



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de la termoestabilidad de la cutinasa recombinante I de *Aspergillus nidulans* (ANCUT1) expresada en *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Karla Fernanda Ramírez González

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Amelia Farrés González-Sarabia  
[Facultad de Química, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Adela Rodríguez Romero  
[Instituto de Química, UNAM](#)

Dr. Rogelio Rodríguez Sotres  
[Facultad de Química, UNAM](#)

Ciudad de México, noviembre, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** Garza Ramos Martínez Georgina

**SECRETARIO:** González Segura Lilian

**VOCAL:** García Hernández Enrique

**VOCAL:** Olguin Contreras Luis Fernando

**VOCAL:** Rudiño Piñera Enrique

**ASESOR:** Dra. Amelía María de Guadalupe Farrés González Saravia

**SUSTENTANTE:** Karla Fernanda Ramírez González

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 312 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo financiero del CONACYT (beca de maestría, CVU: 929805), PAIP 5000-9095 y PAPIIT IT 201921.

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 12 |
| 1.1 Cutinasas: enzimas con capacidades más allá de la degradación de cutina .....   | 12 |
| 1.2 Aplicación de las cutinasas para atender un problema mundial: acumulación de PET  | 14 |
| 1.3 Importancia de la termoestabilidad en la aplicación de las cutinasas .....  | 16 |
| 1.4 Características estructurales que contribuyen a la termoestabilidad .....   | 17 |
| 1.4.1 Puentes de hidrógeno.....   | 17 |
| 1.4.2 Puentes salinos .....   | 18 |
| 1.4.3 Interacciones aromáticas.....   | 18 |
| 1.4.4 Interacciones hidrofóbicas .....  | 19 |
| 1.4.5 Interacciones covalentes: Puentes disulfuro.....  | 20 |
| 1.4.6 Aumento de prolinas y/o de disminución de glicinas .....  | 20 |
| 1.4.7 Introducción de sitios de glicosilación .....   | 21 |
| 1.5 Estrategias de diseño de nuevas proteínas .....   | 21 |
| 1.5.1 Diseño basado en secuencia.....   | 22 |
| 1.5.2 Diseño basado en estructura .....   | 23 |
| 1.6 Predicción de la termoestabilidad por $\Delta\Delta G$ .....  | 23 |
| 1.7 Medición experimental de la termoestabilidad .....  | 24 |
| 1.8 Ventajas de <i>Escherichia coli</i> como organismo de expresión de enzimas recombinantes .....  | 25 |
| 2. Antecedentes .....   | 27 |
| 2.1 ANCUT1.....   | 27 |
| 2.1.1 Clonación de <i>ancut1</i> en <i>Pichia pastoris</i> X-33 y caracterización bioquímica de ANCUT1 recombinante.....                          | 27 |
| 2.1.2 ANCUT1 tiene capacidad para despolimerizar PET y disminuir su cristalinidad.....  | 28 |
| 2.1.3 Modelado de ANCUT1 con Alpha Fold y predicción del sitio de unión a PET   | 30 |
| 2.2 Caracterización de las propiedades enzimáticas de la cutinasa de <i>Humicola insolens</i> (HiC), una enzima termófila homóloga a ANCUT1 ..... | 32 |
| 2.3 Aumento de la termoestabilidad por ingeniería de proteínas .....  | 32 |
| 2.3.1 Mejora de la termoestabilidad por medio de diseño basado en estructura....  | 32 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.1.1 Aumento en la termoestabilidad de la cutinasa de <i>Aspergillus oryzae</i> (AOC) por diseño racional .....                      | 32 |
| 2.3.1.2 Mejora de la termoestabilidad de una hidrolasa por introducción de argininas en su superficie .....                             | 33 |
| 2.3.1.3 La ingeniería de un sitio de glicosilación inhibe la agregación térmica....   | 33 |
| 2.3.1.4 El reemplazo de un sitio de unión a calcio por un puente disulfuro aporta estabilidad térmica .....                             | 34 |
| 2.3.1.5 Obtención de la hidrolasa de PET más eficiente hasta la fecha.....  | 34 |
| 2.3.2 Mejora de la termoestabilidad por medio de diseño basado en secuencia....   | 36 |
| 2.3.2.1 Estudio de los cambios en las propiedades térmicas y cinéticas de tres variantes alélicas de una hidrolasa $\alpha/\beta$ ..... | 36 |
| 2.3.2.2 Estudio de las bases moleculares de las propiedades térmicas de una fumarasa .....  | 36 |
| 3. Justificación.....   | 38 |
| 4. Hipótesis .....  | 39 |
| 5. Objetivos .....  | 40 |
| 5.1 Objetivos particulares .....  | 40 |
| 6. Estrategia general .....   | 41 |
| 7. Materiales y métodos .....   | 42 |
| 7.1 Análisis bioinformático .....   | 42 |
| 7.1.1 Alineamiento de secuencias .....  | 42 |
| 7.1.2 Predicción del cambio en la estabilidad por introducción de una sustitución. 42   |    |
| 7.1.2.1 Análisis del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) por método rápido  | 42 |
| 7.1.2.2 Análisis de interacciones intramoleculares .....  | 42 |
| 7.2 Cepas y medios de cultivo usados.....   | 42 |
| 7.3 Preparación de células competentes .....  | 43 |
| 7.3.1 Células de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ quimiocompetentes .....  | 43 |
| 7.4 Transformación de células .....   | 44 |
| 7.4.1 Transformación de DH5 $\alpha$ .....  | 44 |
| 7.5 Purificación de DNA.....  | 44 |
| 7.5.1 Extracción y purificación de plásmidos .....  | 44 |
| 7.5.2 Purificación de productos de ligación o PCR .....   | 44 |
| 7.6 Concentración de los productos de purificación.....   | 45 |
| 7.7 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) y oligonucleótidos usados para ellas .....   | 45 |

