



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“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)”**

Tesis que presenta

LBT. Juan Carlos Sánchez Bermúdez.

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: Dr. Rodolfo Marsch Moreno

México, D.F.

Febrero del 2021

Agradecimientos

Agradezco a:

Al Dr. Rodolfo Marsch Moreno por permitirme trabajar en su laboratorio, por sus asesorías y su paciencia. Así como a los miembros de mi comité tutorial Dra. María Eugenia Hidalgo Lara y al Dr. Luis Bernardo Flores Cotera, por sus observaciones y apoyo durante este proyecto.

Al Dr. Achim Max Loske Mehring y Dra. Blanca Edith Millán Chiu por su asesorías y apoyo durante mi experimento en el CEFATA de la UNAM, Querétaro.

A la Dra. Yaneth Bartolo Aguilar por su asesoramiento en el manejo del software para la construcción *in silico* de los plásmidos.

A mis amigos y compañeros del departamento por toda su ayuda para poder lograr los experimentos en el laboratorio: Samuel Sotelo Gómez, Óscar Ulises García Flores, Juan Daniel Luna Ávila, Nayeli Saraib Escobar Flores, Janeth García Hernández y Azucena López López.

Y agradezco de forma especial a Yasmin Irene Rodríguez Gavaldón, por todo su apoyo, por los ánimos mutuos y porque logramos terminar los experimentos pese a la pandemia.

Finalmente, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo, con el número de registro 934231.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT.....	ix
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Politereftalato de etileno (PET)	1
1.2. Reciclaje del PET.....	2
1.3. <i>Aspergillus niger</i>	3
1.4. La glucoamilasa como proteína de fusión para expresión extracelular de proteínas en <i>A. niger</i>	4
1.5. La PETasa.....	6
1.5.1. La estructura de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	6
1.5.2. Características estructurales específicas de la PETasa.....	7
1.5.3. Mecanismo de acción de la enzima.....	9
1.5.4. Variantes generadas por mutagénesis.....	10
2. JUSTIFICACIÓN.....	12
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS.....	13
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	14
6. DIAGRAMA DE FLUJO.....	15
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
7.1. Enzimas y reguladores.....	16
7.2. Microorganismos.....	16
7.3. Etapa uno.....	16
7.3.1. Obtención de la secuencia de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	16
7.3.2. Optimización del gen que codifica para la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> para <i>Aspergillus niger</i>	17

7.3.3. Diseño <i>in sillico</i> del gen que codifica para la enzima PETasa y sitios que lo flanquean, en el software Gen Construction Kit.....	18
7.3.4. Análisis de la resistencia de <i>A. niger</i> a higromicina.....	20
7.3.5. Propagación y extracción de los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro.....	21
7.3.6. Análisis de restricción enzimática de los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro.....	21
7.3.7. Cotransformación de <i>A. niger</i> con los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro mediante choque de ondas.....	21
7.4. Etapa dos.....	23
7.4.1. Subclonación del gen que codifica para la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i> en el vector pIN-III-OmpA2.....	23
7.4.2. Transformación de <i>E.coli</i> SoluBL21 con el plásmido pIN-PETasa.....	23
7.4.3. Análisis de proteínas SDS-PAGE de <i>E.coli</i> SoluBL21 con el plásmido pIN-PETasa.....	23
7.4.4. Secuenciación del vector pIN-PETasa.....	24
7.4.5. Diseño de primers para corregir los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7 mediante Golden Gate.....	24
7.4.6. Técnica de Golden Gate para la ligación de los amplicones A1, A2 y A3.....	25
7.4.7. Estrategia para corregir el plásmido pIN-PETasa.....	25
7.4.8. Estrategia para corregir el plásmido pGLAam7-PETasa.....	28
7.4.9. Diseño de iniciadores para la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido...30	30
7.4.10. Amplificaciones para la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.....	30
7.4.11. Secuenciación de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa corregidos.....	31
7.4.12. Transformación de <i>E.coli</i> SoluBL21 y BL21 plys con el plásmido pIN-PETasa corregido.....	31
7.4.13. Inducción de la PETasa en <i>E.coli</i> SoluBL21 y BL21 plys con el plásmido pIN-PETasa corregido.....	31
7.5. Etapa tres.....	33
7.5.1. Subclonación del gen que codifica para la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> en el vector pET-38b (+).....	33
7.5.2. Inducción de la PETasa en <i>E.coli</i> BL21 plys con la construcción pET-PETasa.....	34

8. RESULTADOS.....	36
8.1. Resultados de la etapa uno.....	36
8.1.1. Optimización del gen que codifica para la PETasa de <i>I. sakaiensis</i> para <i>A. niger</i>	36
8.1.2. Análisis de la resistencia de <i>A. niger</i> a higromicina.....	37
8.1.3. El plásmido pGLAam7-PETasa.....	37
8.1.4. Análisis de restricción enzimática del plásmido pGLAam7-PETasa.....	38
8.1.5. Análisis de restricción enzimática del plásmido pHigro.....	38
8.1.6. Cotransformación de <i>A. niger</i> mediante choque de ondas.....	39
8.2. Resultados de la etapa dos.....	40
8.2.1. El plásmido pIN-PETasa.....	40
8.2.2. Análisis de restricción del vector pIN-PETasa (<i>E. coli</i> BL21).....	40
8.2.3. Análisis de proteínas SDS-PAGE de SoluBL21.....	41
8.2.4. Secuenciación del vector pIN-PETasa.....	42
8.2.5. Amplificación de A1, A2 y A3 para la corrección de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa mediante Golden Gate.....	43
8.2.6. Ligación de los amplicones A1, A2 y A3 para la corrección de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa mediante Golden Gate.....	43
8.2.7. El plásmido pIN-PETasa corregido.....	44
8.2.8. El plásmido pGLAam7-PETasa corregido.....	45
8.2.9. Corrección del sentido del fragmento de 1797 pb del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.....	49
8.2.10. Secuenciación del plásmido pIN-PETasa corregido.....	52
8.2.11. Secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.....	53
8.2.12. Inducción de la PETasa en <i>E. coli</i> SoluBL21 y BL21 plys.....	54
8.3. Resultados de la etapa tres.....	57
8.3.1. El plásmido pET-38b (+).....	57

8.3.2. Subclonación del gen que codifica para la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i> en el vector pET-38b (+).....	57
8.3.3. Inducción de la PETasa en <i>E.coli</i> BL21 plys con la construcción pET-PETasa.....	58
9. DISCUSIÓN.....	60
10. CONCLUSIONES.....	64
11. PERSPECTIVAS.....	65
12. ANEXOS.....	65
Anexo. Amplicones para la secuenciación de pIN-PETasa.....	
Anexo 12.1. Mezclas de reacción para las PCRs y programaciones del termociclador.....	65
Anexo 12.2. Algoritmo en Python para la optimización de codones para <i>Aspergillus niger</i>	66
Anexo 12.3. Protocolo de transformación química de células E. coli DH5α (Invitrogen).....	68
Anexo 12.4. Protocolo para extracción de plásmido por la técnica de Birnboim y Doly.....	68
Anexo 12.5. Producto de la optimización de condones del gen que codifica para la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> para <i>Aspergillus niger</i>	69
Anexo 12.6. Análisis de restricción enzimática del plásmido pGLAam7-PETasa.....	70
Anexo 12.7. Análisis de restricción enzimática del plásmido pHigro.....	71
Anexo 12.8. Análisis de restricción del plásmido pIN-PETasa.....	73
Anexo 12.9. Amplicones para la secuenciación de pIN-PETasa.....	74
Anexo 12.10. Análisis de la muestra que demostró la sobreexpresión de una proteína entre 25 y 35 kD.....	74
Anexo 12.11. Análisis de codones raros de la secuencia que codifica para la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	75
Anexo 12.12. Alineamiento de la secuencia de pIN-PETasa y la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	76
13. REFERENCIAS.....	79

Índice de figuras

Figura 1. Manufactura del PET.....	1
Figura 2. Representación esquemática de los casetes de expresión de anticuerpos.....	5
Figura 3. Estructura de cristalina de la PETasa.....	7
Figura 4. Modelo de superficie de potencial electrostático de la enzima PETasa.....	8
Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de degradación del PET.....	10
Figura 6. Cadena de aminoácidos de la PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	16
Figura 7. Mutaciones de la PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	17
Figura 8. Diseño del gen que codifica para la PETasa <i>in sillico</i>	19
Figura 9. Diseño de unión del plásmido pGLAam7- PETasa.....	20
Figura 10. Resumen gráfico de la estrategia para corregir el plásmido pIN-PETasa.....	27
Figura 11. Resumen gráfico de la estrategia para corregir el plásmido pGLAam7-PETasa.....	29
Figura 12. Traducción del producto del algoritmo en Python para la optimización de codones para <i>A. niger</i>	36
Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos producto de la optimización de codones y la hidrolasa nativa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	36
Figura 14. Ensayo de resistencia a higromicina de <i>A. niger</i>	37
Figura 15. Gel de agarosa con el plásmido pGLAam7-PETasa, obtenido de midiprep.....	37
Figura 16. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/KpnI.....	38
Figura 17. Análisis electroforético de plásmido pHigro cortados con PvuII.....	39
Figura 18. Cotransformación de <i>A. niger</i> pGLAam7-PETasa y pHigro.....	39
Figura 19. Escrutinio de las transformantes con el plásmido PIN-PETasa.....	40
Figura 20. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con DraI.....	41
Figura 21. Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS/poliacrilamida al 10%.....	41
Figura 22. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq1.....	42
Figura 23. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq2.....	43

Figura 24. Análisis electroforético de los amplicones A1, A2 y A3 y de la unión de los tres amplicones después de 134 ciclos.....	43
Figura 25. Análisis electroforético de la amplificación de 996pb (ligación de A1, A2 y A3) y del plásmido pIN-III-OmpA3 y amplicón A996 cortados con XbaI y HindIII.....	44
Figura 26. Búsqueda del plásmido pIN-PETasa corregido por medio del corte enzimático Scal/NcoI y amplicones Seq1 y Seq2 para la secuenciación del plásmido pIN-PETasa corregido.....	45
Figura 27. Análisis electroforético de la amplificación de 911 pb de la ligación de A1, A2 y A3 y del plásmido pGLaAm7-PETasa y el amplicón A911 cortados con EcoRI y HindIII.....	46
Figura 28. Búsqueda del plásmido pGLAam7-PETasa corregido por medio del corte enzimático EcoRI/HidIII.....	47
Figura 29. Análisis de restricción de pGLAM7-PETasa corregido, con PstI/HindIII.....	47
Figura 30. Análisis de restricción de pGLAM7-PETasa corregido, con PvuII/PstI/SmaI.....	48
Figura 31. Análisis electroforético de PCRs para secuenciar el plásmido pGIAam7-PETasa corregido.....	49
Figura 32. Búsqueda del plásmido con el fragmento de 1797 pb en dirección correcta por amplificación de pgf.....	49
Figura 33. Amplicones correspondientes al promotor del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28).....	50
Figura 34. Amplicón 3-4 correspondientes al promotor del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28).....	51
Figura 35. Amplicones correspondientes al gen que codifica para la PETasa del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28).....	51
Figura 36. Inserción de las bases CT en el plásmido pIN-PETasa corregido.....	52
Figura 37. Inserción de la base C en el plásmido pIN-PETasa corregido.....	53
Figura 38. Análisis de la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa arreglado.....	54
Figura 39. Ensamble de las secuencias del promotor del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.....	54
Figura 40. SDS-PAGE al 16% de proteína total de E. coli SolubBL21 y BL21plys con la construcción pIN-PETasa.....	55

Figura 41. SDS-PAGE al 16% de proteína total de <i>E.coli</i> BL21plys y SoluBL21 con la construcción pIN-PETasa.....	55
Figura 42. SDS-PAGE al 16% de proteína total de <i>E.coli</i> BL21plys y SoluBL21 con la construcción pIN-PETasa.....	56
Figura 43. Análisis electroforético de plásmido pET-38b+ cortado con las enzimas SmaI y NcoI.....	57
Figura 44. Análisis electroforético de plásmido pET-38b+ y el amplicón correspondiente al gen que codifica para la PETasa, cortados con EcoRI y HindIII.....	58
Figura 45. Búsqueda de la transformante positiva con las enzimas ApaI y SmaI.....	58
Figura 46. SDS-PAGE al 16% de proteína total de <i>E.coli</i> BL21plys con la construcción pET-PETasa.....	59
Figura 47. SDS-PAGE al 16% de proteína total de <i>E.coli</i> BL21plys con la construcción pET-PETasa.....	59
Figura 48. SDS-PAGE al 16% de proteína total de <i>E.coli</i> BL21plys con la construcción pET-PETasa.....	59
Figura 49. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq2 proporcionado por la empresa Synbio-Technologies.....	61
Figura 50. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/HindIII.....	70
Figura 51. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con HindIII/PstI.....	70
Figura 52. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/PvuII.....	71
Figura 53. Análisis electroforético de plásmido pHigro cortado con PstI.....	72
Figura 54. Análisis electroforético del plásmido pHigro cortado con XbaI/EcoRI.....	72
Figura 55. Análisis electroforético del plásmido pHigro cortado con XhoI/EcoRI.....	72
Figura 56. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con HindIII/EcoRI.....	73
Figura 57. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con PvuII.....	73
Figura 58. Amplicones para la secuenciación de pIN-PETasa.....	74

Figura 59. Análisis de la muestra que demostró la sobreexpresión de una proteína entre 25 y 35 kD.....	75
Figura 60. Análisis de codones raros en la secuencia (pIN-PETasa).....	75
Figura 61. Análisis de codones raros en la secuencia (pET-PETasa).....	76
Figura 62. Análisis de codones raros en la secuencia de la PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	76

Índice de tablas

Tabla 1. Variaciones de la secuencia de aminoácidos de la PETasa.....	11
Tabla 2. Uso de condones de <i>A. niger</i>	17
Tabla 3. Codones elegidos para la optimización del gen que codifica para la PETasa de <i>I. sakainensis</i> en <i>A. niger</i>	18
Tabla 4. Diseño factorial 2 ² para la inducción de <i>E.coli</i> SoluBL21.....	24
Tabla 5. Iniciadores para la secuenciación parcial del plásmido pIN-PETasa.....	24
Tabla 6. Iniciadores para corregir los plásmidos pIN-PETasa.....	25
Tabla 7. Iniciadores usados para la secuenciación del promotor del plásmido pGLAaM7-PETasa y el gen que codifica para la PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	30
Tabla 8. Iniciadores para amplificar el gen que codifica para la PETasa.....	33
Tabla 9. Programación para la polimerasa Q5.....	65
Tabla 10. Programación para la Taq polimerasa.....	65
Tabla 11. Programación para la polimerasa phusion.....	66

Resumen

El politereftalato de etileno (PET) es uno de los polímeros sintéticos más consumidos, con una producción anual de 50 millones de toneladas. Desafortunadamente, el PET se acumula como basura y es altamente resistente a la biodegradación.

En suma, el reciclaje eficientemente de PET es una necesidad global urgente, desde los aspectos ambientales y económicos, ya que se espera que la producción de plásticos crezca más que la producción de combustibles en las siguientes décadas.

Por otro lado, Yoshida *et al.*, aislaron una nueva bacteria, *Ideonella sakaiensis*, que produce una enzima capaz de hidrolizar el PET. En este trabajo se presentan los resultados de la construcción de tres plásmidos para la expresión de la enzima PETasa para su uso en *Aspergillus niger* y en *Escherichia coli*. Sin embargo, al hacer la inducción de la expresión de la enzima en *E.coli* BL21 y SoluBL21 no se observó la proteína en el análisis SDS-PAGE, por lo que se considera que los codones elegidos pudieron influir en esto.

Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most consumed synthetic polymers, with an annual production of 50 million tons. Unfortunately, PET accumulates as waste and is highly resistant to biodegradation.

In addition, the efficient recycling of PET is an urgent global need, from the environmental and economic aspects, since the production of plastics is expected to grow more than the production of fuels in the next decades.

In another hand, Yoshida *et al.*, isolated a novel bacterium, *Ideonella sakaiensis*, that produces an enzyme capable of hydrolizing PET. In this work will be presented the results of the construction of three plasmids for the expression of the PETase enzyme, in *Aspergillus niger* and *Escherichia coli*. However, when inducing the expression of the enzyme in *E. coli* BL21 and SoluBL21, the protein was not observed in the SDS-PAGE analysis, so it is considered that the chosen codons could influence this.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Politereftalato de etileno (PET)

PET es el acrónimo de tereftalato de polietileno, el cual es un polímero de cadena larga que pertenece a la familia de poliésteres, es semicristalino y tiene como características alta resistencia, transparencia y seguridad (Sinha *et al.*, 2010) (López-Fonseca *et al.*, 2011).

Para la fabricación del PET, se necesitan los intermediarios: ácido tereftálico puro (TPA) y etilenglicol (EG), que se derivan del petróleo crudo. Cuando ambos se calientan, se produce un monómero (tereftalato de bis(2-hidroxi-etilo)) mezclado con oligómeros de bajo peso molecular. La mezcla continúa reaccionando, posteriormente se destila el exceso de etilenglicol y se forma el PET (**Figura 1**). En esta etapa, el polímero es un líquido viscoso. Se extruye y se enfría con agua para formar un material amorfo similar al vidrio (Al-Sabagh, Yehia, Eshaq, Rabie, & ElMetwally, 2016)

El PET de alto peso molecular requerido se fabrica mediante una segunda etapa de polimerización llevada a cabo en estado sólido a temperaturas más bajas. Esto elimina eficazmente todas las impurezas volátiles, como acetaldehído, glicoles libres y agua. El peso molecular alto es esencial para obtener buenas propiedades mecánicas, ya que proporciona rigidez, dureza y resistencia a la fluencia, mientras ofrece suficiente flexibilidad para resistir el estallido y la ruptura por presión (Al-Sabagh *et al.*, 2016).

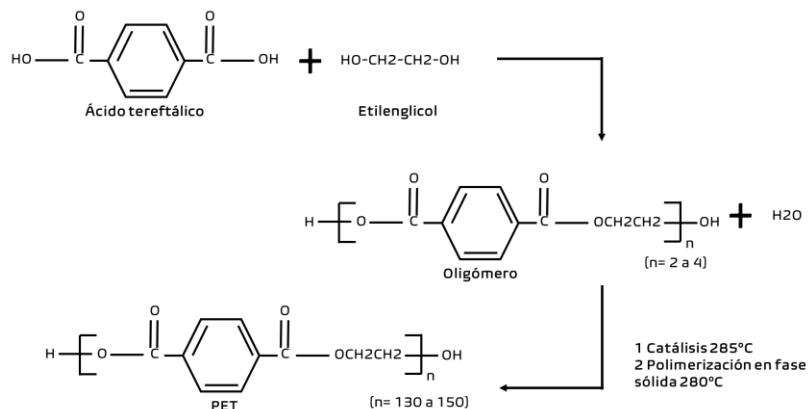


Figura 1. Manufactura del PET. Los intermediarios del tereftalato: ácido tereftálico y etilenglicol reaccionan en una primera etapa, posteriormente se lleva a cabo una polimerización en fase sólida. Figura adaptada de (Sinha *et al.*, 2010).

En suma, el PET está considerado como uno de los polímeros de ingeniería más importantes en las últimas dos décadas debido al rápido crecimiento de su uso, es el plástico más abundante, con casi 50 millones de toneladas fabricadas anualmente en todo el mundo con diferentes aplicaciones como productos textiles y envases (Awaja & Pavel, 2005) (Fecker *et al.*, 2018).

1.2. Reciclaje del PET

Debido a que este polímero es resistente a la biodegradación se espera que en el 2050, se hallan acumulado billones de toneladas como basura, por lo tanto, se han desarrollado métodos para su reciclaje (Joo *et al.*, 2018). La clasificación del reciclaje, tanto del PET como de otros polímeros, se divide en cuatro categorías: primario, secundario, terciario y cuaternario.

1.2.1. Reciclaje primario.

Es el reciclaje de polímero limpio, donde en su mayoría se encuentran residuos no contaminados de un solo tipo, que aseguran la simplicidad y el bajo costo, especialmente cuando la obtención de la basura es controlada en la planta de producción. La basura reciclada es mezclada con material virgen para asegurar la calidad del producto o usada como un material de segundo grado. El polímero no es alterado durante el proceso. La principal desventaja de este tipo de reciclaje es el deterioro de las propiedades del producto en cada ciclo (Sinha *et al.*, 2010).

1.2.2. Reciclaje secundario (reciclaje mecánico).

En este enfoque el polímero es separado de sus contaminantes y posteriormente es reprocesado en gránulos por extrusión de fusión convencional, incluye clasificación y separación de los contaminantes, reducción de tamaño, fusión y reformación del material plástico. Este proceso tiene diversos problemas: uno, es inapropiado para productos finales que tengan contacto con comida, particularmente si no se tiene control sobre la contaminación (Sinha *et al.*, 2010). Dos, en el reprocesamiento de PET por fusión se reduce la viscosidad de fusión, que es causada por la degradación hidrolítica y térmica (Al-Sabagh *et al.*, 2016). Tres, se pueden generar oligómeros lineales y cíclicos, que afectan las propiedades del producto final como imprimibilidad

o teñibilidad (Al-Sabagh *et al.*, 2016). Por último, un obstáculo mayor en el reciclaje del PET postconsumidor es la coloración amarilla del polímero. El color es debido al entrecruzamiento intramolecular y reacciones de oxidación. La coloración amarilla es un problema significativo para el PET que es reusado en la producción de botellas (Al-Sabagh *et al.*, 2016).

1.2.3. Reciclaje terciario (reciclaje químico).

Al igual que el reciclaje mecánico, el reciclaje químico conlleva la transformación de la cadena del polímero, la cual es degradada en monómeros (despolimerización) o rupturas azarosas, asociada a la formación de productos gaseosos. El reciclaje químico es llevado a cabo por solvólisis o por pirólisis; a través de la degradación con solventes. El reciclaje químico da como resultado monómeros, gases y líquidos del petróleo. Los monómeros son purificados por destilación y secados, y usados para la manufactura de polímeros (Sinha *et al.*, 2010). La desventaja de estos procesos es el uso de altas temperaturas (200-250°C) y presión (1.4 – 2 MPa), también como el tiempo necesario para completar la despolimerización (Al-Sabagh *et al.*, 2016). Por otro lado la hidrólisis de PET por ácido sulfúrico concentrado produce alta corrosividad del sistema de reacción y la generación de grandes cantidades de sales inorgánicas y desechos acuosos (Al-Sabagh *et al.*, 2016)

1.2.4. Reciclaje cuaternario.

Es la recuperación del contenido energético de los plásticos por incineración. Cuando la colección, clasificación y separación de los plásticos es difícil, no económicamente viable, o se desconoce de donde provienen, la mejor opción de manejo es recuperar la energía química guardada en forma de energía térmica (Sinha *et al.*, 2010).

1.3. *Aspergillus niger*.

Aspergillus es uno de los géneros de hongo más estudiado y más ubicuo que se encuentra en la naturaleza, se aísla comúnmente del suelo, restos de plantas y ambientes interiores (Mojsov, 2016). La morfología de los conidióforos, la estructura que soporta las esporas asexuales, es la principal característica usada en la taxonomía del género. En 1729, Micheli le asigna el nombre de *Aspergillus*, ya que al observarlos

al microscopio notó que la estructura que soporta a las esporas era parecida a la herramienta litúrgica usada por los católicos romanos, denominada *arperges* (Machida *et al.*, 2010).

Por otro lado, *Aspergillus niger* crece abundantemente en diversos sitios como vegetación en descomposición, heno mohoso, pilas de composta orgánica y hojarasca. Esta especie está adaptada para la degradación de polímeros complejos como restos de plantas, también para sustratos como el estiércol, tejidos humanos y pergaminos antiguos (Machida *et al.*, 2010). Su versatilidad ha sido aprovechada para el desarrollo de muchos procesos industriales incluyendo la producción de diversas enzimas (glucoamilasa), químicos (ácido cítrico) y productos de cocina (salsa de soya) (Machida *et al.*, 2010) (Baker, 2006).

Durante las últimas décadas *A. niger* se ha usado para la producción de enzimas comerciales como la fitasa Natuphos® (van Hartingsveldt *et al.*, 1993). Así mismo, la enzima triacilglicerol lipasa nombrada comercialmente Panamore®, por su habilidad para mejorar las propiedades de cocción, en este caso el gen incluido en *A. niger* codifica para una preprolipasa, el cual fue construido sintéticamente con base en secuencias de especies de *Fusarium*. Su expresión es controlada por el promotor de la glucoamilasa (*glaA*) y está flanqueado en el extremo 3' por la secuencia del terminador *glaA* que pertenece a *A. niger* (Trono, 2019). Otras enzimas producidas en *A. niger* son la lipasa de *R. oryzae*, de la cual el gen tuvo una optimización de codones y es controlado por el promotor de la amilasa (*amyA*) y su terminador (FDA, 2018b). La enzima comercial *beta-mananasa* por medio del gen de *T. leycettanus* (Novozymes) (FDA, 2018a) y de igual forma produce una glucoamilasa de *Penicillium* (FDA, 2016).

1.4. La glucoamilasa como proteína de fusión para expresión extracelular de proteínas en *A. niger*.

Ya que algunas cepas industriales de *A. niger* han secretado hasta 20 g/l de la enzima glucoamilasa (*GlaA*) (Finkelstein, 1987), existen numerosos ejemplos del uso de ésta como proteína de fusión para la expresión extracelular de enzimas, del mismo modo el uso de su promotor (*PglaA*), terminador (*TglaA*) y la señal de tipo KEX para su liberación.

En uno de los primeros reportes se produjo quimiosina mediante la fusión con glucoamilasa, se evidenció que la enzima era liberada después de la secreción y el rendimiento logrado fue de 140 mg/L. Sin embargo, la integración del plásmido no fue probablemente por homología con el locus nativo glaA (Ward *et al.*, 1990).

La señal de tipo KEX2 ha sido colocada entre la glucoamilasa (glaA) y la interleucina humana-6 (IL-6), esto permitió la ruptura eficiente para la liberación de la proteína de interés, teniendo un rendimiento de 5 mg/l (Proielt *et al.*, 1991).

Posteriormente, se investigó cómo variaciones en la secuencia KEX generaban diferentes rendimientos de liberación en la producción de dos anticuerpos, al utilizar la secuencia de los aminoácidos ISKRGGG se logró un 100% de separación (**Figura 2**) (Ward *et al.*, 2004).



