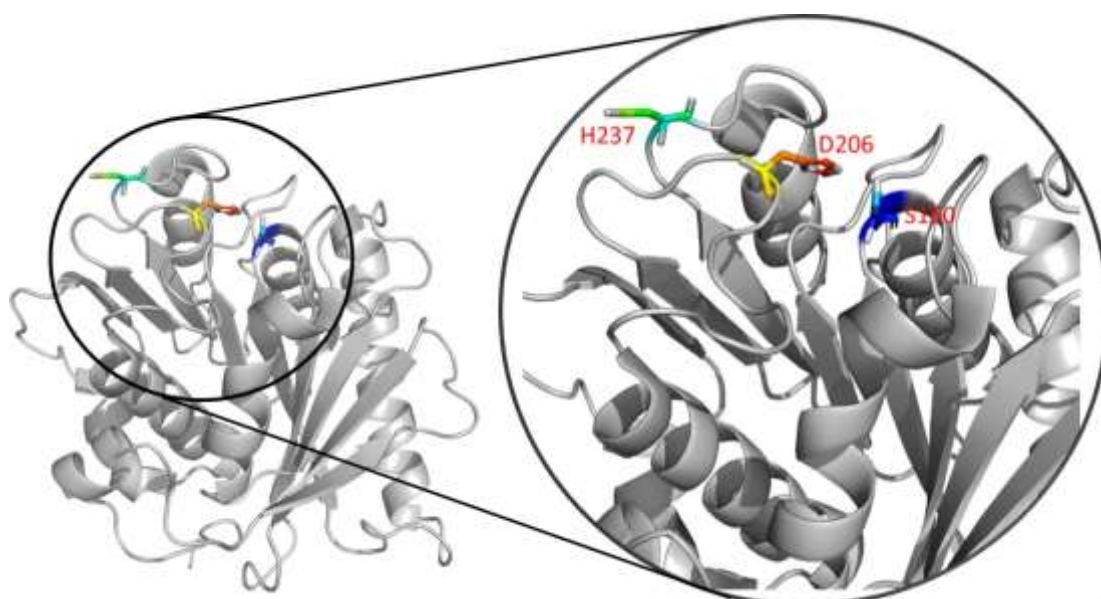


Figura 6 Triada Catalítica de PETasa. Enzima PETasa representada en estructura hélices α - hoja plegada β de color gris, residuos catalíticos representados en sticks de color blanco, verde naranja y azul de acuerdo a sus átomos.

A diferencia de otras enzimas homólogas, la enzima PETasa posee dos puentes disulfuro en lugar de uno. Este segundo enlace disulfuro (DS2) conecta el bucle carbono terminal y la última hélice y es estrictamente conservado en todas las estructuras homólogas [85]. Por otro lado, el puente disulfuro DS1 se encuentra

adyacente al sitio activo y conecta los bucles $\beta 7 - \alpha 5$ y $\beta 8 - \alpha 6$ que contienen el ácido catalítico Asp206 y la base catalítica His237 respectivamente [84]. De las enzimas con mayor homología a la enzima PETasa encontradas durante la ejecución de Blast, 3 de ellas presentan un segundo enlace disulfuro localizado en donde se forma la superficie del sitio activo. La configuración de dichos enlaces disulfuro son representadas en las **figuras 7b, 7c y 7d**.

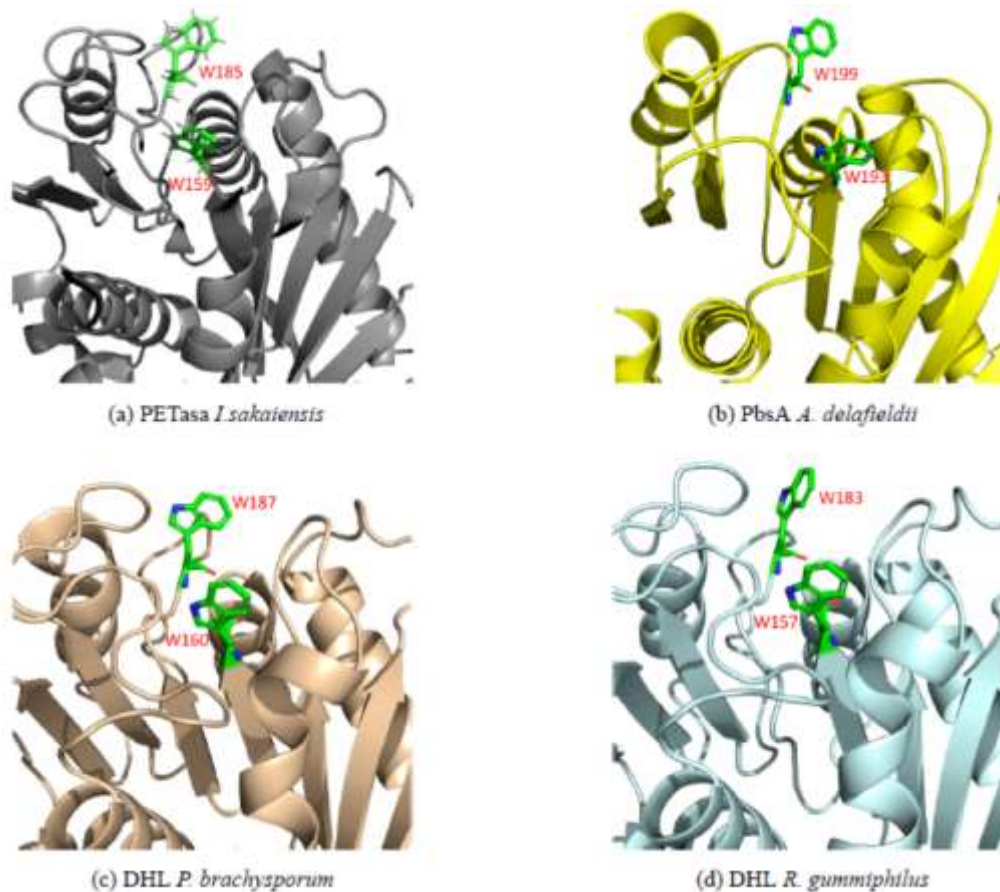


Figura 7 Residuos SD1 y SD2. Los residuos SD1 y SD2 están representados en sticks de color verde y azul. Enzimas representadas en estructuras de hélices α -hoja plegada β . PETasa de color gris, PbsA de color amarillo, DHL de *P. brachysporum* de color caramelo, DHL de *R. gummiphilus* de color celeste.

Investigaciones anteriores en hidrólisis de PET bajo condiciones reductoras y mutagénesis indican que al deshacer el puente DS1, se reduce significativamente la actividad enzimática, lo que sugiere que dicho puente juega

un rol crítico en la actividad PETasa [85] [86] [87]. El triptófano 159 es estrictamente conservado a lo través de enzimas homólogas pero exhibe más de una conformación en la enzima PETasa exclusivamente. Por esta razón, se lo conoce como 'triptófano tambaleante' (W159 wobbling) y su flexibilidad en la conformación juega un rol importante en la reacción de catálisis de PET.

Las enzimas lipasas de *Moraxella*, *S. exfoliatus* y *Gammaproteobacteria* no conservan el sitio SD2, por lo que se decidió descartarlas de procedimientos posteriores. Sin embargo, la conservación de los sitios DS1 y DS2 en las enzimas PbsA de *A. delafieldii*, DHL de *P. brachysporum* y DHL de *R. gummiphilus* se puede ver claramente representada en color verde en las **figuras 7b, 7c, 7d** respectivamente. Bajo los criterios expuestos anteriormente, se formula la hipótesis de posible actividad PETasa en cada una de estas enzimas.