|   |    |
|---|----|
| 7.7.1 Amplificación para confirmar la presencia del vector pET22 en <i>E. coli</i> DH5α y BL21 .....            | 45 |
| 7.8 Reacciones de digestión y ligación .....  | 46 |
| 7.8.1 Digestión de pET22 y pUCIDT-AMP .....   | 46 |
| 7.8.2 Ligación .....  | 46 |
| 7.9 Secuenciación.....  | 46 |
| 7.10 Expresión y extracción de ANCUT1 nativa y variante K53I en <i>E. coli</i> .....                            | 47 |
| 7.10.1 Diseño y síntesis del gen <i>ancut1</i> optimizado para expresión en <i>E. coli</i> .....                | 47 |
| 7.10.2 Producción de ANCUT1.....  | 47 |
| 7.10.3 Extracción .....   | 48 |
| 7.10.3.1 Obtención de sobrenadante .....  | 48 |
| 7.10.3.2 Choque osmótico para extracción de proteínas de periplasma.....  | 48 |
| 7.11 Estudio de ANCUT1 producida en <i>E. coli</i> .....  | 48 |
| 7.11.1 Concentración.....   | 48 |
| 7.11.2 Identificación.....  | 49 |
| 7.11.3 Determinación cualitativa de actividad.....  | 49 |
| 7.11.4 Cuantificación de proteína total .....   | 50 |
| 7.11.5 Determinación cuantitativa de actividad .....  | 50 |
| 7.11.6 Estudio de termoestabilidad.....   | 50 |
| 7.11.6.1 Determinación de la temperatura de inactivación media .....  | 50 |
| 7.11.6.2 Determinación de actividad enzimática en función de la temperatura hacia pNPB .....                    | 51 |
| 7.12 Análisis estadísticos.....   | 51 |
| 8. Resultados y Discusión .....   | 52 |
| 8.1. Análisis <i>in silico</i> de la proteína e identificación de sitios a modificar .....                      | 52 |
| 8.1.1 Alineamiento de secuencias de residuos de ANCUT1 y una enzima homóloga altamente termoestable (HiC) ..... | 53 |
| 8.1.2 Evaluación de termoestabilidad <i>in silico</i> del modelo de ANCUT1 generado con Alpha Fold.....         | 54 |
| 8.2 Diseño del sistema de expresión en <i>E. coli</i> .....   | 56 |
| 8.2.1 Diseño de la secuencia de <i>ancut1</i> nativo, optimizado para expresión en <i>E. coli</i> .....         | 57 |
| 8.2.2 Diseño de la secuencia de <i>ancut1</i> nativo, optimizado para expresión en <i>E. coli</i> .....         | 58 |