Figura 2. Representación esquemática de los casetes de expresión de anticuerpos. La barra vertical de lado izquierdo representa el cassette que codifica para la proteína: PglA, región del promotor glaA; SS, secuencia señal de la glucoamilasa; Pro, proregión; TglA, región de terminación del gen glaA. A la derecha se mencionan varios anticuerpos, la secuencia de aminoácidos unida la parte C terminal de la glucoamilasa se denomina sitio KEXB (en negro) y se muestra el porcentaje de ruptura. Figura modificada de (Ward *et al.*, 2004).

Del mismo modo, en trabajos recientes se ha usado el sitio KEX entre la glucoamilasa y la proteína de interés (antígenos), logrando rendimientos desde 12 mg/l hasta 0.9 gramos/L (Karnaukhova *et al.*, 2007) (Azizi *et al.*, 2013) (Magaña-Ortiz *et al.*, 2018).

1.5. La PETasa

Yoshida y colaboradores, analizaron muestras de 250 sitios contaminados con PET, encontrando un consorcio de bacterias, células parecidas a levaduras y protozoarios, que tenían la capacidad de degradar la película de PET a una velocidad de 0.13 mg/cm² por día a 30°C. Posteriormente, aislaron a la bacteria *Ideonella sakaiensis*, que expresa una enzima con actividad hidrolítica del PET. Después, incubaron la película de PET con la enzima purificada a 30° C por 18 horas, obteniendo como productos de la degradación mono(2-hidroxietil)-ácido tereftálico (MHET, como el mayor producto) y menores cantidades de TPA y bis(2-hidroxietil)TPA. Al hacer la comparación con otras enzimas que de igual manera hidrolizan el PET: la hidrolasa de *Thermobifida fusca* (TfH), la cutinasa encontrada en el metagenoma de composta (LCC) y la cutinasa del hongo *F. solani* (FsC), se determinó que la enzima aislada tiene una mayor degradación: 120, 5.5 y 88 veces respectivamente, por lo que se le denominó PETasa por su afinidad por este poliéster (Yoshida *et al.*, 2016).

1.5.1. La estructura de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

La estructura ha sido resuelta desde 2.00 hasta 0.92 Å, pertenece a las α/β hidrolasas, donde el anillo central está formado por nueve hojas β ($\beta_1 - \beta_9$) y está rodeada por siete hélices α (**Figura 3A**), en que está estrictamente conservada la triada catalítica S131-H208-D177. El aminoácido S131 sirve como nucleófilo y está localizado dentro de la distancia de un enlace de hidrógeno para ser polarizado por la base H280, que a su vez es estabilizada por el ácido D177 (**Figura 3B**). De igual forma, conserva el motivo serina hidrolasa Gly – x1 – Ser – x2 – Gly (Gly129– Trp130 – Ser131 – Met132– Gly133) ubicado en el sitio activo, como se observa en las lipasas y esterases (Joo *et al.*, 2018) (Han *et al.*, 2017).

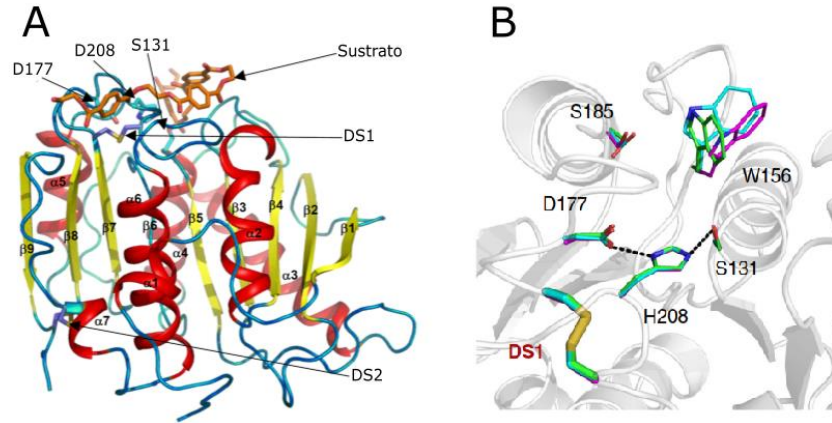


Figura 3. Estructura de cristalina de la PETasa. A. Las flechas demuestran los puentes disulfuro, así como la triada catalítica y el sustrato. **B.** Triada catalítica de la PETasa. Las líneas punteadas indican que la distancia es menor a 3.5 Å. Figuras modificadas de (Joo *et al.*, 2018) (Han *et al.*, 2017).

1.5.2. Características estructurales específicas de la PETasa.

Primera característica: la PETasa forma dos puentes disulfuro intramoleculares (DS1 y DS2) mientras que las otras enzimas homólogas tienen sólo uno. El puente DS2 está estrictamente conservado (C244-C260) y conecta la hélice C-terminal y el último bucle, mientras que el puente DS1, que es específico de la PETasa (C174-C210), une dos bucles que albergan el ácido y la base catalítica (Han *et al.*, 2017).

Segunda característica: el sitio de unión del sustrato se simula como una hendidura larga, principalmente hidrófoba y poco profunda en forma de L, con dimensiones de aproximadamente 25 y 29 Å (**Figura 4**) (Joo *et al.*, 2018).

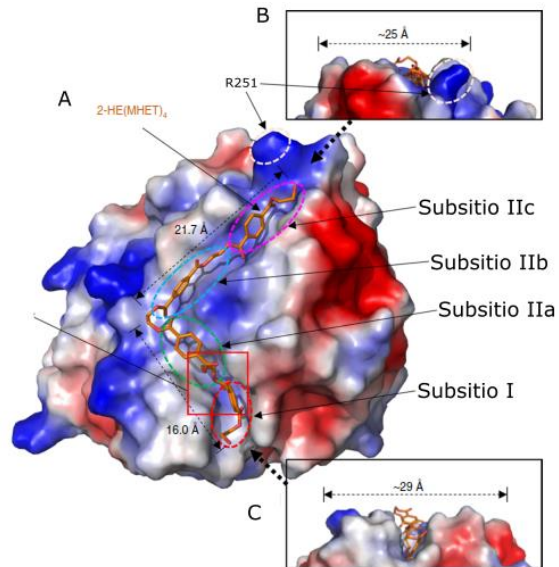


Figura 4. Modelo de superficie de potencial electrostático de la enzima PETasa. En color azul los aminoácidos positivos, mientras que en color rojo los aminoácidos negativos. Se muestra la molécula 2-HE(MHET)₄ (color naranja) acoplada al sitio de unión (A). Vistas laterales del modo de unión del sustrato con la enzima (B y C). Figura modificada de (Joo *et al.*, 2018).

Por último, el sitio catalítico se puede dividir en dos subsitios, en el subsitio I encontramos a W156 que parece ser el principal contribuyente de la estabilización del ligando, ya que tiene interacciones $\pi - \pi$ con anillo de benceno. Este aminoácido presenta bamboleo, gracias a la presencia de S185, además, se pronostica que M132 e I179 ayudarán a la unión del primer residuo al proporcionar una superficie hidrófoba (Fig. 2e) (Han *et al.*, 2017) (Joo *et al.*, 2018).

El subsitio II se puede dividir en tres partes, subsitio IIa, IIb y IIc, donde se acomodan tres restos MHET (mono(2-hidroxietil)tereftalato). Está compuesto de residuos que incluyen T59, A60, W130, I203, N204, S207, S209, N212, N215, S216, N217 y R251. Aunque la interacción entre el subsitio II y tres restos MHET parece estar mediada principalmente por interacciones hidrófobas, los átomos de oxígeno del carbonilo en el cuarto resto MHET también forman interacciones polares con una cadena principal de S207 y una cadena lateral de N217 en el subsitio IIc. De nuevo existe un apilamiento en T, de W130 sobre el anillo de benceno. T59 podría interactuar por medio de un puente de hidrógeno con el oxígeno del éster. R251 parece dificultar la extensión del

sitio de unión del sustrato debido a su carga positiva y estructura ligeramente sobresaliente (**Figura 4B**) (Joo *et al.*, 2018) (Han *et al.*, 2017).

1.5.3. Mecanismo de acción de la enzima

El proceso de degradación de PET se puede dividir en dos pasos: de generación de la muesca y de digestión terminal. En el paso uno, se unen cuatro restos MHET (uno al subsitio I y tres al subsitio II) y el enlace éster escindible parece estar colocado entre el subsitio I y II cerca del residuo catalítico Ser131. La tríada catalítica lleva a cabo un ataque nucleófilo y el agujero del oxianión polariza el enlace éster y estabiliza la reacción intermedia. La posterior formación de acilo-enzima intermedia y el segundo ataque nucleofílico por una molécula de agua siguen el mecanismo clásico de acción de las cutinasas. Después de la escisión se generan dos cadenas con diferentes extremos: con extremo TPA y con extremo HE (**Figura 5A**) (Joo *et al.*, 2018) (Han *et al.*, 2017).

Estas cadenas pueden escindirse de forma combinatoria, que depende de cómo se coloquen sobre el sitio catalítico una variedad de monómeros y dímeros de PET, como 2-HE (MHET)₂ (2-hidroxietil-(mono(2-hidroxietil) tereftalato), (MHET)₂, MHET y BHET (bis(hidroxietil)tereftalato), que finalmente se pueden digerir en MHET, TPA y EG (**Figura 5B**). Vale la pena señalar que la enzima no puede hidrolizar MHET a TPA y EG. Se puede concluir que la acumulación de TPA de la degradación de la película de PET se deriva principalmente de la etapa de digestión terminal de la cadena que tiene extremo TPA (Joo *et al.*, 2018).

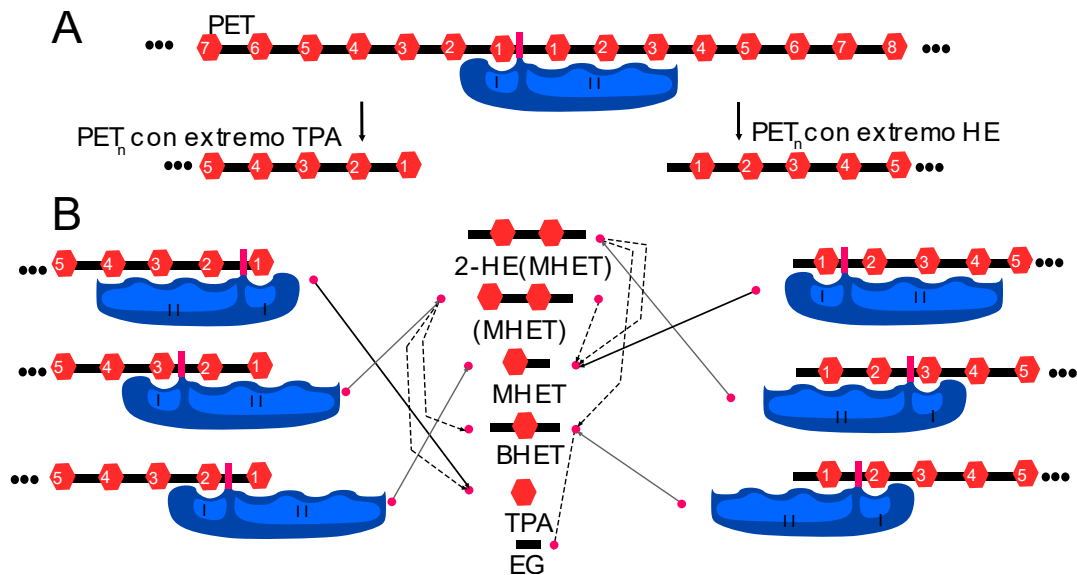


Figura 5. Diagrama esquemático del proceso de degradación del PET. **A** Paso de generación de la muestra. Los residuos de TPA y EG del polímero PET se presentan con hexágonos de color rojo y barras de color negro, respectivamente. La PETasa se muestra con un diagrama de color azul. El subsitio I y el subsitio II de la PETasa se muestran como diagramas de color azul claro, y se etiquetan como I y II, respectivamente. El residuo catalítico Ser131 se muestra como un rectángulo de color rosa. **B** Paso de digestión terminal. Cada reacción enzimática en el paso de digestión terminal se muestra como un diagrama. Los productos escindidos de las reacciones enzimáticas se indican con flechas de color negro. Las líneas punteadas indican los caminos que siguen los productos para la siguiente reacción. Se muestran seis compuestos relacionados con la degradación del PET. Figura modificada de (Joo *et al.*, 2018).

1.5.4. Variantes generadas por mutagénesis.

En la **Tabla 1** se describen las variaciones hechas en la cadena de aminoácidos hasta la fecha (UniProt, 2020). Uno de los primeros cambios generados para conocer el mecanismo de degradación fue la modificación de un aminoácido perteneciente a la triada catalítica, por lo que las mutaciones S131A, D177A, H208A bajan drásticamente la actividad (Joo *et al.*, 2018). Otra modificación importante es el cambio C174A/C210A para desaparecer el puente disulfuro característico de la enzima, lo que genera una nula actividad.

Por otro lado, es necesario destacar que usando el enfoque de ingeniería racional de proteínas se incrementó la estabilidad térmica de la proteína y se mejoró su actividad de degradación, siendo la mayor reportada hasta el momento. La variante

S92E/D157H/R251A incrementó la Tm por 8.81°C y la actividad de degradación del PET fue aumentada 14 veces a 40°C en comparación con la PETasa nativa (Son *et al.*, 2019).

Tabla 1. Variaciones de la secuencia de aminoácidos de la PETasa.

Variante por posición	Descripción de la actividad
58	Y → A: tiene mayor actividad enzimática en la botella de PET. Tiene actividad enzimática disminuida en la película de PET y en BHET (bis(2-hidroxietil)TPA).
64	S → M: aumenta la actividad hacia el butirato de 1-naftilo.
90	Q → R: disminuye la actividad enzimática en la botella de PET y en BHET.
92	S → E: tiene mayor termoestabilidad y mayor actividad de degradación del PET: 14 veces a 40°C cuando se asocia con H-186 y A-280.
130	W → A: disminuye la actividad enzimática en la película de PET y en BHET.
130	W → H: tiene mayor actividad enzimática en la botella de PET y en BHET. Mejora su capacidad de degradación de PET y PEF en relación con la PETasa de tipo silvestre cuando se asocia con F-238.
131	S → A: Pérdida de actividad enzimática en botella PET y BHET.
132	M → A: disminuye la actividad enzimática en la botella de PET y en BHET.
156	W → A: tiene capacidad de degradación de PET muy deteriorada en relación con la PETasa de tipo silvestre. También disminuye su actividad enzimática en BHET.
157	D → H: tiene mayor termoestabilidad y mayor actividad de degradación del PET: 14 veces a 40°C cuando se asocia con E-121 y A-280.
174	C → A: tiene actividad enzimática disminuida en la película de PET y en BHET cuando se asocia con A-239.
177	D → A: pérdida de actividad enzimática en botella PET y BHET.
185	S → H: tiene mayor actividad enzimática en la botella de PET.
208	H → A: pérdida de actividad enzimática en botella PET y BHET.
209	S → F: disminuye la actividad enzimática en la película de PET y en BHET. Mejora su capacidad de degradación de PET y PEF en relación con la PETasa de tipo silvestre cuando se asocia con H-159.
210	C → A: tiene actividad enzimática disminuida en la película de PET y en BHET cuando se asocia con A-203.
212	N → A: disminuye la actividad enzimática en la película de PET y en BHET.

- 212 N → F: aumenta la actividad hacia el butirato de 1-naftilo.
- 251 R → A: tiene mayor actividad enzimática en la película de PET. Tiene mayor termoestabilidad y mayor actividad de degradación del PET: 14 veces a 40°C cuando se asocia con E-121 y H-186.
-

2. JUSTIFICACIÓN

Ya que la producción de PET es creciente, y debido a su poca biodegradación, aunado al poco porcentaje de reciclado y a sus desventajas como un gran requerimiento energético para alcanzar, por ejemplo: 280°C y 2 MPas, el uso de una tecnología verde para su degradación es necesaria. La búsqueda de enzimas para biodegradar plástico ha sido incesante, entre ellas se han encontrado cutinasas y lipasas; sin embargo, han tenido limitaciones como el requerimiento de degradar a temperaturas considerablemente altas. Por lo que se propone la construcción de los plásmidos pGLAam7-PETasa y pIN-PETasa para expresar la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*, que degrada a temperatura ambiente el PET, en *Aspergillus niger* y *Escherichia coli*, para tener un sistema biológico que degrade este poliéster o que se use la enzima para su reciclaje.

3. HIPÓTESIS

Si la construcción de los plásmidos pGLAam7-PETasa, pIN-PETasa y pET-PETasa es de acuerdo con el diseño *in silico*, entonces serán funcionales para la expresión de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* en *A. niger* y *E. coli*.

4. OBJETIVOS

General:

Construir los plásmidos pGLAam7-PETasa, pIN-PETasa y pET-PETasa para la expresión de la PETasa de *I. sakaiensis* en *A. niger* y *E. coli* para la degradación de politereftalato de etileno (PET).

Específicos:

- 1.-Obtener la secuencia del gen que codifica para la PETasa de *I. sakaiensis*, diseñarla y optimizarla para su expresión en *A. niger*.
- 2.-Obtener el plásmido pGLAam7-PETasa (síntesis del gen y su inserción por la empresa Synbio-Technologies, USA).
- 3.-Obtener la cepa transformante para la expresión de la PETasa en *A. niger*.
- 4.-Construir los plásmidos pIN-PETasa y pET-PETasa.
- 5.-Expresar la enzima PETasa en *E. coli* mediante los plásmidos pIN-PETasa y pET-PETasa.

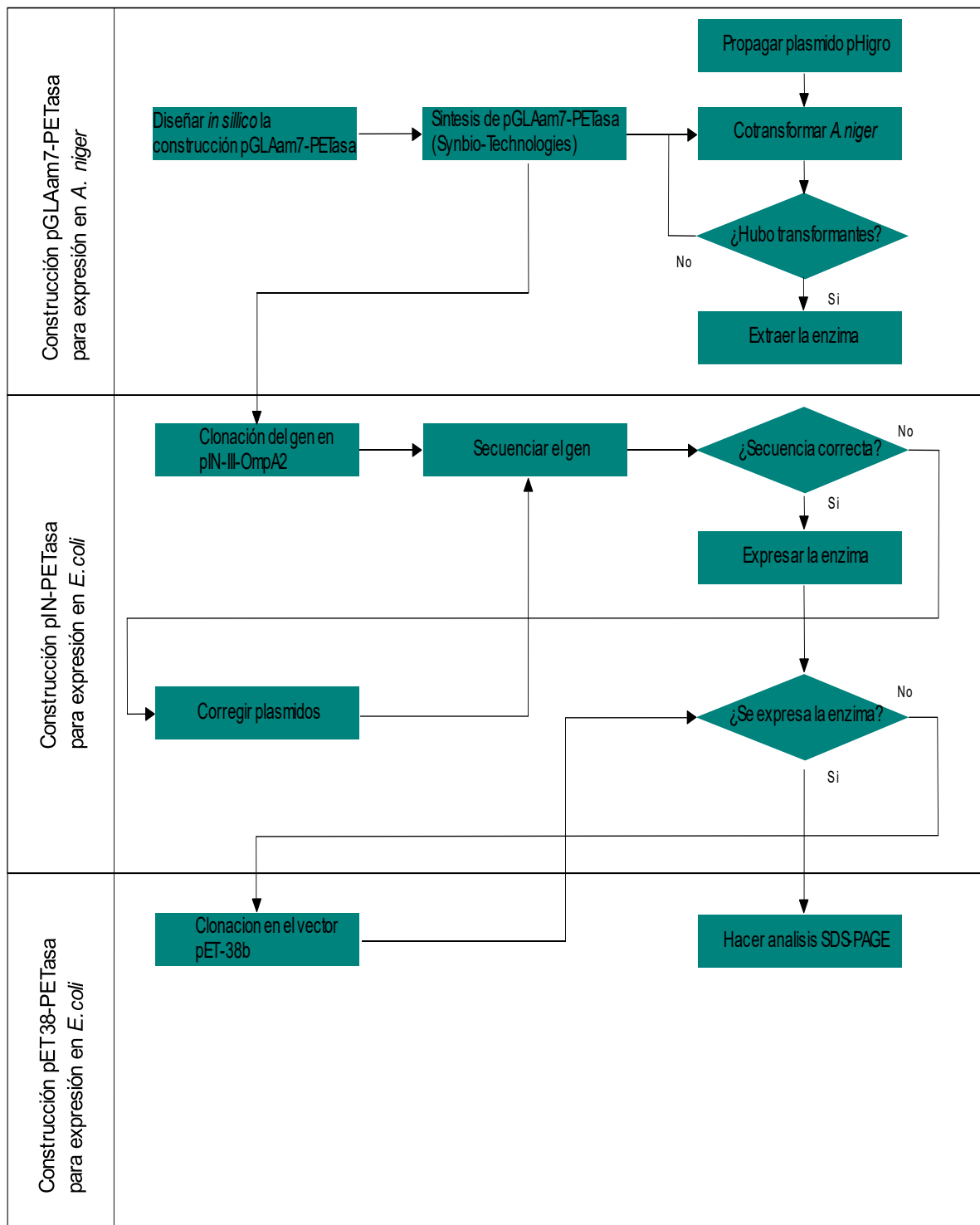
5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la primera etapa, se obtuvo el plásmido pGLAam7-PETasa por medio de la empresa Synbio-Technologies, posteriormente se usó para cotransformar *A. niger* (junto con el plásmido pHigro), sin embargo, no se obtuvieron transformantes.

En la segunda etapa, se subclonó el gen que codifica para la PETasa en el plásmido pIN-III-OmpA2, para formar el plásmido pIN-PETasa con el cual se transformó *E. coli* SoluBL21, sin embargo, no se observó expresión de la enzima, por lo que se secuenció el plásmido y se dilucidó que en realidad era pIN-III-OmpA3 y se encontró una deleción de un par de nucleótidos en el gen, por lo que sería necesario corregir los plásmidos. En consecuencia, se llevó a cabo una estrategia mediante la técnica de Golden Gate para arreglar la deleción de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa, posteriormente se corroboró por medio de secuenciación. Además, se transformaron cepas SoluBL21 y BL21 plys de *E. coli* con el plásmido pIN-PETasa corregido para inducir la expresión de la enzima, sin embargo, no se obtuvo el resultado esperado.

Por último, a partir del plásmido pGLAM7-PETasa se subclonó el gen que codifica para la PETasa en el vector pET-38b(+), para formar el plásmido pET-PETasa. En consecuencia, se transformó *E. coli* BL21 plys con la construcción y se indujo para expresar la enzima.

6. DIAGRAMA DE FLUJO.



7. MATERIALES Y MÉTODOS.

7.1. Enzimas y reguladores

Las enzimas y reguladores de la marca NEB usados para la efectuar los experimentos de la fueron: CutSmart (10x), regulador 3.1 y regulador 2.1. Por otro lado, de la marca Thermo Scientific™, las enzimas usadas fueron: SmaI, DraI, BsaI, NcoI, EcoRI, PstI, KpnI, XbaI, XhoI y T4 ligasa, los reguladores Tango 10X y de ligación.

Las reacciones de PCR se realizaron usando tres diferentes enzimas: la polimerasa de alta fidelidad Q5 (NEB), Taq (Thermo Scientific™) y phusion (Thermo Scientific™). Las mezclas de reacción y la programación del termociclador se describen en el **Anexo 12.1**.

7.2. Microorganismos

Para la propagación de los plásmidos se utilizó *E. coli* DH5α. Para las inducciones de la proteína recombinante se utilizó *E. coli* BL21 plys y SolBL21. Para el análisis de resistencia a higromicina y cotransformación se utilizó la cepa *A. niger* CBS 513.88, que fue proporcionada por el Dr. Miguel Ángel Gómez Lim del CINVESTAV-Irapuato.

7.3. Etapa uno.

7.3.1. Obtención de la secuencia de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.

Se obtuvo la secuencia de aminoácidos de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* de la base de datos NCBI Protein con número de referencia WP_054022242.1, la cual contiene 290 aminoácidos (**Figura 6**).

```
MNFPPRASRLM QAAVLGGLMA VSAAATAQTN PYARGPNPTA ASLEASAGPF TVRSFTVSRP SGYGAGTVYY
PTNAGGTVGA IAIVPGYTAR QSSIKWWGPR LASHGFVVIT IDTNSTLDQP SSRSSQQMAA LRQVASLNGT
SSSPIYGKVD TARMGVMGWS MGGGGLISA ANNPSLKAAA PQAPWDSSTN FSSVTVPTLI FACENDSIAP
VNSSALPIYD SMSRNAKQFL EINGGSHSCA NSGNSNQALI GKKGVAVMKR FMDNDTRYST FACENPNSTR
VSDFRANCS
```

Figura 6. Cadena de aminoácidos de la PETasa de *I. sakaiensis*. Se observan 290 aminoácidos en código de letra, en rojo se remarca la péptido señal de nueve aminoácidos.

Se hicieron las mutaciones S121E/D186H/R280A (**Figura 7**) para aumentar la actividad de la enzima (Son *et al.*, 2019) .

MNFPRASRLM QAAVLGGLMA VSAAATAQTN PYARGPNPTA ASLEASAGPF TVRSFTVSRP SGYGAGTVYY
 PTNAGGTVGA IAIVPGYTAR QSSIKWWGPR LASHGFVIT IDTNSTLDQP ESRSSQQMAA LRQVASLNGT
 SSSPIYGKVD TARMGVMGWS MGGGGSLISA ANNPSLKAAA PQAPWHSSTN FSSVTPTLI FACENDSIAP
 VNSSALPIYD SMSRNAKQFL EINGGSHSCA NSGNSNQALI GKKGVAVMKR FMDNDTRYST FACENPNSTA
 VSDFRTANCS

Figura 7. Mutaciones de la PETasa de *I. sakaiensis*. Se observan 290 aminoácidos en código de letra y se remarcan en rojo tres mutaciones correspondientes.

7.3.2. Optimización del gen que codifica para la PETasa de *Ideonella sakaiensis* para *Aspergillus niger*.

Se tomó el uso de codones de *A. niger*, de la base de datos KAZUZA (Japón), el cual se realizó a partir de 13905 secuencias completas de codificación de proteínas (6130423 codones), correspondientes al genoma del hongo (<https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=5061>) (Tabla 2)

Tabla 2. Uso de condones de *A. niger*.