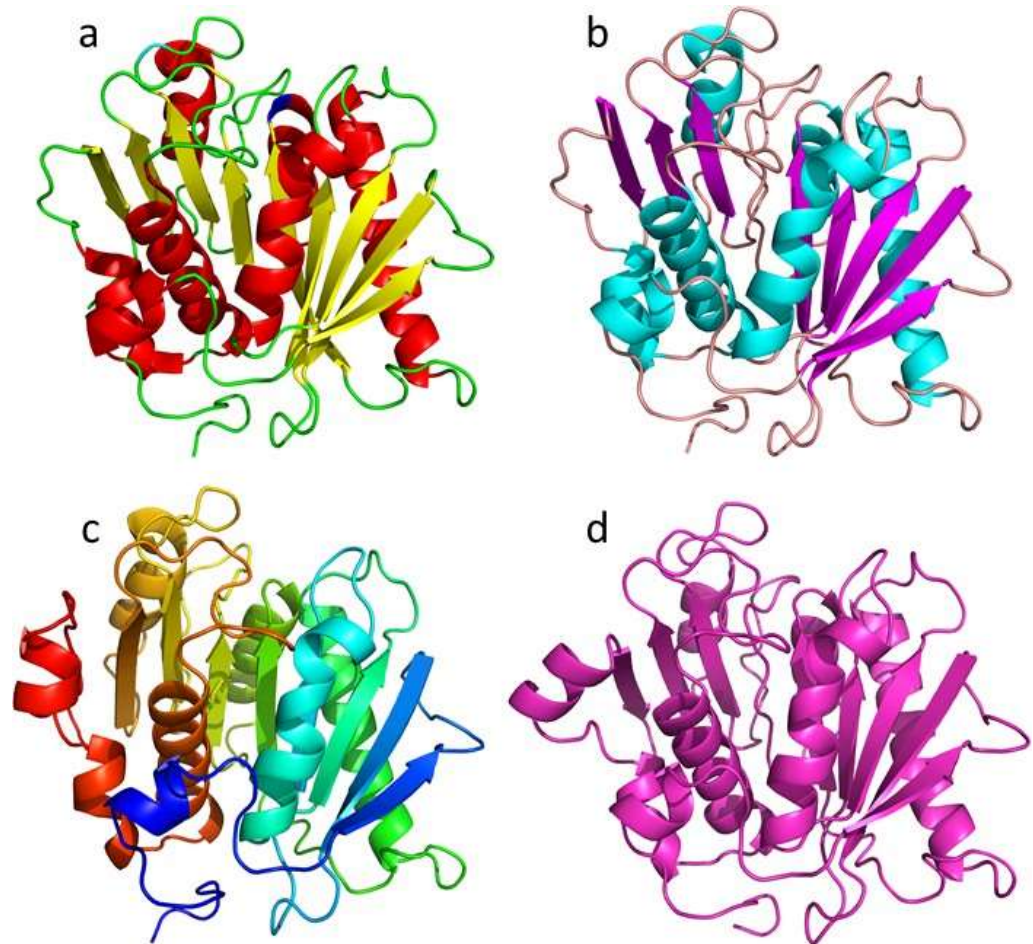


Figura 8 Representación de enzimas en forma de hélice α -hoja plegada β . La figura 8^a representa la enzima PETasa en colores rojo, amarillo y verde. La figura 8b representa la enzima PbsA en colores violeta, caramelo y celeste. La figura 8c representa la enzima DHL de *R. gummiphilus* de color violeta.

La **figura 3.2.2** indica la localización del sitio activo de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* señalada con una circunferencia. Como puede verse en las **figuras 8a, 8b, 8c, y 8d**, las enzimas DHL de *P. brachysporum* y *R. gummiphilus* además de PbsA visualizadas por medio de Pymol presentan una estructura clásica de α/β hidrolasa, al igual que PETasa

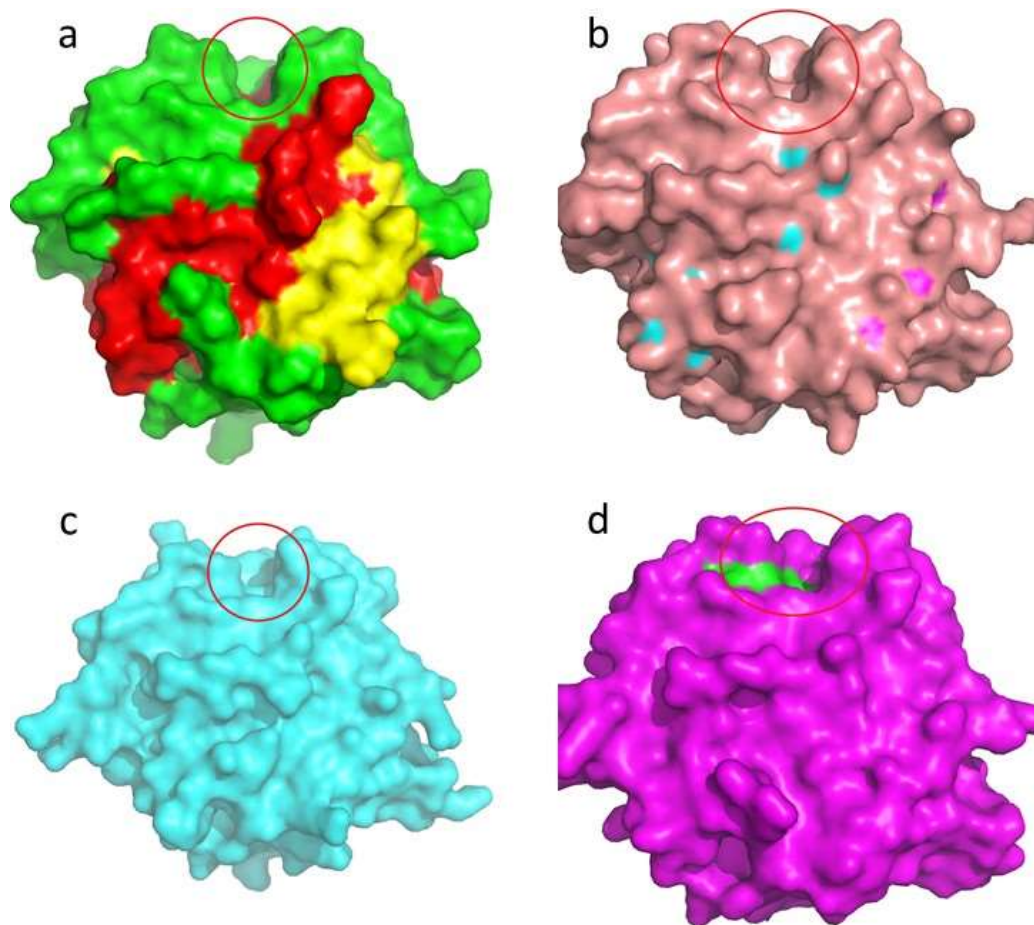


Figura 9 Representación de superficie de enzimas. La figura 9a representa la enzima PETasa en colores rojo, amarillo y verde. La figura 9b representa la enzima PbsA en colores violeta, caramelo y celeste. La figura 9c representa la enzima DHL de *P. brachysporum* en color celeste. La figura 9d representa a la enzima DHL de *R. gummiphilus* en colores violeta y verde.

[84]. A excepción de la enzima DHL de *R. gummiphilus*, todas las enzimas representadas en los paneles de la **figura 9** demuestran una superficie en su sitio activo muy similar al de la enzima PETasa.

3.3. Análisis de interacción ligando-receptor

3.3.1. Preparación de documento .PDB de sustrato

Se utilizó la herramienta de visualización y constructor molecular Avogadro [88] para la edición del monómero de PET. Se eligió una geometría bidimensional aproximada y un set de energía MMFF94 [89]. Tras guardar el archivo .PDB del ligando, se abrió en AutodockTools, se añadieron todos los hidrógenos y se combinaron hidrógenos no polares, se añadieron cargas Gasteiger, donde se detectaron 0.0000667. El monómero de PET posee 6 carbonos aromáticos y 4 enlaces rotables.

3.3.2. Preparación de documento de macromolécula

Se prepararon los archivos .PDB por medio de la interface visual AutodockTools [90]. Se añadieron hidrógenos polares, se mezclaron contactos polares y finalmente se añadieron cargas de Kollman en cada estructura objetivo. Las cargas atómicas parciales cuantifican el grado de enlaces iónicos contra enlaces covalentes en cualquier compuesto químico. Es necesario para poder computar propiedades de la superficie de compuestos de acuerdo a cada experimento en simulaciones moleculares. La evidencia de compuestos químicamente diferentes demuestra que los datos experimentales y la comprensión química llevan a las cargas atómicas justificadas [91]. Se calcularon 11,0 cargas parciales de Kollman para la enzima PbsA de *A. delafieldii*, 11,0 para DHL de *R. gummiphilus* y 12,0 cargas para DHL de *P. brachysporum*.

La mayoría de lipasas y esterases contienen el patrón Gly-X1-Ser-X2-Gly que se conoce como la caja lipasa [76], donde además se encuentra uno de los tres aminoácidos correspondientes a la triada catalítica que se conserva a lo largo de las familias de lipasas y cutinasas [92]. La enzima PETasa posee su triada

catalítica en los aminoácidos Serina-160, Aspartato-206 e Histidina-237 y basándose en su posición, dicha enzima sugiere tener un sistema de carga-relé similar al de otras enzimas α/β hidrolasas [93]. Un hecho particular de la caja lipasa de PbsA es que un triptófano ocupa la posición X1, mientras que en la mayoría de las lipasas, dicha posición es ocupada por histidina [94].

Se eligieron siguientes residuos flexibles para cada documento de macromolécula en base a los alineamientos realizados en Pymol con la enzima PETasa de *I. sakaiensis*: S174, D220, H251 que corresponden al sitio activo de PbsA *A. delafieldii*. S158, D203, H234 correspondientes a DHL *R. gummiphilus*. Además, se seleccionaron los residuos W157y W183. S162, D208, H240. W160, W187 para DHL *P. brachysporum*.

3.3.3. Preparación de archivo de parámetros de Grid

Se seleccionó la estructura rígida (sin sus residuos flexibles) de cada enzima como macromolécula, el archivo de ligando y residuos flexibles respectivamente. El cuadro de análisis se situó sobre el área de residuos flexibles.

3.3.4. AutoGrid

Los reportes de resultados del análisis de AutoGrid 4.2.6 para las enzimas seleccionadas fueron creados el 16 de septiembre de 2020. La **tabla 17** indica las cargas parciales y totales de cada enzima. Las coordenadas del Grid son reportadas en la **tabla 18**.