|  |    |
|--|----|
| 8.2.3 Clonación de los genes <i>ancut1</i> nativo y codificante para la variante K53I en el vector pET22b .....      | 59 |
| 8.2.4 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 con los vectores pET22b- <i>ancut1</i> y pET22b- <i>ancut1</i> K53I ..... | 62 |
| 8.2.5 Estudio de ANCUT1 nativa y K53I producidas en <i>E. coli</i> .....   | 62 |
| 8.3 Estudio de la termoestabilidad de Ancut1 nativa y variante K53I.....   | 68 |
| 8.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad residual de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB.....                      | 68 |
| 8.3.2 Temperatura de máxima actividad de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB   | 73 |
| 9. Conclusiones.....   | 75 |
| 10. Perspectivas.....  | 76 |
| 11. Referencias .....  | 77 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Producción y acción de las cutinasas. ....  | 12 |
| Figura 2. Estructura cristalográfica de una cutinasa. ....  | 15 |
| Figura 3. Estructura molecular del PET.....   | 15 |
| Figura 4. Actividad máxima de ANCUT1 producida en <i>Pichia pastoris</i> en función de pH y temperatura .....   | 27 |
| Figura 5. Disminución de la cristalinidad de PET tratado con ANCU1 producida en <i>P. pastoris</i> .....  | 28 |
| Figura 6. Productos de la reacción de PET tratado con ANCUT1 producida en <i>P. pastoris</i> .....  | 29 |
| Figura 7. Modelo de ANCUT1 obtenido con Alpha Fold, acoplado a PET. ....  | 31 |
| Figura 8. Caracterización de la cutinasa HiC, silvestre y mutantes.....   | 32 |
| Figura 9. Hidrólisis de PET por TfCut2.....   | 34 |
| Figura 10. Búsqueda de sitios de unión de iones divalentes en LCC y adición de un puente disulfuro.....   | 35 |
| Figura 11. Determinación de la T <sub>m</sub> de LCC nativa y variante D238C/S283C por fluorometría diferencial de barrido en función de la concentración de CaCl <sub>2</sub> . .... | 35 |
| Figura 12. Estrategia general usada en el presente trabajo.....   | 41 |
| Figura 13. Alineamiento de secuencias de residuos de ANCUT1 y HiC .....   | 54 |
| Figura 14. Modelo de ANCUT1 variante K53I.....  | 56 |
| Figura 15. Secuencia de ancut1 optimizada para expresión en <i>E. coli</i> .....  | 57 |
| Figura 16. Secuencia de ancut1 K53I con codones optimizados para expresión en <i>E. coli</i> .....  | 58 |
| Figura 17. Esquema de la clonación del gen ancut1 optimizado para expresión en <i>E. coli</i> el vector pET22b.....   | 61 |
| Figura 18. Esquema del vector pET22-ancut1. ....  | 60 |
| Figura 19. Digestión de pET22 y pUCIDT-AMP-ancut1 con NcoI y XhoI.....  | 61 |
| Figura 20. Recortes de bandas para la purificación de los fragmentos a ligar para generar el vector pET22-ancut1.....   | 61 |
| Figura 21. Comprobación de la transformación de <i>E. coli</i> con los productos de la ligación del vector pET22b y <i>ancut1</i> nativa y variante K53I. ....                        | 62 |
| Figura 22. Perfiles de proteínas presentes en muestras de ANCUT1 nativa .....   | 63 |
| Figura 23. Perfiles de proteínas presentes en muestras de ACUT1 variante K53I. ....   | 64 |
| Figura 24. Zimograma de muestras de ANCUT1 nativa.....  | 65 |
| Figura 25. Zimograma de muestras de ANCUT1 K53I.....  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 26. Actividad residual de ANCUT1 nativa hacia pNPB de 35-60°C después de 15, 30 y 60 minutos.....                                      | 69 |
| Figura 27. Actividad residual de ANCUT1 K53I hacia pNPB de 35-60°C después de 15, 30 y 60 minutos.....  | 70 |
| Figura 28. Comparación de la actividad residual de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB de 65-75°C después de 15, 30 y 60 minutos .....            | 71 |
| Figura 29. Comparación de la actividad residual de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB de 70-90°C después de 15, 30 y 60 minutos .....            | 72 |
| Figura 30. Comparación de actividad residual hacia pNPB de ANCUT1 nativa y K53I después de 60 minutos a distintas temperaturas (35-90°C)..... | 73 |
| Figura 31. Actividad de ANCUT1 nativa hacia pNPB en función de la temperatura, de 40-90 °C.....   | 74 |
| Figura 32. Actividad de ANCUT1 K53I hacia pNPB en función de la temperatura, de 40-90 °C .....  | 74 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Determinación de la actividad volumétrica y específica de ANCUT1 recombinante de <i>A. nidulans</i> producida en <i>Pichia pastoris</i> obtenida del sobrenadante..... | 28 |
| Tabla 2. Medios de cultivo usados.....  | 43 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos usados para amplificar secuencia entre promotor y terminador de T7 en vector pET22b.....  | 45 |
| Tabla 4. Predicción de las interacciones intraproteína de ANCUT1, nativa y variantes.....   | 55 |
| Tabla 5. Impacto en la estabilidad de ANCUT1 con distintas sustituciones de residuos, por predicción del $\Delta\Delta G$ , en distintos servidores.....                        | 55 |
| Tabla 6. Actividad volumétrica y específica determinada para ANCUT1 nativa y variante hacia pNPB.....   | 66 |
| Tabla 7. Comparación de la actividad específica de distintas cutinasas hacia p-nitrofenol.....  | 68 |