	U			C			A			G		
U	UUU	12.8	Phe	UCU	14.0	Ser	UAU	12.3	Tyr	UGU	5.8	Cys
	UUC	23.8		UCC	19.0		UAC	17.1		UGC	8.3	
	UUA	5.1	Leu	UCA	10.6		UAA	0.6	Stop	UGA	0.9	Stop
	UUG	16.4		UCG	14.0		UAG	0.7	Stop	UGG	15.3	Trp
C	CUU	15.4	Leu	CCU	15.2	Pro	CAU	12.3	His	CGU	10.1	Arg
	CUC	22.4		CCC	17.8		CAC	12.8		CGC	15.9	
	CUA	8.9		CCA	13.1		CAA	15.8	Gln	CGA	9.3	
	CUG	23.0		CCG	14.2		CAG	24.2	CGG	11.2		
A	AUU	16.7	Ile	ACU	13.6	Thr	AAU	14.9	Asn	AGU	10.6	Ser
	AUC	26.2		ACC	21.3		AAC	21.0		AGC	15.4	
	AUA	6.9		ACA	12.4		AAA	14.1	Lys	AGA	7.9	Arg
	AUG	22.0	ACG	12.9	AAG		29.6	AGG		7.6		
G	GUU	14.7	Val	GCU	21.7	Ala	GAU	27.8	Asp	GGU	17.5	Gly
	GUC	21.8		GCC	27.2		GAC	27.2		GGC	22.5	
	GUA	6.9		GCA	17.4		GAA	24.8	Glu	GGA	16.1	
	GUG	18.6		GCG	17.2		GAG	34.7		GGG	12.6	

Con letras negras y cursiva se muestran los codones de mayor frecuencia (por cada mil).

pGLAam7). En el extremo 5' se colocó un sitio de restricción para la enzima EcoRI y en el extremo 3' se colocó la secuencia para expresar seis histidinas (TagHis), dos codones de terminación (Stop) y un sitio de corte HindIII. En el paso siguiente, se colocaron en el extremo 5' tres Glicinas y el sitio KEX, necesarios para la liberación de la enzima de la fusión con la glucoamilasa. Y finalmente, se colocaron en los extremos 5' y 3' los sitios SpeI y XbaI respectivamente (**Figura 8**).

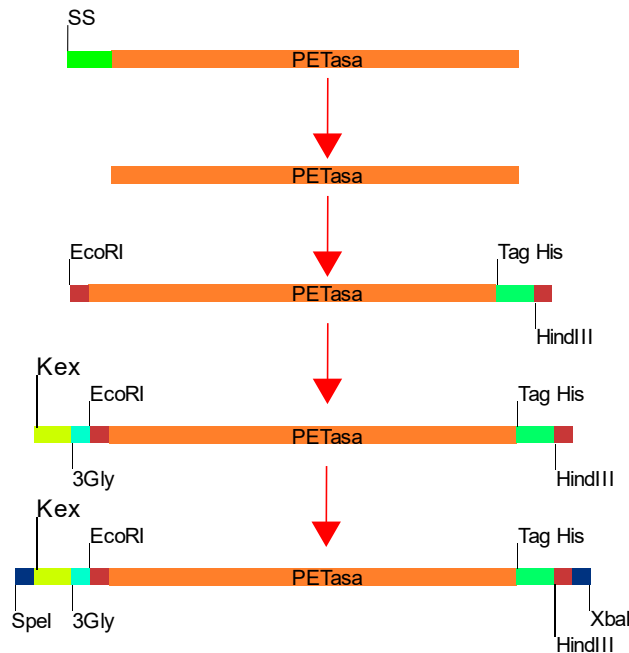


Figura 8. Diseño del gen que codifica para la PETasa *in silico*. Por medio del software GCK, se colocaron las regiones de corte enzimático (EcoRI, HindIII, Kex, XbaI, SpeI) y las histidinas necesarias, para purificar a la enzima por columna de afinidad a níquel.

De esta forma el gen que codifica para la PETasa y los sitios que la flanquean (860 pb) se mandaron a sintetizar y ligar en el plásmido pGLAam7 (amablemente donado por el Dr. Miguel ángel Gómez Lim del Cinvestav campus Irapuato) entre los sitios SpeI y XbaI, a la empresa Synbio-Technologies, para formar el plásmido pGLAam7-PETasa de 6814 pb de longitud (**Figura 9**).

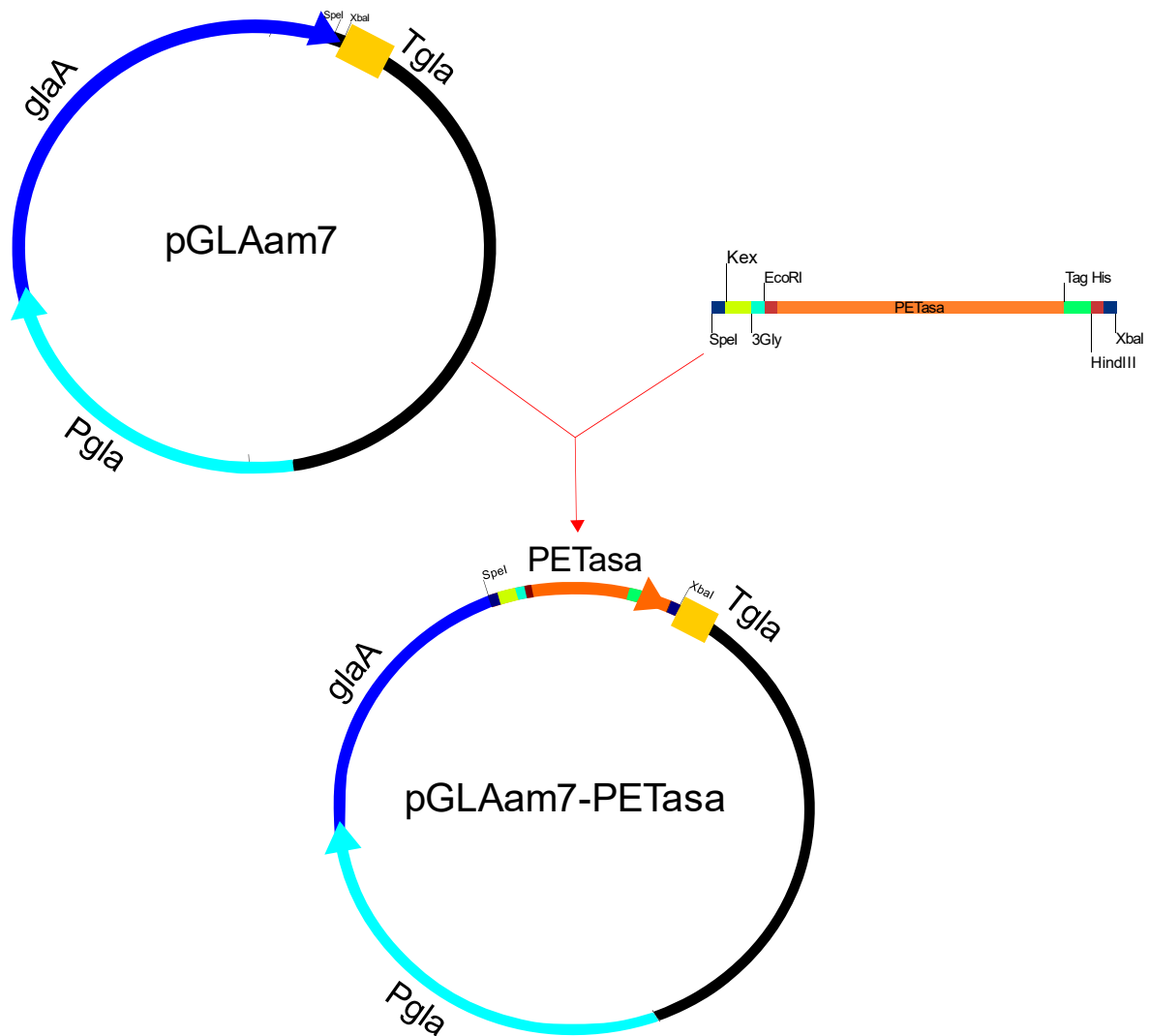


Figura 9. Diseño de unión del plásmido pGLAam7-PETasa. Por medio del software Gene Construction Kit, se hizo el diseño para la unión del gen de interés y el plásmido pGLAam7, por medio de los sitios SpeI y XbaI. El plásmido pGLAam7 contiene el promotor de la glucoamilasa (PglA) de *A. niger*, el gen de la glucoamilasa (glaA) que sirve como proteína de fusión y de igual forma el terminador de la glucoamilasa (Tgla).

7.3.4. Análisis de la resistencia de *A. niger* a higromicina.

Se sembraron ~100,000 esporas de *A. niger* (contenidas en 100 µl de agua inyectable) sobre papel filtro previamente esterilizado (diámetro de 7.5 cm), colocado sobre una placa de agar Czapeck y se incubó a 30°C por 24 h, posteriormente, el filtro se cambió a otra placa del mismo medio con higromicina y se incubó a la misma temperatura por

ocho días, para posteriormente observar su inhibición. Lo anterior se hizo por duplicado para las diferentes concentraciones 50, 100, 150 y 200 µg/ml del antibiótico, respectivamente.

7.3.5. Propagación y extracción de los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro.

La propagación de los plásmidos correspondientes se hizo por medio de la transformación de *Escherichia coli* DH5α por choque térmico, de acuerdo con el protocolo de Invitrogen (**Anexo 12.3.**). Se realizó la extracción de DNA plasmídico (a pequeña y mediana escala), por la técnica de Birnboim y Dolly modificada (**Anexo 12.4.**). Los plásmidos se visualizaron por medio de un gel de agarosa al 1% y se llevó a cabo la migración del DNA por electroforesis en gel de agarosa.

7.3.6. Análisis de restricción enzimática de los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro.

Para el análisis de restricción se siguieron dos protocolos: el primero, para el caso en que el corte de los plásmidos correspondientes con diferentes enzimas se hacía en un solo paso, ya que éstas tenían actividad en el mismo regulador y a la misma temperatura de incubación. El segundo, en el cual las enzimas no tenían actividad en el mismo regulador, por lo que la restricción fue de forma escalonada, con un paso intermedio que consistía en una purificación mediante cloroformo, isopropanol y etanol.

7.3.7. Cotransformación de *A. niger* con los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro mediante choque de ondas.

Para la transformación de *A. niger* se utilizó la metodología descrita por Magaña-Ortíz *et al.*, (2018). De manera general, se sembraron conidias en placas de medio Czapeck, se incubaron durante una semana y posteriormente se recolectaron. Se cuantificaron mediante una cámara de Neubauer (aproximadamente 900,000/ml). Se colocaron en bolsas de plástico de 1.5 X 1.5 cm (previamente esterilizadas por UV) junto con los plásmidos pGLAam7-PETasa y pHigro aproximadamente 100 µg de cada uno. Se colocaron en el generador de ondas y se dieron trenes de 150 ondas en 5 minutos a 5.75 kVolts (aproximadamente 1 onda cada 2 segundos) posteriormente se colocaron en hielo. Las esporas se recuperaron y se añadió medio Czapeck hasta alcanzar 500

microlitros totales. En el siguiente paso se sembraron sobre papel filtro previamente esterilizado (diámetro de 7.5 cm), colocado sobre una placa de agar Czapeck y se incubó a 30°C por 24 h, posteriormente, el filtro se cambió a otra placa del mismo medio con higromicina y se incubó a la misma temperatura por ocho días, para posteriormente observar si hubo transformantes positivas.

7.4. Etapa dos

7.4.1. Subclonación del gen que codifica para la enzima PETasa de *I. sakaiensis* en el vector pIN-III-OmpA2

Se hizo la extracción de los plásmidos pIN-III-OmpA2 y pGLAam7-PETasa, en seguida, ambos se cortaron con HindIII en tubos por separado (1 µl enzima, 3 µl plásmido, 4 µl agua, 1 µl regulador Tango 10X), por 2 h a 37°C y se inactivó la enzima por 20 min a 65°C. Posteriormente se mezclaron en un tubo de 1.5 ml con 1.5 µl de buffer de ligación y 1 µl de ligasa, se incubó por 4 h a 28°C y 20 minutos de inactivación a 65°C. De la mezcla resultante se tomaron 5 µl y se le colocaron 2 µl de regulador Tango 10X, 2 µl de EcoRI y 16 µl de agua, se incubó por 2 h a 37°C y se inactivó la enzima por 20 min a 65°C. Se tomaron 5 µl de la mezcla y se les añadió 2.5 µl de regulador de ligación, 1 µl de ligasa, 16.5 µl de agua, se incubó por 4 h a 28°C. Posteriormente, se transformaron células de *E.coli* DH5α quimiocompetentes con 5 µl de la mezcla resultante, por choque térmico (**Anexo 12.3.**). Se sembraron las colonias transformantes y se hizo la búsqueda del plásmido de interés por medio del corte con las enzimas EcoRI/HindIII. Al plásmido resultante se le denominó pIN-PETasa.

7.4.2. Transformación de *E.coli* SoluBL21 con el plásmido pIN-PETasa

Se transformaron células quimiocompetentes *E.coli* SoluBL21 con 5 µl del plásmido pIN-PETasa por choque térmico (**Anexo 12.3.**). Para corroborar, se hizo la extracción del plásmido y un análisis de restricción con las siguientes enzimas: PvuII, HindIII/EcoRI y DraI.

7.4.3. Análisis de proteínas SDS-PAGE de *E.coli* SoluBL21 con el plásmido pIN-PETasa.

Se cultivaron cuatro matraces de medio LB (50 ml) con *E. coli* SoluBL21 que contenían el plásmido y un control negativo (células *E. coli* SoluBL21 que no contenían el plásmido) hasta alcanzar 0.5 de OD. Se siguió un diseño factorial 2², de dos factores y dos niveles (**Tabla 4**). Se indujo con IPTG a las concentraciones de 0.1 mM (nivel

alto, +) y 0.02 mM (nivel bajo, -). Se tomó la misma cantidad de muestra a las 6 h (nivel bajo, -) y las 24 h (nivel alto, +).

Tabla 4. Diseño factorial 2² para la inducción de *E.coli* SoluBL21.

Tratamiento	[IPTG]	Tiempo
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+

Se analizó la proteína total de *E. coli* SoluBL21 mediante un análisis SDS/PAGE al 10%.

7.4.4. Secuenciación del vector pIN-PETasa

Se diseñaron los iniciadores de la **Tabla 5** para la amplificación del promotor y el gen que codifica para PETasa del plásmido pIN-PETasa, para ser secuenciados y determinar que la clonación fue correcta.

Tabla 5. Iniciadores para la secuenciación parcial del plásmido pIN-PETasa.

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)	Amplicón
PP-Fseque	gttattgtctcatgagcggat	807	Seq1
PP-Rviejo	ccaccacttgatggaggact	807	Seq1
PP-Rseque	gcacgagctgcgtcatctt	825	Seq2
PP-Fviejo	ttcaccgtgcgctcctca	825	Seq2

Se amplificaron Seq1 y Seq2 usando la mezcla de reacción para la polimerasa fusión (**Anexo 12.1**). Se secuenciaron los productos de PCR, mediante la empresa MacroGen (Corea). Posteriormente, las secuencias fueron ensambladas con el software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation) y se compararon usando como templado el plásmido pIN-PETasa generado en el software GCK.

7.4.5. Diseño de primers para corregir los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7 mediante Golden Gate.

Se diseñaron los iniciadores para corregir los plásmidos en el software GCK, para obtener tres amplificaciones, con extremos cohesivos generados por la enzima Bsal y las inserciones correspondientes (CT y C), también dos iniciadores para reamplificar el producto de la ligación de los tres (dos fragmentos de 996 y 911 pb) (**Tabla 6**).

Tabla 6. Iniciadores para corregir los plásmidos pIN-PETasa

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)	Amplicón
PP-Fseque	gttattgtctcatgagcggat	600	A1
InserCT-Reverse	gggggtctccagcggcctgcgctacgga	600	A1
InserCT-Forward	cgcggtctccgctgaattccagaccaacccta	369	A2
InserC-Reverse	gcgcggctctcagtgccgttcagggaggcca	369	A2
InserC-Forward	gcccggctctcggcacctcctcctccccatcta	560	A3
PP-Rseque	gcacgagctgcgctcatctt	560	A3
Xbal-Forward	ggattcactggaactctagat	996	A996
PP-Rseque	gcacgagctgcgctcatctt	996	A996
InserCT-Forward	cgcggtctccgctgaattccagaccaacccta	911	A911
PP-Rseque	gcacgagctgcgctcatctt	911	A911

7.4.6. Técnica de Golden Gate para la ligación de los amplicones A1, A2 y A3.

Se hicieron tres amplificaciones del plásmido pIN-PETasa (A1, A2 y A3), usando las condiciones para la polimerasa Q5 (**Anexo 12.1.**) (**Figura 10, a**). Posteriormente A1, A2 y A3 fueron purificados mediante cloroformo/isopropanol/etanol y se resuspendieron en 30 µl de agua inyectable (PISA), se adicionó lo siguiente: 3 µl de Bsal, 2.5 µl de ligasa T4, 4 µl de buffer Cutsmart, 2 µl de ATP. Se colocó la mezcla de reacción en el termociclador variando 5 min a 37°C, 5 min a 28°C por 134 ciclos (Potapov *et al.*, 2018), para su ligación (**Figura 10, b**).

7.4.7. Estrategia para corregir el plásmido pIN-PETasa.

El producto de la ligación se visualizó por medio de un gel de agarosa al 1% y se seleccionó la banda correspondiente mediante la introducción de una punta estéril de micropipeta, se diluyó en un tubo de PCR con 10 µl de agua inyectable para reamplificar con los primers Xbal-Forward y PP-Rseque, para obtener el amplicón A996 (**Figura 10, c**). Se cortó la banda obtenida de la amplificación y el plásmido pIN-

III-OmpA3 con XbaI y HindIII por 6 h a 37°C, usando: 2 µl de cada enzima y 2 µl de buffer Tango 10X (**Figura 10, d**). Ambos se purificaron por cloroformo/isopropanol/etanol, al final se obtuvieron en 30 µl de agua inyectable, se les colocó 4 µl de buffer de ligación y 4 µl de ligasa. Se incubó a 28°C por 17 h y 30 min a 65°C. Se transformaron células quimiocompetentes de *E. Coli* DH5, con 5 µl de la ligación resultante (**Figura 10, e**) por choque térmico. Las colonias transformantes se resembaron, se hizo la extracción de sus plásmidos y se cortaron mediante las enzimas NcoI y ScaI.

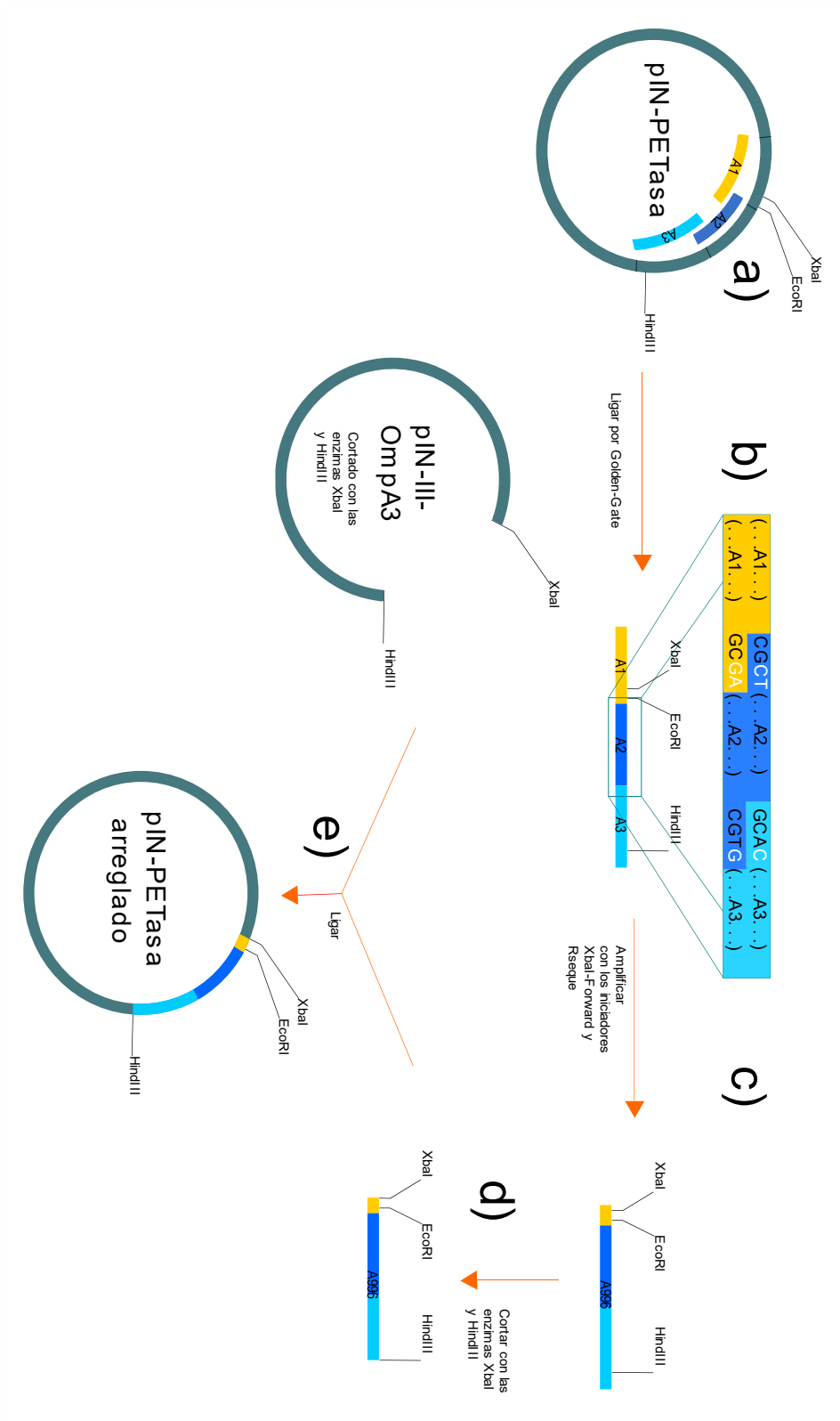


Figura 10. Resumen gráfico de la estrategia para corregir el plásmido pIN-PETasa. Se obtuvieron tres amplicones A1, A2 y A3 a partir del plásmido pIN-PETasa (a), estos se ligaron por los extremos

cohesivos que dejó la enzima BsaI en los que se insertaron la bases faltantes (en color blanco), formando un fragmento de 1539 pb (b). Se reamplificó un fragmento de 996 pb por medio de un par de primers (c). Se cortó tanto el plásmido pIN-III-OmpA3 como el fragmento de 996 pb con las enzimas XbaI/HindIII (d) y posteriormente se ligaron para formar pIN-PETasa corregido (e).

7.4.8. Estrategia para corregir el plásmido pGLAam7-PETasa.

El producto de la ligación de A1, A2 y A3 (**Figura 11, a**) se visualizó por electroforesis en gel de agarosa y se seleccionó la banda correspondiente mediante la introducción de una punta estéril de micropipeta, se diluyó en un tubo de PCR con 10 µl de agua inyectable para reamplificar con los primers InserCT-Forward y Rseque (A911) (**Figura 11, b**). Usando las condiciones para la polimerasa Q5 (**Anexo 12.1**).

El fragmento de 911 pb y el plásmido pGLAam7-PETasa fueron cortados por separado con las enzimas EcoRI y HindIII (**Figura 11, c**). Posteriormente fueron purificados por corte de gel (KIT Quiagen), en un solo tubo, en 20 µl de agua. Se adicionó 2.5 µl de ligasa y 2 µl de regulador de ligación, y se incubó a 28°C por 6 h. Se transformó *E. coli* DH5α por medio de choque térmico (**Anexo 12.3.**) con 5 µl de la mezcla de ligación. Se obtuvieron seis transformantes, los cuales se sembraron. Se hizo la extracción de plásmido por la técnica de Birnboim y Dolly modificada (**Anexo 12.4.**). A continuación, se cortaron los plásmidos con las enzimas EcoRI y HindIII, usando 10 µl del plásmido correspondiente, 1 µl de regulador Tango 10X y 2 µl de cada enzima, la mezcla se incubó a 37° C por 4 h. Se realizó la migración del plásmido cortado, en gel de agarosa al 1% y sólo una transformante tuvo las bandas correspondientes al plásmido pGLAam7-PETasa (819, 1797 y 4198 pb) (**Figura 11, d**).

Se sembró la transformante y se hizo la extracción de plásmido para hacer el análisis de restricción con PstI/HindIII. De igual forma se hizo un corte escalonado con las enzimas PvuII/PstI/SmaI.

