



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



---

**Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis***

---

Informe final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Degradación de polímeros orgánicos mediante el uso de enzimas recombinantes” CEDIA-CEPRAXVI,2022, aprobado mediante Resolución 1324-CU-P-2021 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

**Autor:** María Eduarda Sevilla Cevallos

**Tutor:** PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre 2022**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Liliana Alexandra Cerda Mejía, PhD.

### **CERTIFICA**

Que el presente trabajo ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final de Integración Curricular 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.

Ambato, 12 de Agosto de 2022

---

PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Sevilla Cevallos María Eduarda, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Sevilla Cevallos María Eduarda

C.I. 1805455969

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, 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. Helena Maritza De La Torre Olvera

C.I. 1309651998

---

PhD. Lorena De Los Ángeles Núñez Villacís

C.I. 1804256905

Ambato, 5 de Septiembre de 2022

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, 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.



---

Sevilla Cevallos María Eduarda

C.I. 1805455969

**AUTORA**

## DEDICATORIA

*A mi familia.*

*A mis padres, mi ejemplo, quienes me enseñaron a creer en mí.*

*A mi hermanita, y su impresionante capacidad para hacernos sonreír.*

*A José Miguel.*

## AGRADECIMIENTOS

GRACIAS A DIOS POR ABSOLUTAMENTE TODO.

ES DIFÍCIL CREER QUE ESTA ETAPA TAN LINDA SE ESTÁ TERMINANDO ( PARECÍA INFINITA) Y QUE ME DEJA TANTO POR QUÉ AGRADECER.

EN PRIMER LUGAR, A MIS TUTORES, LILIANA CERDA Y MARIO GARCÍA, GRACIAS POR SU GUÍA, SU APOYO Y PACIENCIA, GRACIAS POR SER VERDADEROS PROFESIONALES, POR SER EJEMPLO, NO SOLO DE INVESTIGADORES, SINO DE PERSONAS.

GRACIAS A MI FAMILIA. A MIS PADRES, POR APOYARME EN CADA UNA DE MIS DECISIONES Y SUEÑOS, POR DEMOSTRARME QUE NADA ES IMPOSIBLE, Y ENSEÑARME A VER LO VERDADERAMENTE IMPORTANTE DE LA VIDA. A MI HERMANITA, MI COMPAÑERA Y AMIGA, POR ESTAR SIEMPRE AHÍ, POR SER LUZ.

A MIS AMADOS ABUELOS, CARMITA, BOLÍVAR Y SYLVI, GRACIAS POR COMPARTIR CON AMOR SU SABIDURÍA Y EXPERIENCIA, POR SU PREOCUPACIÓN, Y AYUDA INCONDICIONAL.

A JOSÉ MIGUEL, GRACIAS POR ESTAR. POR SER AMOR, AMISTAD, REFUGIO Y APOYO INCONDICIONAL. GRACIAS POR EL MANGO RELAJADO EN CADA CRISIS DE ESTRÉS. GRACIAS POR SER SOL EN DÍAS DE OSCURIDAD.

A MIS QUERIDOS AMIGOS, GABY, MELA, ANA, DANIEL, MIGUE Y ZULY. ¡SIN USTEDES NO HABRÍA SOBREVIVIDO! GRACIAS, NO SOLO POR SER UN GRAN EQUIPO EN LO ACADÉMICO, SINO TAMBIÉN EN LO PERSONAL. GRACIAS POR LAS RISAS, LOS ALMUERZOS, LAS CONVERSACIONES, GRACIAS POR SU AMISTAD Y SU APOYO.

A LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO Y A LA FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, NO SOLO POR LA INVALUABLE FORMACIÓN Y LAS EXPERIENCIAS QUE ME HAN BRINDADO, SINO TAMBIÉN POR PERMITIRME SER LA VOZ DE MIS COMPAÑEROS Y CONVERTIRME EN UN AGENTE DE CAMBIO.

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO

<b>APROBACIÓN DEL TUTOR</b> .....	ii
<b>DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD</b> .....	iii
<b>APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO</b> .....	iv
<b>ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDO</b> .....	viii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>ÍNDICE DE ANEXOS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	1
<b>1.1. Antecedentes Investigativos</b> .....	1
1.1.1. Problemática ambiental generada por los residuos plásticos .....	1
1.1.2. Polímeros .....	1
1.1.3. Tratamientos para la degradación del PET .....	3
1.1.4. PCR Mutagénica .....	11
1.1.5. Expresión de enzimas .....	12
1.1.6. Purificación de enzimas .....	13
<b>1.2. Objetivos</b> .....	16
1.2.1. Objetivo general .....	16
1.2.2. Objetivos específicos .....	16
<b>CAPÍTULO II</b> .....	17
<b>2. METODOLOGÍA</b> .....	17
<b>2.1. Métodos</b> .....	17
<b>2.1.1. Diseño de primers</b> .....	17
2.1.1.1. Determinación de las variantes mutantes .....	17
2.1.1.2. Secuencia de del gen que codifica para PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> .....	17
2.1.1.3. Diseño de primers para cada variante mutante .....	18

2.1.2.	<b>Obtención de variantes mutantes de la enzima PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> mediante mutagénesis dirigida.</b>	18
2.1.2.1.	PCR mutagénica	18
2.1.3.	<b>Expresión de las variantes mutantes construidas mediante un sistema heterólogo.</b>	22
2.1.3.1.	Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> Rosetta (DE3) mediante choque térmico	22
2.1.3.2.	<b>Expresión de la proteína</b>	22
2.1.4.	<b>Purificación de las variantes mutantes desarrolladas a través de cromatografía de afinidad</b>	23
2.2.	<b>Materiales y reactivos.</b>	23
2.2.1.	Materiales	23
2.2.2.	Reactivos	24
2.2.3.	Líneas celulares	24
2.2.4.	Secuencias utilizadas	25
2.2.5.	Equipos	25
2.2.6.	Recursos tecnológicos:	25
<b>CAPÍTULO III</b>		26
3.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	26
3.1.	Diseño de primers	26
3.2.	Obtención de variantes mutantes	29
3.3.	Análisis de secuencias de nucleótidos	30
3.4.	Ensayo de expresión	32
<b>CAPÍTULO IV</b>		39
4.	<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	39
4.1.	Conclusiones	39
4.2.	Recomendaciones	39
<b>MATERIAL DE REFERENCIA</b>		40
<b>ANEXOS</b>		50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Variaciones en la secuencia de aminoácidos de la enzima PETasa.....	9
<b>Tabla 2.</b>	Procedimientos de purificación de proteínas .....	14
<b>Tabla 3.</b>	Orden de los reactivos para la preparación de la PCR.....	19
<b>Tabla 4.</b>	Parámetros para los ciclos de la PCR mutagénica.....	19
<b>Tabla 5.</b>	Formulación del medio de cultivo SOC. ....	20
<b>Tabla 6.</b>	Energías libres de unión predichas para las mutaciones realizadas expresadas en kcal/mol. ....	28
<b>Tabla 7.</b>	Primers diseñados para cada mutación .....	28
<b>Tabla 8.</b>	Resultados de la extracción de ADN plasmídico de las diferentes variantes mutantes.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Composición química del polietileno tereftalato .....	2
<b>Figura 2.</b>	Procesos de reciclado químico del PET. <b>A)</b> Metanólisis; <b>B)</b> Glicólisis; <b>C1)</b> Hidrólisis alcalina; <b>C2)</b> Hidrólisis ácida o neutra; <b>D)</b> Amonólisis; <b>E)</b> Aminólisis.....	4
<b>Figura 3.</b>	Proceso de degradación del polietileno tereftalato por las enzimas PETasa y MHETasa .....	6
<b>Figura 4.</b>	Estructura proteica 3D de la enzima PETasa.....	7
<b>Figura 5.</b>	Procesos de degradación de PET catalizados por las enzimas PETasa y MHETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> . ....	8
<b>Figura 6.</b>	Alineación de la enzima IsPETasa con diversas enzimas homólogas. ....	27
<b>Figura 7.</b>	Cromatograma obtenido de la secuenciación de la variante mutante I208V, clon 1 empleando el primer T7 terminador.....	30
<b>Figura 8.</b>	Cromatograma obtenido de la secuenciación de la variante mutante I208V, clon 3 empleando el primer T7 terminador.....	31

<b>Figura 9.</b> Alineamiento de secuencias de las variantes mutantes <b>A) I208V, B) N212A y C) S238Y</b> .....	32
<b>Figura 10.</b> Ensayo de expresión de la enzima PETasa WT.....	33
<b>Figura 11.</b> Purificación de la enzima PETasa WT mediante cromatografía de afinidad (FPLC). .....	35
<b>Figura 12.</b> Purificación de la variante mutante I208V Clon 1 mediante cromatografía de afinidad (FPLC) .....	36
<b>Figura 13.</b> Purificación de la variante mutante N212A Clon 2 mediante cromatografía de afinidad (FPLC). .....	37
<b>Figura 14.</b> Purificación de la variante mutante S238Y Clon 2 mediante cromatografía de afinidad (FPLC). .....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Formulación del medio de cultivo Luria Bertani (LB).....	50
<b>Anexo 2.</b> Análisis de las posiciones de corte por proteasas en la enzima IsPETasa utilizando el software ExPASy PeptideCutter .....	50
<b>Anexo 3.</b> Cálculo del peso molecular de la sección hidrolizada por la enzima trombina utilizando el software ExPASy Compute pI/Mw .....	51

## RESUMEN

La producción indiscriminada de plásticos representa un grave problema para el medio ambiente. El polietileno tereftalato (PET) es uno de los polímeros sintéticos de difícil degradación más comúnmente utilizado; sin embargo, las opciones químicas y físicas para su degradación no son eficientes, ni ecológicas. En la última década, el tratamiento biológico del PET ha despertado gran interés, ya que permite la completa degradación de este polímero y los productos de degradación constituyen materia prima para la elaboración de nuevo PET. En la presente investigación se construyó variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* en base a un análisis estructural y computacional que permitió diseñar racionalmente variantes que potencialmente permitan incrementar la actividad enzimática sobre el PET. Las mutaciones I208V, N212A y S238Y presentaron gran diferencia de energía de unión, sugiriendo una alta afinidad por el sustrato y baja por los productos de reacción. Se obtuvieron las variantes mutantes mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit QuickChange II, y a través de secuenciación de Sanger se confirmó que al menos dos clones de cada variante poseían la mutación deseada. Los mutantes obtenidos se expresaron en *E. coli* Rosetta (DE3) bajo condiciones establecidas por medio de ensayo de expresión, 0.1mM de IPTG y 22 grados centígrados durante toda la noche. Las variantes mutantes expresadas se purificaron mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de Ni-NTA acoplada a un sistema FPLC. Se verificó la presencia de la enzima mediante electroforesis SDS-PAGE.

### **Palabras clave:**

Tereftalato de polietileno (PET); biodegradación; PETasa de *Ideonella sakaiensis* (*IsPETasa*); mutagénesis dirigida al sitio; FPLC; enzimología

## ABSTRACT

Indiscriminate plastic production has become a serious environmental problem due to the lack of an efficient treatment. Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most used polymers, however chemical and physical options for its degradation are not efficient, neither environmentally friendly. During the last decade, PET biologic treatment has aroused great interest, since it allows the complete degradation of this polymer, and its degradation products work as raw material for the production of new PET. Consequently, biological degradation makes it possible to establish a circular system for the use of PET. This investigation built mutant variants of the *Ideonella sakaiensis* PETase, based on a structural and computational analysis of the enzyme to rationally design variants that potentially increase the enzymatic activity on PET. I208V, N212A and S238Y mutations presented a greater difference in binding energies, suggesting high affinity for the substrate and a low one for the reaction products. Mutant variants were built by site-directed mutagenesis using QuickChange II kit, and through Sanger sequencing it was confirmed that at least two clones of each mutant variant got the desired sequence. Obtained mutations were expressed in *E. coli* Rosetta (DE3) under expression assay established conditions, 0.1 mM IPTG and 22°C overnight (approx. 15 h). Finally, expressed mutants were purified through affinity chromatography (FPLC) using a Ni-NTA column coupled to an FPLC system. The presence of the enzyme of interest was verified by SDS-PAGE electrophoresis.

### **Keywords:**

Polyethylene terephthalate (PET); biodegradation; PETase from *Ideonella sakaiensis* (*Is*PETase); site directed mutagenesis; FPLC; enzymology

## CAPÍTULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Antecedentes Investigativos

##### 1.1.1. Problemática ambiental generada por los residuos plásticos

En los últimos 20 años se ha producido más plástico que en toda la historia de la humanidad. De hecho, cada año los fabricantes de bebidas producen más de 500 mil millones de botellas de un solo uso, la mayoría de ellas elaboradas a partir de polietileno tereftalato (PET) (Greenpeace, 2018). Sin embargo, según la ONU (2018), solo el 9% de los desechos plásticos son reciclados, mientras que el 79% se arroja a vertederos o directamente al medio ambiente, y el 12% restante tiene un destino desconocido. Además, se conoce que actualmente existen entre 75 y 199 millones de toneladas de este material no biodegradable en los océanos (ONU, 2018). En consecuencia, la Organización de las Naciones Unidas ha planteado el Objetivo de Desarrollo Sostenible número 13, donde se habla de “adoptar medidas urgentes para combatir el cambio climático y sus efectos” (ONU, 2015). Con el fin de aportar a la consecución de este objetivo, urge diseñar alternativas apropiadas y eficientes para facilitar el reciclaje del plástico y así disminuir su impacto en el medio ambiente.

##### 1.1.2. Polímeros

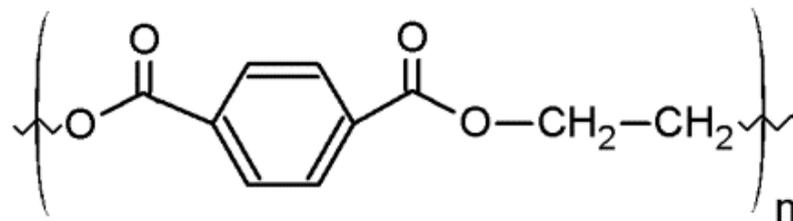
La palabra polímero hace referencia a macromoléculas que se forman debido a la unión repetida de uno o varios monómeros mediante enlaces covalentes y éstos pueden ser de origen natural o sintético (Billmeyer, 2020). Los primeros naturales, también llamados biopolímeros, como la celulosa o proteínas, que poseen estructuras muy complejas, mientras que los sintéticos, es decir, los diferentes tipos de plásticos comerciales, contienen generalmente entre uno y tres tipos de unidades repetitivas (Davidenko et al., 2018). Los polímeros sintéticos pueden clasificarse según su composición, estructura, comportamiento frente al calor y método de síntesis química (Olatunji, 2015). Los procesos de síntesis fueron clasificados inicialmente en 1929 por Carothers como síntesis por condensación y por adición y posteriormente, en 1953 Flory los clasificó como polimerización en etapas (condensación) y en cadena (adición) (López-Carrasquero, 2014).