## Resumen

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son serin esterases cuyos sitios activos se encuentran abiertos, lo cual permite que actúen sobre una amplia variedad de sustratos incluyendo ácidos grasos solubles, triglicéridos, poliésteres insolubles como la cutina e incluso, el tereftalato de polietileno (PET) (Dong *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). Este último representa un desecho recalcitrante que ha generado una grave contaminación ambiental, la cual es necesario abordar y resolver.

En el equipo de trabajo, Morales-García (2018) demostró la capacidad de despolimerización de PET por la cutinasa recombinante 1 de *Aspergillus nidulans* (ANCU1) producida en *Pichia pastoris*, lo cual señaló su potencial como método de reciclaje de PET, pero su actividad eficiente depende, entre otros factores, de que la enzima sea activa en altas temperaturas, pues se aumenta la flexibilidad de las cadenas del polímero y la enzima tiene mayor acceso. Debido a esto, en el presente se trabajó con el objetivo de aumentar la termoestabilidad de la enzima, así como de encontrar un sistema competitivo para la producción de esta.

Para lograr tales objetivos se trabajó con modelos de la enzima y por medio de análisis *in silico*, se propuso una variante con potencial de mayor termoestabilidad. Se clonaron, los genes silvestre y mutante, optimizados para la expresión en *Escherichia coli* en el vector pET22b. Una vez obtenidas las enzimas recombinantes en *E. coli*, se realizó su caracterización térmica, observando un aumento en la actividad residual de la variante en comparación con la nativa a temperaturas de 60-90°C. Además, se comprobó que hubo un aumento en la temperatura de mayor actividad de la enzima variante, yendo de 55°C en la enzima silvestre a un rango de 65-75°C para la variante.