Tabla 17 Cargas parciales y totales.

Carga atómica	PbsA	DHLR	DHLP
Parcial máxima	+0.666 e	+0.814 e	+0.814 e
Parcial Mínima	-0.647 e	-0.867 e	-0.867 e
Total	8.27 e	10.02 e	11.02 e
Número total de átomos	2423	2407	2481

Tabla 18 Coordenadas AutoGrid 4.2.6

mGrid Map	PbsA	DHLR	DHLP
mx-dimension	15.0	11.2	13.5
my-dimension	10.5	15.0	12.8
mz-dimension	16.5	16.5	16.5

3.3.5. Resultados de Autodock

Los valores de los parámetros de algoritmo genético utilizados para el procedimiento de docking se reportan en la **tabla 19**, se consideraron condiciones naturales de temperatura (298 °K).

Tabla 19 Parámetros de Docking

Parámetros de algoritmo genético:	
Número de corridos GA:	10
Tamaño de población:	150
Número de evaluaciones:	2500000
Número máximo de individuales:	1
Rate de mutación génica:	0,02
Rate de crossover:	0,8
GA Crossover mode:	twopt
Media de distribución Cauchy para mutación génica:	0,0
Varianza de distribución Cauchy para mutación génica:	1,0
Número de generaciones para elegir peor individual:	10

Tabla 20 Información de Conformación

	PbsA	DHLR	DHLP
Rank	1_1	1_1	1_1
Final Intermolecular Energy (kcal/mol)	-5,34	-7,25	-6,94
Final Total Internal Energy (kcal/mol)	-9,43	-4,25	-4,12
Torsional Free Energy (kcal/mol)	+1,19	+1,19	+1,19
Unbound System's Energy (kcal/mol)	-9,43	-4,25	-4,12
Binbind Energy (kcal/mol)	-4,14	-6,06	-5,75

El cálculo de energía libre de fijación realizado por el software de Autodock4. toma en cuenta La energía libre torsional, las interacciones de puentes de hidrógeno, energía de desolvatación, energía electrostática, las fuerzas de dispersión y repulsión entre ligando y receptor y las fuerzas de van der Walls consideradas en la Energía Intermolecular Final. La energía del sistema sin enlazar es contrarrestada por la energía total Interna que considera las energías internas del ligando, del receptor en reposo y en movimiento [95]. La expansión de la ecuación de la diferencia entre entalpía y entropía se muestra a continuación:

$$\Delta G = (V_b^{L-L}{}_{bound} - W^{L-L}{}_{nbound}) \dagger (V^P{}^{-P}{}_{bound} - V^P{}^{-P}{}_{nbound}) \dots$$

$$\dots + (V^P{}^{-L}{}_{bound} - V^P{}_{u-L}{}_{nbound} + \Delta S_{conf})$$

Donde L se refiere a ligando, P se refiere a proteína, V se refiere a la evaluación de interacción entre ligando y proteína y ΔS denota la perdida de entropía conformacional. El proceso de docking generó 10 complejos por cada enzima

calificados de menor a mayor energía de fijación, de los cuales se eligieron aquellos que presentaban interacciones entre el ligando y los aminoácidos del sitio activo. En la **tabla 20** se reportan los valores de energías considerados para la evaluación de afinidad entre ligando y receptor. Los valores reportados de energía de fijación de las 3 enzimas evaluadas poseen valores negativos, lo que indica una compatibilidad aceptable entre el ligando y cada sustrato de acuerdo a los fundamentos de especificidad de reacción en la catálisis enzimática[96][97]. El valor reportado más bajo de energía de fijación corresponde a la enzima PbsA, con -4,14 kcal/mol. Los valores de las enzimas DHL de *R. gummiphilus* y *P. brachysporum* son 5,71 kcal/mol y 5,5 kcal/mol respectivamente. Dichos valores corresponden a conformaciones de estados de transición calificadas dentro de los rangos más altos de acuerdo al cálculo del programa de docking.

Los valores reportados toman en cuenta una temperatura de 298 °K, la velocidad de reacción de estas enzimas podría ser más alta a temperaturas más altas, considerando que la temperatura de mayor eficiencia de la enzima PETasa es de 30 °C [27] [98] [99].

3.3.6. Visualización de Resultados

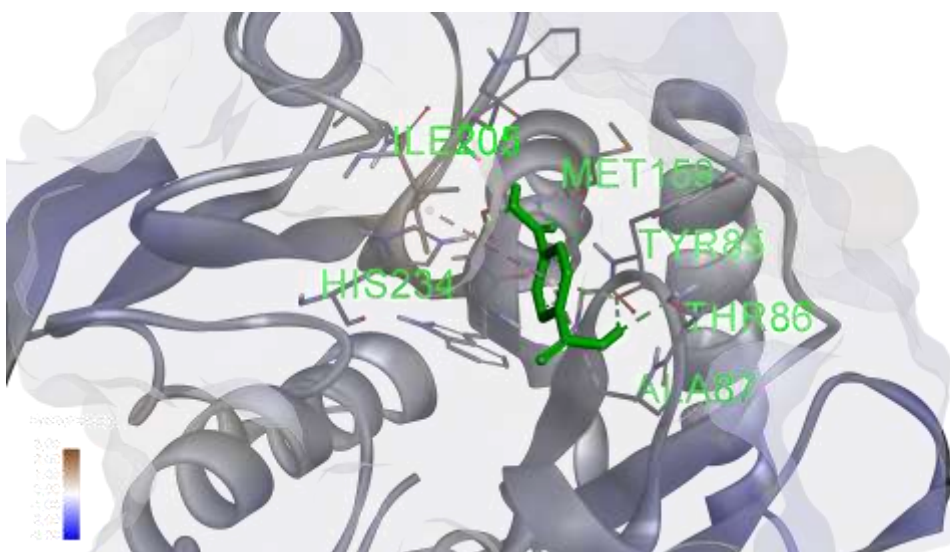
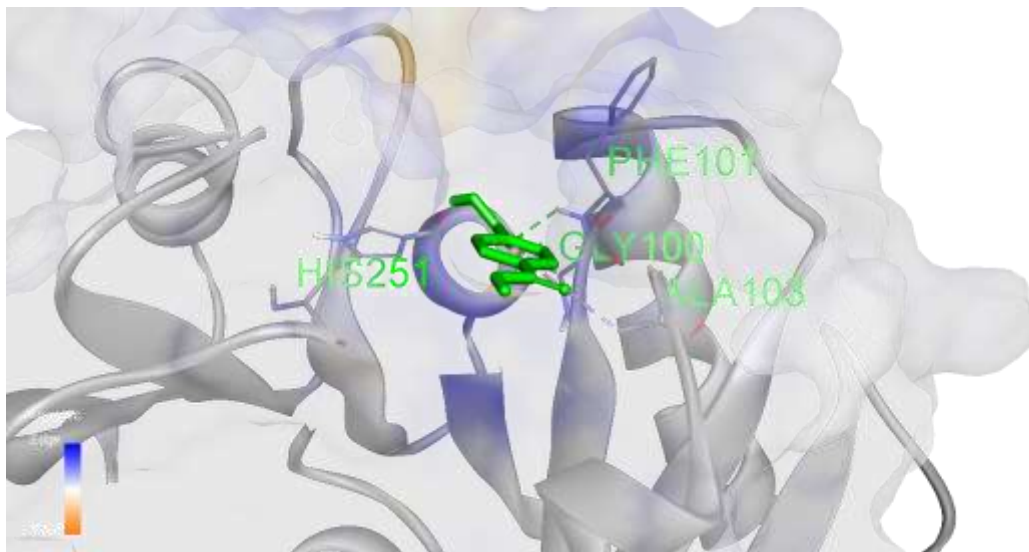
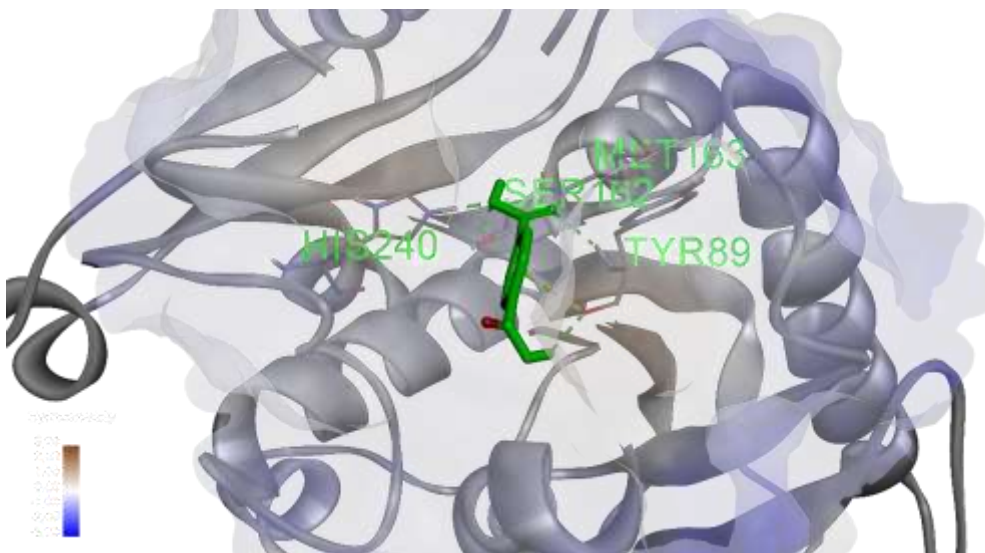


Figura 10 Complejo Proteína-Ligando DHL *P. brachysporum* Superficie Hidrofóbica. Enzima representada en estructura hélice α -hoja plegada β . Monómero de PET representado en stick de color rojo. Residuos catalíticos representados en sticks de color gris, azul y rojo



(a) PbsA



(b) DHL *P. brachysporum*

Figura 11 Complejos Proteína-Ligando, Superficies Hidro-fóbicas. Enzimas representadas en estructura hélice α -hoja plegada β . Monómero de PET representado en stick de color rojo. Residuos catalíticos representados en sticks de color gris, azul y rojo.