El proyecto CEDIA al que pertenece este estudio, se enfocará principalmente en seis de los plásticos comerciales más utilizados en términos de volumen y número de aplicaciones. Éstos son polietileno de alta y baja densidad (HDPE, LDPE), policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS), polipropileno (PP) y polietileno tereftalato (PET).

El presente estudio se centrará específicamente en el polietileno tereftalato (PET), un termoplástico ampliamente utilizado debido a su bajo costo, larga duración, resistencia y su capacidad para la conservación de alimentos (**Suasnavas, 2017**). Por estas características, es posible encontrarlo no solo en botellas y contenedores de alimentos, sino también en diferentes tipos de textiles, películas fotográficas y de rayos X, artículos de iluminación y decoración, elementos publicitarios, entre otros (**Nisticò, 2020**).

#### **1.1.2.1. Polietileno tereftalato (PET) y su estructura química**

El plástico PET es un poliéster saturado que se obtiene de la policondensación entre el ácido tereftálico y un diol, generalmente, el etilenglicol; o a su vez, se produce por la transesterificación del tereftalato de dimetilo y etilenglicol. Este procedimiento se lleva a cabo mediante una esterificación directa del ácido tereftálico a una temperatura de entre 200 y 260°C, por lo que el material se encuentra fundido y debe ser enfriado para llegar a su consistencia habitual (**Al-Sabagh et al., 2016**). En la Figura 1, se puede observar que el PET está conformado de cadenas macromoleculares sin ramificar.



**Figura 1.** Composición química del polietileno tereftalato

**Fuente: Cynthia Fuentes et al., (2017)**

Si bien este polímero derivado del petróleo presenta gran cantidad de aplicaciones y varias ventajas en la conservación de alimentos, es resistente a la degradación biológica, ya que además de su hidrofobicidad y alto peso molecular, las enzimas que participarían de este proceso son incapaces de romper los enlaces entre carbonos del PET (Hiraga et al., 2019; Pérez, 2020).

### **1.1.3. Tratamientos para la degradación del PET**

Se han desarrollado varias alternativas con el fin de lograr la degradación o reciclaje del polietileno tereftalato, entre las que destacan los tratamientos físicos, químicos y biológicos.

#### **1.1.3.1. Tratamiento físico**

El tratamiento físico se basa en la degradación térmica del PET mediante pirólisis o gasificación, con lo cual el polímero se descompone mediante calor en ausencia de oxígeno, por lo que no se producen reacciones de combustión, generando así energía térmica y gas de síntesis, una sustancia importante para la industria química (Zurita, 2013). El gas de síntesis se compone de metanol, éter dietílico, ácido acético, hidrocarburos y otras sustancias en menor concentración (Dimitrov et al., 2013). Este es el tratamiento más utilizado debido a su ventaja económica. Sin embargo, su impacto ambiental es mayor a causa de la gran cantidad de CO<sub>2</sub> emitido (Austin et al., 2018).

#### **1.1.3.2. Tratamiento químico**

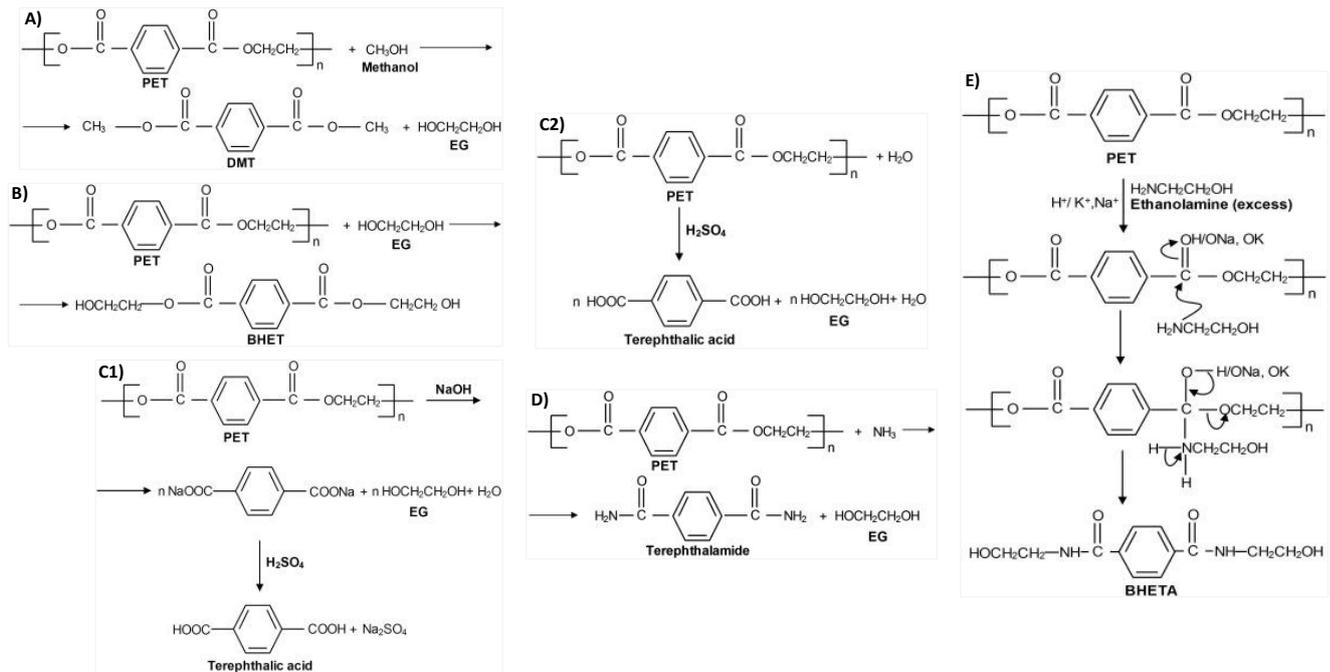
El tratamiento químico del PET, también llamado reciclado químico, logra la descomposición del PET en sus monómeros estructurales con sus propiedades originales, para posteriormente utilizarlos en la fabricación de nuevo plástico (Vargas, 2019). Sin embargo, la resina reprocesada es más cara que los monómeros obtenidos mediante el refinamiento de combustibles fósiles, lo que hace al reciclado químico económicamente poco atractivo. Este tipo de tratamiento posee varios métodos, de los cuales los dos primeros son aplicados industrialmente (Suasnavas, 2017). En la Figura 2 se detallan las reacciones químicas aplicadas para la degradación del PET. A continuación se detalla cada una de ellas:

**Metanólisis:** El PET se degrada por una reacción con metanol líquido o gaseoso bajo condiciones de alta presión y temperatura, obteniéndose como productos principales tereftalato de dimetilo (DMT) y etilenglicol (EG) (C Fuentes et al., 2017).

**Glicólisis:** Se lleva a cabo a través de la transesterificación entre dioles, lo que involucra la inserción de un diol en la cadena del PET, generalmente usando etilenglicol para obtener como producto principal monómeros de bis (hidroxietil) tereftalato (BHET) (Herrera & Estrada, 2012; Muñoz et al., 2016).

**Hidrólisis:** Mediante la adición de agua, se puede realizar en un medio ácido, alcalino o neutro; el tratamiento, que se lleva a cabo a altas temperaturas, genera la despolimerización del PET en ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (Vásquez et al., 2014).

**Amonólisis, aminólisis y otros procesos:** No son utilizados de forma comercial o industrial, sin embargo, se sabe que sus productos son TPA y EG; adicionalmente, se conoce que este tipo de degradación mejora las propiedades del PET en la fabricación de ciertas fibras (Suasnavas, 2017).



**Figura 2.** Procesos de reciclado químico del PET.

A) Metanólisis; B) Glicólisis; C1) Hidrólisis alcalina; C2) Hidrólisis ácida o neutra; D) Amonólisis; E) Aminólisis.

**Fuente:** Adaptado de Al-Sabagh et al., (2016)

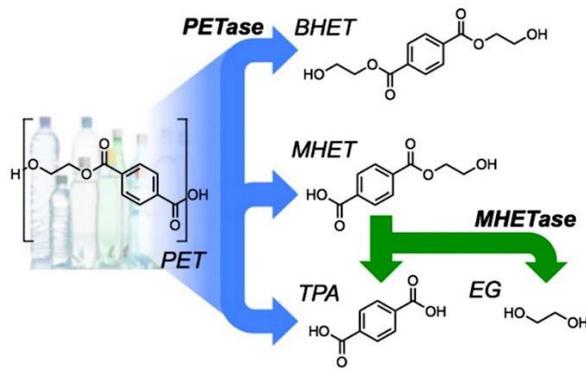
### **1.1.3.3. Tratamiento biológico**

La creciente problemática ambiental que causan la sobreproducción de plásticos y la baja eficacia de los tratamientos existentes han llevado a la propuesta de nuevas formas de degradación del PET, enfocándose principalmente en la biodegradación (**Garcés, 2021**). Se ha puesto especial interés en enzimas como cutinasas, cuya labor es hacer a la superficie del PET más accesible para su degradación; lipasas, que a pesar de romper los enlaces éster no han mostrado resultados efectivos sobre el PET e hidrolasas, donde resaltan principalmente las enzimas PETasa y MHETasa, que son capaces de descomponer el PET en sus componentes más simples, los cuales son reciclables e inofensivos (**Koshti et al., 2018**). Estas hidrolasas fueron encontradas por **Yoshida et al. (2016)** en el consorcio microbiano N. 46 en un vertedero de la ciudad de Sakai, Japón. Este consorcio se caracteriza por crecer en películas de PET de baja cristalinidad, utilizando el PET como fuente principal de carbono y energía, y degradándolo en CO<sub>2</sub> y agua (**Tanasupawat et al., 2016**).

#### **1.1.3.3.1. *Ideonella sakaiensis***

**Yoshida et al. (2016)**, dentro del consorcio encontrado en la ciudad de Sakai, descubrieron una bacteria capaz de metabolizar el PET amorfo en ausencia del consorcio; esta cepa es una bacteria Gram negativa, aeróbica, en forma de bastón, que después del análisis filogenético se afilió al género *Ideonella*, y se nombró *Ideonella sakaiensis* cepa 201-F6 (**Graf et al., 2021**).

Esta bacteria es capaz de emplear el polietileno tereftalato como única fuente de carbono y energía (**Ge et al., 2021**). Esto es posible gracias a la presencia y acción sinérgica de sus enzimas hidrolíticas PETasa y MHETasa, cuya labor es degradar el PET en sus componentes monoméricos básicos (**Han et al., 2017**). Este nuevo método genera los mismos resultados que la degradación química a un menor costo e impacto ambiental.



**Figura 3.** Proceso de degradación del polietileno tereftalato por las enzimas PETasa y MHETasa

**Fuente: Austin et al., (2018)**

En la Figura 3 se describe brevemente el mecanismo básico de las enzimas mencionadas **Yoshida et al., (2021)**, como primer paso la PET hidrolasa degrada al PET en ácido tereftálico (TPA), bis (2-hidroxietil) tereftalato (BHET) y ácido mono (2-hidroxietil) tereftálico (MHET). Se conoce que más del 90 % de los productos de la reacción corresponden a MHET, luego la MHETasa, que es la enzima mono(2-hidroxietil) tereftalato hidrolasa se encarga de convertir el MHET en sus monómeros TPA y etilenglicol (EG).

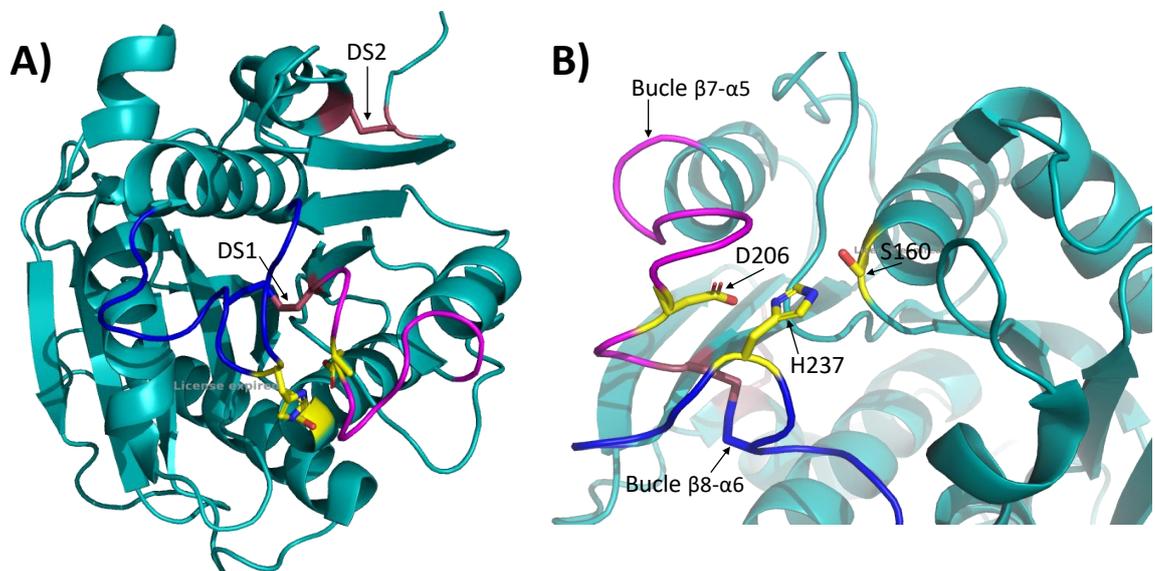
#### 1.1.3.4. Estructura de la PETasa

La enzima PETasa posee un pliegue típico de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, las cuales contienen una lámina  $\beta$  central retorcida conformada por nueve hebras  $\beta$  que se encuentran intercaladas por siete hélices  $\alpha$  (**Feng et al., 2021**). Adicionalmente, se ha encontrado que existe una homología de hasta 78% entre la PETasa y otras cutinasas homólogas, enzimas que hidrolizan un polímero lipídico estructural presente en la cutícula de las plantas (**Chen et al., 2018**). Esta similitud estructural ha permitido determinar rápidamente que la triada catalítica de la PETasa está conformada por los aminoácidos S160-D206-H237 (Figura 4B), que el sitio activo es más amplio que el de otras cutinasas, lo que supone una de las razones por las que esta enzima logra incorporar un sustrato tan voluminoso como el PET (**Chen et al., 2018; B. Liu et al., 2018**).