Esto demostró que la sustitución de un residuo cuidadosamente elegido genera una variante de ANCU1 con mayor termoestabilidad que su contraparte nativa. La razón de las diferencias reportadas aún debe ser investigada.

Adicionalmente, se demostró por primera vez que *E. coli* es un modelo adecuado para la expresión extracelular de ANCU1 y tiene potencial para competir con la producción en *Pichia pastoris*, pero aún se debe optimizar la producción en la bacteria para que puedan ser comparables.

## Abstract

Cutinases (E.C. 3.1.1.74) are serin esterases (Martínez & Maicas, 2021) with an open active site, which allows them to act on a wide variety of substates including soluble fatty acids, triglycerides, insoluble polyesters like cutin and even polyethylene terephthalate (PET) (Dong *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2023). The last one represents a recalcitrant waste that, along with others, has caused a global pollution crisis that needs to be addressed and solved.

In the research group, Morales-García (2018) demonstrated the PET depolymerization ability of the cutinase recombinant 1 from *Aspergillus nidulans* (ANCU1) produced in *Pichia pastoris*, which pointed at its potential as a recycling method of PET. But the enzyme's efficient activity against the plastic depends, along with other factors, on the enzyme's capacity to be active at high temperatures, because it is when there is a considerable increase in the polymer's chain mobility and the enzyme can access better. That is why the aims of the present project were to increase the enzyme's thermostability, as well as finding an adequate system to express it.

To achieve that, models of the enzymes were employed to make *in silico* analysis and that way, a potentially more thermostable variant was proposed. Wild-type and mutant genes were optimized for their expression in *Escherichia coli* and cloned in the expression vector pET22b.

Once the recombinant enzymes were obtained from *E. coli*, they were thermally characterized, and it was observed that the variant's residual activity was higher compared to the native enzyme at 60-90°C. Also, an increase in the optimal temperature of the variant (65-75°C), compared to the native's (55°C), was clearly discerned. This showed that the substitution of a thoughtfully selected residue generates a more thermostable ANCUT1 variant compared to its native counterpart. The reasons behind the observed differences need to be addressed.

Additionally, *E. coli*'s adequacy to extracellularly produce ANCUT1 was demonstrated for the first time, indicating its potential to compete with the production in *P. pastoris* although it is still needed to optimize the production in the bacteria.

# 1. Introducción

## 1.1 Cutinasas: enzimas con capacidades más allá de la degradación de cutina

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son serin esterases pertenecientes a la familia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas. Secretadas naturalmente por bacterias y hongos fitopatógenos, facilitan la invasión a sus hospederos, las plantas (Fig.1), penetrando su capa de cutina (Kawabata *et al.*, 2017; Martínez & Maicas, 2021), la cual es la cubierta protectora de biopolíester alifático que se encuentra en las hojas y en la fruta (Shirke *et al.*, 2016; Liang & Zou, 2022). Consiste de una matriz de poliéster lípido insoluble entrelazado, compuesta de  $n$ -C17 y  $n$ -C18 hidroxí y epoxi ácidos grasos, que sirve como una barrera contra la deshidratación y la invasión (Liu *et al.*, 2009).