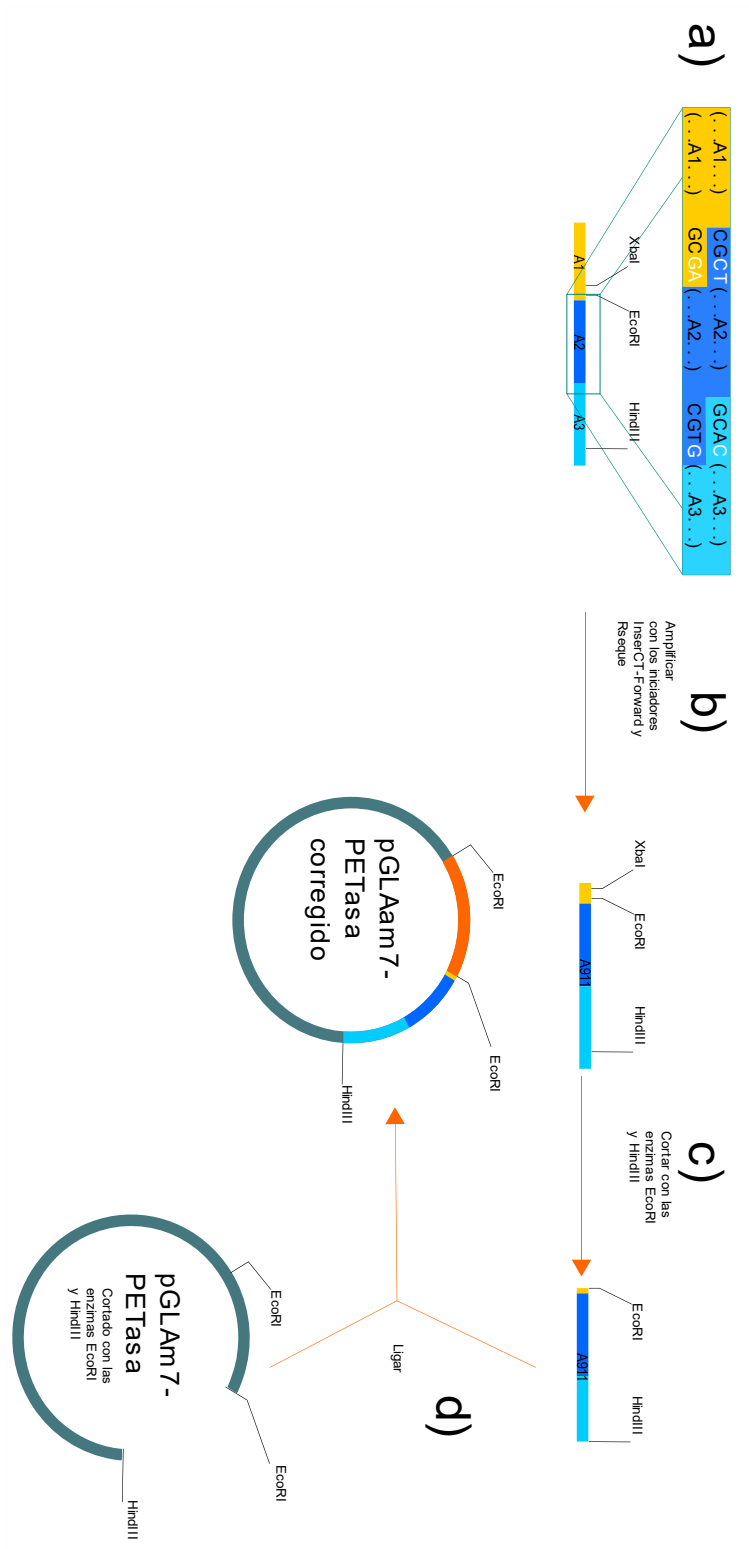


Figura 11. Resumen gráfico de la estrategia para corregir el plásmido pGLAam7-PETasa. Se obtuvieron tres amplicones A1, A2 y A3 a partir del plásmido pIN-PETasa, estos se ligaron por los extremos cohesivos que dejó la enzima BsaI, formando un fragmento de 1539 pb (a). Se reamplificó un

fragmento de 911 pb por medio de un par de primers (**b**). Se cortó tanto el plásmido pGLAam7-PETasa como el fragmento de 911 pb con las enzimas HindIII y EcoRI (**c**) y posteriormente se ligaron para formar pGLAam7-PETasa corregido (**d**).

7.4.9. Diseño de iniciadores para la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.

Los iniciadores fueron diseñados con el software SnapGene Viewer (USA), los oligos del número 1 al 6 se utilizaron para la secuenciación completa del promotor, mientras que los oligos pGLA-F y pGLA-R; PP-Fviejo y PP-Rviejo para la secuenciación del gen que codifica para la PETasa de *I. sakaiensis*.

Tabla 7. Iniciadores usados para la secuenciación del promotor del plásmido pGLAam7-PETasa y el gen que codifica para la PETasa de *I. sakaiensis*.

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Tamaño del amplicón (pb)	Amplicon
Oligo1R	tgcagacgaggccgctca	455	1-2
Oligo2F	aaattgcatcccaggccagt	455	1-2
Oligo3R	actggcctgggatgcaattt	628	3-4
Oligo4F	atataccacgcgttggaacct	628	3-4
Oligo5R	aggtccaacgcgtgtatat	380	5-6
Oligo6F	cccagtcacgacgttgtaaa	380	5-6
Pgla-F	ggcttcgtctctattgtgga	591	pgf
PP-Rviejo	ccaccacttgatggaggact	591	pgf
PP-Fviejo	ttcacggtgcgctccttca	803	pgr
Pgla-R	tgccctcatccccatcctt	803	pgr

7.4.10. Amplificaciones para la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.

Se hicieron las cinco amplificaciones de la **Tabla 7**, sin embargo, en el gel de agarosa se observó que no se obtuvieron tres. Dos amplicones (1-2 y pgf) se repitieron, pero nuevamente no se observaron las bandas en el gel. Sin embargo, cuando se hizo la PCR de pgf usando como templado el plásmido inicial (pGLAam7-PETasa enviado por la empresa Synbio Technologies), la banda sí apareció. Por lo que se cortó nuevamente el plásmido con la enzima EcoRI, se religó y se transformó *E. coli* DH5 α .

Posteriormente se hizo la resiembra de 30 transformantes. Se hizo la extracción de los plásmidos y la búsqueda del correcto: se tomó 1 µl de los primeros ocho y se hizo una PCR con los primers PP-Fviejo y PP-Rviejo, la cual dio resultado positivo, después se hizo amplificación de pgf y no se observó la banda en gel de agarosa. Del 9 al 14 se cortaron con la enzima NcoI y todos mostraron tener el gen, pero al hacer la amplificación de pgf no se observó la banda en el gel de agarosa. Del 15 al 19 se realizó la amplificación de pgf pero no se observó la banda en el gel de agarosa. Del 20 al 30 se seleccionaron sólo aquellos plásmidos que, en el gel de agarosa, mostraban tener un tamaño mayor a 5000 pb, por lo que se hizo amplificación de pgf, para el 23, 26 y 28, y se observaron resultados positivos. Después se hizo la misma PCR para cada uno de los tres plásmidos y todos mostraron la banda buscada, por lo que se volvieron a extraer y se cortaron con PstI. Se hicieron cinco reacciones de PCR del plásmido 28 para la secuenciación del promotor y el gen que codifica para la PETasa.

7.4.11. Secuenciación de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa corregidos.

Se hizo la extracción de los plásmidos pIN-PETasa corregido y pGLAam7-PETasa corregido, posteriormente se cuantificó por NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Los plásmidos se enviaron a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciación. Las secuencias fueron ensambladas con el software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation).

7.4.12. Transformación de *E.coli* SoluBL21 y BL21 plys con el plásmido pIN-PETasa corregido.

Se transformaron células quimiocompetentes de *E.coli* SoluBL21 y BL21 plys con 7 µl del plásmido pIN-PETasa mediante choque térmico. Se confirmó la transformación mediante PCR.

7.4.13. Inducción de la PETasa en *E.coli* SoluBL21 y BL21 plys con el plásmido pIN-PETasa corregido.

Se preparó un preinóculo que se incubó a 37°C y 250 rpm toda la noche, posteriormente se inoculó con 100 µl un matraz de 30 ml de medio LB, suplementado

con extracto de levadura (24 g/l), fosfato de potasio (2.16 g/l) y glicerol (4 ml/l), se incubó a 37 °C hasta alcanzar la DO de 0.6, después se indujo con una concentración final de 1 mM de IPTG a 30°C y 200 rpm por 16 horas. Se incluyó un matraz que contenía a la bacteria con el plásmido sin gen, pIN-III-OmpA3, como control negativo. Posteriormente se hizo un análisis de proteínas totales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 16%) y se cargaron 10 µl de muestra.

Se repitió la inducción usando medio 2YT, se IPTG a 0.2 y 2 mM, donde la temperatura post-inducción fue de 25°C y se obtuvo la fracción soluble e insoluble mediante el reactivo de Bugbuster (Sigma Aldrich).

Por último, se hizo otra inducción con 1 mM de IPTG a 37°C y 200 rpm y se extrajeron nuevamente las fracciones solubles e insolubles.

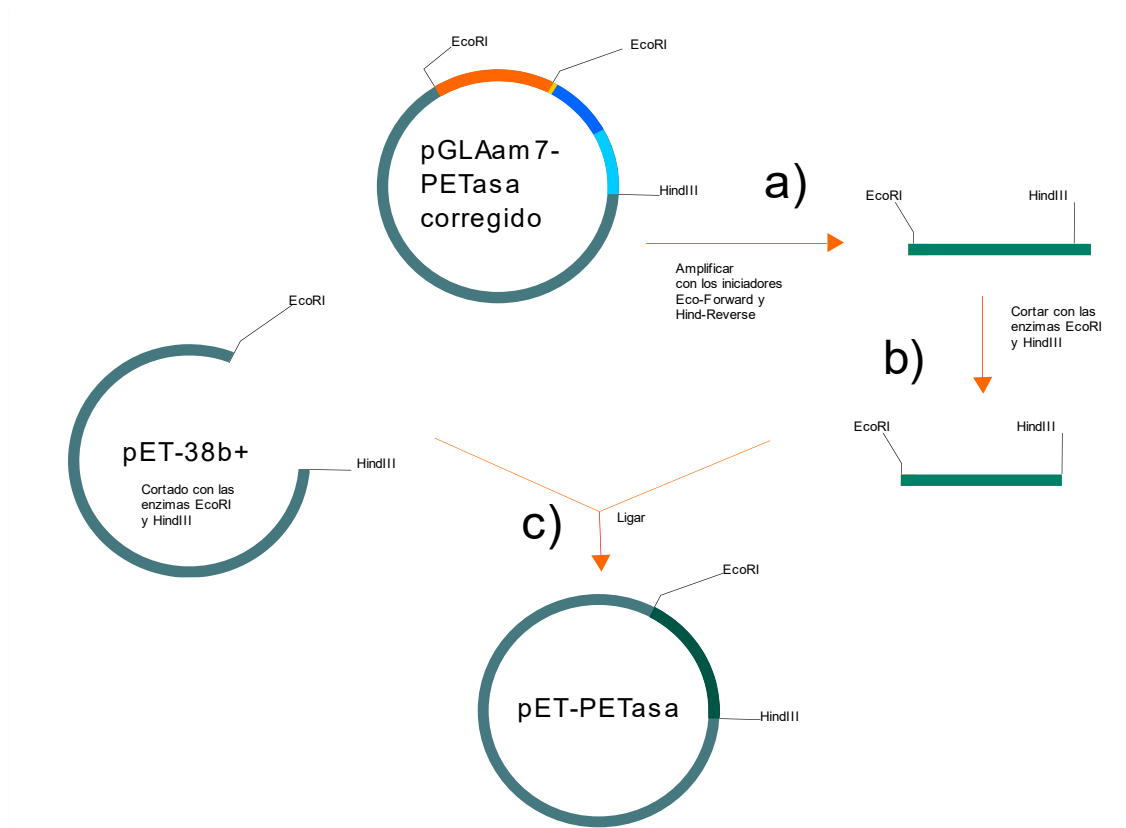
7.5. Etapa tres

7.5.1. Subclonación del gen que codifica para la PETasa de *Ideonella sakaiensis* en el vector pET-38b(+).

Se hizo la extracción del plásmido pET-38b(+) mediante la técnica Birnboim y Dolly modificada (**Anexo 12.4.**) y se corroboró mediante un análisis de digestión enzimática con SmaI y NcoI. Se hizo la amplificación del gen que codifica para la PETasa mediante los iniciadores de la **Tabla 8**, usando la enzima Q5 (**Anexo 12.1.**). Se cortaron 40 µl del vector con la mezcla de reacción: 10 µl de agua, 5 µl de buffer 2.0 (NEB), 5 µl de EcoRI y 5 µl de HindIII, de igual forma 27 µl del amplicón con la mezcla de reacción: 10 µl de agua, 4 µl de buffer 2.0 (NEB), 5 µl de EcoRI y 5 µl de HindIII, por 7 h a 37°C. Posteriormente se purificaron por gel de agarosa (QUIAGEN) y se pusieron a ligar 15 µl de amplicon purificado, 17 µl de vector, 4 buffer de ligación y 4 de ligasa por 17 h a 28°C. En el siguiente paso se transformaron células quimiocomptentes de *E.coli* BL21 plys por choque térmico y se hizo el escrutinio de las transformantes con las enzimas Apal y SmaI.

Tabla 8. Iniciadores para amplificar el gen que codifica para la PETasa.

Iniciador	Secuencia (5'--3')	Tamaño (pb)
Eco-Forward	ggccgaattccacgaccaaccctacgcc	819
Hind-Reverse	gagaaagcttgagcagttggcggcg	819



Estrategia para construir el plásmido pET-PETasa. A partir del plásmido pGLAam7-PETasa corregido, se hizo una amplificación con los iniciadores de la Tabla 8 (a), posteriormente se cortó tanto el vector pET-38b+ como el amplicón con las enzimas EcoRI y HindIII (b), para ponerlos a ligar y así formar la construcción pET-PETasa (c).

7.5.2. Inducción de la PETasa en *E.coli* BL21 plys con la construcción pET-PETasa.

Se hizo la inducción de la misma forma que se describe en el inciso 7.4.13., con las siguientes variaciones: el medio usado fue LB, después de la inducción con 1 mM de IPTG se incubó por 16 h a 25°C y 170 rpm. Se cargaron 7 µl de muestra en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 16%).

Se repitió la inducción a 37°C y se extrajo la fracción soluble e insoluble, de igual forma se hizo el análisis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 16%). Por último, se hizo un preinóculo en placa de medio 2YT, se incubó a 37°C durante 16 h. Posteriormente se tomó una asada y se inocularon matraces de 30 ml del mismo medio. Se incubaron a 37°C hasta alcanzar la DO de 0.6, se indujo con 0.5 mM de IPTG a 17°C y 70 rpm por

16 h y se extrajeron nuevamente las fracciones solubles e insolubles. Se cargó 7 μ l de muestra en el gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 16%).

8. RESULTADOS

8.1. Resultados de la etapa uno.

8.1.1. Optimización del gen que codifica para la PETasa de *I. sakaiensis* para *A. niger*.

El producto de la optimización de codones se muestra en el **Anexo 12.5.**, posteriormente se realizó su traducción y se observó la siguiente secuencia de aminoácidos en el primer ORF, correspondiente a la enzima (**Figura 12**).

```
5'3' Frame 1
MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRPSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIVPGYARQSSIKWGPRLASHGF
VVITIDTNSTLDQPESSRQQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVDTARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAAPQAPWHSSTNFSSVTPTLIFACENDSIAPVN
SSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCANSNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDRYSTRFACENPNSTAVSDFRTANCS
```

Figura 12. Traducción del producto del algoritmo en Python para la optimización de codones para *A. niger*. Se observan la cadena de aminoácidos en código de letra, lo anterior fue realizado con la herramienta de ExPASy:

Al comparar, la secuencia anterior con la base de datos Gene Bank, se observó que tiene 99% de identidad con la hidrolasa nativa de *I. sakaiensis* (**Figura 13**).

Chain A, Poly(ethylene terephthalate) hydrolase [*Ideonella sakaiensis*]
Sequence ID: [6EQD_A](#) Length: 298 Number of Matches: 1
[See 10 more title\(s\)](#) [See all Identical Proteins \(IPG\)](#)

Range 1: 1 to 290 [GenPept](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
583 bits(1502)	0.0	Compositional matrix adjust.	287/290(99%)	287/290(98%)	0/290(0%)
Query 1		MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP			60
Sbjct 1		MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRP			60
Query 61		SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIVPGYARQSSIKWGPRLASHGFVVITIDTNSTLDQ			120
Sbjct 61		SGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIVPGYARQSSIKWGPRLASHGFVVITIDTNSTLDQ			120
Query 121		ESRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVDTARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA			180
Sbjct 121		SSRSSQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVDTARMGVMGWSMGGGSLISAANNPSLKAAA			180
Query 181		PQAPWHSSTNFSSVTPTLIFACENDSIAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA			240
Sbjct 181		PQAPWDSSTNFSSVTPTLIFACENDSIAPVNSSALPIYDSMSRNAKQFLEINGGSHSCA			240
Query 241		NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDRYSTRFACENPNSTAVSDFRTANCS		290	
Sbjct 241		NSGNSNQALIGKKGVAWMKRFMDNDRYSTRFACENPNSTRVSDFRANCS		290	

Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos producto de la optimización de codones y la hidrolasa nativa de *Ideonella sakaiensis*. Se observa la cadena de la hidrolasa de *Ideonella sakaiensis* con la que se compara, etiquetado como Query y debajo la cadena a comparar. Es necesario notar que existió una identidad del 99%.

8.1.2. Análisis de la resistencia de *A. niger* a higromicina.

Después de la inoculación de esporas de *A. niger* en agar Czapeck con higromicina y su incubación por ocho días, se encontró que hubo crecimiento de 50 a 150 µg/ml del antibiótico, mientras que no hubo a la concentración de 200 µg/ml (**Figura 14, d**).

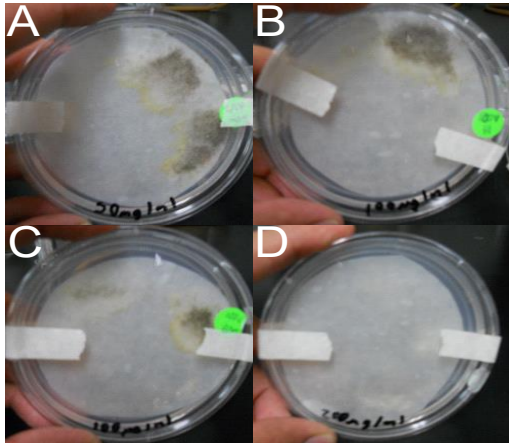


Figura 14. Ensayo de resistencia a higromicina de *A. niger*. Se observó que, en las placas de 50, 100 y 150 µg/ml de higromicina hubo crecimiento de *A. niger* (a, b y c respectivamente). Sin embargo, en la placa de 200 µg/ml no hubo crecimiento (d).

8.1.3. El plásmido pGLAam7-PETasa.

Por electroforesis en gel de agarosa al 1% se demostró la presencia del plásmido y la correcta transformación de *E. coli* DH5α (**Figura 15**).

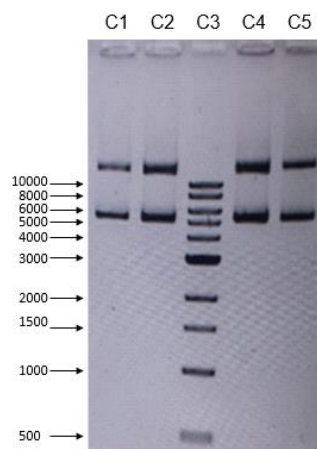


Figura 15. Gel de agarosa con el plásmido pGLAam7-PETasa obtenido de *E. coli* DH5α. Se observa el marcador de tamaño molecular (C3) y el plásmido de interés (C1, C2, C4 y C5).

8.1.4. Análisis de restricción enzimática del plásmido pGLAam7-PETasa.

El análisis de restricción enzimática del plásmido pGLAam7-PETasa se llevó a cabo usando las siguientes combinaciones de enzimas: EcoRI/KpnI (**Figura 16**), EcoRI/HindIII, HindIII/PstI y EcoRI/PvuII (**Anexo 12.6.**), cada corte se visualizó mediante un gel de agarosa al 1% (parte derecha de la figura) y se compararon los tamaños de los fragmentos con el mapa generado por el software GCK (círculo de la parte izquierda de cada figura). Se encontró que falta de fragmento de aproximadamente entre 200 y 300 pb en el promotor.

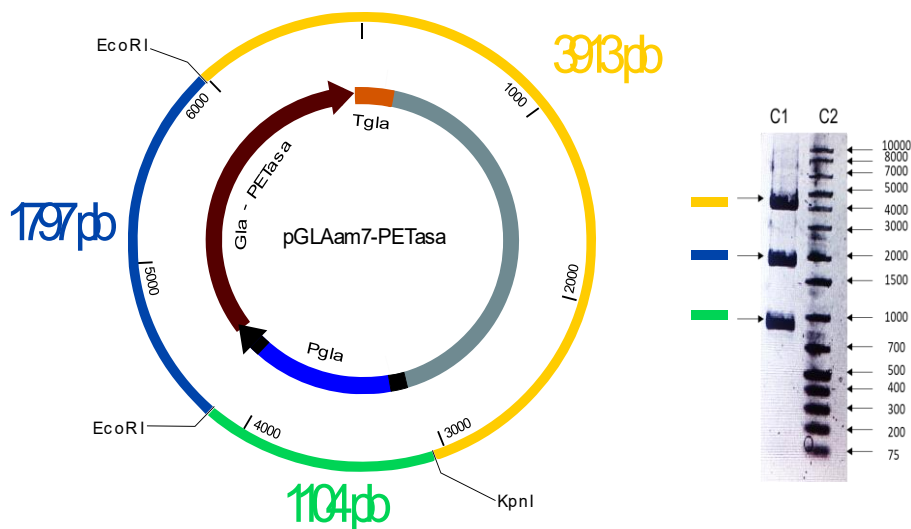


Figura 16. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/KpnI. A) De lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, que genera tres fragmentos (azul, verde, amarillo). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C2) y los fragmentos del plásmido pGLAam7-PETasa cortado (C1). Es necesario notar que el fragmento esperado de 1104 pb se encontró a una altura de aproximadamente 900 pb (color verde).

8.1.5. Análisis de restricción enzimática del plásmido pHigro.

El análisis de restricción enzimática del plásmido pHigro se hizo con las siguientes enzimas: PvuII (**Figura 17**), PstI, XbaI/EcoRI y XhoI/EcoRI (**Anexo 12.7.**) cada corte se visualizó mediante un gel de agarosa al 1% (parte derecha de la figura) y se compararon los tamaños de los fragmentos con el mapa generado por el software GCK (círculo de la parte izquierda de cada figura).

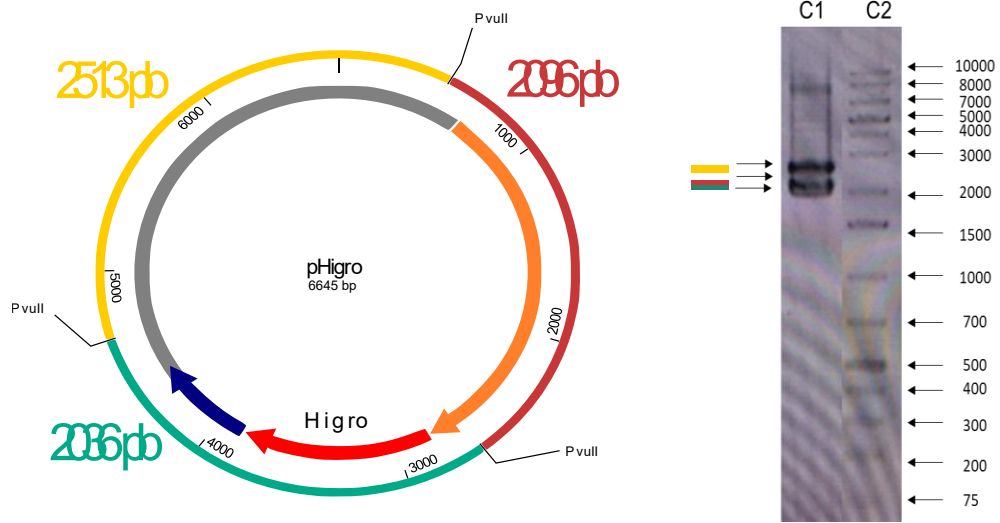


Figura 17. Análisis electroforético de plásmido pHigro cortados con PvuII. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK que genera tres fragmentos (en diferentes colores). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C2) y los fragmentos del plásmido pHigro cortado (C1). Los cortes de 2036 y 2096 pb aparecen muy cercanos en el gel de agarosa.

8.1.6. Cotransformación de *A. niger* mediante choque de ondas.

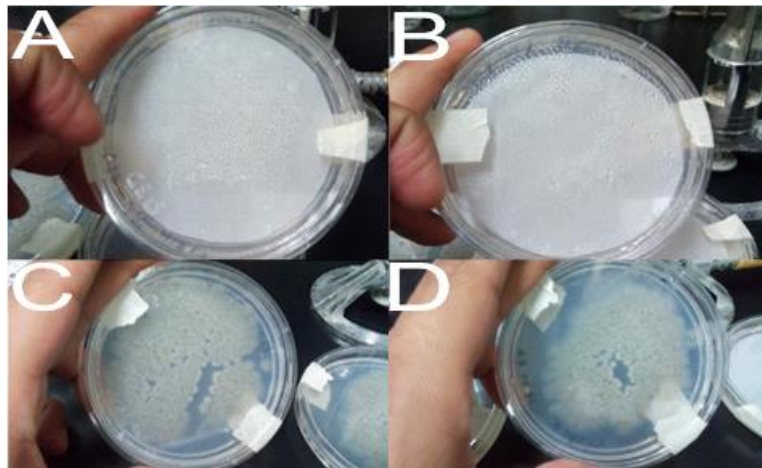


Figura 18. Cotransformación de *A. niger* pGLAam7-PETasa y pHigro. Se puede observar que ninguna conidia tuvo resistencia a higromicina (A y B), mientras que las cultivadas en agar Czapeck crecieron perfectamente, después de ocho días de incubación (C y D).

8.2. Resultados de la etapa dos.

8.2.1. El plásmido pIN-PETasa

Posteriormente a la clonación del gen que codifica para la PETasa en el plásmido pIN-III-OmpA2 se obtuvieron 40 transformantes, se sembraron 12 colonias, se les extrajo de plásmido y se analizaron por restricción enzimática con HindIII/EcoRI, obteniéndose una colonia con el patrón de bandas idéntica al plásmido generado por el software GCK (**Figura 19**).

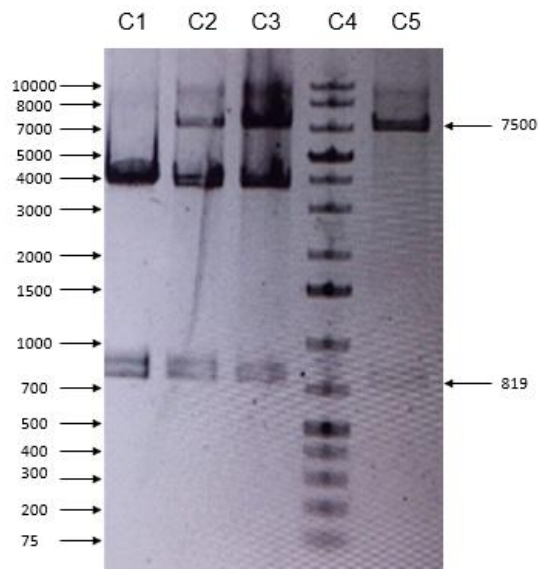


Figura 19. Escrutinio de las transformantes con el plásmido PIN-PETasa. Se observan los plásmidos cortados con las enzimas HindIII y EcoRI (C1, C2, C3 y C5), el marcado de tamaño molecular (C4) y el plásmido objetivo, con las bandas esperadas: 7500 y 819 pb (C5).