Por otra parte, la estructura de la apo – enzima PETasa se diferencia de sus homólogas, debido a que además del puente disulfuro (DS2) que conecta el bucle C-terminal y la

última hélice, conservado estrictamente en todas las estructuras homólogas (Chen et al., 2018); la PETasa, posee un segundo puente disulfuro (DS1) (Figura 4A) adyacente al sitio activo, el cual conecta los bucles  $\beta 7-\alpha 5$  y  $\beta 8-\alpha 6$  (Figura 4B) cuya labor es albergar el ácido catalítico (D177) y la base catalítica (H208), respectivamente (Graf et al., 2021). Así mismo, el bucle  $\beta 8-\alpha 6$  de la PETasa es tres residuos más largo que el de sus homólogos, lo que permite formar un subsitio de unión con el PET (B. Liu et al., 2018).

Chen et al. (2018) determinaron mediante ensayos de mutagénesis y simulación de dinámica molecular, que la delección de DS1 reduce significativamente la actividad enzimática, influyendo de forma negativa en las distancias entre los residuos de la triada catalítica y comprometiendo la integridad del sitio activo.



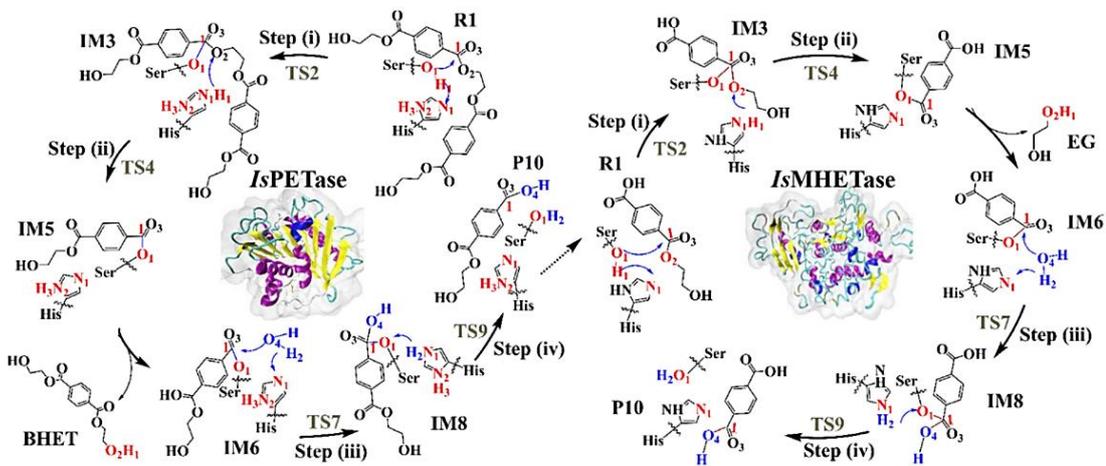
**Figura 4.** Estructura proteica 3D de la enzima PETasa.

A) Estructura tridimensional general de la enzima *Is*PETasa (código PDB 6EQE) ilustrada con el software PyMOL. Los puentes disulfuro 1 y 2 se encuentran señalados. B) Acercamiento a secciones fundamentales de la enzima PETasa. Los residuos catalíticos están representados por sticks de color amarillo, el bucle  $\beta 7-\alpha 5$  de color rosado y el bucle  $\beta 8-\alpha 6$  de azul.

### 1.1.3.5. PETasa y su mecanismo de acción

Feng et al. (2021), determinaron el mecanismo por el cual la enzima PETasa logra catalizar la degradación del PET se da en cuatro pasos fundamentales, los cuales son idénticos a la degradación de MHET catalizada por IsMHETasa, siendo los dos primeros pasos de acilación y los dos últimos de hidrólisis, como se resume a continuación y se observa en la Figura 5:

- i. Ataque nucleofílico iniciado por la triada catalítica (Ser-His-Asp)
- ii. Escisión del enlace C – O
- iii. Ataque nucleofílico por moléculas de agua
- iv. Desacilación de la enzima PETasa/MHETasa



**Figura 5.** Procesos de degradación de PET catalizados por las enzimas PETasa y MHETasa de *Ideonella sakaiensis*.

**Fuente:** Feng et al., (2021)

### 1.1.3.6. Mutaciones que influyen en la actividad catalítica de la PETasa

Se han realizado varias investigaciones con el fin de conocer a profundidad a la enzima, así como para mejorar la actividad catalítica de la PETasa, donde se han desarrollado variantes mediante mutagénesis en diferentes residuos (Y. Liu et al., 2022). Se encontró que las mutaciones en los residuos correspondientes a la triada catalítica S131-D177-H208, disminuyen significativamente la actividad, mientras que

al modificar los residuos C174A/C210A, eliminando el puente disulfuro distintivo de la enzima, la actividad catalítica es nula (Joo et al., 2018; Sánchez, 2021). Por otra parte, la introducción de las mutaciones W159H y S238F en una región adyacente al subsitio de unión al sustrato para hacerlo más estrecho, incrementaron la eficiencia de la enzima para reducir la cristalinidad del PET (Austin et al., 2018). De la misma forma la variante S92E/D157H/R251A logró incrementar 8.81°C la Tm y aumentar 14 veces la actividad de degradación a 40°C en comparación con la PETasa silvestre (Son et al., 2019). Adicionalmente, la Tabla 1 muestra las diferentes variantes que se han llevado a cabo hasta la fecha según la base de datos UniProt.

**Tabla 1.** Variaciones en la secuencia de aminoácidos de la enzima PETasa

Posición de la Mutación	Variante	Descripción de la Actividad
87	Y → A	- Mayor actividad enzimática en botellas PET. - Menor actividad sobre películas de PET y BHET.
93	S → M	- Mayor actividad enzimática sobre el butirato de 1-naftilo.
119	Q → R	- Menor actividad enzimática en botellas PET y BHET.
121	S → E	- Mayor termoestabilidad y capacidad de degradación del PET (14 veces más a 40°C al asociarse con H-186 y A-280).
159	W → A	- Menor actividad sobre películas de PET y BHET.
159	W → F	- Mayor actividad enzimática sobre el butirato de 1-naftilo.
159	W → H	- Mayor actividad enzimática en botellas PET y BHET. - Mejora su capacidad de degradación del PET y PEF al asociarse con F-238.
160	S → A	- Pérdida de actividad enzimática en botellas de PET y BHET.
161	M → A	- Disminución de actividad enzimática en botellas de PET y BHET.

185	W→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Capacidad de degradación de PET muy deteriorada.</li> <li>- Disminución de actividad enzimática sobre BHET.</li> </ul>
186	D→H	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor termoestabilidad y capacidad de degradación del PET (14 veces más a 40°C al asociarse con E-121 y A-280).</li> </ul>
203	C→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de actividad enzimática sobre PET y BHET al asociarse con A-239.</li> </ul>
206	D→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor actividad enzimática en botellas PET y BHET.</li> </ul>
214	S→H	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor actividad enzimática en botellas PET.</li> </ul>
237	H→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Menor actividad enzimática en botellas PET y BHET.</li> </ul>
238	S→F	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de actividad enzimática sobre películas de PET y BHET.</li> </ul>
239	C→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mejora su capacidad de degradación del PET al asociarse con A-203.</li> </ul>
241	N→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Disminución de actividad enzimática sobre películas de PET y BHET.</li> </ul>
241	N→F	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor actividad enzimática sobre el butirato de 1-naftilo.</li> </ul>
280	R→A	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mayor actividad enzimática sobre películas de PET.</li> <li>- Mayor termoestabilidad y capacidad de degradación del PET (14 veces más a 40°C al asociarse con E-121 y H-186).</li> </ul>

---

**Fuente: Modificado de UniProt, (2022)**

### **1.1.3.7. Agentes coadyuvantes de la actividad catalítica de la PETasa**

Desde el descubrimiento de la PETasa diversos grupos de investigadores han buscado mecanismos que permitan llevar los beneficios de esta enzima a la práctica. Con este fin se determinó que la enzima es más activa al encontrarse en un buffer con 20% de glicerol y una alta concentración de sales. En contraste, su actividad es inhibida por solventes orgánicos, detergentes e inhibidores de proteasas, como el etanol, propanol,

Tween 20, Tritón X-100, pMSF y SDS, comúnmente usados en el laboratorio y la industria (**C. Liu et al., 2019**). Por esta razón, se han desarrollado estudios sobre el uso de surfactantes aniónicos, en su investigación, **Furukawa et al. (2018)**, utilizan principalmente tensoactivos de alquilo aniónicos para recubrir a la enzima, de esta manera, las moléculas surfactantes actúan como posibles mediadoras de la interacción PET – PETasa, interactuando con la superficie del PET como proteínas anfifílicas. Esto sucede gracias a que los grupos de cabeza cargados negativamente estarían orientados hacia la fase acuosa, convirtiendo la superficie del PET en la superficie cargada. Del mismo modo, al enlazar previamente cadenas de tensoactivos de alquilo aniónicos por la cola a la superficie del PET se sugiere que se existirá una mayor atracción al sitio activo, acelerando la reacción (**Furukawa et al., 2019**).

Por otra parte, se ha estudiado la posibilidad de utilizar co-disolventes líquidos iónicos para mejorar la actividad catalítica de la PETasa. **Zara et al. (2021)**, proponen usar el fosfato de colinio, ya que causa la menor alteración a la estructura de la enzima y logra interactuar con el BHET como sustrato de forma natural con gran especificidad. Esta propuesta está basada en la interacción que existiría entre los aminoácidos hidrófobos de la superficie de la PETasa y los cationes de colinio, los cuales lograrían solvatar dichos aminoácidos, mejorando la actividad enzimática.

Se ha planteado además la técnica de nano-inmovilización de la enzima PETasa marcada con histidina, a través de la síntesis de nano-flores orgánicas. **Jia et al. (2021)** lograron aumentar 3.5 veces la actividad catalítica de la enzima (medida en la producción de TPA), gracias a la inmovilización de esta en  $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$  nanoestructurado, el cual permite fijar una alta carga de enzimas, provocando una baja inhibición de la transferencia de masa debido a la gran área de superficie específica.

#### **1.1.4. PCR Mutagénica**

Debido a que la reacción en cadena de la polimerasa no remueve los cebadores luego de la amplificación, ésta tiene la capacidad de utilizarse en ensayos de mutagénesis dirigida al sitio mediante la adición de sitios de restricción en los primers. De esta manera, la secuencia amplificada por PCR podrá ser modificada para convertirse en un vector con sitios de restricción (**Primose & Twyman, 2006**). En consecuencia, los primers diseñados deben ser complementarios a la secuencia blanco (excepto la posición que se desee mutar) con el fin de que los productos amplificados contengan

la mutación de interés, la cual puede ser una inserción, delección o sustitución. Por lo tanto, las bases o secuencias que no coincidan entre el cebador de amplificación y la plantilla se incorporarán a la secuencia de la plantilla como resultado de la amplificación **(Primose & Twyman, 2006)**.

Así como otros procedimientos, la PCR mutagénica ha evolucionado y se ha simplificado desde el método propuesto por Higuchi *et al.* en 1988, el cual requiere de cuatro cebadores y tres PCR, dos de ellas para amplificar los segmentos superpuestos y una tercera para fusionar los dos segmentos. En la actualidad existen diversos métodos propuestos por casas comerciales en los que el procedimiento se basa en la extensión de los cebadores alrededor de todo el plásmido para crear una copia de la plantilla con la mutación insertada, el nuevo plásmido mutado servirá como molde para clonarse durante la PCR **(Lorsch, 2013)**.

En este caso, se utilizará el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II, el cual permite realizar la mutaciones específicas en prácticamente cualquier plásmido de doble cadena, por lo que no requiere subclonación, vectores especializados, sitios de restricción únicos, transformaciones múltiples o pasos de tratamiento de metilación *in vitro* **(Agilent Technologies, 2015)**.

#### **1.1.5. Expresión de enzimas**

En diversas investigaciones, las proteínas heterólogas de eubacterias, arqueas y muchas proteínas eucariotas que no necesitan modificación postraducciona se han expresado con éxito en *E. coli* **(Yamabhai et al., 2011)**. Por lo tanto, el sistema de expresión de proteínas de *E. coli* ha sido ampliamente estudiado y se han propuesto varios métodos y sistemas de expresión que permiten optimizar el proceso según el compartimento celular donde se producirá la proteína y su futura aplicación.

En muchos casos, para la expresión de proteínas de alto rendimiento en *Escherichia coli* se aplican sistemas de expresión derivados del operón *lac*, utilizando especialmente medios de autoinducción que contienen glucosa, lactosa y glicerol **(Faust et al., 2015)**. Este principio se basa en la exclusión del inductor entre la glucosa y la lactosa, impidiendo la inducción por la lactosa antes del agotamiento de la glucosa. En este sentido, los inductores sintéticos más utilizados son los galactósidos metil-1-tio-d-galactopiranosido (TMG) y Isopropil- $\beta$ -d-1-tiogalactopiranosido (IPTG), los

cuales, según **Marbach & Bettenbrock (2012)** son muy similares en su mecanismo de acción, las concentraciones necesarias y los resultados obtenidos respecto a la regulación de la actividad transcripcional del promotor *lac*. Sin embargo, debido a algunas desventajas como la toxicidad, costo y monitoreo del cultivo, se ha propuesto un sistema de expresión auto – inducible que evita las desventajas del IPTG (**Briand et al., 2016**).

#### **1.1.5.1.Sistema de expresión con adición de IPTG**

En este estudio se aplicará el sistema de expresión con adición de IPTG, un análogo estructural de la alolactosa, la cual, en el sistema de expresión natural de *E. coli*, se encarga de desencadenar la transcripción del operón *lac*. Del mismo modo que la alolactosa, el IPTG se une al represor *lac*, liberándolo de manera alostérica, lo que permite la transcripción de los genes deseados en el operón *lac* (**Faust et al., 2015**). A diferencia de la alolactosa, el átomo de azufre del IPTG crea un enlace químico que no es hidrolizable por la célula, evitando que la célula metabolice o degrade el inductor, manteniendo su concentración y permitiendo la expresión de los genes controlados por *lac* (**Kielkopf et al., 2021**).

#### **1.1.6. Purificación de enzimas**

El proceso de purificación de proteínas se ha perfeccionado con el uso de distintos materiales, instrumentos computarizados, y el aumento del marcaje *in vivo* para hacer las separaciones más predecibles y controlables (**Voet et al., 2016**). Esto ha sido posible principalmente gracias al desarrollo de las diferentes técnicas de purificación que incrementan la eficiencia y selectividad de las separaciones, así como de nuevos softwares y bases de datos que facilitan la interpretación de los datos obtenidos (**Roe, 2001**).

La selección del método de purificación que se usará depende las características de la proteína a separar, así como de los componentes de la mezcla en la que se encuentra. Algunos de los procedimientos disponibles y las características proteicas de las que dependen se enlistan en la Tabla 2 (**Voet et al., 2016**).