En las **figura 12b** y **figura 12a** puede verse que el oxígeno carbonílico del grupo es- ter está ubicado a 2,275 Å del residuo hidrolítico serina 174, dicha posición es más que apropiada para un ataque nucleofílico [100][1][101]. Por otro lado, el segundo oxígeno del

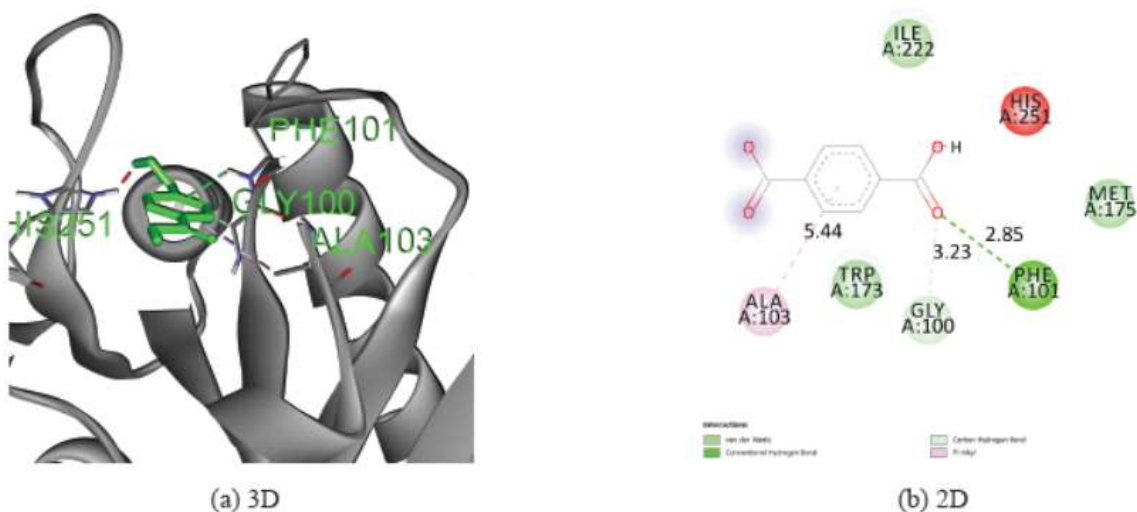


Figura 12 PbsA-Ligando Complejo 1 Interacciones

mismo grupo carbonilo se encuentra a 1,47 Å del grupo amino de la histidina 251, generando un choque de aceptor/donor[86]. Dicha conformación se asimila a otras similares entre la interacción ligando-receptor. El otro extremo del grupo carbonilo se ve estabilizado por un puente de hidrógeno con el grupo amino del residuo fenilalanina 101 a una distancia de 2.85 Å. La posición descrita del extremo carboxilo, que es favorable para la actividad enzimática, es reconocida típicamente en todas las estructuras de cutinasas [86]

[102] [103]. En la **figura 11a** puede verse que los residuos ILE222 y PHE101 favorecen al entorno hidro-fóbico que rodea al anillo tereftálico del PET. Por otro lado, el anillo tereftálico de PET se encuentra a 5,44 Å del extremo metil del residuo alanina 101, formando una interacción $\pi - \sigma$, cuya conjugación lograría doblar el anillo bencénico y favorecer a la estabilidad del PET en dicha posición [104] [105] [105] [106]. El anillo tereftálico se encuentra por encima del residuo

triptófano 174 a 3,235 Å sin embargo, su posición no permite fácilmente una interacción $\pi - \pi$ a diferencia del residuo W185 de la enzima PETasa ubicado en la misma posición [107] [98] [108].

El oxígeno carbonílico del grupo ester de PET en la enzima DHL de *R. gummiphilus* se ve estabilizado por 2 puentes de hidrógeno de los grupos aminos de los residuos metionina 159 a 2,42 Å y tirosina 85 a 1,91 Å, observadas en las figuras 13a y 13b. A diferencia de la conformación observada en la enzima PbsA, el segundo oxígeno carboxílico presenta



Figura 13 DHL *R. gummiphilus*-Ligando Complejo 1 Interacciones

un puente de hidrógeno con el grupo amino del residuo histidina 234 a una distancia de 2,21 Å. El grupo carboxilo se encuentra 2,085 Å del extremo hidrolítico del residuo serina 158, distancia adecuada para un ataque nucleofílico [100][1][101]. El anillo tereftálico de PET se encuentra 5,47 Å y 5,23 Å de los grupos metilos de los residuos isoleucina 205 y alanina 87 respectivamente. Dichas distancias, aunque lejanas, podrían ser considerables para presentar hiper conjugaciones en los orbitales $\pi - \sigma$ y su de localización podría contribuir a la

afinidad del ligando [104] [106]. Al mismo tiempo, una interacción entre el par solitario de un orbital σ interactúa con el anillo tereftálico a una distancia de 2,68 Å del oxígeno del residuo tirosina 85, dicha interacción se conoce como conjugación negativa [109]. EL oxígeno carbonílico del otro extremo de la molécula de PET es estabilizado por dos puentes de hidrógeno del grupo amino del residuo treonina 86 y del oxígeno carbonilo del residuo tirosina 85. La posición del triptófano 157 en esta enzima es muy similar a la posición del triptófano 174 de la enzima PbsA.

La **figura 14b** muestra las siguientes interacciones entre la enzima DHL de *P. brachysporum*: El oxígeno carbonilo del grupo ester de la molécula de PET forma puentes de hidrógeno con el grupo amino del residuo metionina 163 a 2,11 Å y el grupo amino de tirosina 89 a 2,22 Å. El segundo oxígeno del mismo grupo ester de PET forma a la vez 2 puentes de hidrógeno con el grupo amino de histidina 240 1,64 Å y directamente con la serina 240 1,64 Å y directamente con la serina



Figura 14 DHL *P. brachysporum*-Ligando Complejo 1 Interacciones

hidrolítica 162 a 2,21 Å. El carbono hidroxilo de PET se encuentra a 2,737 Å de dicha serina. El par solitario de electrones σ de la tirosina 89 forma una conjugación negativa en le orbital π del anillo tereftálico de PET a una distancia

de 2,95 Å, mientras establece un puente de hidrógeno a 2,42 Å con el oxígeno carbonilo del grupo ester del otro extremo de la molécula de PET. La posición del triptófano 161 de la enzima

Como puede verse en la 11b los residuos leucina 90 y valina 210 favorecen a una superficie hidro-fóbica alrededor del sitio de unión.

3.4. Análisis de Actividad Enzimática

3.4.1. Extracción de plásmidos

Tabla 21 Resultados de Extracción de Plásmidos.

Samp le ID	Date	User Name	Nuclei c Acid conc.	Un it	A26 0	A28 0	260/2 80	260/2 30	Samp le Type	Fact or
W185 A	28/1/20 20	Ayudan te	357. 5	ng / μ L	715 1	356 0	2.01	1.43	DNA	50.00
W159 h- S238F	8/1/202 0	Ayudant e	250. 8	ng / μ L	701 5	3407	2.0 6	1.75	DNA	50.00

En la tabla 21 se reportan los niveles de absorbancia a 260 nm (A_{260}) de las muestras de plásmidos pET21b PETasa W185A mutante con identificación (W185A) y pET21b PETasa W159H-S238F con identificación mutante (W159H-S238F) en solución tras su extracción, siendo 7151 y 7015 respectivamente. Para ADN de doble hélice, una A_{260} de 1.0 es equivalente a $50\mu\text{g/ml}$ [110]. La absorbancia a 280nm reportada fue de 3560 para el plásmido (W185A) y 3407 para (W159H-S238F). Dicha absorbancia se reporta debido a que proteínas con cadenas compuestas por aminoácidos con grupos aromáticos y los compuestos fenólicos tienen una fuerte absorbancia a esa frecuencia[111]. Cadenas laterales como el triptófano y la tirosina son la fuente de absorbancias tan altas de proteínas a 280 nm [96].