8.2.2. Análisis de restricción del vector pIN-PETasa (*E. coli* BL21).

Se corroboraron las bandas obtenidas por la digestión del plásmido con DraI (**Figura 20**), y HindIII/EcoRI y PvuII (**Anexo 12.8.**), al ser comparadas con los mapas generados por el software GCK.

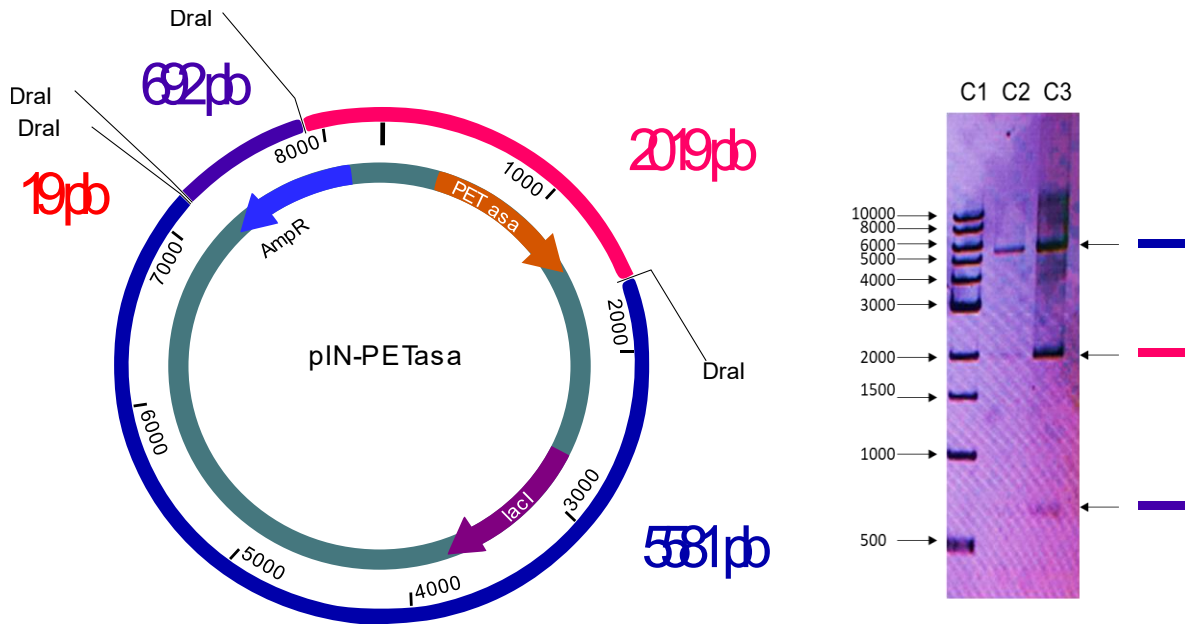


Figura 20. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con Dral. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se ven los fragmentos (azul, rosa, morado y rojo). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y plásmido pIN-PETasa cortado (C2). El fragmento de 19 pb no aparece en el gel.

8.2.3. Análisis de proteínas SDS-PAGE de SoluBL21

Se analizó el contenido de proteína total de *E. coli* SoluBL21, que contenía el plásmido pIN-PETasa, mediante un gel de SDS/poliacrilamida al 10% (**Figura 21**). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los tratamientos y el control negativo.

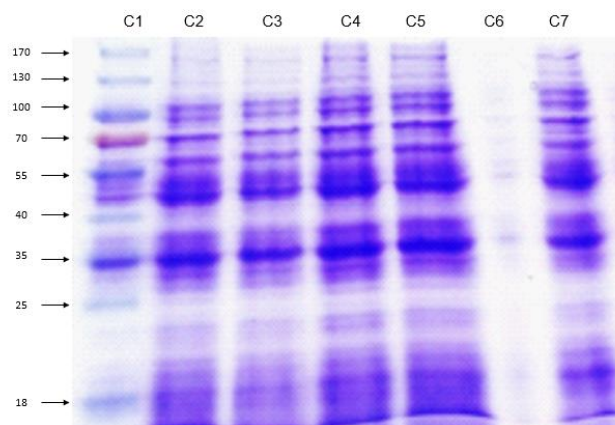


Figura 21. Análisis de proteínas mediante electroforesis SDS/poliacrilamida al 10%. A) *E. coli* BL21 sin plásmido como control negativo (C7). B) *E. coli* BL21 con plásmido pIN-PETasa con los siguientes tratamientos 0.1 mM de IPTG a las 24 h (++; C2), 0.02mM de IPTG

a las 24 h (-+; C3), 0.1 mM de IPTG a las 6 h (+; C4), 0.02mM de IPTG a las 6 h (--; C5), de acuerdo con la Tabla 4. C) Marcador de peso molecular en kDa (C1).

8.2.4. Secuenciación del vector pIN-PETasa

En el Anexo 12.9 se muestra la figura del vector pIN-PETasa con los amplicones para su secuenciación. Se hicieron las comparaciones de las secuencias de los productos de PCR: Seq1 y Seq2 con la secuencia esperada del plásmido pIN-PETasa. Se mostró que la secuenciación, en sentido forward y reverse, del amplicón Seq1 tuvo deleciones de las bases CT (**Figura 22**). De igual forma la secuenciación, en sentido forward y reverse, de Seq2 mostro la falta de la base C (**Figura 23**).



Figura 22. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq1. A) Se observa la comparación de las secuencias del amplicón Seq1 y el plásmido pIN-PETasa, la línea en color azul muestra las deleciones de las bases CT marcadas en color rojo. B) Se observan los cromatogramas alrededor de las deleciones CT.



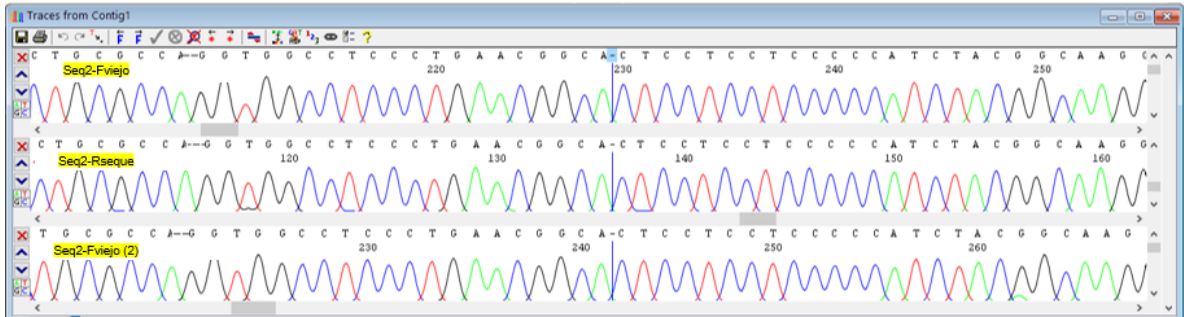


Figura 23. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq2. A) Se observa la comparación de las secuencias del amplicón Seq2 y el plásmido pIN-PETasa, la línea en color azul muestra la delección de la base C marcada en color rojo. B) Se observan los cromatogramas alrededor de la delección C. Nota: Seq2-Reverse (2), fue una repetición de la secuenciación en sentido reverse.

8.2.5. Amplificación de A1, A2 y A3 para la corrección de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa mediante Golden Gate.

Se obtuvieron los amplicones A1, A2 y A3 (Tabla 6) a partir del plásmido pIN-PETasa (que mostró delecciones) y se observaron las bandas por medio de un gel de agarosa al 1% (Figura 24, gel de la izquierda).

8.2.6. Ligación de los amplicones A1, A2 y A3 para la corrección de los plásmidos pIN-PETasa y pGLAam7-PETasa mediante Golden Gate.

Después del corte enzimático de A1, A2 y A3, se corroboró la ligación, por medio de un gel de agarosa al 1%, después de 134 ciclos (Figura 24, gel de la derecha).

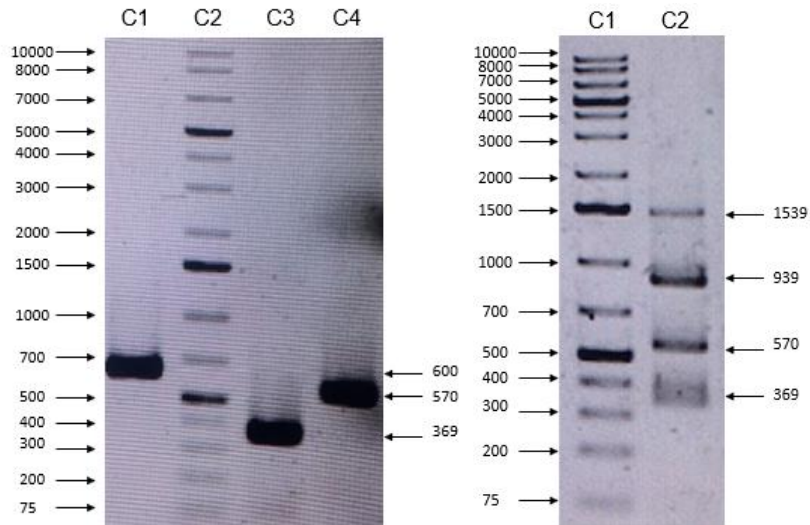


Figura 24. Análisis electroforético de los amplicones A1, A2 y A3 y de la unión de los tres amplicones después de 134 ciclos. En el gel a la izquierda: A) Se observa el marcador de tamaño molecular (C2) y los productos de PCR: A1 de 600pb (C1), A2 de 369pb (C3) y A3 de 570pb (C4). En el gel de la derecha: se observan diferentes bandas, que son las uniones de los amplicones, y la banda objetivo de 1539 pb.

8.2.7. El plásmido pIN-PETasa corregido.

Se reamplificó la banda de 1539 pb por medio de los primers XbaI-Forward y PP-Rseque (amplicón A996), se observó en un gel de agarosa al 1% (**Figura 25**, gel de la izquierda). Después, se cortó enzimáticamente con XbaI y HindIII, el amplicón A996 y el plásmido pIN-III-OmpA3 y se comprobó por medio de un gel de agarosa al 1%. Generando una banda de 906 pb y el vector linearizado de aproximadamente 7500 pb (**Figura 25**, gel de la derecha).

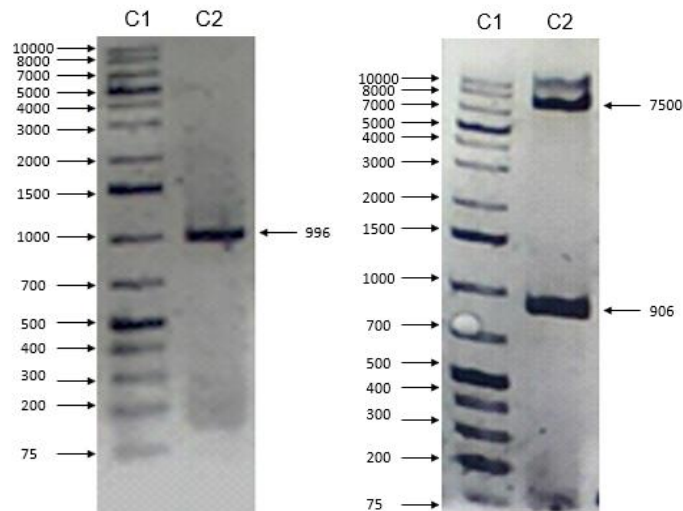


Figura 25. Análisis electroforético de la amplificación de 996 pb (ligación de A1, A2 y A3) y del plásmido pIN-III-OmpA3 y amplicón A996 cortados con XbaI y HindIII. En el gel de la izquierda: Se observa el marcado de tamaño (C1) y el amplicón A996 (C2). En el gel de la derecha: Se muestra el marcador de tamaño (C1), el plásmido pGLAam7-PETasa y el amplicón A996 cortados con XbaI y HindIII (C2).

Posteriormente a la ligación, se transformó a *E. coli* DH5 α , se obtuvieron nueve transformantes de las cuales se sembraron seis y se hizo extracción de plásmido. Los plásmidos fueron cortados con las enzimas NcoI y Scal, sólo un plásmido tuvo la banda correspondiente de 1342 pb. La colonia de *E. coli* DH5 α del carril C2 (**Figura**

26, gel de la izquierda), se resembró y se hizo nuevamente extracción del plásmido y se hicieron las amplificaciones Seq1 y Seq2 necesarias para la secuenciación parcial del plásmido pIN-PETasa (**Figura 26**, de la derecha).

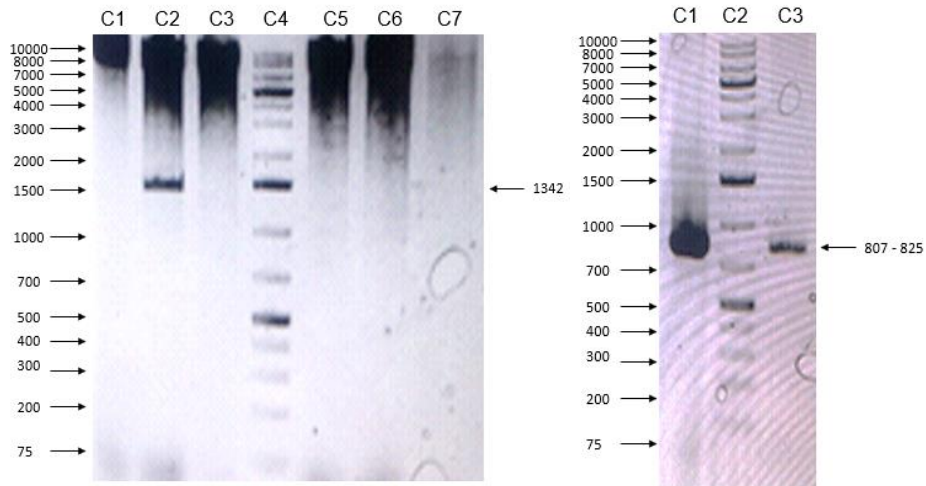


Figura 26. Búsqueda del plásmido pIN-PETasa corregido por medio del corte enzimático *ScaI/NcoI* y amplicones Seq1 y Seq2 para la secuenciación del plásmido pIN-PETasa corregido.

En el gel de la izquierda: Se muestra el marcador de tamaño (C4). Se muestra el plásmido que liberó la banda de 1342 pb (C2). Se muestran los plásmidos que no liberaron el fragmento (C1, C3, C5, C6 y C7). En el gel de la derecha: Se observan los amplicones Seq1 (C1) y Seq2 (C3), con sus bandas de 807 y 825 pb, respectivamente. El marcador molecular (C2).

8.2.8. El plásmido pGLAam7-PETasa corregido.

Se reamplificó la banda de 1539 pb, producto de la ligación de A1, A2 y A3, por medio de los primers InseCT-Forward y PP-Rseque (amplicón A911), se observó en un gel de agarosa al 1% (**Figura 27**, gel de la izquierda). Después, se cortó enzimáticamente con *EcoRI* y *HindIII*, la amplificación de A911 y el plásmido pGLAam7-PETasa y se comprobó por medio de un gel de agarosa al 1% (**Figura 27**, gel de la derecha).

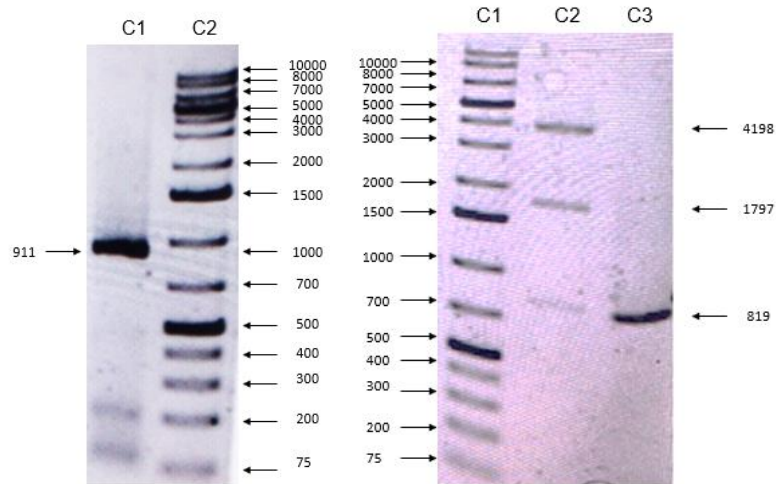


Figura 27. Análisis electroforético de la amplificación de 911 pb de la ligación de A1, A2 y A3 y del plásmido pGLaAm7-PETasa y el amplicón, cortados con EcoRI y HindIII. En el gel de la izquierda: Se observa la banda correspondiente a la amplificación de 911 pb (C1) y el marcador de tamaño (C2). Es necesario notar que también se visualizaron dos bandas tenues entre 200 y 75 pb. En el gel de la derecha: Se muestra el marcador de tamaño (C1), las tres bandas correspondientes a la digestión del plásmido pGLaAm7-PETasa (C2) y el producto de la digestión de A911 de 819 pb (C3).

Se seleccionaron los fragmentos de 4198 y 1797 pb del plásmido pGLaAm7-PETasa (C2) y la banda de 819 pb (C3), mediante purificación de corte de gel y posteriormente se ligaron y se transformó *E. coli* DH5 α .

Se hizo la extracción de plásmido de seis transformantes que fueron cortados con las enzimas EcoRI/HindIII, sólo un plásmido mostró el patrón de bandas correspondiente (4198, 1797 y 819 pb) (**Figura 28**).

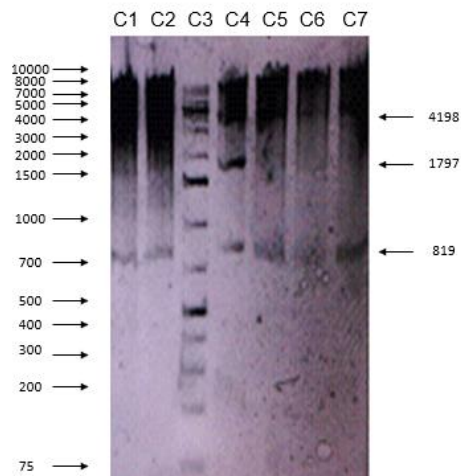


Figura 28. Búsqueda del plásmido pGLAam7-PETasa corregido por medio del corte enzimático EcoRI/HidIII. Se muestra el marcador de tamaño (C3). Se muestra el plásmido que liberó las bandas de 819,1797 y 4198 pb (C4). Se muestran los plásmidos que no liberaron el fragmento (C1, C2, C5, C6 y C7).

Se resembró la colonia transformante (**Figura 28, C4**) que contenía el plásmido pGLAam7-PETasa corregido, se extrajo el plásmido y se cortó con PstI/HindIII (3233, 1667, 951, 822 y 141 pb, de acuerdo con el software GCK), sin embargo, la banda esperada de 822 pb, se encontró a la altura de 400 pb (**Figura 29, ?**), aunque anteriormente se observó de 600 pb en el plásmido inicial (**Figura 51**, pGLAam7-PETasa enviado por la empresa Synbio-technologies). También se realizó un corte escalonado PvuII/PstI/SmaI (2513, 2120, 951, 267, 252, 78 y seis fragmentos de 82 pb), (**Figura 30**).

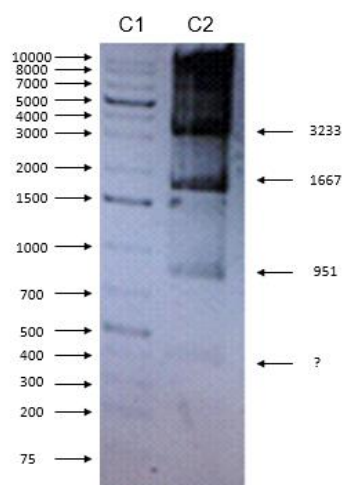


Figura 29. Análisis de restricción de pGLAM7-PETAsa corregido, con PstI/HindIII. Se muestra el marcado de tamaño (C1) y el corte del plásmido PstI/HindIII. Es necesario notar que la banda esperada de 822 pb fue de aproximadamente 400 pb (marcada con el signo: ?).

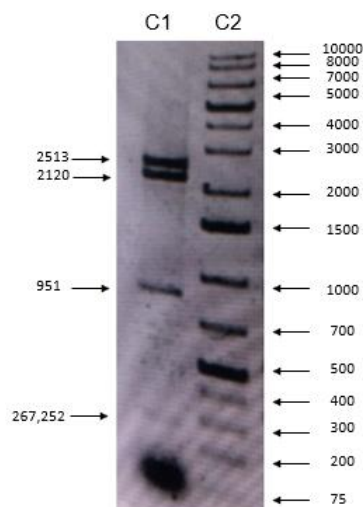


Figura 30. Análisis de restricción de pGLAM7-PETasa corregido, con PvuII/PstI/SmaI. Se muestra el marcado de tamaño (C2) y el corte del plásmido PvuII/PstI/SmaI (C1), los fragmentos de 82 pb quedaron junto con restos de RNA (mancha en la esquina inferior derecha).

Amplificaciones para la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa arreglado.

Se corrieron en gel de agarosa las amplificaciones correspondientes a la **Tabla 7**. (**Figura 31**, gel de la izquierda). Se observó que 1-2 no tuvieron la banda correcta (C1) y en el carril de pgf no se observó banda (C7), esas mismas PCRs se repitieron y no se obtuvo ninguna banda. Se realizó la amplificación de pgf del plásmido inicial (pGLAam7-PETasa enviado por la empresa Synbiotechnologies), como control positivo y se obtuvo la banda correcta (**Figura 31**, gel de la derecha). Por lo que se determinó que el plásmido tenía el fragmento de 1797 pb en sentido inverso (**Figura 50**).

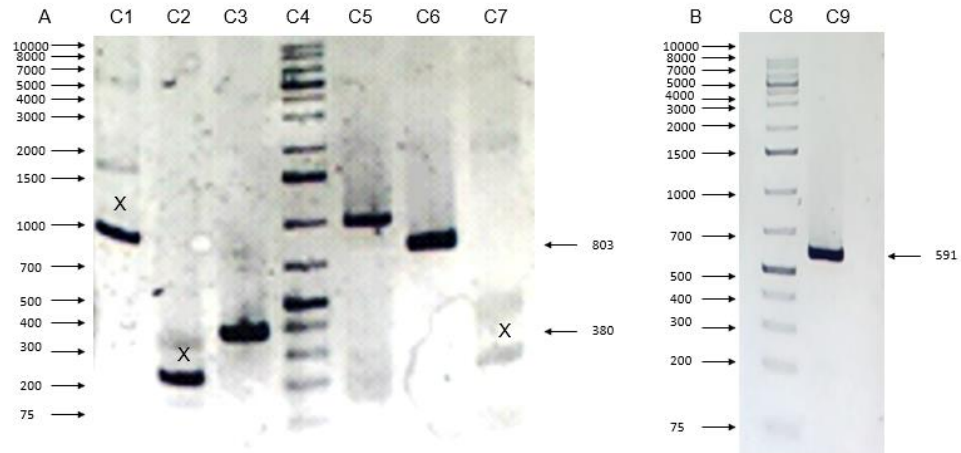


Figura 31. Análisis electroforético de PCRs para secuenciar el plásmido pGIAam7-PETasa corregido. Se muestra con una X las amplificaciones incorrectas: 1-2(C1), 3-4 (C2) y pgf (C7). Los productos de PCR correctos: 5-6 (C3) y pgr (C6). El marcador de tamaño molecular (C4 y C8) y el control positivo de pgf (C9). *Nota: el amplicón del carril C5 corresponde a otro análisis.*

8.2.9. Corrección del sentido del fragmento de 1797 pb del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.

Para corregir la dirección del fragmento de 1797 pb, se cortó el plásmido con EcoRI y se ligó. Se obtuvieron aproximadamente 100 transformantes de las cuales se hizo extracción de plásmido de 30. Sólo tres mostraron la amplificación de pgf, el 23, 26 y 28, en un solo tubo y posteriormente se les hizo PCR a cada uno, los cuales mostraron tener la banda esperada de 591 pb (**Figura 32**).

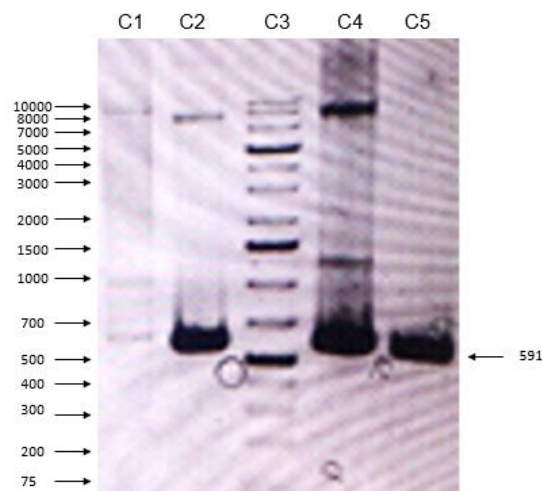


Figura 32. Búsqueda del plásmido con el fragmento de 1797 pb en dirección correcta por amplificación de pgf. Se muestra la amplificación: del plásmido 23 (C1), del plásmido 26 (C2), del plásmido 28 (C4), del control positivo (C5) y el marcador de tamaño (C3).

Se purificó el plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28), posteriormente se hicieron las PCRs correspondientes al promotor y del control positivo (pGIAam7-PETasa enviado por la empresa Synbio-technologies). Se observó que la amplificación 3-4 del control positivo fue de aproximadamente de 400 pb (C6) y no de 628 pb como lo indicaba el software, sin embargo, en el plásmido corregido fue de aproximadamente 200 pb (C2). Las otras amplificaciones fueron idénticas entre los dos plásmidos (**Figura 33**).

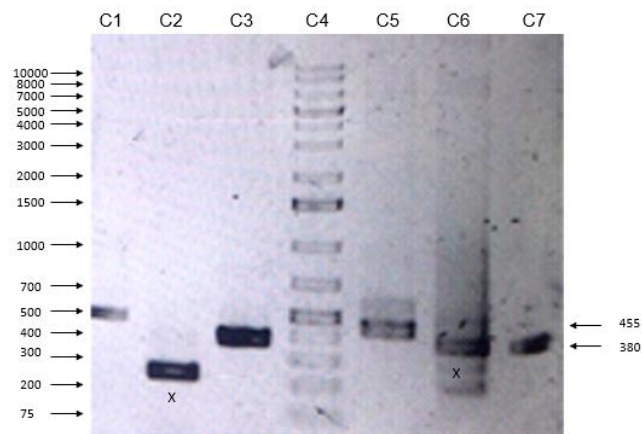


Figura 33. Amplicones correspondientes al promotor del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28). Las primeras tres bandas son correspondientes al plásmido corregido: 1-2, 3-4 y 5-6 (C1, C2 y C3). Los últimos tres carriles son correspondientes al control positivo: 1-2, 3-4 y 5-6 (C5, C6 y C7). El marcador de tamaño (C4).