**Tabla 2.** Procedimientos de purificación de proteínas

<b>Característica de la Proteína</b>	<b>Procedimiento de Purificación</b>
Solubilidad	Salting out
	Salting in
Carga iónica	Cromatografía de intercambio iónico
	Electroforesis
	Enfoque isoelectrico
Polaridad	Cromatografía de interacción hidrofóbica
	Electroforesis
Tamaño	Cromatografía de filtración en gel
	SDS – PAGE
Especificidad de unión	Cromatografía de afinidad

Fuente: **Voet et al., (2016)**

Las técnicas más ampliamente utilizadas son los diversos tipos de cromatografías, las cuales se basan en el uso de dos fases, una móvil y una estacionaria; la primera contiene los componentes de una mezcla, que se desplazarán a distintas velocidades a través de la fase estacionaria, separándose según la característica proteica de interés (**Sgariglia et al., 2010**).

En este caso, las enzimas recombinantes producidas contienen una cola de histidinas (6xHis), por lo que se purificarán mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados.

#### **1.1.6.1. Cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados (IMAC)**

Este método cromatográfico se basa en las diferencias de afinidad que poseen las diversas proteínas por los iones de metales de transición unidos a un adsorbente (generalmente un grupo quelante como el ácido nitrilotriacético (NTA) iminodiacético (IDA)) que se encuentra inmovilizado en un soporte cromatográfico (**Janson, 2011**).

La cromatografía IMAC se caracteriza porque permite separar moléculas con propiedades muy similares con respecto a la carga, el tamaño molecular y la composición de los aminoácidos, pero con diferencias en su estructura secundaria y terciaria gracias a su sensibilidad por la disposición estérica de la cadena proteica (**Roe,**

**2001**). Además, requiere de la adición de ciertos residuos de aminoácidos (histidina, cisteína, triptófano) a la superficie de las proteínas para lograr su adsorción, esto debido a que estos aminoácidos actúan como donantes de electrones, uniéndose de forma reversible a un ion de metal de transición (**Janson, 2011**). Para lo cual se ha probado que la técnica puede ser muy eficaz y sencilla al utilizar marcadores de histidina que le confieren a la proteína una alta afinidad por la columna IMAC. Por lo tanto, se puede afirmar que la separación depende principalmente del contenido de residuos de histidina expuestos en la proteína (**Roe, 2001**).

Con el fin de mejorar y facilitar este tipo de purificación, ciertas casas comerciales han desarrollado el sistema de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad (FPLC), un sistema directo y controlado por microprocesador, que por sus materiales minimiza la corrosión y la adsorción no específica de los componentes de la muestra; adicionalmente, contiene columnas pre – empaquetadas con intercambiadores de iones de 10 mm de diámetro, que brindan separaciones de alto rendimiento con caídas de presión moderadas (**Janson, 2011**).

## **1.2.Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo general**

Construir variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

- Diseñar primers para la obtención de variantes mutantes de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.
- Obtener variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* mediante mutagénesis dirigida.
- Expresar las variantes mutantes construidas mediante un sistema heterólogo.
- Purificar las variantes mutantes desarrolladas a través de cromatografía de afinidad.

## CAPÍTULO II

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1. Métodos

El presente trabajo es un estudio experimental que pertenece al proyecto CEDIA “Degradación de polímeros orgánicos mediante el uso de enzimas recombinantes” liderado por investigadores de la Universidad Técnica de Ambato y en colaboración con investigadores de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) y de la Universidad de Las Américas (UDLA).

##### 2.1.1. Diseño de primers

###### 2.1.1.1. Determinación de las variantes mutantes

Como parte del proyecto CEDIA, el PhD. Vinicio Armijos y PhD. Yunierkis Pérez, investigadores de la Universidad de Las Américas (UDLA), y la PhD. Liliana Cerda Mejía y el PhD. Mario Daniel García, investigadores de la Universidad Técnica de Ambato (UTA), determinaron los restos de aminoácidos a substituir empleando alineamientos múltiples de secuencias, análisis de homología estructural y análisis de dinámica molecular mediante la herramienta bioinformática Rosetta (**Löffler et al., 2017**). El programa empleó un algoritmo genético y simulaciones cortas de dinámica molecular para predecir el cambio de la afinidad del sustrato por la enzima al sustituir residuos clave del sitio de unión del ligando. Estos experimentos permiten determinar las substituciones que presentan un mayor potencial para mejorar la actividad catalítica de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.

###### 2.1.1.2. Secuencia de del gen que codifica para PETasa de *Ideonella sakaiensis*

La secuencia del gen que codifica para la variante silvestre de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* se obtuvo del plásmido pET21b(+)-Is-PETase desarrollado por **Austin et al. (2018)**. El plásmido fue proporcionado por la PhD. Liliana Cerda Mejía, docente – investigadora de la FCIAB. La secuencia total del plásmido y del gen que codifica para la PETasa se obtuvo de la base de datos de Addgene (<https://www.addgene.org/112202/>).

### **2.1.1.3. Diseño de primers para cada variante mutante**

Para el diseño de los primers se consideró la metodología del kit QuickChange II de mutagénesis dirigida al sitio (**Agilent Technologies, 2015**). En este sentido, los primers deben contener entre 25 y 45 bases de longitud, con una temperatura de fusión o melting ( $T_m$ )  $\geq 78$  °C. La mutación deseada se debe encontrar en el medio del cebador con 10 a 15 bases de secuencia que flanquean ambos extremos. Los cebadores contienen idealmente al menos 40% de GC, además de terminar en una o más bases de C o G. Los primers se diseñaron a partir del análisis de la secuencia de nucleótidos, incluyendo codones óptimos para la traducción de proteína en *E. coli*.

Los primers diseñados se ordenaron para su síntesis en la compañía MacroGen ubicada en la República de Corea. Se solicitó que éstos sean purificados por cromatografía (FPLC) ya que esto permite incrementar la eficiencia de la mutación.

## **2.1.2. Obtención de variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* mediante mutagénesis dirigida.**

### **2.1.2.1. PCR mutagénica**

Para la obtención de las variantes mutantes se utilizó el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II, así como las células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Este kit permitió la introducción de mutaciones puntuales en el plásmido pET21b(+)-Is-PETase mediante una PCR mutagénica. Por lo tanto, la metodología de este procedimiento se basó en el manual de instrucciones del kit (**Agilent Technologies, 2015**), como se describe a continuación.

#### **2.1.2.1.1. Desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

El procedimiento se realizó en base a lo descrito en el protocolo del Kit QuickChange II (**Agilent Technologies, 2015**). En primer lugar, para asegurar la homogeneidad y mejorar la recuperación, se mezcló y centrifugó todos los tubos que contiene el kit antes de abrirlos. Luego, se preparó una mezcla de PCR para cada una de las variantes mutantes. Para lo cual, se emplearon los materiales y volúmenes que se detallan en la Tabla 3, ajustados para reacciones de 50  $\mu$ L.

**Tabla 3.** Orden de los reactivos para la preparación de la PCR

Componente	Volumen ( $\mu\text{L}$ )	Concentración final
Buffer de reacción 10X	5	1X
Plantilla de dsADN	1	50 ng
Forward primer	1.25	125 ng
Reverse primer	1.25	125 ng
dNTP mix	1	-
ddH <sub>2</sub> O	39.5	-
ADN polimerasa <i>PfuUltra</i> HF	1	2.5 U/ $\mu\text{L}$

Fuente: Agilent Technologies, (2015)

#### 2.1.2.1.2. Programación del termociclador

Se programó el termociclador según el protocolo del kit QuickChange II (Agilent Technologies, 2015), por lo tanto, se tomó en cuenta las temperaturas y tiempos expuestos en la Tabla 4 para cada mutación. Para el diseño de la PCR se consideró que el plásmido pET21b(+)-Is-PETase tiene una longitud de 6233 pb.

**Tabla 4.** Parámetros para los ciclos de la PCR mutagénica

Paso	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Tiempo	No. ciclos
Desnaturalización inicial	95	30 s	1
Desnaturalización	95	30 s	
Annealing	55	1 min	16
Extensión	68	7 min	
Extensión final	72	10 min	1
Almacenamiento	4	$\infty$	-

Fuente: Agilent Technologies, (2015)

### 2.1.2.1.3. Digestión del ADN plasmídico parental.

Al finalizar la PCR se agregó al producto final 1  $\mu\text{L}$  de la enzima de restricción FastDigest Dpn I ( $\text{U}/\mu\text{L}$ ) directamente a la reacción de mutagénesis y se mezcló gentil pero exhaustivamente. Las soluciones de reacción se microcentrifugaron por 1 minuto y se incubaron a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas.

### 2.1.2.1.4. Transformación de las células competentes de *E. coli* DH5- $\alpha$ mediante choque térmico

Para la transformación de *E. coli* DH5- $\alpha$  se empleó el método de choque térmico (Cohen et al., 1972). En síntesis, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{L}$  de células competentes almacenada a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ , se la descongeló en un baño con hielo por 30 minutos, se añadió 5  $\mu\text{L}$  del producto de digestión con Dpn I de ADN plasmídico y se incubaron las células en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, las células fueron sometidas a choque térmico mediante baño termostático a  $42\text{ }^\circ\text{C}$  durante 90 segundos, y rápidamente se las colocó en hielo durante 2 min. Después, se añadieron 0.5 mL de caldo SOC (Tabla 5) y se las incubó a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  por 1.5 horas con agitación constante a 220 rpm. A continuación, se inoculó todo el contenido del tubo en agar LB suplementado con ampicilina y se incubó las células durante una noche a  $37\text{ }^\circ\text{C}$  (Cerdeja-Mejía, 2016). Finalmente, se transfirieron cinco colonias aisladas a tubos con 5 mL de caldo LB suplementado con antibiótico para la extracción del ADN plasmídico y su respectiva secuenciación. El procedimiento se llevó a cabo para cada variante mutante.

**Tabla 5.** Formulación del medio de cultivo SOC.

Reactivo	Cantidad por L de medio de cultivo
Solución de glucosa 20%	20 mL
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.584 g
Triptona	20 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.186 g
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	2.4 g

**Fuente:** Agilent Technologies, (2015)

**Nota:** Ajustar el pH a 7.5 con Hidróxido de sodio (NaOH) 1M.

### 2.1.2.2. Extracción del ADN plasmídico

Para extraer el ADN plasmídico se utilizó el Kit GenElute Plasmid Miniprep y se siguió la metodología propuesta en su manual de uso (**Sigma-Aldrich, 2013**). Todas las soluciones mencionadas fueron proporcionadas por el kit y el mismo procedimiento se repitió para cada variante mutante.

En primer lugar, se transfirió una colonia aislada de *E. coli* DH5- $\alpha$  a 5 mL de caldo LB (Anexo 1), y se incubó a 37°C, 150 rpm de agitación, por 12 horas. Posteriormente, se centrifugó el cultivo a  $\geq 12000$  g por 1 minuto, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 200  $\mu$ L de solución de resuspensión, mezclando hasta la homogeneidad. A continuación, se añadieron 200  $\mu$ L de solución de lisis e inmediatamente se mezcló por inversión (6-8 veces) hasta observar una solución clara y viscosa, dejando reaccionar por no más de 5 minutos. Se precipitaron los restos celulares añadiendo 350  $\mu$ L de solución de neutralización/unión, mezclando por inversión (4-6 veces), y se centrifugó la solución a  $\geq 12000$  g o velocidad máxima por 10 minutos. Posteriormente, se insertó la columna GenElute Miniprep al tubo de microcentrífuga provisto por el kit, añadiendo 500  $\mu$ L de la solución de preparación de la columna y se centrifugó a 12000 g por un tiempo de 30 segundos a 1 minuto, se descartó el líquido de flujo. Luego, se transfirió la muestra a la columna y se centrifugó a  $\geq 12000$  g por 30 segundos a 1 minuto, se descartó el líquido de flujo. Después, se adicionaron 750  $\mu$ L de solución de lavado diluida a la columna, se centrifugó a  $\geq 12000$  g por 30 segundos a 1 minuto, se descartó el líquido de flujo y se centrifugó nuevamente a velocidad máxima por 1 a 2 minutos para remover el exceso de etanol.

Finalmente, se transfirió la columna a un tubo de recolección nuevo, se le agregó 100  $\mu$ L de agua grado reactivo para biología molecular y se centrifugó nuevamente a  $\geq 12000$  g por 1 minuto para obtener el ADN. La cuantificación del ADN plasmídico se realizó con el equipo Nanodrop 2000.

### **2.1.2.3. Secuenciación de las variantes mutantes**

La secuenciación del gen que codifica para cada una de las variantes mutantes se llevó a cabo con la colaboración de la Universidad de las Américas (UDLA). La secuenciación se realizó mediante el método de Sanger, empleando el primer T7 terminador presente en la secuencia del plásmido a cada extremo del gen. Con los resultados de la secuenciación se determinó en qué colonias se encuentra la mutación correcta.

### **2.1.3. Expresión de las variantes mutantes construidas mediante un sistema heterólogo.**

#### **2.1.3.1. Transformación de las células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) mediante choque térmico**

La expresión de cada variante mutante se realizó en *E. coli* Rosetta (DE3) por su elevada capacidad para expresar proteínas difíciles y que presentan codones raros. La transformación celular se realizó mediante la metodología descrita en la sección 4.2.1.4, con la única diferencia de que para el caso de *E. coli* Rosetta (DE3) también se adicionó cloranfenicol al medio de cultivo.

#### **2.1.3.2. Expresión de la proteína**

La expresión de las variantes mutantes de la enzima PETasa se realizó según la metodología propuesta por **Furukawa et al. (2018)**. Inicialmente, se inoculó una colonia de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con el plásmido diseñado para cada variante mutante en 25 mL de caldo LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol y se lo incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm) durante 16 horas. A continuación, se transfirió el cultivo a un matraz con 500 mL de caldo LB suplementado con antibióticos y se lo incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm) hasta que el cultivo alcance una  $DO_{600}$  0.6 – 0.8 (aprox. 3 a 4 h). Se adicionó 0,1 mM de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) y se incubó a 22 °C durante 16 h para inducir la expresión de la enzima. Por último, se centrifugó el cultivo a 5000 rpm y 4°C por 1 hora, se recolectaron las células, y se las almacenó a -80 °C.

## **2.1.4. Purificación de las variantes mutantes desarrolladas a través de cromatografía de afinidad**

### **2.1.4.1. Lisis celular**

En primer lugar, se añadió 6 mL de buffer de lisis (Tris 25 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl y 20 mM Imidazol) por gramo de células y 10 µL de EDTA 0.5 M por cada mL de buffer de lisis agregado. La lisis celular se realizó a 4 °C mediante el uso de un sonicador marca MRC de 650 WT, aplicando diez ciclos de 10 s de trabajo constante (60% de amplitud) con 10 s de descanso (Hadi, 2005).