El ratio 260/280 reportado en la tabla 21 para los plásmidos (W185A) y (W159H- S238F) fueron 2,01 y 2,06 respectivamente. Estos resultados mayores a

1.80 indican contaminación de proteínas y fenoles [110][111], provenientes de la ejecución del protocolo de extracción. El ratio 260/230 suele ser cercano a 2.0 en reportes de extracciones puras de DNA [111]. Las muestras (W185A) y (W159H-S238F) reportan un ratio de 1,43 y 1,75 respectivamente, lo que indica contaminación de ciertos compuestos orgánicos y sales [111]. Sin embargo, La presencia de los contaminantes reportados no significó ningún inconveniente durante el proceso de transformación celular.

Las concentraciones de ácidos nucleicos de la extracción de los plásmidos 21b PETasa W185A mutante y 21b PETasa W159H-S238F mutante con 357,5 *ng/μl* y 350,8 *ng/μl* respectivamente. Dichas concentraciones son más que suficientes para ejecutar transformaciones celulares en *E. coli* [110][112][113].

3.4.2. Preparación de Stocks de *E. coli* (rosetta)

Se decidió a trabajar con *E. coli* (rosetta) por su capacidad para expresar codones raros. Además, se ha reportado con anterioridad la producción de PETasa en el citosol de *E. coli* (rosetta) a niveles bajos[114]. Los 3 medios solidos con cultivo de *E. coli* (rosetta) presentaron varias colonias bien definidas sin presencia de contaminación.

3.4.3. Transformación de células

Se sembraron 3 placas de cada *E. coli* (rosetta) transformadas con cada uno de los plásmidos (pET21b+IsPETasa, pET21b W185a y PETasa W159H-S238F) exitosamente. Revisión bibliográfica demuestra que *E. coli* (rosetta) ha sido capaz de expresar PETasa por medio de otros plásmidos como pET28 [99][86].

3.4.4. Inducción de producción de enzima por método de IPTG

I. sakaiensis puede degradar plástico a temperaturas de 30 [27][98]. A partir de estos datos y procedimientos anteriores reportados [27][99][98], se decidieron las condiciones de reacción reportadas en la sección de metodología.

Durante el ensayo número 1 se inoculó IPTG en el cultivo líquido de *E. coli* (rosetta) con plásmido pET21b(+)-Is-PETasa al alcanzar una densidad óptica de 0,5879 a 600 nm hasta llegar a una concentración final de 20 mM de IPTG en dicho cultivo. Se mantuvo un tiempo de inducción de 24 horas bajo agitación a 150 rpm a temperatura ambiente.

Durante los ensayos número 2 y 3 se inocularon 113,63 μ L de solución IPTG 1,76 mM en el cultivo de *E. coli* (rosetta) con plásmido pET21b(+)-Is-PETasa al alcanzar una densidad óptica de 0,3667 y 3067 a 600 nm respectivamente. Se mantuvieron tiempos de inducción de 18 horas bajo agitación a 180 rpm a 18 °C para el ensayo número 2 y tiempos de inducción de 2 horas bajo agitación a 180 rpm a 37 °C para el ensayo número 3. El proceso de inducción se diseñó de esta forma para evaluar forma en la que los factores de tiempo de inducción y temperatura intervienen en la producción de PETasa extracelular.

3.4.5. Análisis de expresión enzimática por medio de SDS-PAGE

Las bandas observadas en la **figura 15** indican sobre expresión excesiva de enzima PETasa, cuyo peso molecular es equivalente a 30 kD [54]. Esto indica que la concentración de IPTG fue demasiado alta. Además, las bandas 2, 5, 8 y 10 indican que la concentración más alta de la enzima en cuestión se encuentra en el interior de la célula, lo que lleva a la conclusión de que las condiciones de

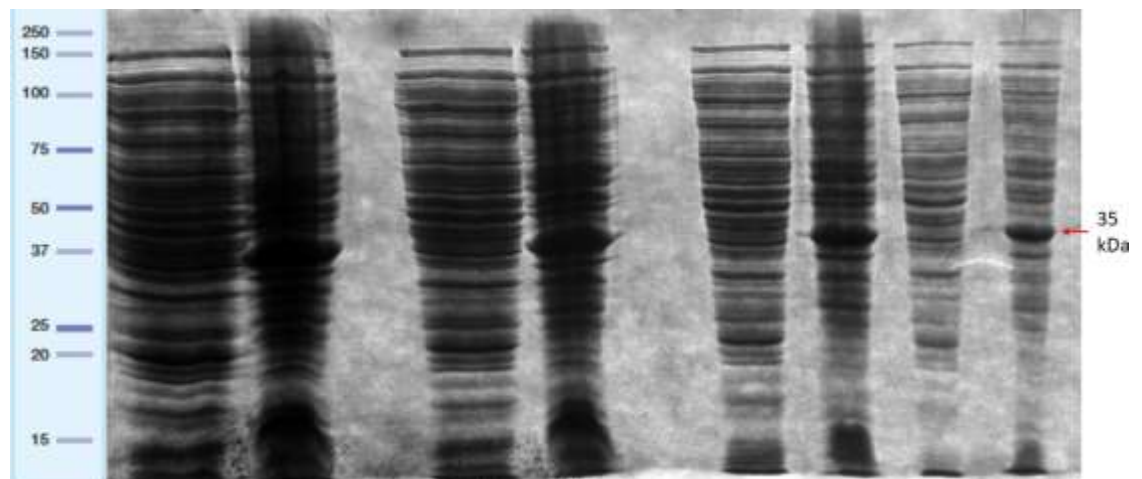


Figura 15 Cultivo *E. coli* rosetta pET21b(+)-Is-PETasa Ensayo N°1: 20 mM IPTG, 500 mL, 37°C, 24 h, 150rpm.

inducción no fueron las adecuadas.

Las bandas número 3,6,8 y 10 observadas en la **figura 16** indican que la enzima PE- Tasa se encuentra en el sobrenadante de los cultivos de ensayos número 2 y 3. Ambos ensayos tuvieron una concentración de 1 mM de IPTG para la inducción de producción de enzima, lo que indica que dicha concentración es la apropiada para expresar dicha enzima de forma extracelular. Además, la densidad de bandas correspondientes al ensayo número 3 es evidentemente más alta que las bandas del ensayo número 2, lo que indica que una temperatura más alta estimula la producción de enzima extracelular en condiciones de agitación constante y periodos de cortos de incubación. Se consideró trabajar con PETasa extracelular por su facilidad de trabajo y porque se considera que su actividad de hidrólisis de PET puede ser comparable a la actividad de PETasa citosólica bajo las condiciones adecuadas [99].

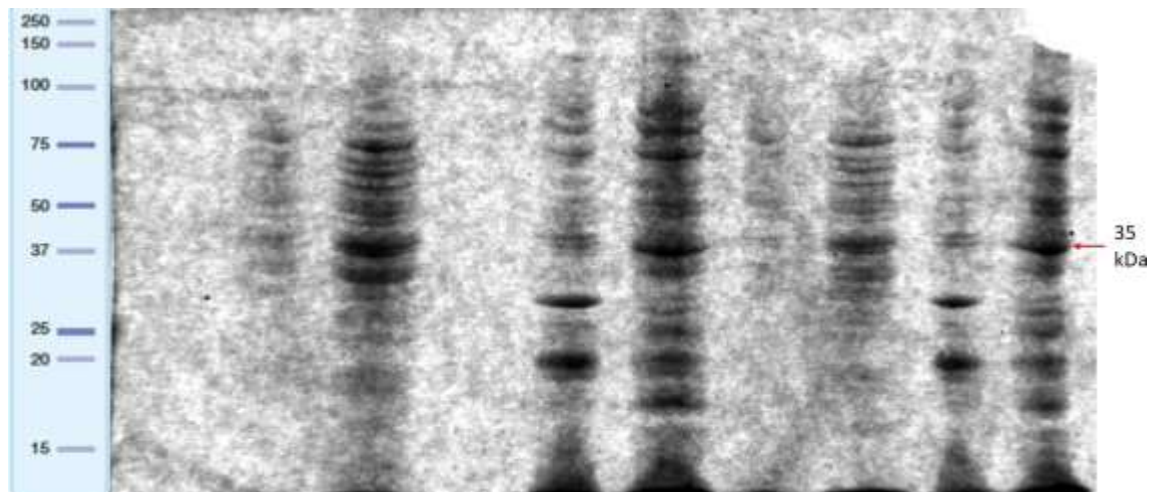


Figura 16 Cultivos *E. coli* rosetta pET21b(+)-Is-PETasa Ensayo N°2: 1 mM IPTG, volumen 1 L, 18 °C, 18 h, 180 rpm. Ensayo N°3: 1 mM IPTG, volumen 1 L, 37 °C, 2 h, 180rpm.

3.4.6. Análisis cualitativo de actividad enzimática

Tabla 22 Pesos Iniciales y finales discos de PET.