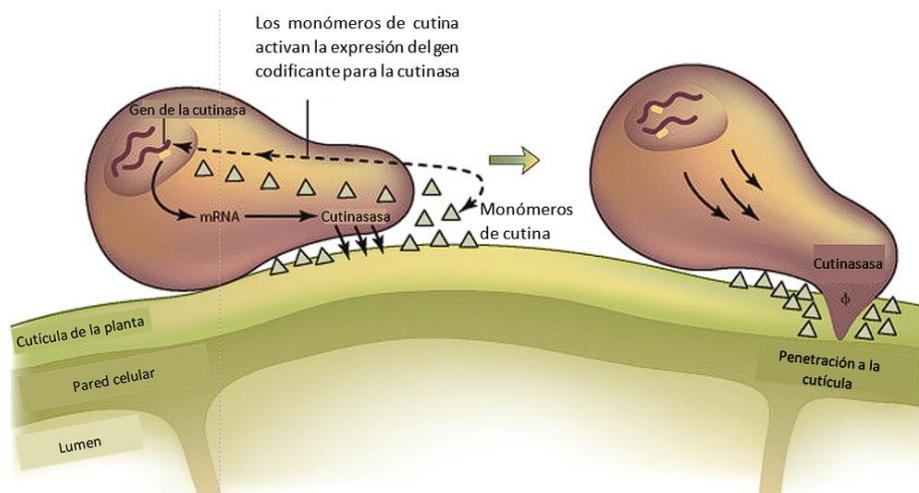


Figura 1. Producción y acción de las cutinasas. La presencia de monómeros de cutina desencadena la expresión del gen que codifica a la cutinasa. Este gen se traduce y el producto se secreta para poder actuar sobre su blanco, la cutina, lo cual le permite al patógeno infectar a su huésped (Agris, 2005).

Las cutinasas tienen una triada catalítica Ser-His-Asp y dos residuos adicionales que forman un agujero oxianión por medio de las amidas de su cadena principal (Fig. 2), lo que estabiliza el estado de transición (Castro-Rodríguez *et al.*, 2023). El mecanismo de hidrólisis de las cutinasas se logra en dos pasos de acilación/deacilación, incluyendo la formación de un intermediario covalente entre el grupo carbonil del éster que se está hidrolizando y la serina catalítica (Nikolaivits *et al.*, 2018).