### **2.1.4.2. Purificación de la proteína**

La purificación de las enzimas recombinantes, se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita previamente por Austin et al. (2018) con ciertas modificaciones. Todos los pasos cromatográficos se realizaron en un equipo de cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad FPLC ÄKTA Start con un colector de fracciones. En resumen, el lisado celular se separó por centrifugación a 21000 g, por 1 hora, a 4 °C. El sobrenadante se colectó y se transfirió a una columna Ni-NTA pre-empacada (GE Health Care) de 1 mL, previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna de buffer de lavado, Tris 25 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl y 20 mM Imidazol. A continuación, se adicionaron de 5 a 10 volúmenes de columna de buffer de lavado para eliminar proteínas que presentan interacciones inespecíficas. Luego, se agregó gradualmente buffer de elución (Tris 25 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl y 500 mM Imidazol) hasta conseguir la elución de la enzima PETasa. Durante la elución se colectaron fracciones de 0.5 mL en tubos estériles. Finalmente, se analizó la pureza de las fracciones recogidas mediante SDS PAGE (Dermitt & Mardakheh, 2021).

## **2.2. Materiales y reactivos**

### **2.2.1. Materiales**

- |                        |                                  |
|------------------------|----------------------------------|
| - Guantes de nitrilo   | - Mascarillas                    |
| - Gradillas            | - Rotuladores                    |
| - Malla metálica       | - Matraz Erlenmeyer 250, 1000 mL |
| - Frascos de tapa azul |                                  |

- Probetas 10, 100 mL
- Micropipetas de volumen variable
- Balones de aforo
- Papel absorbente
- Puntas para pipetas de 20  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1 mL, 10 mL
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Papel film
- Tubos Falcon de 50 mL
- Pipetas
- Hisopos
- Cajas Petri de vidrio
- Mechero
- Espátulas estériles
- Columna Ni-N

### **2.2.2. Reactivos**

- Kit de mutagénesis dirigida al sitio QuickChange II
- Kit para la extracción de ADN plasmídico GenElute™ Plasmid Miniprep
- Lisozima
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Triptona
- Agar – agar
- Acetato sódico ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ )
- Alcohol etílico
- Glucosa
- Tris HCl
- EDTA
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- SDS
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )
- Cloranfenicol
- Glicerol
- Imidazol
- Acrilamida

### **2.2.3. Líneas celulares**

- *E. coli* Rosetta (DE3)
- *E. coli* DH5 $\alpha$

#### 2.2.4. Secuencias utilizadas

Mapa del plásmido N° 112202 obtenido de la base de datos Addgene (<https://www.addgene.org/112202/>)

#### 2.2.5. Equipos

- Estufa (Precisión-Thermo Scientific)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Centrífuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen)
- Incubadora (Isotherm)
- Refrigerador (LG)
- Ultra congelador (Binder)
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIRR)
- Termociclador (Biorad)
- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110)
- Agitador incubador orbital (Shaker mini-Benchmarle)
- FPLC (ÄKTA Start con colector de fracciones)
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- Cámara de electroforesis (Biorad)
- Incubadora (ESCO/Isotherm)
- Cámara de flujo laminar (ESCO/ACB-4 A2)
- Plancha de agitación (IK.C-MAG HS7)
- Plancha de calentamiento (Labnet)
- pH metro (Metler Toledo/SevenCompact)
- Vortex (Labnet/Mixer/VX200)
- Baño termostático con agitación (Stuart)
- Nanodrop (Thermo Scientific)
- Sonicador 650 WT (MRC)

#### 2.2.6. Recursos tecnológicos:

- QuickChange
- Addgene
- Scopus
- ProQuest
- SCIFINDER
- PyMOL
- ExPASy PeptideCutter
- ExPASy Compute pI/Mw

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Diseño de primers

El alineamiento múltiple de secuencias (Figura 6) reveló que al comparar los residuos que contornean el sitio de unión con el PET en IsPETasa con la secuencia de enzimas homólogas (cutinasas y lipasas), se observa un bajo grado de conservación para algunos residuos clave. Siguiendo la metodología de **Austin et al. (2018)**, se analizaron las variaciones en la secuencia de aminoácidos según la cantidad de enzimas homólogas que poseen dicha variación y se descartaron las posibles mutaciones en residuos que anteriormente se mostraron fundamentales para el funcionamiento de la PETasa. Finalmente se encontraron 17 potenciales mutaciones de las cuales se seleccionaron 3 (Tabla 6).

En la Universidad de las Américas, los 17 modelos de los posibles mutantes se generaron en el programa UCSF Chimera (**Pettersen et al., 2004**). Para posteriormente, ser sujetos de estudios de dinámica molecular y cálculos de energía libre de unión. En consecuencia, para cada sistema (complejo) se corrieron 5 dinámicas moleculares de 4 ns cada una. Adicionalmente, para los cálculos de energía libre de unión se aplicaron 100 conformaciones extraídas de cada una de las 5 trayectorias igualmente espaciadas y cubriendo el intervalo de 1 ns a 4 ns. Las energías de unión fueron estimadas con el método MM-GBSA implementado en Amber 2020 (**Ben-Shalom et al., 2019**).



Al comparar los mutantes evaluados se observó que las mutaciones N212A, I208V y S238Y presentan una diferencia de energía libre de unión de al menos 6.92 kcal/mol entre PET y los productos. Considerando que una mayor diferencia de energías de unión sugiere una alta afinidad por el sustrato y baja por los productos de la reacción. Teóricamente, las tres mutaciones antes mencionadas mejorarían la actividad catalítica de la enzima, y, por lo tanto, la eficiencia de procesamiento de PET.

**Tabla 6.** Energías libres de unión predichas para las mutaciones realizadas expresadas en kcal/mol.

<b>Sistema</b>	<b>PET</b>	<b>Productos</b>
Nativa	-21.20	-17.94
I208V	-25.50	-18.58
N212A	-28.36	-14.88
S238Y	-25.50	-17.84

Para las mutaciones seleccionadas, se diseñaron los primers forward y reverse (Tabla 7) de forma manual, siguiendo la metodología propuesta por el kit QuickChange II, y cumpliendo los parámetros que ésta establece. El manual del kit recomienda que los cebadores forward y reverse sean complementarios, que posean una longitud de entre 25 y 45 pares de bases, y que el contenido de GC sea mínimo de 40% (**Agilent Technologies, 2015**). Por lo tanto, los primers diseñados miden 27 pares de bases, poseen un contenido de GC de 55.56 y 70.37%, y se hibridan con la misma secuencia en las hebras opuestas del plásmido.

**Tabla 7.** Primers diseñados para cada mutación

<b>Mutación</b>	<b>Primers</b>	<b>Temperatura de melting (°C)</b>	<b>Contenido Guanina - Citocina (%)</b>
I208V	5' gag aat gat agc <b>tgg</b> gca ccg gtg aac 3'	55	55.56
	5' gtt cac cgg tgc <b>cca</b> gct atc att ctc 3'		
N212A	5' att gca ccg gtg <b>gcg</b> agc agc gcg ctg 3'	55	70.37
	5' cag cgc gct gct <b>cgc</b> cac cgg tgc aat 3'		
S238Y	5' ggc ggt agc cac <b>tat</b> tgt gcc aac tct 3'	55	55.56
	5' aga gtt ggc aca <b>ata</b> gtg gct acc gcc 3'		

Generalmente, los kits de mutagénesis dirigida, incluyendo el kit QuickChange II, sugieren que la mutación deseada se encuentre en la mitad del primer con ~10 – 15 bases de secuencia correcta en ambos lados. Lo cual se tomó en cuenta para el diseño de los cebadores en esta investigación. Sin embargo, **Austin et al. (2018)**, utilizando el kit Q5 llevó a cabo mutagénesis exitosas aplicando primers donde la mutación deseada se ubicó en el extremo 5' del cebador.

### 3.2. Obtención de variantes mutantes

Mediante la ejecución de una PCR mutagénica, se llevaron a cabo tres mutaciones puntuales en los residuos I208V, N212A y S238Y. Se seleccionaron cinco colonias de cada mutación, de cuya biomasa se procedió a extraer el ADN plasmídico, obteniéndose los rendimientos entre 118.1 y 210.4 ng/μL (Tabla 8). Las muestras de ADN plasmídico purificado fueron enviadas para su secuenciación en la Universidad de las Américas.

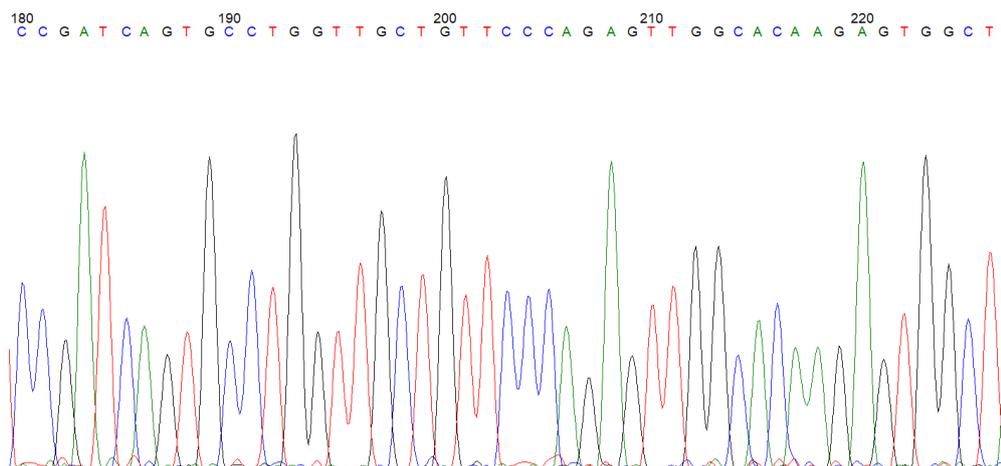
**Tabla 8.** Resultados de la extracción de ADN plasmídico de las diferentes variantes mutantes.

Mutación	Clon	Concentración de ácidos nucleicos (ng/μL)		
		260/280	260/230	
<b>I208V</b>	1	146.6	1.88	1.71
	2	210.4	1.89	1.85
	3	118.1	1.84	1.83
	4	128.1	1.88	1.88
	5	194.5	1.79	1.29
<b>N212A</b>	1	190.4	1.96	2.15
	2	143.0	1.82	1.50
	3	148.3	1.91	2.04
	4	183.9	1.80	1.26
<b>S238Y</b>	1	200.8	1.90	1.91
	2	156.0	1.87	2.01
	3	140.5	1.89	2.05
	4	132.3	1.89	1.82
	5	138.8	1.88	1.83

En la Tabla 8 se observa que en todos los casos se obtuvo una concentración de ácidos nucleicos mayor a 100 ng/μL, además de una relación de absorbancia 260/280 que en todas las muestras, especialmente en los clones 1 y 3 de la variante N212A, y en el clon 1 de la mutación S238Y, se observa que fue de entre 1.8 y 1.9, lo que sugiere que las muestras posiblemente se hayan contaminado con proteínas o sales (**Alejos et al., 2016; Osorio et al., 2013**). Mientras que en cuanto a la relación de absorbancia 260/230, se observa que los clones 1 y 5 de la variante I208V, y los clones 2 y 4 de la mutación N212A presentaron valores menores que 1.8, por lo tanto, dichas muestras probablemente estén contaminadas por compuestos orgánicos o agentes caotrópicos que absorben a una longitud de onda de 230 nm, lo que disminuye su pureza (**Vazquez-Lobo & Morales, 2014**).

### 3.3. Análisis de secuencias de nucleótidos

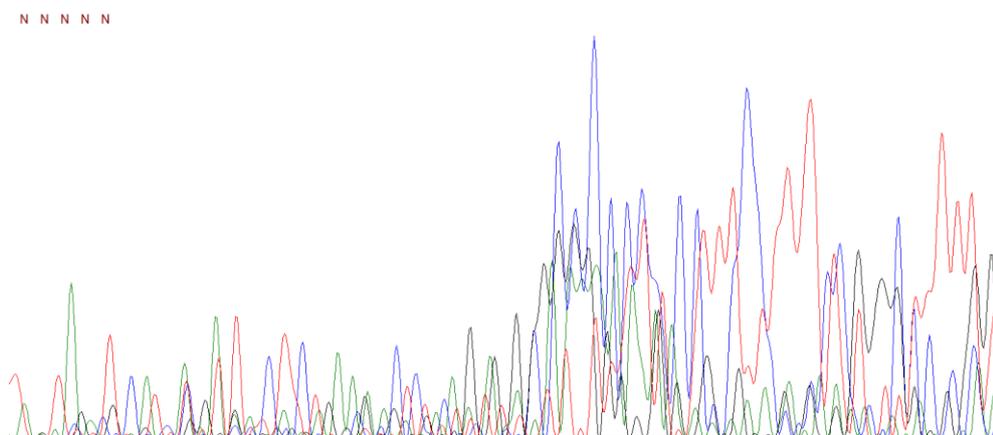
El ADN plasmídico extraído de 15 mutantes fue enviado para su secuenciación en los laboratorios de la Universidad de las Américas. Un ejemplo de los resultados de secuenciación se muestra en la Figura 7.



**Figura 7.** Cromatograma obtenido de la secuenciación de la variante mutante I208V, clon 1 empleando el primer T7 terminador.

Los clones que no se mutaron correctamente generaron interferencias durante la secuenciación, obteniéndose cromatogramas donde se observa que existen gran cantidad de picos sobrepuestos y un ruido bastante alto que se encuentra cercano al pico de la señal, lo que impide identificar la secuencia de ácidos nucleicos en la

muestra analizada (Janitz, 2008), como se observa en la Figura 8. Este tipo de interferencias pueden ser causadas por errores durante la secuenciación o la purificación, por una contaminación de la muestra por material genético extraño, a pesar de haberse utilizado el primer selectivo T7 terminador que debido a su dominio N-terminal está involucrado en la terminación de la transcripción (Crossley et al., 2020). Así mismo, pueden interferir con la secuenciación fragmentos que copurifican con el molde, ya que contienen sitios de unión para los cebadores de secuenciación (Reguero, 2014). Adicionalmente, se considera que otro factor que pudo afectar la muestra fue el embalaje, ya que para hacerlo se usó tubos eppendorf asegurados con cinta adhesiva de papel, en lugar de hacerlo en una tirilla de tubos de PCR como lo requirió el laboratorio a cargo del análisis.



**Figura 8.** Cromatograma obtenido de la secuenciación de la variante mutante I208V, clon 3 empleando el primer T7 terminador.

Posteriormente, para cada variante mutante, se realizó un alineamiento de las secuencias obtenidas por secuenciación para cada clon con la secuencia de ADN de la PETasa silvestre codificada en el plásmido pET112202. Este alineamiento se realizó en MEGA (Figura 9).