Ensayo	Composición	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Inicial (%)	Peso Final (%)	Diferencia (Total (%))
Blanco	200 buffer glicina + 100 buffer STE	0,0088	0,0088	100	100	0,00
2	200 buffer glicina + 100 Sobrenadante (Enzima + buffer STE)	0,0086	0,0086	100	100	0,00
3	200 buffer glicina + 100 Sobrenadante (Enzima + buffer STE)	0,0086	0,0084	100	97,67	2,32

Tras retirar los discos de las soluciones y ser secados, se observó erosión en la superficie de los discos exceptuando el disco sumergido en el control. Como se reporta en la tabla 22, el disco sometido a la solución del ensayo número 3 no presentó cambio alguno en su peso a pesar de tener su superficie erosionada, mientras que el disco sometido a la solución del ensayo número 2 presentó una diferencia de peso de 2,32 %1. Dichos valores de degradación, aunque apreciables, no son comparables con aquellos encontrados en bibliografía debido a su carácter cualitativo [27][99][98].

CAPITULO IV

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Por medio del análisis filogenético se determinó la similitud de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* con la enzima PBS depolimerasa de *A. delafieldii* y de las enzimas lactato deshidrogenasas de bacterias de la familia Rizhobacteria y Polyangium.
- Se construyó un árbol filogenético sin raíz de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* con más de 100 secuencias proteicas de similitud superior al 40 %, a pesar de esto, el número de enzimas con una similitud superior al 70 % a la enzima PETasa son menor a 10.
- Por medio del análisis de docking molecular se determinaron las energías de fijación de las enzimas PbsA, DHL de *R. gummiphilus* y *P. brachysporum*, indicando que poseen afinidad con los monómeros de PET.
- A partir de los resultados de la reconstrucción ancestral en GRASP se deduce que la enzima PETasa proviene de sustituciones de residuos en enzimas α/β hidrolasas expresadas en su mayoría en bacterias del genus Rizhobacteria. Sus ancestros más lejanos pertenecen al filo Actinobacteria.

4.2. Recomendaciones

- Desarrollar estudios de cristalografía de las enzimas de mayor similitud a la enzima PETasa para confirmar su actividad de hidrólisis de PET.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- [1] L.G. Wade. *Organic Chemistry*. Always learning. Pearson, 2013.
- [2] Vijay Kumar Sinha, Mayank R Patel, and J V Patel. Pet Waste Management by Chemical Recycling : A Review Pet Waste Management by Chemical Recycling : A Review. (August 2014), 2010.
- [3] Mohammad Mahdi Paydar and Marjan Olfati. Designing and solving a reverse logistics network for polyethylene terephthalate bottles. *Journal of Cleaner Pro- duction*, 195:605–617, 2018.
- [4] Hogyun Seo, Seongmin Kim, Hyeoncheol Francis Son, Hye-Young Sagong, Seong- joon Joo, and Kyung-Jin Kim. Production of extracellular petase from ideonella sakaiensis using sec-dependent signal peptides in e. coli. *Biochemical and Biophy- sical Research Communications*, 508(1):250 – 255, 2019.
- [5] Silpa Kaza, Lisa Yao, Perinaz Bhada-Tata, and Frank Van Woerden. *What a waste 2.0: a global snapshot of solid waste management to 2050*. The World Bank, 2018.
- [6] Roland Geyer, Jenna R Jambeck, and Kara Lavender Law. Production , use , and fate of all plastics ever made. (July):25–29, 2017.
- [7] INEC. Información Ambiental en Hogares. Technical report, Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2016.

- [8] Christopher Blair Crawford and Brian Quinn. 3 - plastic production, waste and legislation. In Christopher Blair Crawford and Brian Quinn, editors, *Microplastic Pollutants*, pages 39 – 56. Elsevier, 2017.
- [9] Laurent Lebreton and Anthony Andrady. Future scenarios of global plastic waste generation and disposal. *Palgrave Communications*, 5(1):6, 2019.
- [10] David Santillo, Kathryn Miller, and Paul Johnston. Microplastics as contaminants in commercially important seafood species. *Integrated environmental assessment and management*, 13(3):516–521, 2017.
- [11] A. J. Jamieson, L. S. R. Brooks, W. D. K. Reid, S. B. Piertney, B. E. Narayanas- wamy, and T. D. Linley. Microplastics and synthetic particles ingested by deep-sea amphipods in six of the deepest marine ecosystems on earth. *Royal Society Open Science*, 6(2):180667, 2019.
- [12] Karen Duis and Anja Coors. Microplastics in the aquatic and terrestrial environ- ment: sources (with a specific focus on personal care products), fate and effects. *Environmental Sciences Europe*, 28(1):2, 2016.
- [13] Albert A Koelmans, Ellen Besseling, and Won J Shim. Nanoplastics in the aqua- tic environment. critical review. In *Marine anthropogenic litter*, pages 325–340. Springer, Cham, 2015.
- [14] Matthias C Rillig. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil?, 2012.
- [15] Alice A Horton, Alexander Walton, David J Spurgeon, Elma Lahive, and Claus Svendsen. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. *Science of the Total Environment*, 586:127–141, 2017.

- [16] Maruf Mortula. Health Risk Assessment of PET Bottles in GCC. (February), 2015.
- [17] James E Cooper, Eric L Kendig, and Scott M Belcher. Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles. *Chemosphere*, 85(6):943–947, oct 2011.
- [18] D. Brown, K.R. Butterworth, I.F. Gaunt, P. Grasso, and S.D. Gangolli. Short-term oral toxicity study of diethyl phthalate in the rat. *Food and Cosmetics Toxicology*, 16(5):415 – 422, 1978.
- [19] S. Oishi and K. Hiraga. Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: Effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 53(1):35 – 41, 1980.
- [20] A. Michalski. Hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) waste to obtain terephthalic acid. *WI. Chem*, 49(144), 1987.
- [21] Polish patent 140015. 1987.
- [22] Debajyoti Ghosal, Shreya Ghosh, Tapan K Dutta, and Youngho Ahn. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (pahs): a review. *Frontiers in microbiology*, 7:1369, 2016.
- [23] Ee-ling Ng, Esperanza Huerta, Simon M Eldridge, Priscilla Johnston, Hangwei Hu, Violette Geissen, and Deli Chen. Science of the Total Environment An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. *Science of the Total Environment*, 627:1377–1388, 2018.
- [24] Ren Wei and Wolfgang Zimmermann. Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we? *Microbial biotechnology*, 10(6):1308–1322, 2017.

- [25] Carla Silva, Shi Da, Nádia Silva, Teresa Matamá, Rita Araújo, Madalena Martins, Sheng Chen, Jian Chen, Jing Wu, Margarida Casal, and Artur Cavaco-Paulo. Engineered thermobifida fusca cutinase with increased activity on polyester substrates. *Biotechnology Journal*, 6(10):1230–1239, 2011.
- [26] Thidarat Nimchua, Hunsu Punnapayal, and Wolfgang Zimmermann. Comparison of the hydrolysis of polyethylene terephthalate fibers by a hydrolase from *Fusarium oxysporum* LCH I and *Fusarium solani* f. sp. pisi. *Biotechnol. J.*, pages 361–364, 2007.
- [27] Shosuke Yoshida, Kazumi Hiraga, Toshihiko Takehana, Ikuo Taniguchi, Hironao Yamaji, Yasuhito Maeda, Kiyotsuna Toyohara, Kenji Miyamoto, Yoshiharu Kimura, and Kohei Oda. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *351(6278)*:1–5, 2016.
- [28] H Mark and G.S. Whitby. *Collected Papers Of Wallace Hume Carothers On High Polymeric Substances*. Interscience Publishers Inc., 1940.
- [29] Richard J Sheehan, Amoco Chemical Company, and United States. Terephthalic Acid, Dimethyl Terephthalate, and Isophthalic Acid. In *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley Verlag GmbH & Co. KGaA., Naperville, 2011.
- [30] Courtney Arthur, Joel Baker, and Holly Bamford. Proceedings of the International Research Workshop on the Occurrence, Effects, and Fate of Microplastic Marine Debris. (September), 2008.
- [31] Julien Gigault, Alexandra ter Halle, Magalie Baudrimont, Pierre-Yves Pascal, Fabienne Gauffre, Thuy-Linh Phi, Hind [El Hadri], Bruno Grassl, and Stéphanie Reynaud. Current opinion: What is a nanoplastic? *Environmental Pollution*, 235:1030–1034, 2018.

- [32] Brigitte Toussaint, Barbara Raffael, Alexandre Angers-Loustau, Douglas Gilliland, Vikram Kestens, Mauro Petrillo, Iria M. Rio-Echevarria, and Guy Van den Eede. Review of micro- and nanoplastic contamination in the food chain. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36(5):639–673, 2019. PMID: 30985273.
- [33] Julien Gigault, Boris Pedrono, Benoît Maxit, and Alexandra Ter Halle. Marine plastic litter: the unanalyzed nano-fraction. *Environmental Science: Nano*, 3(2):346–350, 2016.
- [34] Scott Lambert and Martin Wagner. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. *Chemosphere*, 145:265 – 268, 2016.
- [35] C W Neale, N. C. Hilyard, and P. Barber. OBSERVATIONS ON THE ECONOMICS OF RECYCLING INDUSTRIAL SCRAP PLASTIC IN NEW PRODUCTS *. *Conservation & Recycling*, 6(December 1982), 1983.
- [36] Burns R Warren, LM. *Plast technol.* pages 6–41, 1988.
- [37] Holger J. Glatzer and L.K. Doraiswamy. Rate enhancements due to autocatalysis and heterogenization in phase transfer catalysis: a comparative study. *Chemical Engineering Science*, 55(21):5149 – 5160, 2000.
- [38] K V Datye, H M Raje, and N D Sharma. Poly(ethylene terephthalate) waste and its utilisation: A review. *Resources and Conservation*, 11(2):117–141, 1984.
- [39] Ben-Zu Wan, Chih-Yu Kao, and Wu-Hsun Cheng. Kinetics of Depolymerization of Poly(ethylene terephthalate) in a Potassium

Hydroxide Solution. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 40(2):509–514, jan 2001.