Se repitió la amplificación 3-4 y se observó que nuevamente fue de 400 pb en el control positivo y que en el plásmido corregido se observa la misma banda, pero de menor intensidad (**Figura 34**).

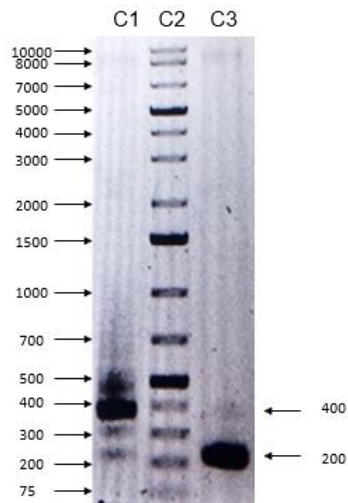


Figura 34. Amplicón 3-4 correspondientes al promotor del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28). Se observa la amplificación 3-4: del control positivo (C1) y del plásmido arreglado (C3). El marcador de tamaño (C2). Aunque en C3 se observa una banda intensa de 200 pb, también se nota una banda tenue de 400 pb.

De igual forma se hicieron las PCRs del plásmido de la zona correspondiente al gen que codifica para la PETasa: pgf y pgr (**Figura 35**).

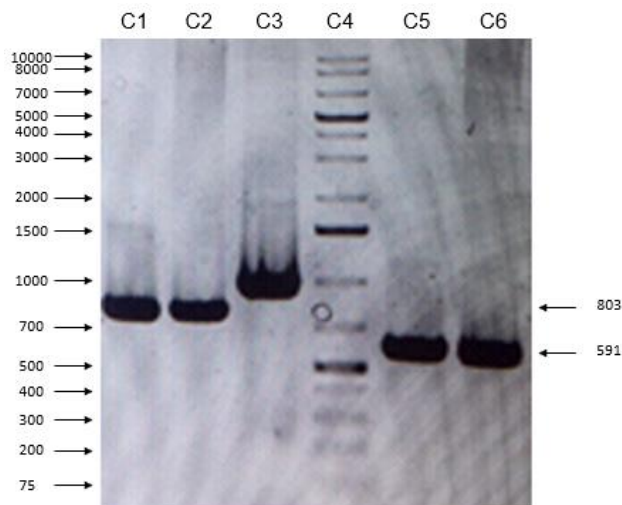


Figura 35. Amplicones correspondientes al gen que codifica para la PETasa del plásmido pGIAam7-PETasa corregido (28). Se observa la amplificación pgr: del control positivo (C1) del plasmido corregido (C2). Se observa la amplificación de pgf: del control positivo (C5) y del plásmido corregido (C6). El marcador de tamaño (C4). **Nota: el amplicón del carril C3 corresponde a otro análisis.**

8.2.10. Secuenciación del plásmido pIN-PETasa corregido.

Las secuencias fueron ensambladas con el software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Para el plásmido pIN-PETasa, por un lado, se corroboró la inserción de citocina y timina (**Figura 36**) y dentro del gen la inserción de citocina (**Figura 37**), bases que faltaban.

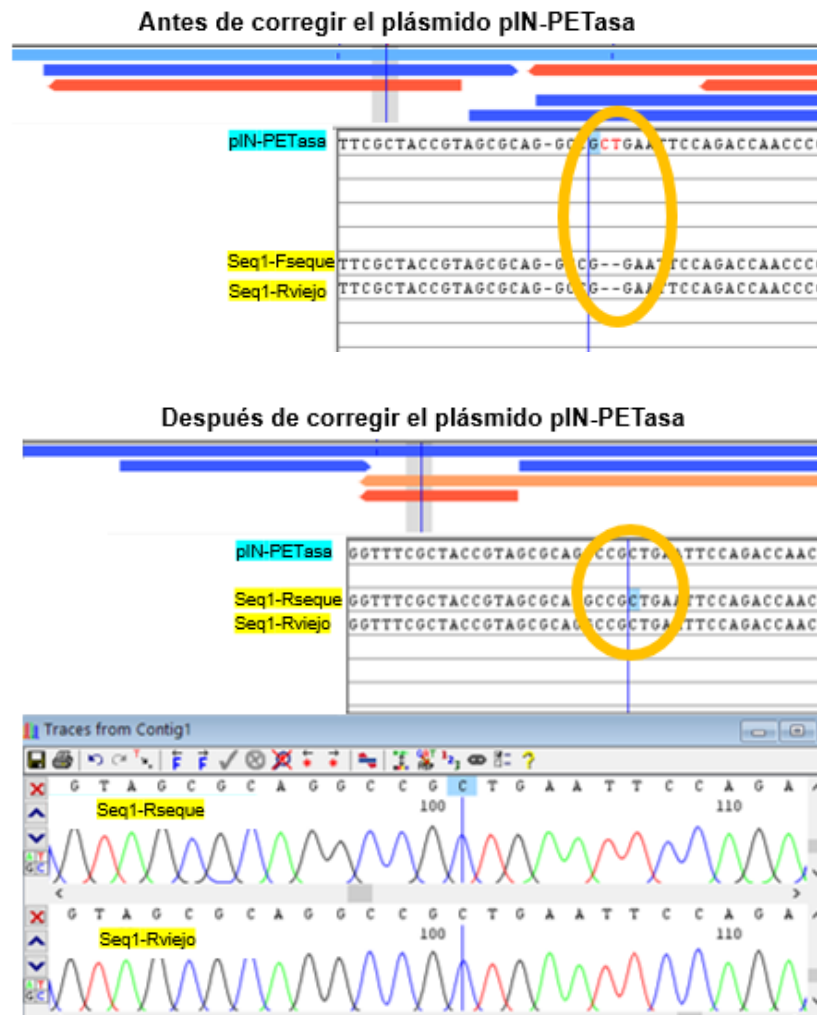


Figura 36. Inserción de las bases CT en el plásmido pIN-PETasa corregido. En la parte superior, se observan los resultados de la secuenciación previa y se marca en un círculo amarillo la delección de las bases CT. En la parte inferior, se observa la secuenciación del plásmido corregido, por lo que en el círculo amarillo se observan las bases añadidas y los respectivos cromatogramas.

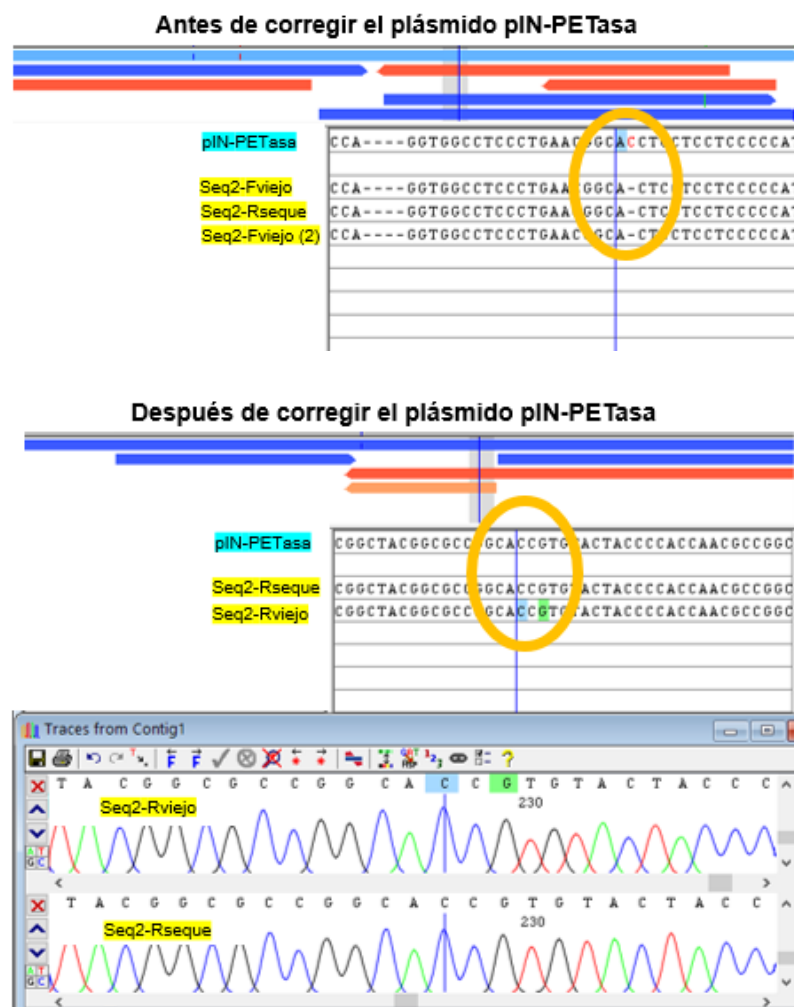


Figura 37. Inserción de la base C en el plásmido pIN-PETasa corregido. En la parte superior, se observan los resultados de la secuenciación previa y se marca en un círculo amarillo la delección de la base C. En la parte inferior, se observa la secuenciación del plásmido corregido, por lo que en el círculo amarillo se observan las bases añadidas y los respectivos cromatogramas.

8.2.11. Secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa corregido.

Las secuencias fueron ensambladas con el software CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Para el plásmido pGLAam7-PETasa, por un lado, se corroboró la inserción de citocina (**Figura 38**).



Figura 38. Análisis de la secuenciación del plásmido pGLAam7-PETasa arreglado. En la parte superior se observa el ensamble de las secuencias. Por otro lado, la línea vertical de color azul muestra la inserción de la base citocina, tanto en la secuencia de letras, como en los cromatogramas de la parte inferior.

Por otro lado, se demostró que el promotor sólo tiene dos repeticiones de un sitio de unión a un factor de transcripción (**Figura 39**, etiquetados B y C) y no siete como lo mostraba la secuencia enviada por Synbio-technologies, estos fueron amplificados por el Oligo3R y Oligo4F obteniendo únicamente 218 pb y no 628 pb como se esperaba (**Tabla 7**).

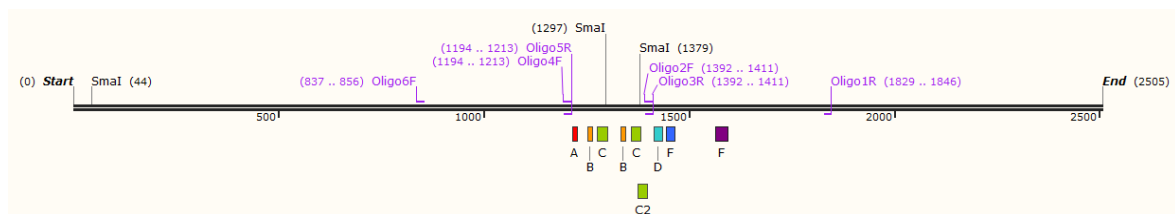


Figura 39. Ensamble de las secuencias del promotor del plásmido pGLAam7-PETasa corregido. Se observa la unión de las secuencias amplificadas del promotor, en color morado se identifican los iniciadores forward y reverse. Los cuadros A, B, C, C2, D, F identifican regiones de unión a factores de transcripción.

8.2.12. Inducción de la PETasa en *E. coli* SoluBL21 y BL21 plys.

Se hizo la inducción de la PETasa en *E. coli* SoluBL21 y BL21 plys, sin embargo, no se observaron diferencias entre los matraces inducidos y no inducidos (**Figura 40**).

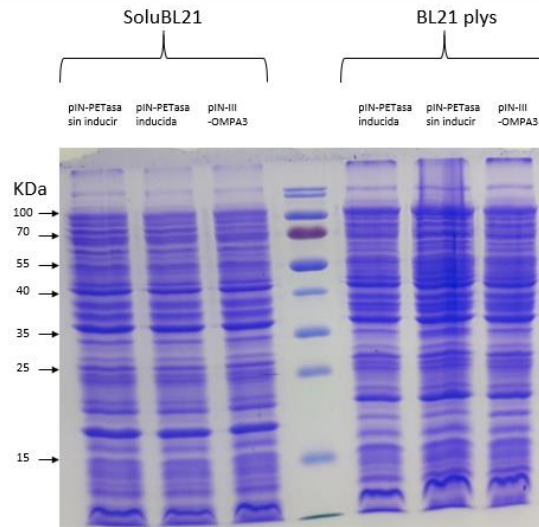


Figura 40. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E. coli* SoluBL21 y BL21plys con la construcción pIN-PETasa. Se observan las proteínas correspondientes a las muestras de SoluBL21 y BL21 plys. KDa: kilodaltons

Después, se repitió la inducción con dos concentraciones distintas de IPTG a 0.2 mM y 2 mM. Además, se hizo la extracción de la fracción soluble con el reactivo Bugbuster. Sin embargo, no se observó la sobreexpresión de la proteína esperada (**Figura 41**).

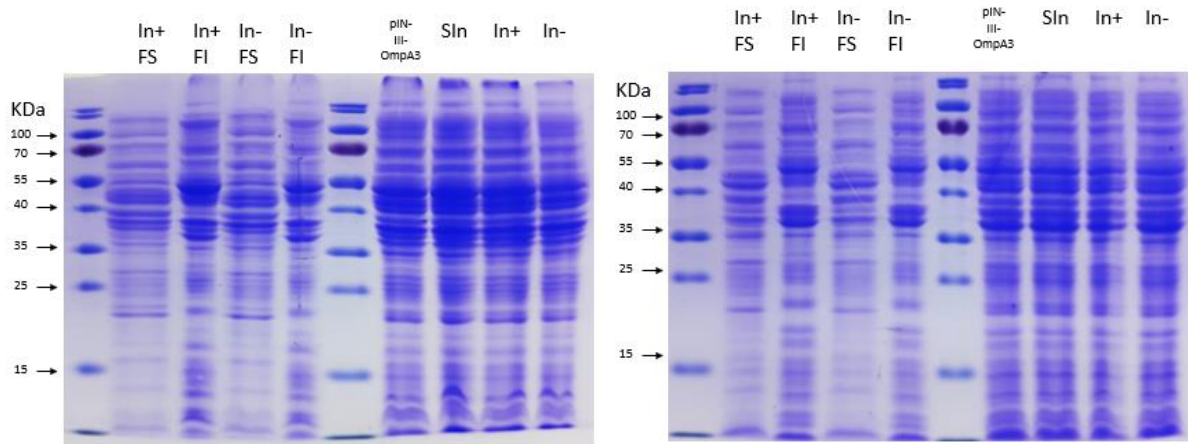


Figura 41. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E. coli* BL21plys y SoluBL21 con la construcción pIN-PETasa. Se observan las proteínas extraídas de *E. coli* BL21plys (gel a la izquierda) y SoluBL21 (gel a la derecha). En este caso se usó como control negativo el vector vacío pIN-III-OmpA3 (sin inducir). Las fracciones solubles e insolubles sólo se obtuvieron de las muestras inducidas. In+: muestra inducida con 2 mM de IPTG, In-: muestra inducida con 0.2 mM de IPTG, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble

Se repitió la inducción, usando medio LB. En esta ocasión se indujo con IPTG (1 mM) el control negativo pIN-III-OmpA3 y en éste se observó la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 27 kDa, en BL21 plys (**Figura 42**, primer gel, C- In). Sin embargo, se corroboró que la proteína efectivamente se expresaba mediante la inducción del plásmido vacío (sin gen que codifica para la PETasa, **Anexo 12.10.**)

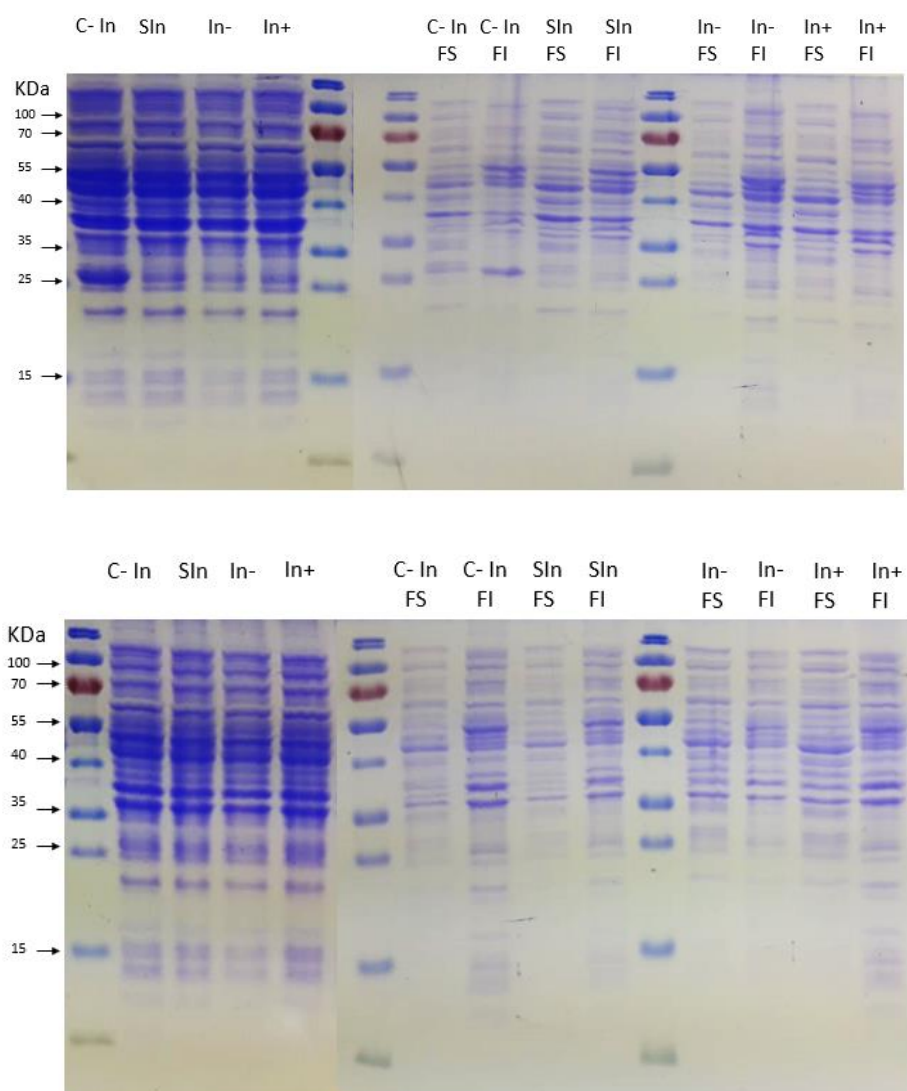


Figura 42. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E.coli* BL21plys y SoluBL21 con la construcción pIN-PETasa. El primer gel pertenece a las proteínas de *E.coli* BL21plys. De izquierda a derecha se observan en los primeros cuatro carriles las proteínas totales. En este caso se usó como control negativo el vector vacío pIN-III-OmpA3 (inducido; C-In), en el que se observó la sobreexpresión de una proteína de entre 25 y 35 kDa. El segundo gel pertenece a las proteínas de *E.coli* SoluBL21. In+: muestra

inducida con 2 mM de IPTG, In-: muestra inducida con 0.2 mM de IPTG, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble.

8.3. Resultados de la etapa tres.

8.3.1. El plásmido pET-38b (+).

El plásmido pET-38b (+) fue verificado mediante un análisis de restricción con las enzimas SmaI y NcoI generando los fragmentos de 1677 y 4144 pb (**Figura 43**),

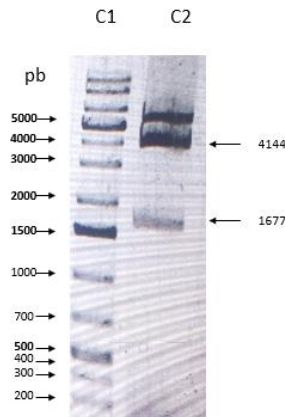


Figura 43. Análisis electroforético de plásmido pET-38b(+) cortado con SmaI y NcoI. Se observa la banda de 1,677 pb y el resto del plásmido de 4,144 pb (C2). Marcador de tamaño (C1).

8.3.2. Subclonación del gen que codifica para la enzima PETasa de *I. sakaiensis* en el vector pET-38b (+).

Se cortó tanto el plásmido pET-38b(+) como el gen que codifica para la enzima, con las enzimas EcoRI y HindIII (**Figura 44**), posteriormente se obtuvo una transformante positiva del plásmido pET-PETasa (**Figura 45**).

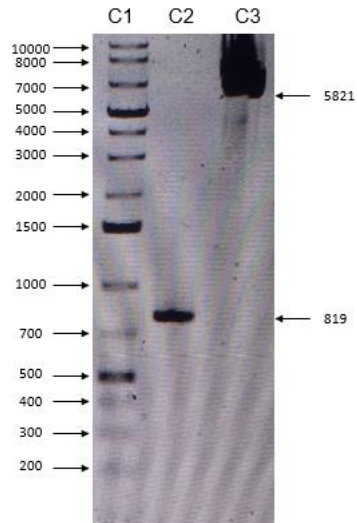


Figura 44. Análisis electroforético de plásmido pET-38b(+) y el amplicón correspondiente al gen que codifica para la PETasa, cortados con *EcoRI* y *HindIII*. Se muestra el marcador de tamaño (C1), el amplicón correspondiente al gen que codifica para la PETasa (C2) y el producto de la digestión del plásmido (C3).

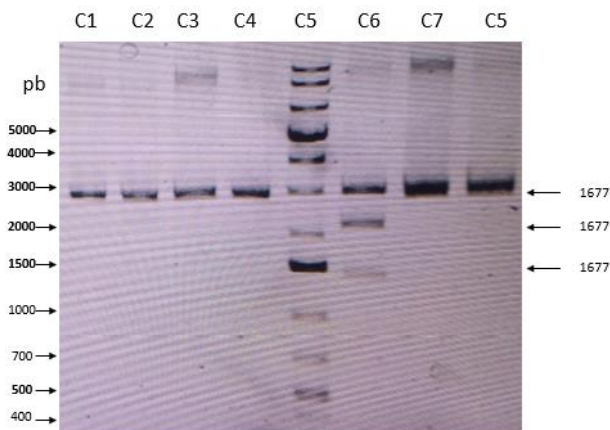


Figura 45. Búsqueda de la transformante positiva con las enzimas *ApaI* y *SmaI*. Se observa que sólo la transformante 5 mostró los cortes correspondientes a la construcción pET-PETasa: 1,441, 2,233 y 2,966 pb (C6). Marcador de tamaño (C5).

8.3.3. Inducción de la PETasa en *E.coli* BL21 plys con la construcción pET-PETasa.

Se hizo la inducción de *E.coli* BL21 plys con la construcción pET-PETasa con diferentes concentraciones de IPTG, sin embargo, no se observaron diferencias entre las muestras inducidas y no inducidas (**Figura 46, Figura 47 y Figura 48**).

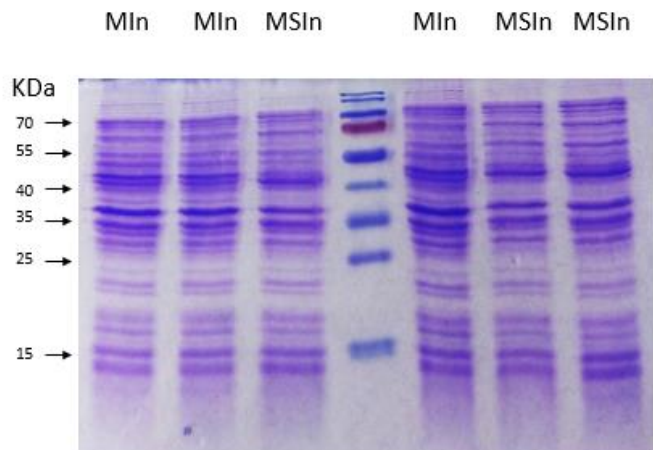


Figura 46. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E.coli* BL21plys con la construcción pET-PETasa. Se muestra la inducción a 25°C. Se observan las muestras inducidas y no inducidas. MIn: muestra inducida, MSIn: muestra sin inducir.

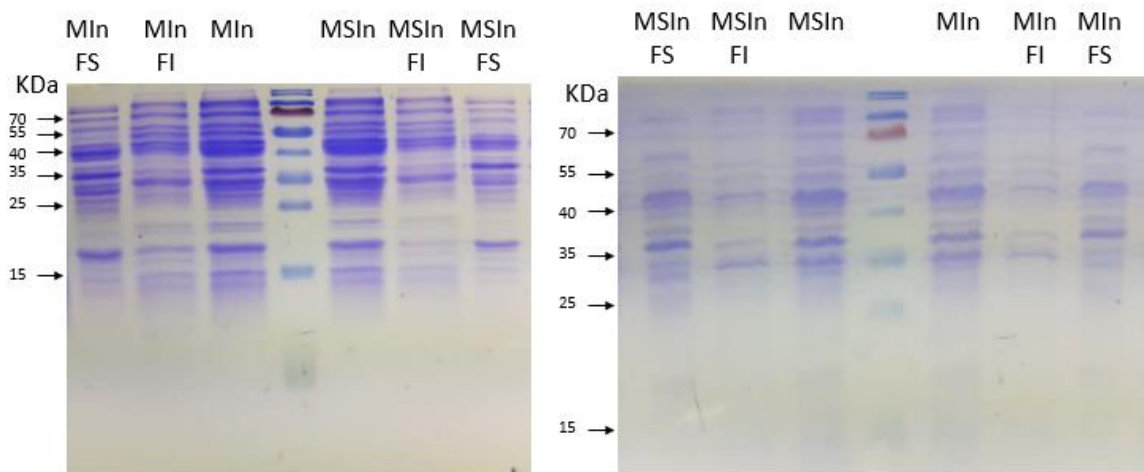


Figura 47. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E.coli* BL21plys con la construcción pET-PETasa. Del lado izquierdo se muestra la inducción a 37°C, mientras que de lado derecho a 25°C. MIn: muestra inducida, MSIn: muestra sin inducir, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble.