En la Figura 9A se observa que los clones 1, 2 y 4 presentan una guanina en lugar de la adenina original, lo que codifica para una valina que reemplaza a la isoleucina en el residuo 208, es decir que los tres clones de esta mutación poseen la mutación deseada. En el análisis de secuencias de la variante mutante N212A (Figura 9B), se encontró que los clones 1 y 2 obtuvieron la mutación requerida, intercambiando a la asparagina

original por alanina en el residuo 212. Sin embargo, el clon 3 muestra haber mantenido la secuencia de la enzima silvestre, y en la secuencia del clon 4 se observa que, a pesar de haber mutado, existió una delección no deseada en el residuo 215; por lo tanto, el ADN plasmídico de los clones 3 y 4 no fue utilizado para la expresión o purificación de proteína. En la Figura 9C se observa que la variante mutante S238Y fue analizada mediante alineamiento de secuencias, observándose que los clones 1 y 2 mutaron en el residuo deseado. En ambos se reemplazó la citocina señalada por una adenina, lo que se traduce como una tirosina en el residuo 238 donde antes se expresaba una serina.

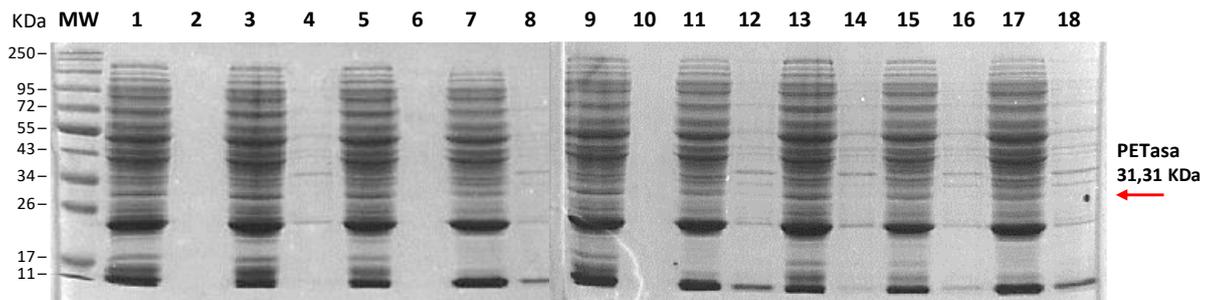
A)	1. IsPETasa WT	G A G A A T G A T A G C	A	T T G C A C C G G T G A A C
	2. T7 terminator - 1.1	G A G A A T G A T A G C	G	T T G C A C C G G T G A A C
	3. T7 terminator - 1.2	G A G A A T G A T A G C	G	T T G C A C C G G T G A A C
	4. T7 terminator - 1.4	G A G A A T G A T A G C	G	T T G C A C C G G T G A A C
B)	1. IsPETasa WT	A T T G C A C C G G T G	A	A C A G C A G C G C G C T G
	2. T7 terminator - 2.1	A T T G C A C C G G T G	G	C C A G C A G C G C G C T G
	3. T7 terminator - 2.2	A T T G C A C C G G T G	G	C C A G C A G C G C G C T G
	4. T7 terminator - 2.3	A T T G C A C C G G T G	A	A C A G C A G C G C G C T G
	5. T7 terminator - 2.4	A T T G C A C C G G T G	G	C C - G C A G C G C G C T G
C)	1. IsPETasa WT	G G C G G T A G C C A C T	C	T T G T G C C A A C T C T
	2. T7 terminator - 3.1	G G C G G T A G C C A C T	A	T T G T G C C A A C T C T
	3. T7 terminator - 3.2	G G C G G T A G C C A C T	A	T T G T G C C A A C T C T

**Figura 9.** Alineamiento de secuencias de las variantes mutantes A) I208V, B) N212A y C) S238Y.

\*Se muestra en color amarillo la secuencia original de la enzima PETasa WT y en color celeste los clones que fueron mutados correctamente en el residuo encerrado y señalado de color azul marino. En color gris se muestran los clones que no presentaron la secuencia deseada.

### 3.4. Ensayo de expresión

Para establecer las condiciones idóneas de expresión, se realizó un ensayo de expresión de la enzima PETasa wild type (WT) en *E. coli* Rosetta. La expresión se indujo con la aplicación de Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) en concentraciones de 0.1 mM, 0.5 mM y 1 mM, a temperaturas de 37°C, 30°C y ambiente (aproximadamente 22°C), durante un tiempo de incubación de 2, 4 y 15 horas, respectivamente. Luego del periodo de incubación se analizaron los resultados mediante una electroforesis desnaturalizante SDS PAGE (Figura 10), con el fin de verificar mediante la comparación del peso molecular de la PETasa, de 31.31 KDa, a qué concentración se expresó una mayor cantidad de proteína.



**Figura 10.** Ensayo de expresión de la enzima PETasa WT.

1) Pellet, 0.1 mM IPTG, 22 °C; 2) Sobrenadante, 0.1 mM IPTG, 22 °C; 3) Pellet, 0.5 mM IPTG, 22 °C; 4) Sobrenadante, 0.5 mM IPTG, 22 °C; 5) Pellet, 1 mM IPTG, 22 °C; 6) Sobrenadante, 1 mM IPTG, 22 °C; 7) Pellet, 0.1 mM IPTG, 30 °C; 8) Sobrenadante, 0.1 mM IPTG, 30 °C; 9) Pellet, 0.5 mM IPTG, 30 °C; 10) Sobrenadante, 0.5 mM IPTG, 30 °C; 11) Pellet, 1 mM IPTG, 30 °C; 12) Sobrenadante, 1 mM IPTG, 30 °C; 13) Pellet, 0.1 mM IPTG, 37 °C; 14) Sobrenadante, 0.1 mM IPTG, 37 °C; 15) Pellet, 0.5 mM IPTG, 37 °C; 16) Sobrenadante, 0.5 mM IPTG, 37 °C; 17) Pellet, 1 mM IPTG, 37 °C; 18) Sobrenadante, 1 mM IPTG, 37 °C.

En la Figura 10 se observa que con la mayoría de los tratamientos se obtuvo una cantidad similar de enzima expresada, por lo que se empleó la concentración de 0,1 mM de IPTG a temperatura ambiente, incubándose el cultivo durante toda la noche (aproximadamente 15 horas).

En estudios similares se consiguió la expresión de la enzima PETasa mediante la adición de IPTG a una concentración de entre 0,4 y 0,6 mM (**Meng et al., 2021; Rennison et al., 2021**), dependiendo de la línea celular de *E. coli* utilizada, en este caso Rosetta (DE3). Así mismo, **Kielkopf et al. (2021)** recomienda usar IPTG 0,5 mM para inducir la expresión de proteína en *E. coli*. Sin embargo, la concentración óptima de IPTG se debe establecer de forma empírica (**Tolia & Joshua-Tor, 2006**). En este caso, se presume que la enzima estudiada se expresa de forma adecuada con 0,1 mM IPTG, debido a que de esta manera no se sobrecarga la maquinaria biosintética de la bacteria, permitiendo que la transcripción se dé lentamente y logrando un adecuado plegamiento intracelular de la proteína expresada (**Kielkopf et al., 2021**). Adicionalmente, se ha encontrado que la concentración de IPTG podría ser diez veces menor que 1 mM, la concentración comúnmente utilizada en biología molecular, manteniendo niveles similares de expresión e induciendo menos daño al crecimiento celular (**Larentis et al., 2014**).

Por otra parte, según (**Lagunas et al., 2020**), así como la concentración de IPTG, el tiempo y temperatura de incubación se deben establecer de forma empírica, siendo

éstos inversamente proporcionales, por los principios del crecimiento celular. Como se muestra en los carriles 1 y 3 de la Figura 10, en este ensayo de expresión se observó que, a temperaturas más bajas, y, por lo tanto, un mayor tiempo de incubación se obtiene una cantidad ligeramente mayor de proteína. Por tal razón el tratamiento elegido para la expresión de las variantes mutantes fue con 0.1 mM de IPTG, y una temperatura de incubación de aproximadamente 22 °C por 15 horas.

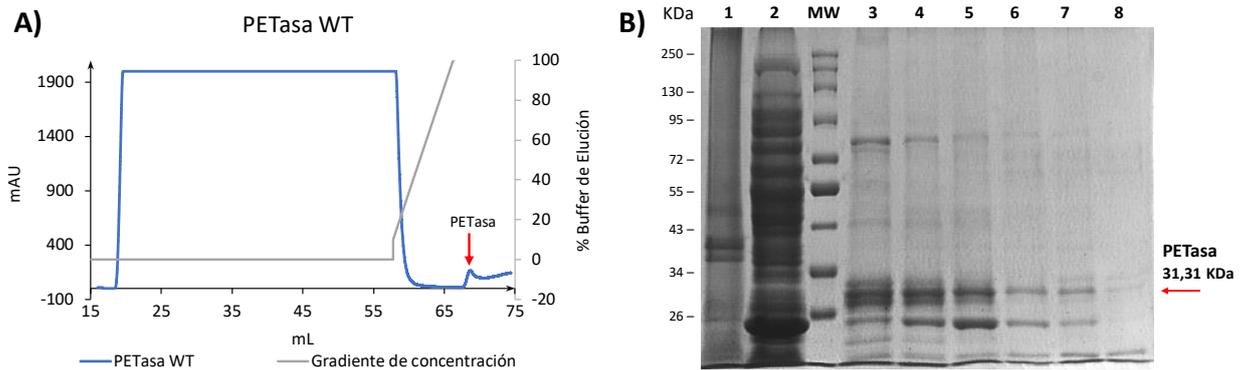
En la Figura 10, las bandas correspondientes a 31.31 KDa de la PETasa se muestran bastante tenues. Sin embargo, se observan en todos los tratamientos dos bandas intensas cercanas a los 20 y 11 KDa, por lo que se deduce que la enzima PETasa fue cortada en dos secciones de estos pesos por una proteasa, ya que para este ensayo no se aplicó ningún inhibidor de proteasas. Al analizar la enzima en el software ExPASy PeptideCutter, se determinó que ésta puede ser hidrolizada por 23 proteasas en más de 300 posiciones, sin embargo, de la lista de enzimas disponibles en el programa, solamente la trombina, una serina proteasa, es capaz de realizar un solo corte en el aminoácido número 100, sección que según el software ExPASy Compute pI/Mw pesaría 10,251 KDa, un valor que coincide con las bandas obtenidas en la Figura 10. En este sentido, según (**Gottesman, 1996**), existen cuatro serina proteasas propias de *E. coli* que podrían llevar a cabo esta hidrólisis: In [3pt] So, DegP (HtrA) proteasa, DegQ (HhoA) proteasa y la Proteasa VI.

Adicionalmente, en los carriles correspondientes al sobrenadante, se observa muy poca proteína o ausencia de ésta, debido a que para el proceso de lisis celular se aplicó 10 mg de lisozima por gramo de células y tres ciclos de congelación – descongelación, lo cual no fue suficiente para lograr la lisis; generando que la mayoría de enzima se encuentre en el pellet.

### 3.5. Expresión y purificación de la enzima PETasa wild type

Después de inducir la expresión de la proteína, se lisaron las células mediante sonicación, la muestra tratada se purificó con el equipo FPLC y la enzima purificada se analizó por medio de una electroforesis SDS PAGE.

En la Figura 11A se evidencia que en la purificación de la PETasa WT existió un pico bastante claro que alcanzó los 163.94 mAU, se observa que la proteína eluyó a una concentración de 42 a 61% de buffer de elución, colectándose las fracciones 9 a 15. Al correr la electroforesis SDS, se observó en el gel de acrilamida (Figura 11B) que la proteína de interés estuvo presente en todas las fracciones analizadas, así como en el sobrenadante. La mayor cantidad de enzima purificada se colectó en las fracciones 9 y 10, seguidas de la 11, sin embargo, en éstas, además de la PETasa, se observa una gran presencia de otras proteínas, lo que en las fracciones 13 y 14 sucede muy poco, por lo que se considera que la enzima colectada en estas últimas se encuentra más pura. Por otra parte, en la fracción 15 existió una cantidad casi imperceptible de proteína. Al haberse logrado purificar la enzima PETasa WT de manera satisfactoria se considera que el método es adecuado para llevar a cabo la purificación de las variantes mutantes.

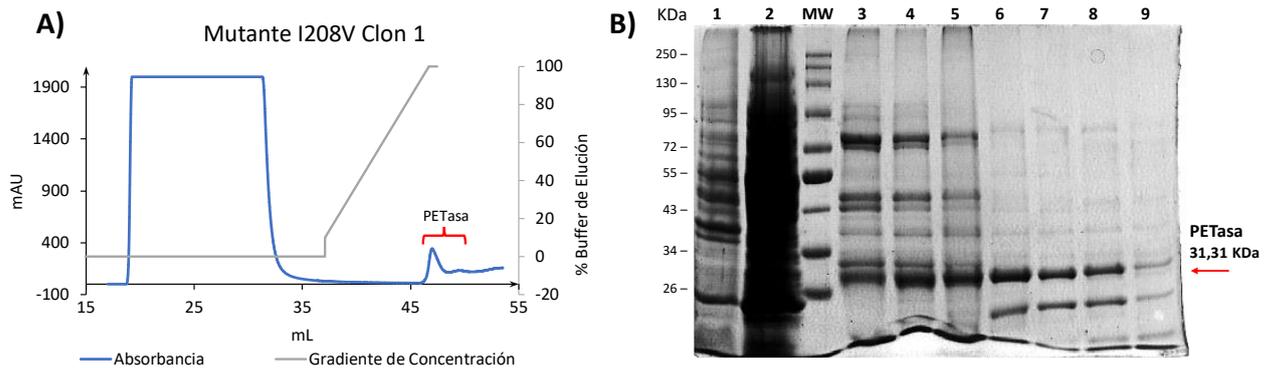


**Figura 11.** Purificación de la enzima PETasa WT mediante cromatografía de afinidad (FPLC).

**A)** Cromatograma obtenido de la purificación de la enzima PETasa WT, el pico en el que eluyó la proteína de interés (fracciones 9 a 14) se encuentra señalado. **B)** Análisis SDS PAGE (gel al 12%) de los resultados de la purificación de la enzima PETasa WT, donde los carriles se cargaron de la siguiente manera: **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 9; **4)** Fracción 10; **5)** Fracción 11; **6)** Fracción 13; **7)** Fracción 14; **8)** Fracción 15

### 3.6. Expresión y purificación de variantes mutantes

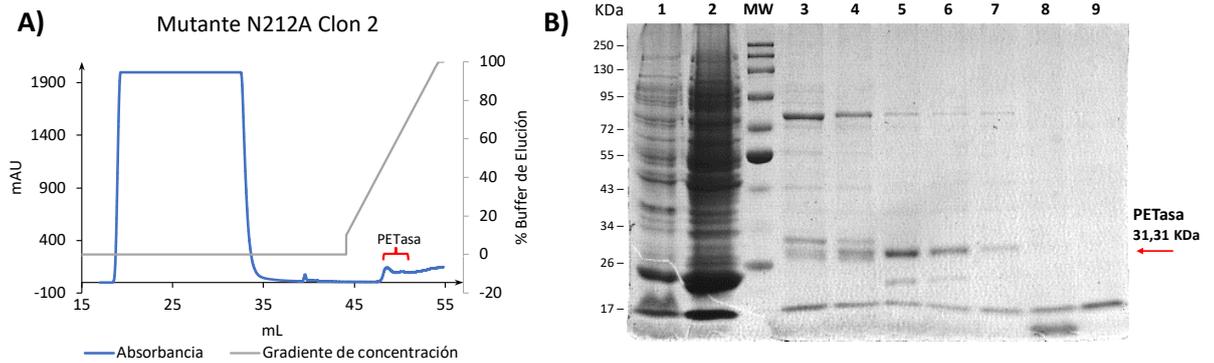
En la Figura 12A se observa que existieron dos picos, el primero y más prominente llegó a los 342.09 mAU, y tuvo su punto máximo eluyendo a una concentración de 46% del buffer de elución. En el análisis SDS PAGE (Figura 12B), los carriles 3, 4 y 5 corresponden a las fracciones 9, 10 y 11 colectadas en este pico. Por otra parte, el segundo pico, significativamente más pequeño, tuvo su punto máximo en 131.73 mAU, eluyendo a una concentración muy cercana al 70% del buffer de elución, de este pico se recogieron las fracciones 13, 14, 15 y 16 que se observan en los carriles 6, 7, 8 y 9 del gel de poliacrilamida, respectivamente. Al correr la electroforesis SDS PAGE (figura 12B) se encontró que la mayor cantidad de enzima purificada se colectó en la fracción 9, seguida de la 10 y 11, sin embargo, en las fracciones 13 y 14 la enzima colectada se encuentra más pura, ya que se observa solamente una banda de proteína, además de la banda de la PETasa (31.31 KDa), a diferencia de los carriles 3, 4 y 5 donde existieron varias bandas de proteína desconocida. En la fracción 15 se observa una banda bastante tenue, lo que sugiere poca presencia de proteína (**Gallagher, 2012**).