- [40] M John Ramsden and Julia A Phillips. Factors influencing the kinetics of the alkaline depolymerisation of poly(ethylene terephthalate). I: The effect of solvent. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 67(2):131–136, oct 1996.
- [41] A. Michalski. Poly(ethylene terephthalate) waste utilization by hydrolysis in neutral environment. *Ekoplast*, 2(52), 1993.
- [42] Jorge W. Mandoki. Depolymerization of Condensation Polymers. (19), 1986.
- [43] Bruce Rosen, Morton Grove, H Magidson, and Ralph C Medhurst. United States Patent (19). (19), 1992.
- [44] Harvie. JL Royall. DJ. EU Patent 550,979;CA 120:9127a. 1993.
- [45] Ioanna Kyrikou and Demetres Briassoulis. Biodegradation of agricultural plastic films: a critical review. *Journal of Polymers and the Environment*, 15(2):125–150, 2007.
- [46] Ann-Christine Albertsson. Biodegradation of synthetic polymers. ii. a limited microbial conversion of 14c in polyethylene to 14co2 by some soil fungi. *Journal of Applied Polymer Science*, 22(12):3419–3433, 1978.
- [47] Tuan Quoc Nguyen. Polymer degradation and stabilization. *Handbook of polymer reaction engineering*, pages 757–831, 2005.
- [48] Ann-Christine Albertsson, Sven Ove Andersson, and Sigbritt Karlsson. The mechanism of biodegradation of polyethylene. *Polymer degradation and stability*, 18(1):73–87, 1987.

- [49] Noreen L Thomas, Jane Clarke, Andrew R McLauchlin, and Stuart G Patrick. Oxo- degradable plastics: degradation, environmental impact and recycling. In *Proceedings of the Institution of Civil Engineers-Waste and Resource Management*, volume 165, pages 133–140. ICE Publishing, 2012.
- [50] Daniel Moog, Johanna Schmitt, Jana Senger, Jan Zarzycki, Karl Heinz Rexer, Uwe Linne, Tobias Erb, and Uwe G Maier. Using a marine microalga as a chassis for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Microbial Cell Factories*, pages 1–15, 2019.
- [51] Xu Han, Weidong Liu, Jian-wen Huang, Jiantao Ma, Yingying Zheng, Tzuping Ko, Limin Xu, Ya-shan Cheng, Chun-chi Chen, and Rey-ting Guo. Structural insight into catalytic mechanism of PET. *Nature Communications*.
- [52] Rolf-Joachim Müller, Hedwig Schrader, Jörn Profe, Karolin Dresler, and Wolf-Dieter Deckwer. Enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate): rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular rapid communications*, 26(17):1400–1405, 2005.
- [53] JY Chen, CF Ou, YC Hu, and CC Lin. Depolymerization of poly (ethylene terephthalate) resin under pressure. *Journal of applied polymer science*, 42(6):1501–1507, 1991.
- [54] The UniProt Consortium. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D506–D515, 11 2018.
- [55] ncbi.nlm.nih.gov. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed: 2020-04-14.

- [56] blast.ncbi.nlm.nih.gov. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome. Accessed: 2020-04-14.
- [57] Multiple alignment program for amino acid or nucleotide sequences. https://mafft.cbrc.jp/alignment/software/ubuntu_on_windows.html. Accessed: 2020-04-15.
- [58] Seqscrub. upload a fasta file to edit all headers into the specified cleaned format.
<http://www.gabefoley.com/seqscrub/>. Accessed: 2020-05-10.
- [59] ebi.ac.uk multiple sequence alignment. https://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/simple_phylogeny/. Accessed: 2020-04-15.
- [60] raxmlgui 2.0. <https://antonellilab.github.io/raxmlGUI/>. Accessed: 2020-04-15.
- [61] Graphical representation of ancestral sequence predictions. <http://grasp.scmb.uq.edu.au/>.
- [62] Rcsb protein data bank. <https://www.rcsb.org/>. Accessed: 2020-04-15.
- [63] Biozentrum swiss-model. <https://swissmodel.expasy.org/>. Accessed: 2020-06-04.
- [64] Pymol. <https://pymol.org/2/>. Accessed: 2020-06-15.
- [65] Adt / autodocktools. <http://autodock.scripps.edu/resources/adt>.
- [66] Adt / addgene. <https://www.addgene.org/>.

- [67] HC Birnboim and Janine Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic acids research*, 7(6):1513–1523, 1979.
- [68] HC Birnboim. [17] a rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid dna. In *Methods in enzymology*, volume 100, pages 243–255. Elsevier, 1983.
- [69] Tohru Yamamoto and Masami Horikoshi. Rapid preparation of plasmid templates suitable for a dna sequencer without rnase treatment. *Nucleic acids research*, 23(16):3351–3352, 1995.
- [70] Liliana Cerda-Mejía. *Enzimas Modificadoras de la Pared Celular vegetal. Celulas de Interés Biotecnológico Papelero*. PhD thesis, Universitat de Barcelona, 2016.
- [71] Biorad. Mini-Protein Tetra Cell Instruction Manual.
- [72] Julie D. Thompson, Arnaud Muller, Andrew Waterhouse, Jim Procter, Geoffrey J. Barton, Frédéric Plewniak, and Olivier Poch. MACSIMS : Multiple alignment of complete sequences information management system. *BMC Bioinformatics*, 7:1– 13, 2006.
- [73] Michele Clamp, James Cuff, Stephen M. Searle, and Geoffrey J. Barton. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*, 20(3):426–427, 2004.
- [74] Hardaning Pranamuda, Rungsima Chollakup, and Yutaka Tokiwa. Degradation of polycarbonate by a polyester-degrading strain, *amycolatopsis* sp. strain ht-6. *Applied and environmental microbiology*, 65(9):4220–4222, 1999.

- [75] Hiromi Uchida, Toshiaki Nakajima-Kambe, Yukie Shigeno-Akutsu, Nobuhiko Nomura, Yutaka Tokiwa, and Tadaatsu Nakahara. Properties of a bacterium which degrades solid poly (tetramethylene succinate)-co-adipate, a biodegradable plastic. *FEMS microbiology letters*, 189(1):25–29, 2000.
- [76] Hiromi Uchida, Yukie Shigeno-Akutsu, Nobuhiko Nomura, Tadaatsu Nakahara, and Toshiaki Nakajima-Kambe. Cloning and sequence analysis of poly(tetramethylene succinate) depolymerase from *Acidovorax delafieldii* strain BS-3. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93(2):245–247, 2002.
- [77] Andrew Waterhouse, Martino Bertoni, Stefan Bienert, Gabriel Studer, Gerardo Tauriello, Rafal Guminiy, Florian T Heer, Tjaart A P de Beer, Christine Rempfer, Lorenza Bordoli, Rosalba Lepore, and Torsten Schwede. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1):W296–W303, 05 2018.
- [78] Nicolas Guex, Manuel C. Peitsch, and Torsten Schwede. Automated comparative protein structure modeling with swiss-model and swiss-pdbviewer: A historical perspective. *ELECTROPHORESIS*, 30(S1):S162–S173, 2009.
- [79] M Biasini, T Schmidt, Stefan Bienert, V Mariani, G Studer, Jürgen Haas, Niklaus Johnner, Andreas Schenk, A Philippsen, and Torsten Schwede. Openstructure: An integrated software framework for computational structural biology. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 69:701–9, 05 2013.