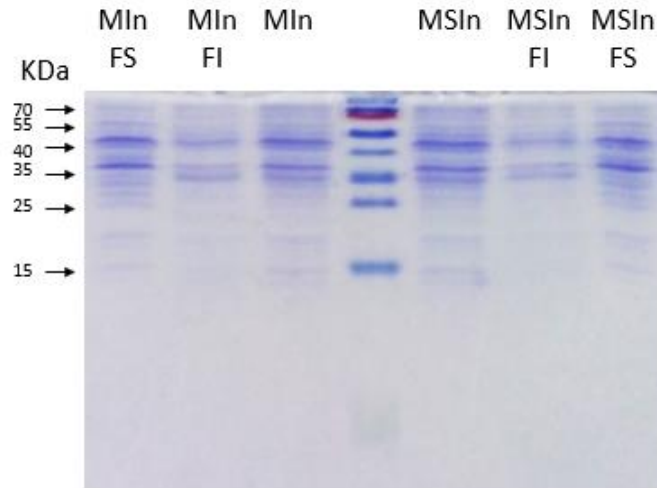


Figura 48. SDS-PAGE al 16% de proteína total de *E.coli* BL21plys con la construcción pET-PETasa. Se muestra la inducción a 17°C. MIn: muestra inducida, MSIn: muestra sin inducir, FS: fracción soluble, FI: fracción insoluble.

9. DISCUSIÓN

Optimización de codones para la expresión de la PETasa en *A. niger*.

Se han descrito varios estudios en los que se demuestra como la optimización de codones puede influir en el proceso de traducción de proteínas heterólogas. La razón de esto es porque los codones preferidos se correlacionan con la abundancia de tARNs afines disponibles dentro de la célula (Gustafsson *et al.*, 2004). En este estudio se eligió realizar la optimización de codones de forma automática, por medio de la selección del uso de codones de *A. niger* de la base de datos KASUSA y un algoritmo en Python. Es necesario resaltar que, como el gen que codifica para la PETasa también se expresaría en *E. coli*, se determinó no usar el codón más frecuente para el aminoácido Valina GUC (*A. niger*) sino el segundo codón más frecuente GUG, puesto que el primero es uno de los codones menos usados por la bacteria (<https://www.genscript.com/tools/codon-frequency-table>) y esto podría ser un inconveniente en su traducción.

Por otro lado, para el diseño *in silico* se determinó colocar en el extremo 5' del gen que codifica para la PETasa, el sitio KEX (ISKR) para su liberación de la fusión con la glucoamilasa y también tres glicinas (GGG) pues éstas permitirán el acceso de la kexasa al sitio y de esta forma la liberación de la fusión con la glucoamilasa (Ward *et al.*, 2004).

Finalmente, aunque se llevó a cabo un experimento para cotransformar *A. niger*, no se obtuvieron transformantes, por lo que es necesario repetirlo.

El plásmido para insertar el gen que codifica para la PETasa de *Ideonella sakaiensis* en *E. coli* en realidad era pIN-III-OmpA3.

Después de la secuenciación del plásmido pIN-PETasa se observaron dos deleciones en la dirección 5' del sitio EcoRI, específicamente la falta de las bases CT (amplicón Seq1). Indagando en la literatura sobre el plásmido se encontró que pertenecía a una familia de vectores de expresión para *E. coli* y haciendo la comparación con cada uno, se llegó a la conclusión que en realidad el plásmido que se estaba usando era pIN-III-OmpA3, el cual no contiene estas dos bases y no el plásmido pIN-III-OmpA2 (etiqueta que tenía el tubo que contenía el plásmido con el que se trabajó) (Ghrayeb *et al.*, 1984).

También se observó una deleción dentro del gen que codifica para la enzima PETasa. Se secuenció por triplicado el amplicón Seq2 y los cromatogramas fueron de calidad, pues no hubo ruido basal, ni deformidad de los picos, esto nos indica la fidelidad de la deleción. Podemos sugerir que el error fue en la síntesis del gen, ya que en el cromatograma que la empresa Synbio-technologies proporcionó se observa un solo pico para dos citocinas (CC) (**Figura 49**).

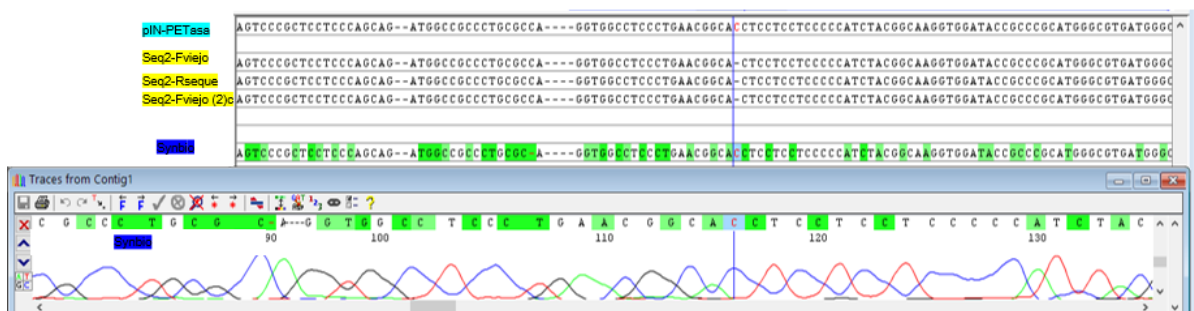


Figura 49. Secuenciación en sentido forward y reverse del amplicón Seq2 proporcionado por la empresa Synbio-Technologies. A) Se observa la comparación de las secuencias del amplicón Seq2 y el plásmido pIN-PETasa, la línea en color azul muestra la delección de la base C marcada en color rojo. B) Se observa el cromatograma proporcionado por la empresa de síntesis (Synbio-technologies).

Por lo anterior fue necesario hacer la inserción de estos tres nucleótidos (CT y C), por medio de los amplicones de la **Tabla 6** y de la técnica de Golden Gate, para la corrección del marco de lectura de pIN-PETasa y el arreglo de pGLAam7-PETasa.

La técnica de Golden-Gate para la corrección del plásmido pIN-PETasa

Los extremos cohesivos de cuatro bases que se seleccionaron para la unión de los amplicones A1, A2 y A3 fueron 5'CGCT3'/3'GCGA5' y 5'GCAC3'/3'CGTG5', guiados por la misma secuencia del templado y la posición en la que se necesitaba incluir la inserción. Sin embargo, como se ha descrito, este tipo de extremos cohesivos, con gran cantidad GC, son ligados con poca fidelidad por la T4 ligasa (Potapov *et al.*, 2018). Por lo que era posible que los amplicones se ligaran con errores, no obstante, la secuenciación demostró lo contrario.

El tiempo en el cual se llevó a cabo la reacción de Golden Gate fue de aproximadamente 22 horas, sin embargo, no se observó únicamente la banda esperada de 1539 pb, también se notó una banda de aproximadamente 1000 pb, la cual podría ser el producto de la unión de dos amplicones (A1/A2 ó A2/A3) y otras dos bandas que corresponden a amplicones que no se unieron (**Figura 24**, gel de la derecha). Por lo que la ligación no fue eficiente. Sin embargo, en experimentos previos donde primero se cortaron los amplicones con Bsal por 6 h y posteriormente se purificaron por corte de gel en agarosa (Kit Qiagen), después de la ligación se observó únicamente la presencia de dos bandas (de 1539 y 1000 pb) (datos no mostrados). En consecuencia, de esta forma la ligación fue más eficiente. La explicación para lo anterior en la reacción de Golden Gate de un solo paso es que los fragmentos liberados del corte con Bsal de los amplicones, estarán presentes en el tubo y compiten con los amplicones por volverse a ligar, esto no ocurre para la ligación en dos pasos, pues los fragmentos migran al fondo del gel de agarosa (por ser de corto tamaño) y únicamente

se seleccionan los amplicones cortados, por lo cual aumenta la probabilidad de su ligación.

Sobre el plásmido pGLAM7-PETasa

Posteriormente a la inserción del gen que codifica para la PETasa en el plásmido pGLAam7, se hicieron las reacciones de PCR correspondientes para su secuenciación, se encontró que las amplificaciones pgf y 1-2 no se obtuvieron. Ambas necesitan emparejar un iniciador sobre el fragmento de 1797 pb (**Figura 50**), ya que éste tiene en los extremos 5´y 3´ el sitio EcoRI, es posible que se haya ligado en sentido inverso. Por lo que fue necesario volver a cortar con EcoRI y ligar nuevamente.

De acuerdo con el mapa del plásmido pGLAam7-PETasa proporcionado por la empresa Synbio-Technologies, el promotor contenía siete repeticiones de un fragmento de unión a un factor de transcripción, cada uno de estos está flanqueado por el sitio de restricción de la enzima SmaI. Sin embargo, cuando se realizó el análisis de restricción enzimática, se encontró la pérdida de aproximadamente 200 ó 300 pb en el promotor. Esto se puede visualizar en el gel de agarosa del corte con HindIII/PstI, donde la banda esperada de 822 pb se obtuvo de aproximadamente 600 pb (**Figura 51**, banda color verde oscuro) y se corroboró con los geles de los cortes EcoRI/PvuII, EcoRI/KpnI donde las bandas de 1232 y 1104 pb aparecen de 1000 y 900 pb respectivamente (**Figura 52** y **Figura 16**). Posteriormente, cuando se hizo el mismo corte con HindIII/PstI en el plásmido pGLAam7-PETasa corregido, la banda de 822 pb apareció de aproximadamente 400 pb (**Figura 29**), no obstante, la secuenciación de esta zona (amplicon 3-4) fue de 219 pb y sólo mostró dos de estas repeticiones (**Figura 39**). Se sugiere que, dependiendo del número de divisiones del hospedero, el plásmido puede perder estos fragmentos repetidos. Lo anterior está fundamentado en algunos estudios que muestran que las repeticiones en tándem son inestables, ya que en los procesos de replicación del DNA plasmídico, cuando se forma la unión de Holliday, la hebras se pueden alinear erróneamente por la homología de los fragmentos, llevando a la delección o a la multiplicación de estos (Goldfless *et al.*, 2006) (Bzymek & Lovett, 2001). Sin embargo, el promotor original de la glucoamilasa de *Aspergillus niger* sólo

contiene un fragmento de unión a este factor de transcripción, por lo que podemos suponer que el promotor será funcional.

Sobre la inducción del plásmido pIN-PETasa corregido

Se corroboró mediante la secuenciación las inserciones de las bases que faltaban (CT y C), lo que corrigió el marco de lectura. Inicialmente se llevó a cabo la inducción de la PETasa en *E. coli* DH5 α , como se describe en un artículo donde se utiliza el mismo vector y la misma cepa (Quaas *et al.*, 1988), no obstante, no se mostró la expresión de la enzima en el gel de agarosa (dato no mostrado). Se determinó usar las cepas SoluBL21 y BL21 plys que son cepas deficientes de la proteasa Lon, que degrada las proteínas mutantes o anormales (Gottesman, 1996), de igual forma, carecen de la proteasa de membrana externa OmpT, cuya función es degradar proteínas extracelulares, por lo que son ideales para la expresión de proteínas recombinantes (Grodberg & Dunn, 1988). Se hicieron diferentes experimentos, con variaciones de medios de cultivo, diferentes concentraciones de IPTG y diferentes temperaturas, como se describe en la literatura referente a la expresión de proteínas, sin embargo, no se observó la proteína en el análisis SDS-PAGE (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Sobre la inducción del plásmido pET-PETasa corregido.

Ya que en ocasiones es necesario variar entre cepas y vectores de expresión para producir la proteína (Rosano & Ceccarelli, 2014), se determinó insertar el gen que codifica para la enzima PETasa en el plásmido pET-38b(+) y de esta forma tener la construcción pET-PETasa. Este plásmido utiliza el promotor T7, que es reconocido por la RNA polimerasa del bacteriófago T7, por lo que se usó la cepa BL21 plys que la produce (Rosano & Ceccarelli, 2014) . De igual forma que en la inducción de la bacteria con pIN-PETasa, se hicieron diferentes experimentos, con variaciones de medios de cultivo, diferentes concentraciones de IPTG y diferentes temperaturas, sin embargo, tampoco se observó la proteína en el análisis SDS-PAGE.

El uso de codones pudo influir en que no se expresara de la enzima.

Como se observa en el **Anexo 12.11.**, la secuencia que codifica para la enzima PETasa en pIN-PETasa (**Figura 59**) y en pET-PETasa (**Figura 60**) contiene gran porcentaje de GC%, de igual forma ambas tienen un índice de adaptación de codones (CAI) por debajo del ideal (0.77 y 0.74 respectivamente). Por otro lado, la secuencia de la PETasa nativa tiene un CAI de 0.81 (ideal), al comparar ésta y la secuencia usada se observa un 80.7% de similaridad (**Anexo 12.12**). Por lo que podemos suponer que las diferencias en los codones podrían haber influido en que la enzima no se expresara.

10. CONCLUSIONES

No se obtuvieron transformantes de *A. niger* (plásmido pGLAam7-PETasa y pHigro), por lo que no se pudo expresar la enzima en este sistema biológico.

Mediante secuenciación del plásmido pIN-PETasa se determinó que el vector usado para la clonación era pIN-III-OmpA3 y la delección de una citosina en el gen que codifica para la PETasa, por lo que se corrigió mediante la técnica de Golden Gate y se corroboró por secuenciación.

No se obtuvo la expresión de la PETasa (pIN-PETasa corregido y pET-PETasa), esto pudo ser por los codones elegidos para la secuencia que codifica para la enzima.

11. PERSPECTIVAS

Repetir la cotransformación de *A. niger* mediante choque de ondas, para expresar la enzima en este sistema biológico.

Modificar los codones en la secuencia que codifica para la enzima para tener un valor más alto de CAI y mayor probabilidad de que se exprese en *E. coli*.

Volver a sintetizar la secuencia y hacer de nuevo las construcciones, para expresar la enzima en *E. coli*.

12. ANEXOS

Anexo 12.1. Mezclas de reacción para las PCRs y programaciones del termociclador

Para la polimerasa de alta fidelidad Q5 (NEB) la mezcla de reacción fue la siguiente: 12.5 µl del master mix de la polimerasa Q5 (2X), 1.25 µl del iniciador forward y 1.25 µl del iniciador reverse, 1 µl de DNA del templado y 10 µl de agua inyectable (PISA).

Tabla 9. Programación para la polimerasa Q5:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	30 s
35 ciclos	98°C	10 s
	60°C	30 s
	72°C	30 s
Extensión final	72°C	2 min

Para la polimerasa Taq (Thermo Scientific™), la mezcla de reacción fue la siguiente: 2 µl del regulador Taq, 0.4 µl de dNTPs, 2 µl del iniciador forward, 2 µl del iniciador reverse, 1 µl de ADN templado, 1 µl de enzima, 2 µl de MgCl₂ y 14.6 µl de agua inyectable (PISA).

Tabla 10. Programación para la Taq polimerasa:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
35 ciclos	95°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	1 min
Extensión final	72°C	5 min

Para la polimerasa phusion (Thermo Scientific™), la mezcla de reacción fue la siguiente: 10 µl del regulador 5x, 1 µl de dNTPs, 2.5 µl del iniciador forward, 2.5 µl del iniciador reverse, 1 µl de ADN templado, 1.5 µl de DMSO, 5 µl de enzima y 26.0 µl de agua inyectable (PISA).

Tabla 11. Programación para la polimerasa phusion:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	98°C	5 min
Agregar phusion	70°C	3 min
35 ciclos	98°C	30 s
	60°C	30 s
	72°C	30 s
Extensión final	72°C	5 min

Anexo 12.2. Algoritmo en Python para la optimización de codones para *Aspergillus niger*

```
my_seq =
"MNFPRASRLMQAAVLGGLMAVSAATAQTNPYARGPNPTAASLEASAGPFTVRSFTVSRPSGYGAGTVYYPTNAGGTVGAIIV
PGYTARQSSIKWWGPRRLASHGFVITIDTNSTLDQPESSQQMAALRQVASLNGTSSSPIYGVKVDTARMGVMGWWSMGGGSL
ISAANNPSLKAAAPQAPWHSSTNFSSVTPTLIFACENDSIAPVNSSALPIYDMSRNAKQFLEINGGSHSCANSNGNSNQALIGKK
GVAWMKRFMDNDTRYSTFACENPNSTAVSDFRTANCS"
```

```
lista_vacia=['X']*len(my_seq)
```

```
for i in range(0,len(my_seq)):
```

```
    if my_seq[i]=='F':
```

```
        lista_vacia[i]='UUC'
```

```
    elif my_seq[i]=='H':
```

```
        lista_vacia[i]='CAC'
```

```
    elif my_seq[i]=='N':
```

```
        lista_vacia[i]='AAC'
```

```
    elif my_seq[i]=='L':
```

```
        lista_vacia[i]='CUG'
```

```
    elif my_seq[i]=='Q':
```

```
        lista_vacia[i]='CAG'
```

```
    elif my_seq[i]=='K':
```

```
        lista_vacia[i]='AAG'
```

```
    elif my_seq[i]=='S':
```

```
        lista_vacia[i]='UCC'
```

```
    elif my_seq[i]=='R':
```

```
        lista_vacia[i]='CGC'
```

```
    elif my_seq[i]=='V':
```

```
        lista_vacia[i]='GUG'
```

```
    elif my_seq[i]=='Y':
```

```
        lista_vacia[i]='UAC'
```

```

elif my_seq[i]=='I':
    lista_vacia[i]='AUC'
elif my_seq[i]=='A':
    lista_vacia[i]='GCC'
elif my_seq[i]=='C':
    lista_vacia[i]='UGC'
elif my_seq[i]=='M':
    lista_vacia[i]='AUG'
elif my_seq[i]=='D':
    lista_vacia[i]='GAU'
elif my_seq[i]=='P':
    lista_vacia[i]='CCC'
elif my_seq[i]=='T':
    lista_vacia[i]='ACC'
elif my_seq[i]=='E':
    lista_vacia[i]='GAG'
elif my_seq[i]=='G':
    lista_vacia[i]='GGC'
elif my_seq[i]=='W':
    lista_vacia[i]='UGG'

optimizacion= '-'.join(lista_vacia)
print(optimizacion)

```

Anexo 12.3. Protocolo de transformación química de células *E. coli* DH5α (Invitrogen).

- 1.- Tomar las células competentes del REVCO (mantenerlas en hielo).
- 2.- Añadir 3 µl del plásmido pIN-III-OmpA2.
- 3.- Incubar en hielo por 5 a 30 minutos.
- 4.- Realizar choque térmico por 30 segundos a 42°C sin agitación.
- 5.- Transferir los tubos a hielo inmediatamente.
- 6.- Añadir 200-500 µl de medio LB o SOC a temperatura ambiente.

7.- Incubar los tubos a 37°C a 200 rpm por 1 h.

8.- Propagar 10-50 µl de transformantes en una placa selectiva e incubar toda la noche a 37°C. Se recomienda propagar dos volúmenes diferentes para asegurar que al menos una placa tenga colonias dispersas.

Anexo 12.4. Protocolo para extracción de plásmido por la técnica modificada de Birnboim y Doly.

1.- Obtener un paquete celular de la bacteria con el plásmido. A partir de un medio de cultivo de toda la noche en medio selectivo sólido, tomar una asada gruesa y resuspenderla en 150 µl de solución I BD, en un tubo para microcentrífuga.

2.- Agregar 300 µl de la solución II BD y agitar por inversión por 1 ó 2 segundos y dejar reposar 5 min en baño de hielo.

3.- Agregar 300 µl de la solución III BD, agitar por inversión aproximadamente 100 veces para mezclar perfectamente y dejar reposar en baño de hielo por 10 min.

4.- Centrifugar por 10 min (13,000 rpm, de preferencia a 4°C) y transferir el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo y estéril.

5.- Agregar 700 µl de isopropanol, agitar bruscamente por inversión y dejar reposar por 10 a 15 min en el baño de hielo o bien, por 20 min a -20°C en congelador.

6.- Centrifugar por 15 min a 4°C y eliminar el sobrenadante.

7.- Para eliminar el exceso de sales agregar 1 ml de etanol al 70%, agitar en agitador orbital por 30 seg y centrifugar nuevamente por 5 min (centrífuga no refrigerada), eliminar el sobrenadante.

8.- Secar la pastilla calentando a 56 ó 65°C el tiempo requerido y resuspenderla con 40 µl de agua bidistilada estéril.

9.- El rendimiento es entre 2 a 40 µg de plásmido por preparación, dependiendo del plásmido.

Solución I BD^a:	volumen (ml)	concentración final
Tris·HCl (pH 8.0) 1 M	1.25	25 mM
EDTA 0.25 M	2.00	10 mM
Glucosa 1 M	2.50	50 mM
Agua destilada c.b.p.	50.00	
RNasa (10 mg/ml) ^b	0.5	0.1 mg/ml

^a **BD**= Birnboim y Doly.

^b Añadir la RNasa sólo para hacer las preparaciones en pequeña escala (MInipreps).
Guardar en refrigeración.

Solución II BD:	volumen (ml)	concentración final
NaOH 1 N	5.00	0.2 N
SDS al 10 %	2.50	1.0 %
Agua destilada c.b.p.	25.00	

Guardar a temperatura ambiente no más de dos meses, si se ve floclada, la solución ya no sirve.

Solución III BD:	volumen (ml)	concentración final
Acetato de potasio 5 M	30.00	3 M
Acido acético glacial	5.75	
Agua destilada c.b.p.	50.00	

Guardar en refrigeración no más de seis meses, el pH debe permanecer aproximadamente en 4.6, cerrar perfectamente el frasco para evitar que se eleve el pH.

Anexo 12.5. Producto de la optimización de condones del gen que codifica para la PETasa de *Ideonella sakaiensis* para *Aspergillus niger*.

AUG-AAC-UUC-CCC-CGC-GCC-UCC-CGC-CUG-AUG-CAG-GCC-GCC-GUG-CUG-GGC-GGC-CUG-AUG-GCC-GUG-UCC-GCC-GCC-GCC-ACC-GCC-CAG-ACC-AAC-CCC-UAC-GCC-CGC-GGC-CCC-AAC-CCC-ACC-GCC-GCC-UCC-CUG-GAG-GCC-UCC-GCC-GGC-CCC-UUC-ACC-GUG-CGC-UCC-UUC-ACC-GUG-UCC-CGC-CCC-UCC-GGC-UAC-GGC-GCC-GGC-ACC-GUG-UAC-UAC-CCC-ACC-AAC-GCC-GGC-GGC-ACC-GUG-GGC-GCC-AUC-GCC-AUC-GUG-CCC-GGC-UAC-ACC-GCC-CGC-CAG-UCC-UCC-AUC-AAG-UGG-UGG-GGC-CCC-CGC-CUG-GCC-UCC-CAC-GGC-UUC-GUG-GUG-AUC-ACC-AUC-GAU-ACC-AAC-UCC-ACC-CUG-GAU-CAG-CCC-GAG-UCC-CGC-UCC-UCC-CAG-CAG-AUG-GCC-GCC-CUG-CGC-CAG-GUG-GCC-UCC-CUG-AAC-GGC-ACC-UCC-UCC-UCC-CCC-AUC-UAC-GGC-AAG-GUG-GAU-ACC-GCC-CGC-AUG-GGC-GUG-AUG-GGC-UGG-UCC-AUG-GGC-GGC-GGC-GGC-UCC-CUG-AUC-UCC-GCC-GCC-AAC-AAC-CCC-UCC-CUG-AAG-GCC-GCC-GCC-CCC-CAG-GCC-CCC-UGG-CAC-UCC-UCC-ACC-AAC-UUC-UCC-UCC-GUG-ACC-GUG-CCC-ACC-CUG-AUC-UUC-GCC-UGC-GAG-AAC-GAU-UCC-AUC-GCC-CCC-GUG-AAC-UCC-UCC-GCC-CUG-CCC-AUC-UAC-GAU-UCC-AUG-UCC-CGC-AAC-GCC-AAG-CAG-UUC-CUG-GAG-AUC-AAC-GGC-GGC-UCC-CAC-UCC-UGC-GCC-AAC-UCC-GGC-AAC-UCC-AAC-CAG-GCC-CUG-AUC-GGC-AAG-AAG-GGC-GUG-GCC-UGG-AUG-AAG-CGC-UUC-AUG-GAU-AAC-GAU-ACC-CGC-UAC-UCC-ACC-UUC-GCC-UGC-GAG-AAC-CCC-AAC-UCC-ACC-GCC-GUG-UCC-GAU-UUC-CGC-ACC-GCC-AAC-UGC-UCC

Anexo 12.6. Análisis de restricción enzimática del plásmido pGLAam7-PETasa.

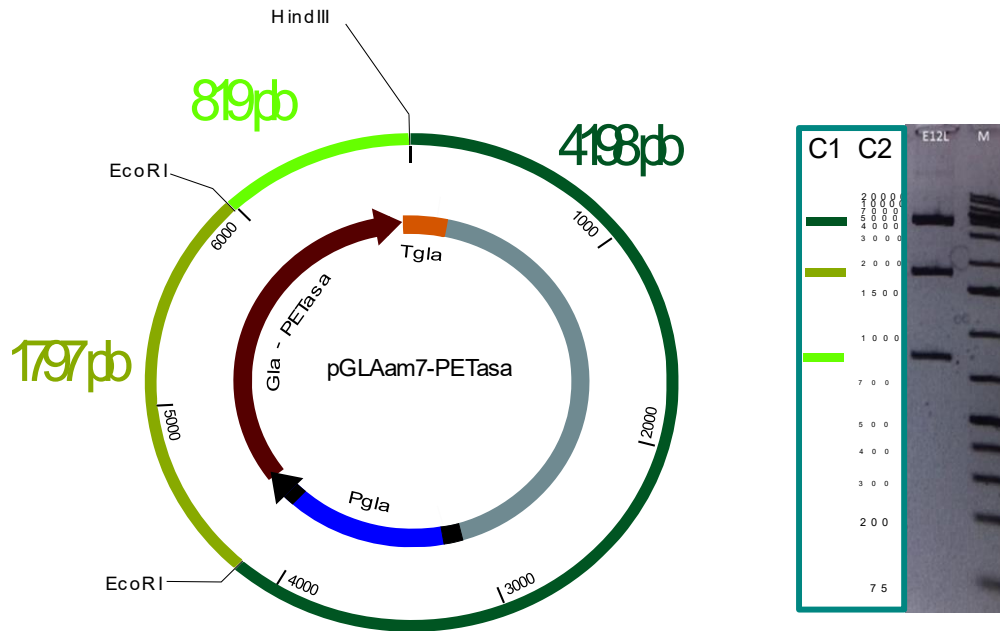


Figura 50. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/HindIII. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, el cual genera tres fragmentos (en diferentes tonos de verde). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C2) y los fragmentos del plásmido pGLAam7-PETasa cortado (C1).