**Figura 12.** Purificación de la variante mutante I208V Clon 1 mediante cromatografía de afinidad (FPLC)

**A)** Cromatograma obtenido de la purificación de la variante mutante I208V C1, las fracciones 9 a 16, en las que eluyó la proteína de interés se encuentran señaladas. **B)** Análisis SDS PAGE (gel al 12%) de los resultados de la purificación de la variante mutante I208V C1, donde los carriles se cargaron de la siguiente manera: **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 9; **4)** Fracción 10; **5)** Fracción 11; **6)** Fracción 13; **7)** Fracción 14; **8)** Fracción 15; **9)** Fracción 16

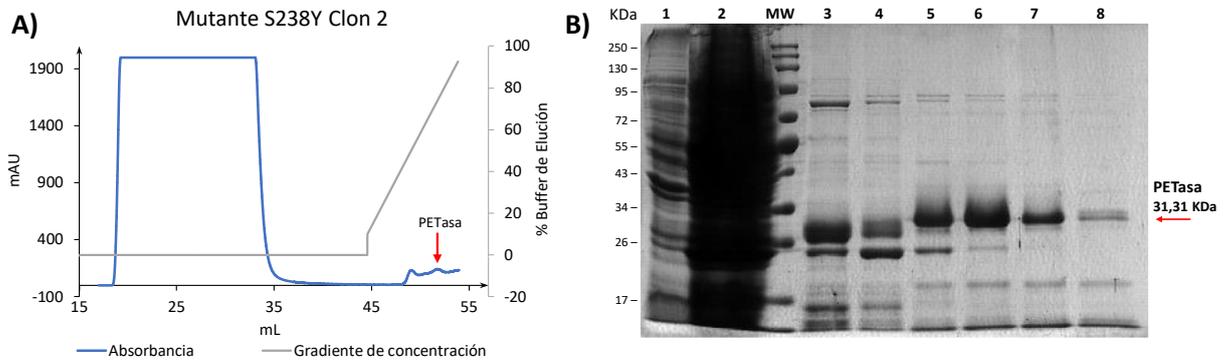
En la Figura 13A, se observa que existieron dos picos, el primero y más prominente llegó a los 141.48 mAU, y tuvo su punto máximo eluyendo a una concentración de 46.8% del buffer de elución. Mientras que, el segundo pico, significativamente más pequeño, tuvo una absorbancia máxima de 103.35 mAU, eluyendo a una concentración de 62.57% del buffer de elución. En la Figura 13B, las fracciones 9 y 10 (carriles 3 y 4) corresponden al primer pico y las fracciones 12 a 16 (carriles 5 a 9), al segundo. Se encontró mediante electroforesis SDS PAGE, que en las fracciones 9 a 14 existió la presencia de la variante mutante (31.31 KDa), observándose con mayor intensidad en la fracción 12. No obstante, en las fracciones 9 y 10 (carriles 3 y 4), se observan, además de la banda de la PETasa, varias otras bandas de proteína desconocida, por lo que se considera en las fracciones 12, 13 y 14 la proteína de interés se encuentra en un estado más puro; a pesar de que en la fracción 14 la banda de la proteína de interés es casi imperceptible. En los carriles 8 y 9 no se observa ninguna banda de proteína, lo que sugiere que la absorbancia detectada en las fracciones 15 y 16 durante la purificación es solamente debido a la presencia del buffer de elución.



**Figura 13.** Purificación de la variante mutante N212A Clon 2 mediante cromatografía de afinidad (FPLC).

**A)** Cromatograma obtenido de la purificación de la variante mutante N212A C2, las fracciones 9 a 14 en las que eluyó la proteína de interés se encuentran señaladas. **B)** Análisis SDS PAGE (gel al 12%) de los resultados de la purificación de la variante mutante N212A C2, donde los carriles se cargaron de la siguiente manera: **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 9; **4)** Fracción 10; **5)** Fracción 12; **6)** Fracción 13; **7)** Fracción 14; **8)** Fracción 15; **9)** Fracción 16

En la Figura 14A, se observa que existieron dos picos, el primero con una absorbancia de 129.75 mAU, y tuvo su punto máximo eluyendo a una concentración de 46.9% del buffer de elución. En el análisis SDS PAGE (Figura 14B), los carriles 3 y 4 corresponden a las fracciones 9 y 10 colectadas en este pico; mientras que, en los siguientes carriles, las fracciones 12, 13, 14 y 15 se colectaron del segundo pico, cuyo punto máximo se dio en 142.99 mAU, cuando la concentración del buffer de elución fue de 72%. En los resultados de la electroforesis SDS PAGE (Figura 14B) se encontró que las fracciones 9 y 10, es decir, el primer pico de la cromatografía, no corresponden a la enzima PETasa, de 31.31 KDa, ya que, según el marcador de peso molecular, la proteína contenida en estas fracciones pesa aproximadamente 28 KDa. Sin embargo, en las fracciones 12, 13, 14 y 15 se observa que existe la presencia de la variante mutante, siendo la fracción 13 la que muestra la banda más intensa, y la 14 la que se considera más pura.



**Figura 14.** Purificación de la variante mutante S238Y Clon 2 mediante cromatografía de afinidad (FPLC).

**A)** Cromatograma obtenido de la purificación de la variante mutante S238Y C2, el pico en el que eluyó la proteína de interés (fracciones 12 a 15) se encuentra señalado. **B)** Análisis SDS PAGE (gel al 12%) de los resultados de la purificación de la variante mutante S238Y C2, donde los carriles se cargaron de la siguiente manera: **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 9; **4)** Fracción 10; **5)** Fracción 12; **6)** Fracción 13; **7)** Fracción 14; **8)** Fracción 15

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

- Se diseñaron primers para la construcción de las variantes mutantes I208V, N212A y S238Y de la enzima *IsPETasa*, que cumplen con los parámetros establecidos por el kit QuickChange II para llevar a cabo de forma exitosa la amplificación por mutagénesis dirigida al sitio.
- Mediante el uso del kit comercial para mutagénesis dirigida QuickChange II, se llevaron a cabo tres mutaciones puntuales, I208V, N212A y S238Y, en la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Las variantes mutantes obtenidas se expresaron en un sistema heterólogo y se purificaron mediante cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad.
- Se estableció que las condiciones para la expresión de las variantes mutantes I208V, N212A y S238Y de la enzima *IsPETasa* son 0.1 mM de IPTG y 22°C durante toda la noche (aprox. 15 h).

#### 4.2. Recomendaciones

- Llevar a cabo ensayos sobre plástico PET con el fin de determinar la eficiencia de las variantes mutantes en comparación con la enzima silvestre.
- Construir combinaciones de las diferentes mutaciones conocidas y de esta manera, explorar nuevas opciones para lograr conseguir una enzima aplicable a la problemática medioambiental actual.

## MATERIAL DE REFERENCIA

- Agilent Technologies. (2015). *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit User Manual*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.434>
- Al-Sabagh, A., Yehia, F., Eshaq, G., Rabie, A., & ElMetwally, A. (2016). Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/J.EJPE.2015.03.001>
- Alejos, P., Aragón, C., & Cornejo, A. (2016). Extracción y purificación de ADN. In *Herramientas moleculares aplicadas en ecología*. UNAM. [www.eoearth.org/view/article/158858](http://www.eoearth.org/view/article/158858).
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. El, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Lee Woodcock, H., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4350–E4357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115>
- Ben-Shalom, I. Y., Lin, C., Kurtzman, T., Walker, R. C., & Gilson, M. K. (2019). Simulating Water Exchange to Buried Binding Sites. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 15(4), 2691. <https://doi.org/10.1021/ACS.JCTC.8B01284>
- Billmeyer, F. (2020). *Ciencia de los polímeros (2º)*. Reverté. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=Fe0FEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=polimeros&ots=e3v2qZjejO&sig=VRHW4VZ9VdQBvdUVfBvTQK3HEz4&redir\\_esc=y#v=onepage&q=polimeros&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=Fe0FEAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=polimeros&ots=e3v2qZjejO&sig=VRHW4VZ9VdQBvdUVfBvTQK3HEz4&redir_esc=y#v=onepage&q=polimeros&f=false)
- Briand, L., Marcion, G., Kriznik, A., Heydel, J. M., Artur, Y., Garrido, C., Seigneiric, R., & Neiers, F. (2016). A self-inducible heterologous protein expression system in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP33037>
- Cerda-Mejía, L. (2016). *Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico paplero* [Universitat de Barcelona]. [www.tdx.cat](http://www.tdx.cat)
- Chen, C. C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., & Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal

- the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, 285(20), 3717–3723. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14612>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110>
- Crossley, B. M., Bai, J., Glaser, A., Maes, R., Porter, E., Killian, M. L., Clement, T., & Toohey-Kurth, K. (2020). Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 767–775. <https://doi.org/10.1177/1040638720905833>
- Davidenko, N., Cameron, R., Best, S., & Kingdom, U. (2018). Natural Biopolymers for Biomedical Applications. In *Encyclopedia of Biomedical Engineering* (Issue 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.11026-8>
- Dermit, M., & Mardakheh, F. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100462>
- Dimitrov, N., Kratofil Krehula, L., Ptiček Siročić, A., & Hrnjak-Murgić, Z. (2013). Analysis of recycled PET bottles products by pyrolysis-gas chromatography. *Polymer Degradation and Stability*, 98(5), 972–979. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2013.02.013>
- Faust, G., Stand, A., & Weuster-Botz, D. (2015). IPTG can replace lactose in auto-induction media to enhance protein expression in batch-cultured *Escherichia coli*. *Engineering in Life Sciences*, 15(8), 824–829. <https://doi.org/10.1002/ELSC.201500011>
- Feng, S., Yue, Y., Zheng, M., Li, Y., Zhang, Q., & Wang, W. (2021). IsPETase- and IsMHETase-Catalyzed Cascade Degradation Mechanism toward Polyethylene Terephthalate. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 9(29), 9823–9832. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C02420>
- Fox, B. G., & Blommel, P. G. (2009). Autoinduction of Protein Expression. *Current Protocols in Protein Science*, 5(56), 5–23.

<https://doi.org/10.1002/0471140864.PS0523S56>

- Fuentes, C, Marcoccia, C., Moyano, D., Peluso, M., & Sambeth, J. (2017). Reciclado químico de Polietilentereftalato empleado sólidos recuperados de baterías agotadas como catalizadores de la glicólisis. *Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental*, 338–343. [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/80998/Documento\\_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/80998/Documento_completo.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
- Fuentes, Cynthia, Gallegos, M., Moyano, D., Peluso, A., Cortizo, S., & Sambeth, J. (2017). Glicólisis de PET usando como catalizadores sólidos recuperados de pilas. *Congreso Argentino de Catálisis*, 1(3), 6–12. [www.frc.utn.edu.ar/XXCAC2017/](http://www.frc.utn.edu.ar/XXCAC2017/)
- Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K., & Miyamoto, K. (2018). Acceleration of Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants. *ChemSusChem*, 11(23), 4018–4025. <https://doi.org/10.1002/CSSC.201802096>
- Furukawa, M., Kawakami, N., Tomizawa, A., & Miyamoto, K. (2019). Efficient Degradation of Poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* Cutinase Exhibiting Improved Catalytic Activity Generated using Mutagenesis and Additive-based Approaches. *Nature Scientific Reports*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52379-z>
- Gallagher, S. (2012). SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE). *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 6(1), 7.3.1-7.3.28. <https://doi.org/10.1002/9780470089941.ET0703S06>
- Garcés, A. (2021). *Análisis Filogenético de Estructura y Genoma de enzima PETasa de Ideonella sakaiensis* [Universidad Técnica de Ambato]. [https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32087/1/BQ\\_244.pdf](https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/32087/1/BQ_244.pdf)
- Ge, B. K., Hu, G. M., & Chen, C. M. (2021). Plastic bioconversion: Reaction mechanism of PETases. *Chinese Journal of Physics*, 73, 331–339. <https://doi.org/10.1016/J.CJPH.2021.07.027>
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review*

of *Genetics*, 30(1), 465–506.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.GENET.30.1.465>

Graf, L. G., Michels, E. A. P., Yew, Y., Liu, W., Palm, G. J., & Weber, G. (2021). Structural analysis of PET-degrading enzymes PETase and MHETase from *Ideonella sakaiensis*. *Methods in Enzymology*, 648, 337–356.  
<https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2020.12.015>

Greenpeace. (2018). *Datos sobre la producción de plásticos*. Greenpeace España.  
<https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/>

Hadi, M. (2005). Effectiveness of Ultrasound on the Destruction of *E. coli*. *American Journal of Environmental Sciences*, 1(3), 187–189.  
<https://doi.org/10.3844/ajessp.2005.187.189>

Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-017-02255-Z>

Herrera, J., & Estrada, A. (2012). Depolimerización de botellas de poli(tereftalato de etileno) (PET) post-consumo mediante glicólisis. Efecto del catalizador y del tipo de glicol. *Rev. Iberoam. Polímeros*, 13(3), 117–129. <https://acortar.link/zGwAGr>