- [80] Christiam Camacho, George Coulouris, Vahram Avagyan, Ning Ma, Jason Papadopoulos, Kevin Bealer, and Thomas L Madden. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics*, 10(1):421, 2009.
- [81] Michael Remmert, Andreas Biegert, Andreas Hauser, and Johannes Söding. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nature Methods*, 9(2):173–175, 2012.
- [82] Stefan Bienert, Andrew Waterhouse, Tjaart A. P. de Beer, Gerardo Tauriello, Gabriel Studer, Lorenza Bordoli, and Torsten Schwede. The SWISS-MODEL Repository—new features and functionality. *Nucleic Acids Research*, 45(D1):D313–D319, 11 2016.
- [83] Pascal Benkert, Marco Biasini, and Torsten Schwede. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 27(3):343–350, feb 2011.
- [84] Chun-Chi Chen, Xu Han, Tzu-Ping Ko, Weidong Liu, and Rey-Ting Guo. Structural studies reveal the molecular mechanism of petase. *The FEBS journal*, 285(20):3717–3723, 2018.
- [85] Xu Han, Weidong Liu, Jian-Wen Huang, Jiantao Ma, Yingying Zheng, Tzu-Ping Ko, Limin Xu, Ya-Shan Cheng, Chun-Chi Chen, and Rey-Ting Guo. Structural insight into catalytic mechanism of pet hydrolase. *Nature communications*, 8(1):1–6, 2017.
- [86] Tobias Fecker, Pablo Galaz-Davison, Felipe Engelberger, Yoshie Narui, Marcos Sotomayor, Loreto P Parra, and César A Ramírez-Sarmiento. Active site flexibility as a hallmark for efficient pet degradation by *i. sakaiensis* petase. *Biophysical journal*, 114(6):1302–1312, 2018.
- [87] Bing Liu, Lihui He, Liping Wang, Tao Li, Changcheng Li, Huayi Liu, Yunzi Luo, and Rui Bao. protein crystallography and site-direct

mutagenesis analysis of the poly (ethylene terephthalate) hydrolase petase from *ideonella sakaiensis*. *ChemBio- Chem*, 19(14):1471–1475, 2018.

- [88] Marcus D Hanwell, Donald E Curtis, David C Lonie, Tim Vandermeersch, Eva Zurek, and Geoffrey R Hutchison. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4(1):17, 2012.
- [89] Thomas A Halgren. Merck molecular force field. i. basis, form, scope, parameterization, and performance of mmff94. *Journal of computational chemistry*, 17(5-6):490–519, 1996.
- [90] Garrett M Morris, Ruth Huey, William Lindstrom, Michel F Sanner, Richard K Belew, David S Goodsell, and Arthur J Olson. Autodock4 and autodocktools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*, 30(16):2785–2791, 2009.
- [91] Hendrik Heinz and Ulrich W Suter. Atomic Charges for Classical Simulations of Polar Systems. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(47):18341–18352, nov 2004.
- [92] Alissa Rauwerdink and Romas J Kazlauskas. How the same core catalytic machinery catalyzes 17 different reactions: the serine-histidine-aspartate catalytic triad of α/β -hydrolase fold enzymes. *ACS catalysis*, 5(10):6153–6176, 2015.
- [93] Sheng Chen, Xing Tong, Ronald W Woodard, Guocheng Du, Jing Wu, and Jian Chen. Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of biological chemistry*, 283(38):25854–25862, 2008.
- [94] Georges Feller, Michel Thiry, Jean-Louis Arpigny, Max Mergeay, and Charles Gerday. Lipases from psychrotropic antarctic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 66(1-3):239–243, 1990.

- [95] Ruth Huey, Garrett M Morris, Arthur J Olson, and David S Goodsell. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *Journal of computational chemistry*, 28(6):1145–1152, 2007.
- [96] David L Nelson, Albert L Lehninger, and Michael M Cox. *Lehninger principles of biochemistry*. Macmillan, 2008.
- [97] Michael T Madigan, John M Martinko, Jack Parker, et al. *Brock biology of micro-organisms*, volume 11. Prentice hall Upper Saddle River, NJ, 1997.
- [98] Harry P Austin, Mark D Allen, Bryon S Donohoe, Nicholas A Rorrer, Fiona L Kearns, Rodrigo L Silveira, Benjamin C Pollard, Graham Dominick, Ramona Duman, Kamel El Omari, et al. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(19):E4350–E4357, 2018.
- [99] Hogyun Seo, Seongmin Kim, Hyeoncheol Francis, Hye-young Sagong, Seongjoon Joo, and Kyung-jin Kim. Biochemical and Biophysical Research Communications Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, (xxxx), 2018.
- [100] HB Burgi, JD Dunitz, and Eli Shefter. Geometrical reaction coordinates. ii. nucleophilic addition to a carbonyl group. *Journal of the American Chemical Society*, 95(15):5065–5067, 1973.
- [101] S Kashif Sadiq and Peter V Coveney. Computing the role of near attack conformations in an enzyme-catalyzed nucleophilic bimolecular reaction. *Journal of chemical theory and computation*, 11(1):316–324, 2015.

- [102] Peter James Baker and Jin Kim Montclare. Biotransformations using cutinase. In *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*, pages 141–158. ACS Publications, 2010.
- [103] Takeshi Kawabata, Masayuki Oda, and Fusako Kawai. Mutational analysis of cutinase-like enzyme, cut190, based on the 3d docking structure with model compounds of polyethylene terephthalate. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(1):28–35, 2017.
- [104] Rolf Gleiter. Pi-sigma interactions: Experimental evidence and its consequences for the chemical reactivity of organic compounds. *Pure and Applied Chemistry*, 59(12):1585–1594, 1987.
- [105] Igor V Alabugin, Kerry M Gilmore, and Paul W Peterson. Hyperconjugation. *Wiley interdisciplinary reviews: computational molecular science*, 1(1):109–141, 2011.
- [106] John E McMurry. *Organic chemistry with biological applications*. Cengage Learning, 2014.
- [107] Eric V Anslyn and Dennis A Dougherty. *Modern physical organic chemistry*. University science books, 2006.
- [108] Ildiko Pecsí, Ibolya Leveles, Veronika Harmat, Beata G Vertessy, and Judit Toth. Aromatic stacking between nucleobase and enzyme promotes phosphate ester hydrolysis in dutpase. *Nucleic acids research*, 38(20):7179–7186, 2010.
- [109] Alan D McNaught, Andrew Wilkinson, et al. *Compendium of chemical terminology*, volume 1669. Blackwell Science Oxford, 1997.
- [110] Desmond ST Nicholl. *An introduction to genetic engineering*. Cambridge University Press, 2008.

- [111] George Somerset Watts. Interpreting Nanodrop (Spectrophotometric) Results. page 4, 2017.
- [112] Addgene, pet21b(+)-is-petasa. <https://www.addgene.org/112202/>. Accessed: 2019-11-27.
- [113] Sha Li, L Meadow Anderson, Jui-Ming Yang, Liwei Lin, and Haw Yang. Dna transformation via local heat shock. *Applied physics letters*, 91(1):013902, 2007.
- [114] Seongjoon Joo, In Jin Cho, Hogyun Seo, Hyeoncheol Francis Son, Hye-Young Sa-gong, Tae Joo Shin, So Young Choi, Sang Yup Lee, and Kyung-Jin Kim. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1):382, 2018.

Anexos

Extracción de Plásmidos

Los valores reportados en el cuadro corresponden a un volumen de 1 Litro.

Tabla 23 Receta caldo de Lisogenia

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de Levadura	10
NaCl	5
Triptona	10

Tabla 24 Receta medio sólido de Lisogenia

Reactivo	Cantidad (g)
Extracto de Levadura	10
NaCl	5
Triptona	10
Agar	

Tabla 25 Soluciones para Extracción de ADN por medio de lisis alcalina.

	Glucosa 50 mM
Solución I (Solución de resuspensión):	Tris HCL 25 mM pH 8 EDTA 10 mM Conservar a 4° C
Solución II (Solución de Lisis):	NaOH 0,2 N SDS al 1 %
Solución III:	Acetato Sódico 3M pH 4,8
TE:	Tris HCL 10 mM pH 8,0
EDTA 1 mM	

Archivos adjuntos de SDS-PAGE

Tabla 26 Concentración de gel necesaria para concentración de proteína.

Protein MW range, kDa	Recommended gel, %
~5-50	18
~5-60	16
~10-80	14
~20-150	12
~30-200	10
~40-250	8
~60-300	6
~100-400	4
Protein MW range, kDa	Recommended gradient gel, %
~5-100	10-20
~5-300	4-20
~10-200	8-16
~30-300	4-12

Tabla 27 Preparación de gel de corrido

Reactivo	100	12	15	Reactivo	10	12	15
	%	%	%		%	%	%
MilliQ H ₂ O(ml)	3.95	3.3	2.4	MilliQ H ₂ O(ml)	4.8	4.3	3.6
30 % acrylamide mix(ML)	3.35	4	5	%	2.5	3	3.75
1.5 m Tris/HCL (pH 8.8)(ml)	100	100	100	1.5 m Tris/HCL (pH 8.8)(ml)	100	100	100
10 % SDS (μl)	100	100	100	10 % SDS (μl)	100	100	100
10 % Amonio persulfate (μl)	100	100	100	10 % Amonio persulfate (μl)	100	100	100
TEMED (μl)	5	5	5	TEMED (μl)	5	5	5

Tabla 28 Preparación de gel de stacking

Stacking				
MilliQ H ₂ O (ml)		2.28	MilliQ H ₂ O (ml)	3.13
30 % Acrylamide mix (μl)		680	40 % Acrylamide mix (μl)	620
0.5 M Tris/HCL (pH 6.8)(ml)		1	0.5 M Tris/HCL (pH 6.8)(ml)	1.25
10 % SDS (μl)		40	10 % SDS (μl)	40
10 % Ammonium persulfate (μl)		50	10 % Ammonium persulfate (μl)	50
TEMED (μl)		5	TEMED (μl)	10