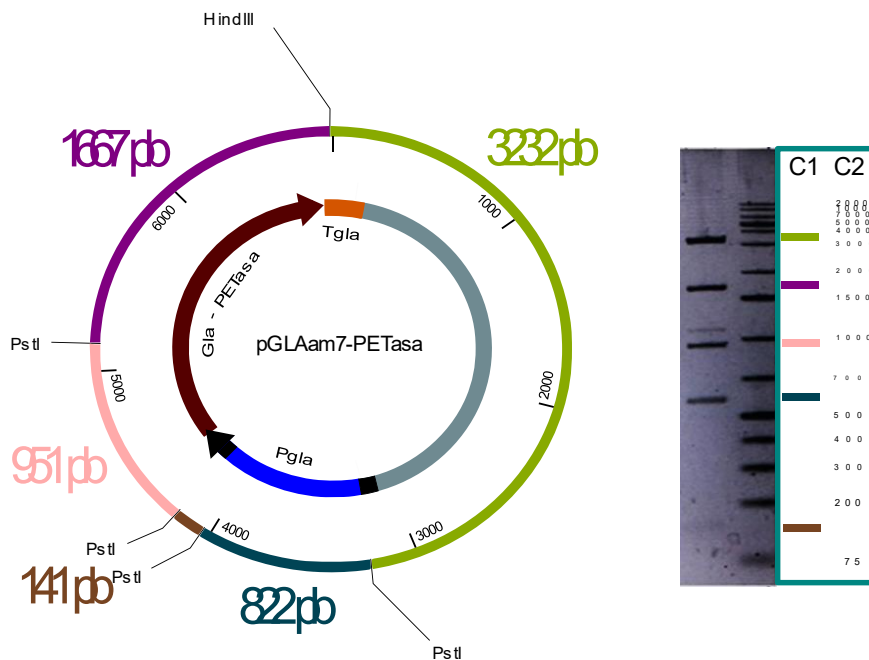


Figura 51. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con HindIII/PstI. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, el cual genera cinco fragmentos

(en diferentes colores). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C2) y los fragmentos del plásmido pGLAam7-PETasa cortado (C1). Se muestra que el fragmento esperado de 822 pb se observó en el gel de agarosa de aproximadamente 600 pb (verde oscuro).

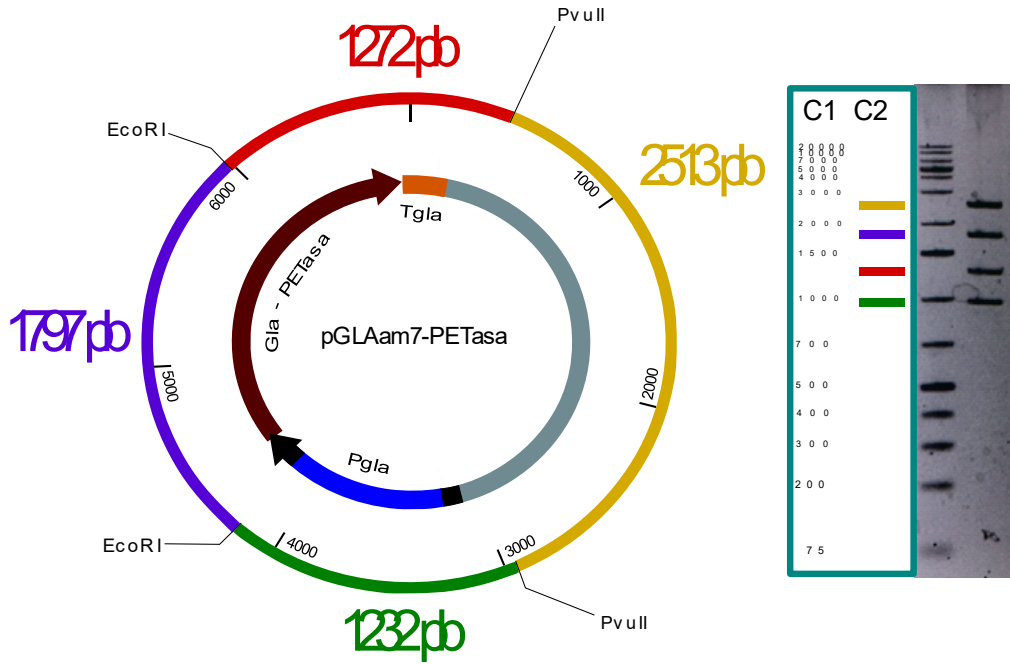


Figura 52. Análisis electroforético de plásmido pGLAam7-PETasa cortados con EcoRI/PvuII. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, el cual genera cuatro fragmentos (en diferentes colores). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y los fragmentos del plásmido pGLAam7-PETasa cortado (C2). Se muestra que el fragmento esperado de 1232 pb se observó en el gel de agarosa de aproximadamente 1000 pb (color verde).

Anexo 12.7. Análisis de restricción enzimática del plásmido pHigro.

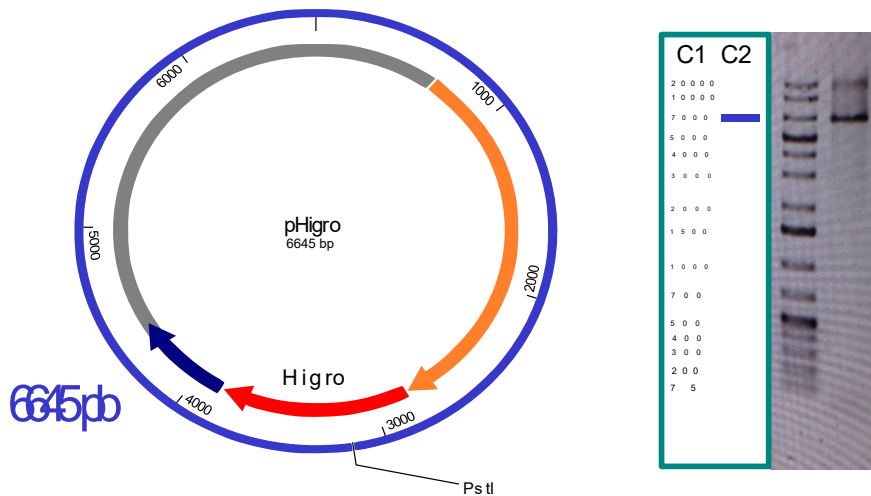


Figura 53. Análisis electroforético de plásmido pHigro cortado con PstI. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se observa un solo corte B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y el plásmido pHigro linealizado (C2).

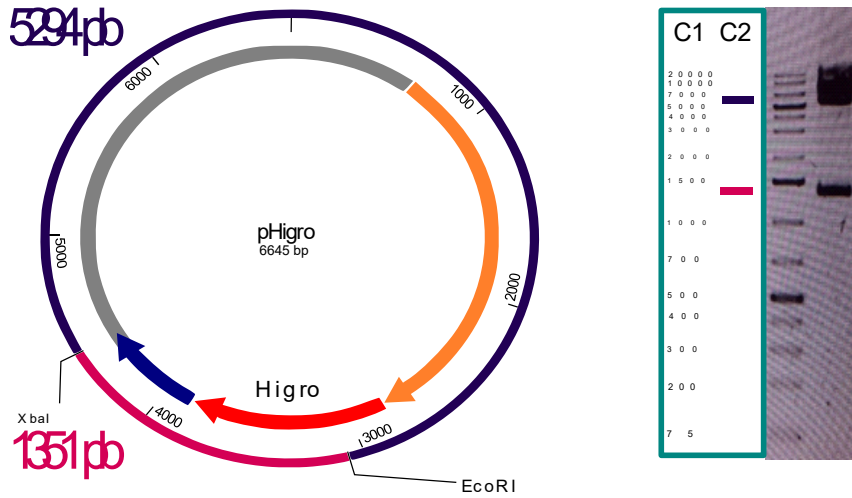


Figura 54. Análisis electroforético del plásmido pHigro cortado con XbaI/EcoRI. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se observan dos fragmentos (morado y rosa). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y el plásmido pHigro cortado (C2).

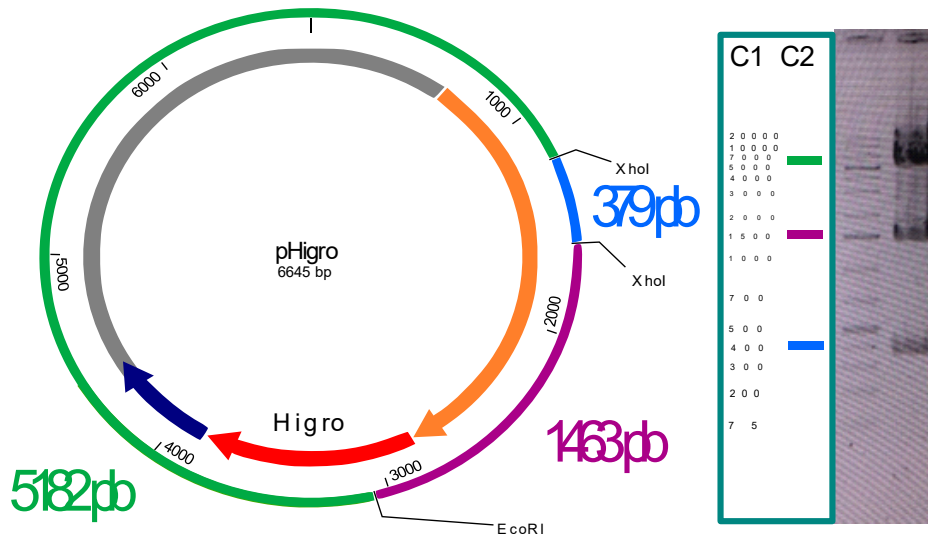


Figura 55. Análisis electroforético del plásmido pHigro cortado con XhoI/EcoRI. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se observan tres fragmentos (de diferentes colores). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y el plásmido pHigro cortado (C2).

Anexo 12.8. Análisis de restricción del plásmido pIN-PETasa.

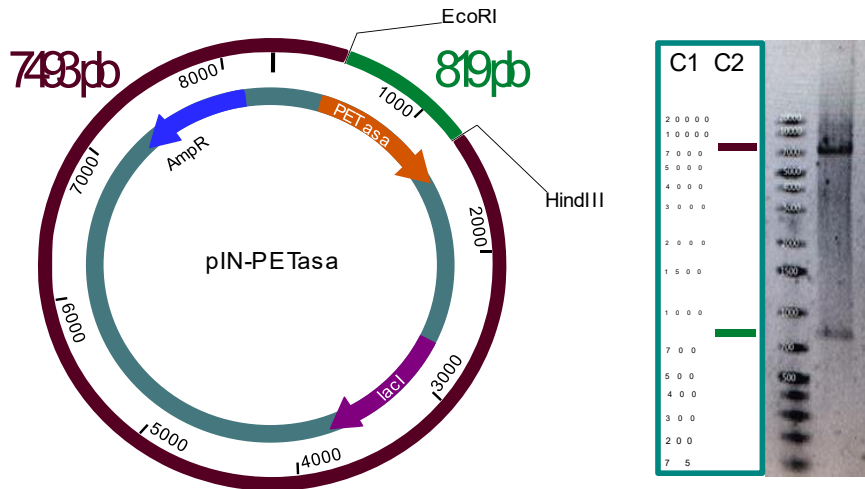


Figura 56. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con HindIII/EcoRI. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se observan dos fragmentos (morado y verde). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y el plásmido pIN-PETasa cortado (C2).

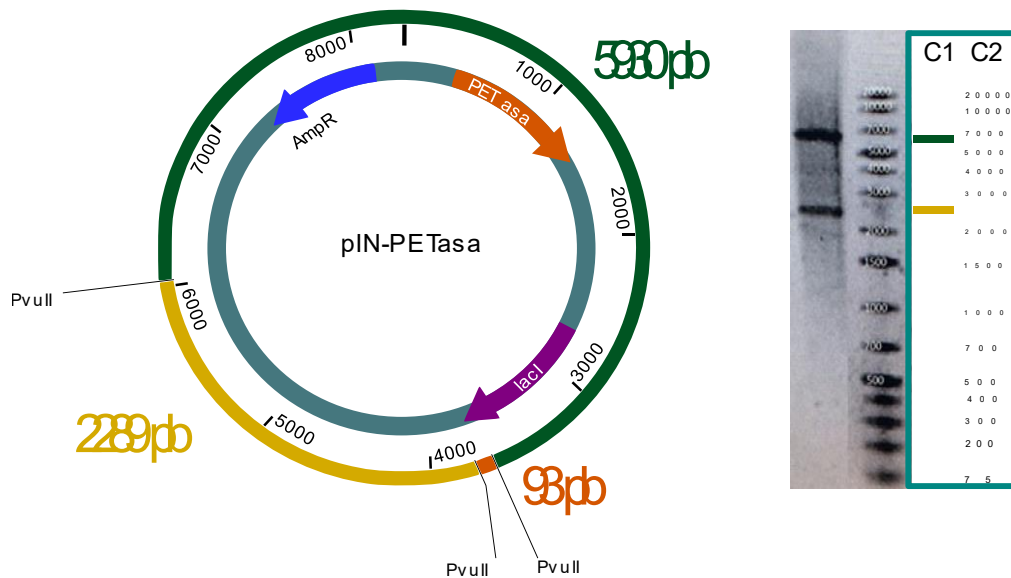


Figura 57. Análisis electroforético del plásmido pIN-PETasa cortado con PvuII. A) Del lado derecho se observa el mapa generado por el software GCK, en el cual se observan tres fragmentos (amarillo, verde y naranja). B) Del lado izquierdo se muestra el marcador de tamaño (C1) y plásmido pIN-PETasa cortado (C2).

Anexo 12.9. Amplicones para la secuenciación de pIN-PETasa

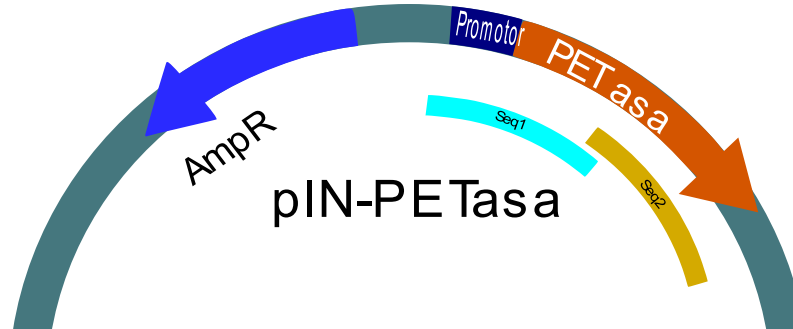


Figura 58. Amplicones para la secuenciación de pIN-PETasa. Se observa el plásmido pIN-PETasa, tanto el promotor (en azul y naranja, respectivamente) como la secuencia que codifica para la enzima, fueron amplificados por Seq1 y Seq2 (en azul claro y amarillo), los cuales se sobreponen.

Anexo 12.10. Análisis de la muestra que demostró la sobreexpresión de una proteína entre 25 y 35 kD.

Se repitió la inducción de la muestra a analizar y volvió a aparecer la proteína sobreexpresada, se hizo extracción del plásmido se cortó con la enzima Bsal y se observó el tamaño esperado del plásmido vacío (2300 pb). Del mismo modo se hizo una PCR con los iniciadores Eco-forward e Hin-reverse, y no hubo amplificación. Estos resultados demostraron que efectivamente la bacteria contenía el plásmido pIN-III-OmpA3, sin el gen y por lo tanto la proteína inducida no era la PETasa (**Figura 58**).

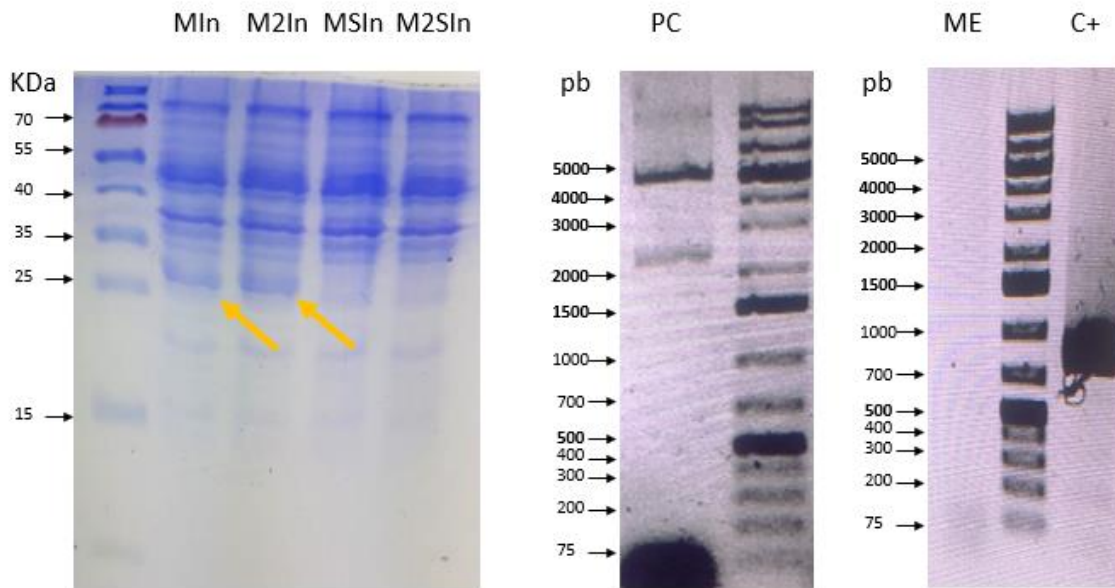


Figura 59. Análisis de la muestra que demostró la sobreexpresión de una proteína entre 25 y 35 kD. De izquierda a derecha, primero se observa el análisis SDS-PAGE de las muestras inducidas y no inducida con la sobreexpresión de una proteína entre 25 y 35 kD, en segundo lugar, el plásmido cortado con la enzima BsaI que libera una banda de 2300 pb. Por último, se muestra que no hubo amplificación de un fragmento de 819 pb, que pertenece al gen de interés. En este caso se usó como control positivo la amplificación del plásmido pIN-PETasa. M1In: muestra inducida, M2In: muestra 2 inducida, MS1In: muestra sin inducir, M2S1In: muestra 2 sin inducir, PC: plásmido cortado, ME: muestra analizada. C+: control positivo

Anexo 12.11. Análisis de codones raros de la secuencia que codifica para la PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.77 ↓ Free Codon Optimization	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	67.96%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	5%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene can give you the option to solve this problem.

Figura 60. Análisis de codones raros en la secuencia (pIN-PETasa). Se muestran los valores obtenidos por el análisis hecho mediante la empresa Genscript. Se observa que esta secuencia tiene un valor de 0.77, por debajo del ideal (0.8-1.0).

Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.74 ↓ Free Codon Optimization	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	66.65%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	6%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene can give you the option to solve this problem.

Figura 61. Análisis de codones raros en la secuencia (pET-PETasa). Se muestran los valores obtenidos por el análisis hecho mediante la empresa genscript. Se observa que esta secuencia tiene un valor de 0.74, por debajo del ideal (0.8-1.0).

Rare Codon Analysis Result			
	Actual Value	Ideal Value	Terms
CAI	0.81	0.8-1.0	<ul style="list-style-type: none"> A CAI of 1.0 is considered ideal. The lower the number, the higher the chance that your gene will be expressed poorly. GenScript's OptimumGene codon optimization tool can typically improve your sequence.
GC Content	69.09%	30%-70%	<ul style="list-style-type: none"> The ideal percentage range of GC content is between 30% and 70%.
CFD	3%	<30%	<ul style="list-style-type: none"> This un-optimized gene employs tandem rare codons that can reduce the efficiency of translation or even disengage the translational machinery. GenScript's OptimumGene can give you the option to solve this problem.

Figura 62. Análisis de codones raros en la secuencia de la PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Se muestran los valores obtenidos por el análisis hecho mediante la empresa genscript. Se observa que esta secuencia tiene un valor ideal de 0.81.

Anexo 12.12. Alineamiento de la secuencia de pIN-PETasa y la PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

```
# Aligned_sequences: 2
# 1: I.sakaiensis
# 2: pIN-PETasa
# Length: 914
# Identity: 738/914 (80.7%)
# Similarity: 738/914 (80.7%)
#=====
```

```
I.sakaiensis      1 atgaa-----ctttccccgcgcttccccgcctgatgcaggccgcgctt      42
```


13. REFERENCIAS

- Al-Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Eshaq, G., Rabie, A. M., & ElMetwally, A. E. (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>
- Awaja, F., & Pavel, D. (2005). Recycling of PET. *European Polymer Journal*, 41(7), 1453–1477. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2005.02.005>
- Azizi, M., Yakhchali, B., Ghamarian, A., & Enayati, S. (2013). Cloning and Expression of Gumboro VP2 Antigen in *Aspergillus niger*. 5(1), 35–41.
- Baker, S. E. (2006). *Aspergillus niger* genomics: Past, present and into the future. *Medical Mycology*, 44(SUPPL. 1), 17–21. <https://doi.org/10.1080/13693780600921037>
- Bzymek, M., & Lovett, S. T. (2001). Instability of repetitive DNA sequences: The role of replication in multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(15), 8319–8325. <https://doi.org/10.1073/pnas.111008398>
- Fecker, T., Galaz-davison, P., Engelberger, F., Narui, Y., Sotomayor, M., & Ramı, A. (2018). Active Site Flexibility as a Hallmark for Efficient PET Degradation by *I. sakaiensis* PETase. (6), 1302–1312. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.005>
- Finkelstein, D. B. (1987). Improvement of enzyme production in *Aspergillus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(5), 349–352. <https://doi.org/10.1007/BF00400559>
- Ghrayeb, J., Kimura, H., Takahara, M., Hsiung, H., Masui, Y., & Inouye, M. (1984). Secretion cloning vectors in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*, 3(10), 2437–2442. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1984.tb02151.x>
- Goldfless, S. J., Morag, A. S., Belisle, K. A., Sutera, V. A., & Lovett, S. T. (2006). DNA repeat rearrangements mediated by DnaK-dependent replication fork repair. *Molecular Cell*, 21(5), 595–604. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.025>
- Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual Review of Genetics*, 30, 465–506. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.465>
- Grodberg, J., & Dunn, J. J. (1988). ompT encodes the *Escherichia coli* outer membrane protease that cleaves T7 RNA polymerase during purification. *Journal of Bacteriology*, 170(3), 1245–1253. <https://doi.org/10.1128/jb.170.3.1245-1253.1988>
- Gustafsson, C., Govindarajan, S., & Minshull, J. (2004). Codon bias and heterologous protein expression. *Trends in Biotechnology*, 22(7), 346–353.

<https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.04.006>

- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., ... 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>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., ... Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Karnaukhova, E., Ophir, Y., Trinh, L., Dalal, N., Punt, P. J., Golding, B., & Shiloach, J. (2007). Expression of human α 1-proteinase inhibitor in *Aspergillus niger*. *Microbial Cell Factories*, 6, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-6-34>
- López-Fonseca, R., Duque-Ingunza, I., de Rivas, B., Flores-Giraldo, L., & Gutiérrez-Ortiz, J. I. (2011). Kinetics of catalytic glycolysis of PET wastes with sodium carbonate. *Chemical Engineering Journal*, 168(1), 312–320. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.01.031>
- Machida, Msayuki & Gomi, K. (2010). *Aspergillus: Molecular Biology and Genomics*. Norfolk: Caister Academic Press.
- Magaña-Ortíz, D., Fernández, F., Loske, A. M., & Gómez-Lim, M. A. (2018). Extracellular Expression in *Aspergillus niger* of an Antibody Fused to *Leishmania* sp. Antigens. *Current Microbiology*, 75(1), 40–48. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1348-1>
- Mojsov, K. D. (2016). *Aspergillus* Enzymes for Food Industries. In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering: Aspergillus System Properties and Applications*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63505-1.00033-6>
- Potapov, V., Ong, J. L., Kucera, R. B., Langhorst, B. W., Bilotti, K., Pryor, J. M., ... Lohman, G. J. S. (2018). Comprehensive Profiling of Four Base Overhang Ligation Fidelity by T4 DNA Ligase and Application to DNA Assembly. *ACS Synthetic Biology*, 7(11), 2665–2674. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.8b00333>
- Proielt, G.-F., Contreras, R., Carrez, D., Kingho, J. R., Den, C. A. M. J. J. Van, & Fiers, W. (1991). Efficient KEX2-like processing of a glucoamylase-interleukin-6 fusion protein by *Aspergillus nidulans* and secretion of mature interleukin-6. *Nature Biotechnology*, 9(April), 9–12.
- Quaas, R., McKeown, Y., Stanssens, P., Frank, R., Blöcker, H., & Hahn, U. (1988). Expression of the chemically synthesized gene for ribonuclease T1 in *Escherichia coli* using a secretion cloning vector. *European Journal of Biochemistry*, 173(3), 617–622. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14043.x>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). *Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges*. 5(April), 1–17.

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>

- Sinha, V., Patel, M. R., & Patel, J. V. (2010). Pet waste management by chemical recycling: A review. *Journal of Polymers and the Environment*, 18(1), 8–25. <https://doi.org/10.1007/s10924-008-0106-7>
- Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H., Choi, S. Y., ... Kim, K. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation [Research-article]. *ACS Catalysis*, 9, 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00568>
- Trono, D. (2019). Recombinant Enzymes in the Food and Pharmaceutical Industries. In *Advances in Enzyme Technology*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64114-4.00013-3>
- UniProt. (2020). Poly(ethylene terephthalate) hydrolase. Retrieved from <https://www.uniprot.org/uniprot/A0A0K8P6T7>
- van Hartingsveldt, W., van Zeijl, C. M. J., Hartevelde, G. M., Gouka, R. J., Suykerbuyk, M. E. G., Luiten, R. G. M., ... van den Hondel, C. A. M. J. J. (1993). Cloning, characterization and overexpression of the phytase-encoding gene (phyA) of *Aspergillus niger*. *Gene*, 127(1), 87–94. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90620-l](https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90620-l)
- Ward, Michael., Wilson, Lori ., Kodama, Khaterine., Rey, Michael., Berka, R. (1990). Improved production of chymosin in *Aspergillus* by expression ass a glucoamylase-chymosin fusion. *Nature Biotechnology*, 8.
- Ward, M., Lin, C., Victoria, D. C., Fox, B. P., Fox, J. A., Wong, D. L., ... Wang, H. (2004). Characterization of humanized antibodies secreted by *Aspergillus niger*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(5), 2567–2576. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.5.2567-2576.2004>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... Oda, K. (2016). *A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate)*. 351(6278), 1–5.