Hiraga, K., Taniguchi, I., Yoshida, S., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of waste PET. *EMBO Reports*, 20(11).  
<https://doi.org/10.15252/EMBR.201949365>

Janitz, M. (2008). Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine. In *Next Generation Genome Sequencing: Towards Personalized Medicine*. Wiley-VCH. <https://doi.org/10.1002/9783527625130>

Janson, J.-C. (2011). *Protein Purification: Principles, high resolution methods, and applications* (3rd ed., Vol. 54). Wiley.  
<https://drive.google.com/drive/folders/1JvK0KzdAB1GbfCxpVj1U0IbitgbGJQJ>  
o

- Jia, Y., Samak, N. A., Hao, X., Chen, Z., Yang, G., Zhao, X., Mu, T., Yang, M., & Xing, J. (2021). Nano-immobilization of PETase enzyme for enhanced polyethylene terephthalate biodegradation. *Biochemical Engineering Journal*, 176, 108205. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2021.108205>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/S41467-018-02881-1>
- Kielkopf, C. L., Bauer, W., & Urbatsch, I. L. (2021). Expression of Cloned Genes in E. coli Using IPTG-Inducible Promoters. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2021(2), pdb-prot102137. <https://doi.org/10.1101/PDB.PROT102137>
- Koshti, R., Mehta, L., & Samarth, N. (2018). Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate: A Mini-Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 26(8), 3520–3529. <https://doi.org/10.1007/S10924-018-1214-7>
- Lagunas, V. H., Cabrera, N., Bolívar, F., & Gosset Alfredo Martínez, G. (2020). Estudio paramétrico para la producción de melanina en Escherichia coli recombinante. *Simposio Puerto Vallarta*, 54.
- Larentis, A. L., Nicolau, J. F. M. Q., Esteves, G. D. S., Vareschini, D. T., De Almeida, F. V. R., Dos Reis, M. G., Galler, R., & Medeiros, M. A. (2014). Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in E. coli using shaking flasks and microbioreactor. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-671/FIGURES/6>
- Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y., & Bao, R. (2018). Protein Crystallography and Site-Direct Mutagenesis Analysis of the Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase PETase from Ideonella sakaiensis. *ChemBioChem*, 19(14), 1471–1475. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201800097>
- Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. C. (2019). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from Ideonella sakaiensis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1),

289–294. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.11.148>

Liu, Y., Liu, Z., Guo, Z., Yan, T., Jin, C., & Wu, J. (2022). Enhancement of the degradation capacity of IsPETase for PET plastic degradation by protein engineering. *Science of The Total Environment*, 834, 154947. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.154947>

Löffler, P., Schmitz, S., Hupfeld, E., Sterner, R., & Merkl, R. (2017). Rosetta:MSF: a modular framework for multi-state computational protein design. *PLoS Computational Biology*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005600>

López-Carrasquero, F. (2014). *Fundamentos de Polímeros* [Universidad de Los Andes]. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2573.0000>

Lorsch, J. (2013). Laboratory Methods in Enzymology: DNA. In *Methods in Enzymology* (Vol. 529). Elsevier. [https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=wJ8G0c4p40wC&oi=fnd&pg=PA241&dq=site-directed+mutagenesis&ots=KXIYyEc12X&sig=8vxeMI5t-a1A2FX7O7g8ZWDtIx8&redir\\_esc=y#v=onepage&q=site-directed+mutagenesis&f=false](https://books.google.com.ec/books?hl=es&lr=&id=wJ8G0c4p40wC&oi=fnd&pg=PA241&dq=site-directed+mutagenesis&ots=KXIYyEc12X&sig=8vxeMI5t-a1A2FX7O7g8ZWDtIx8&redir_esc=y#v=onepage&q=site-directed+mutagenesis&f=false)

Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2011.10.009>

Meng, X., Yang, L., Liu, H., Li, Q., Xu, G., Zhang, Y., Guan, F., Zhang, Y., Zhang, W., Wu, N., & Tian, J. (2021). Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 667–676. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.058>

Muñoz, M., Altamiranda, C., Osorio, S., Meza, E., & Rodriguez, J. (2016, September 23). Influencia de la composición de catalizadores Ni/Zn/Al tipo hidrotalcitas en la selectividad a bis-(2-hidroxiethyl) tereftalato en la reacción de glicolisis de PET post-consumo. *XXV Congreso Iberoamericano de Catálisis*.

<https://acortar.link/rBM03t>

- Nisticò, R. (2020). Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. *Polymer Testing*, 90, 106707. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106707>
- Olatunji, O. (2015). Classification of natural polymers. In *Natural Polymers: Industry Techniques and Applications* (pp. 1–17). Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-26414-1_1)
- ONU. (2015, September 27). *Cambio climático - Desarrollo Sostenible*. Objetivos de Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/climate-change-2/>
- ONU Medio Ambiente. (2018). Plásticos De Un Solo Uso. In *Technology for Environment* (Vol. 227, Issue 5).
- Osorio, J., Pachajoa, H., & Hurtado, P. (2013). Concentración y pureza del ADN de muestras sanguíneas en papel Whatman FTA almacenadas entre 1 a 3 años\* DNA concentration and purity of blood samples stored in whatman FTA paper between 1 to 3 years. *Estomatología y Salud*, 21(1), 35–38. <https://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/01/877727/7-osorio-concentracion-pureza-adn.pdf>
- Pérez, J. (2020). *Biodegradación de tereftalato de polietileno: microorganismos, enzimas y perspectivas futuras*. Universidad de la Laguna.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605–1612. <https://doi.org/10.1002/JCC.20084>
- Primose, S., & Twyman, R. (2006). *Principles of gene manipulation and genomics* (Blackwell Publishing). <https://drive.google.com/drive/folders/1pISXgEUc74IvOI71QDiIJEi8IWYhTFoP>
- Reguero, M. (2014). La secuenciación del DNA: consideraciones históricas y técnicas.

*Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 5–8.  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-34752014000100001](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-34752014000100001)

Rennison, A., Winther, J. R., & Varrone, C. (2021). Rational Protein Engineering to Increase the Activity and Stability of IsPETase Using the PROSS Algorithm. *Polymers*, 13(22), 3884. <https://doi.org/10.3390/POLYM13223884>

Roe, S. (2001). *Protein purification techniques: a practical approach* (2nd ed.). Oxford University Press.

Sánchez, J. (2021). *Construcción de los plásmidos pIN-PETasa, pET-PETasa, pGLAam7- PETasa para la expresión de la PETasa de Ideonella sakaiensis en Escherichia coli y Aspergillus niger, para la degradación de PET (politereftalato de etileno)* [UNIDAD ZACATENCO]. <https://repositorio.cinvestav.mx/bitstream/handle/cinvestav/2564/SSIT0016357.pdf?sequence=1>

Sgariglia, A., Soberón, J., Sampietro, D., & Vattuone, M. (2010). Cromatografía: Conceptos y Aplicaciones. *Revista Arakuku*, 1(2), 1–6. [www.csnat.unt.edu.ar/academica/publicaciones/revista-arakuku](http://www.csnat.unt.edu.ar/academica/publicaciones/revista-arakuku)

Sigma-Aldrich. (2013). *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit User Manual*. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Bulletin/pln70bul.pdf>

Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.9B00568>

Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1), 207–234. <https://doi.org/10.1016/J.PEP.2005.01.016>

Suasnavas, D. (2017). *Degradación de materiales plásticos “PET” (polyethylene terephthalate), como alternativa para su gestión* [Universidad Católica del Ecuador].

[http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13224/Degradación Química del PET.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13224/Degradación%20Química%20del%20PET.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). *Ideonella sakaiensis* sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(8), 2813–2818. <https://doi.org/10.1099/IJSEM.0.001058>

Tolia, N. H., & Joshua-Tor, L. (2006). Strategies for protein coexpression in *Escherichia coli*. *Nature Methods*, 3(1), 55–64. <https://doi.org/10.1038/nmeth0106-55>

UniProt. (2022, February 23). *Poly(ethylene terephthalate) hydrolase precursor - Ideonella sakaiensis*. A0A0K8P6T7 (PETH\_IDESA). <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0K8P6T7>

Universitat de Barcelona. (2019). *Poli (tereftalato de etileno)*. CMEmaterials. <http://www.ub.edu/cmematerials/es/content/poli-tereftalato-de-etileno>

Vargas, A. (2019). *Análisis de Reciclado Químico de Plásticos (PE y PET) para la Obtención de Productos con Valor Agregado en México* [Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo]. [http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB\\_UMICH/5737/FIQ-D-2019-0214.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/bitstream/handle/DGB_UMICH/5737/FIQ-D-2019-0214.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Vásquez, A., Contreras, E., Felipe Sánchez, A., Rober Muñoz, J., Hoyos, A., & Gartner, C. (2014). Degradación Hidrolítica Del Polietilen-Tereftalato (PET). *Revista Colombiana de Materiales*, 1(5), 100–105. [https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/5752/1/VasquezAlejandro\\_2014\\_degradacionhidroliticapolietilen.pdf](https://bibliotecadigital.udea.edu.co/bitstream/10495/5752/1/VasquezAlejandro_2014_degradacionhidroliticapolietilen.pdf)

Vazquez-Lobo, A., & Morales, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 1–17). Semarnat. <https://www.researchgate.net/publication/280731680>

Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2016). *Fundamentals of biochemistry: life at the*

*molecular level*. John Wiley & Sons.

- Yamabhai, M., Buranabanyat, B., Jaruseranee, N., & Songsiriritthigul, C. (2011). Efficient *E. coli* expression systems for the production of recombinant  $\beta$ -mannanases and other bacterial extracellular enzymes. *Bioengineered Bugs*, 2(1), 45–49. <https://doi.org/10.4161/BBUG.2.1.13419>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6359>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. *Methods in Enzymology*, 648, 187–205. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2020.12.007>
- Zara, Z., Mishra, D., Pandey, S. K., Csefalvay, E., Fadaei, F., Minofar, B., & Řeha, D. (2021). Surface Interaction of Ionic Liquids: Stabilization of Polyethylene Terephthalate-Degrading Enzymes in Solution. *Molecules* 2022, 27(1), 119. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES27010119>
- Zurita, D. (2013). *Gasificación Térmica y Catalítica de Residuos Sólidos de PET*. Universidad Central Del Ecuador.

## ANEXOS

### Anexo 1. Formulación del medio de cultivo Luria Bertani (LB).

Reactivo	Cantidad por L de medio de cultivo
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Tryptona	10 g
Agar	20 g

**Fuente: (Sigma-Aldrich, 2013)**

**Nota:** Ajustar el pH a 7.0 con Hidróxido de sodio (NaOH) 1M. Para la elaboración de medios líquidos se omitirá la adición de Agar.

Name of enzyme	No. of cleavages	Positions of cleavage sites
Arg-C proteinase	15	5 8 34 53 59 90 100 123 132 153 224 260 267 280 285
Asp-N endopeptidase	9	111 117 149 185 205 219 262 264 282
Asp-N endopeptidase + N-terminal Glu	13	43 111 117 149 185 203 205 219 230 262 264 273 282
BNPS-Skatole	5	96 97 159 185 257
CNBr	10	1 10 19 128 154 157 161 222 258 262
Chymotrypsin-high specificity (C-term to [FYW], not before P)	20	32 50 55 63 69 87 96 97 106 146 159 185 191 201 219 229 261 268 271 284
Chymotrypsin-low specificity (C-term to [FYWML], not before P)	45	1 9 10 15 18 19 32 43 50 55 63 69 87 96 97 101 104 106 117 128 131 137 146 154 157 159 161 167 176 185 191 199 201 219 222 229 230 237 249 258 261 262 268 271 284
Clostripain	15	5 8 34 53 59 90 100 123 132 153 224 260 267 280 285
Formic acid	9	112 118 150 186 206 220 263 265 283
Glutamyl endopeptidase	4	44 204 231 274
Hydroxylamine	2	138 233
Iodosobenzoic acid	5	96 97 159 185 257
LysC	7	95 148 177 227 252 253 259
LysN	7	94 147 176 226 251 252 258
NTCB (2-nitro-5-thiocyanobenzoic acid)	4	202 238 272 288
Pepsin (pH1.3)	35	3 9 14 15 17 18 42 43 49 54 101 105 116 117 130 131 136 137 166 167 176 190 191 199 200 201 216 228 230 248 249 270 271 283 284
Pepsin (pH>2)	51	3 9 14 15 17 18 31 42 43 49 54 62 63 68 70 87 95 96 101 105 116 117 130 131 136 137 146 158 159 166 167 176 184 190 191 199 200 201 216 219 228 230 248 249 256 257 268 270 271 283 284
Proline-endopeptidase [1]	1	60
Proteinase K	129	3 6 9 12 13 14 15 18 20 21 23 24 25 26 27 29 32 33 39 40 41 43 44 45 47 50 51 52 55 56 57 63 65 67 68 69 70 72 74 77 78 80 81 82 83 84 87 88 89 94 96 97 101 102 106 107 108 109 110 111 113 116 117 129 130 131 134 135 137 140 145 146 149 151 152 156 159 167 168 170 171 176 178 179 180 183 185 189 191 194 195 196 198 199 200 201 202 204 208 209 211 215 216 218 219 226 229 230 231 232 240 248 249 250 255 256 257 261 266 268 270 271 272 274 279 281 284 286 287
Staphylococcal peptidase I	4	44 204 231 274
Thermolysin	90	5 8 9 11 12 13 14 17 18 19 20 22 23 24 26 32 39 40 42 46 49 51 54 56 64 67 73 77 79 80 81 82 88 93 100 101 105 106 107 108 110 116 127 128 129 130 133 134 136 144 148 151 153 155 156 160 166 167 169 170 175 177 178 190 193 198 199 200 201 207 210 214 217 221 225 228 229 239 247 248 249 254 255 257 260 261 270 271 280 286
Thrombin	1	100
Trypsin	21	5 8 34 53 90 95 100 123 132 148 153 177 224 227 252 253 259 260 267 280 285

### Anexo 2. Análisis de las posiciones de corte por proteasas en la enzima ISPETasa utilizando el software ExPASy PeptideCutter

### Compute pI/Mw

Theoretical pI/Mw (average) for the user-entered sequence:

```
      10      20      30      40      50      60
MNFPRASRLM QAAVLGGLMA VSAAATAQTN PYARGPNPTA ASLEASAGPF TVRSFTVSRP

      70      80      90      100
SGYGAGTVYY PTNAGGTVGA IAIVPGYTAR QSSIKWWGPR
```

Theoretical pI/Mw: 10.96 / 10250.62

**Anexo 3.** Cálculo del peso molecular de la sección hidrolizada por la enzima trombina utilizando el software ExPASy Compute pI/Mw