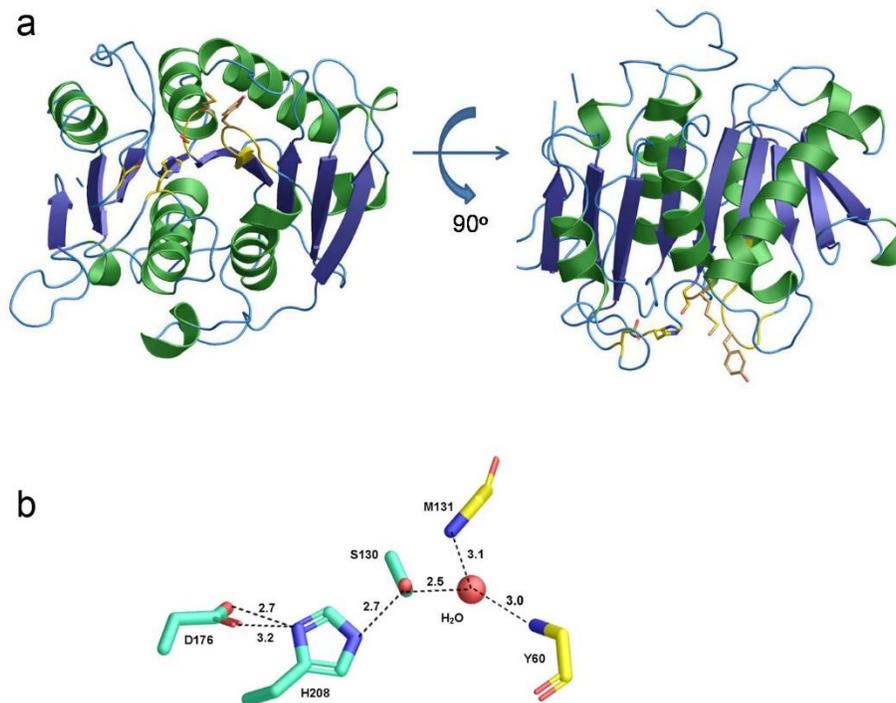


Figura 2. Estructura cristalográfica de una cutinasa (cutinasa de *Thermobifida fusca*). a) Estructura general de una cutinasa mostrada en dos vistas perpendiculares; se muestran las hojas  $\beta$  en color azul,  $\alpha$ -hélices en color verde y los bucles en azul claro, los residuos de la triada catalítica y del agujero oxianión se muestran en bastones amarillos. b) Sitio activo de la cutinasa, los residuos catalíticos se muestran en color verde (D176, H208 y S130), los residuos del agujero oxianión se muestran en color amarillo (Y60 y M131) y el hidrógeno en el sitio de unión de sustrato se muestra como una esfera roja (Dong *et al.*, 2020).

Las cutinasas son típicamente consideradas como estructuras intermedias entre lipasas y esterasas debido a que presentan características pertenecientes a ambas (Martínez & Maicas, 2021), pero, a diferencia de las lipasas que poseen una tapa que cubre su sitio activo, las cutinasas tienen un sitio activo abierto, permitiendo el acceso fácil de sustratos, como polímeros rígidos o complejos, a la serina catalítica, que está expuesta al solvente. Además, el sitio de unión a sustrato es más grande en comparación con las esterasas, lo que beneficia la unión de macromoléculas de mayor tamaño (Yang *et al.*, 2023). Este fácil acceso se considera la razón por la que las cutinasas pueden actuar sobre una amplia variedad de sustratos incluyendo ácidos grasos solubles, triglicéridos, poliésteres insolubles como la cutina e incluso, el tereftalato de polietileno (PET) (Dong *et al.*, 2020).

Estructuralmente, tanto las cutinasas bacterianas, como fúngicas, tienen un plegamiento  $\alpha/\beta$  similar, pero difieren mucho en sus extremos N y C terminales y las bacterianas tienden a ser más grandes. Además, las cutinasas bacterianas presentan normalmente un puente disulfuro, mientras que las fúngicas presentan dos o tres (Nikolaivits *et al.*, 2018). El peso molecular de las cutinasas fúngicas varía entre 22 y 26 kDa, presentan actividad máxima cuando el pH es de 10, cuando la cutina es sustrato. mientras que en las bacterianas varía entre 8.5 y 10.5. También se sabe que las cutinasas bacterianas presentan una termoestabilidad mucho mayor que sus contrapartes fúngicas, posiblemente debido a que las primeras provienen de fuentes termófilas; por ello, actúan a temperaturas que se encuentran entre 50 y 60°C, en cambio, las de hongos varían entre 30 y 40°C (Liang & Zou, 2022), aunque hay algunos reportes de algunas que pueden actuar a 55, 60 y 80°C en TtcutB de *Thielavia terrestris* (Xu *et al.*, 2015), ANCUT2 de *Aspergillus nidulans* (Bermudez-Garcia *et al.*, 2017) y HiC de *Humicola insolens*, respectivamente (Su *et al.*, 2020).

## 1.2 Aplicación de las cutinasas para atender un problema mundial: acumulación de PET

En el mundo se producen anualmente alrededor de 390 millones de toneladas de plástico de origen fósil (Plastics-The Facts, 2022), de los cuales, entre 150 y 200 millones de toneladas terminan acumuladas en basureros o en ambientes naturales (Tournier *et al.*, 2020), y se ha estimado, considerando estas tendencias, que para el año 2050, 12,000 millones de toneladas de basura plástica terminarán en esos sitios (Nikolaivits *et al.*, 2018).

El PET es el plástico tipo poliéster más abundante, con casi 70 millones de toneladas manufacturadas al año en el mundo (Diao *et al.*, 2023). Debido a su versatilidad, bajo costo, ligereza, facilidad de procesamiento y manufactura, así como propiedades mecánicas y térmicas satisfactorias, tiene un amplio número de aplicaciones en nuestra vida diaria en muchas áreas, desde material de empaque y transporte de materiales y bebidas, hasta la industria textil, pero solo, alrededor del 10% del total de producción, es reciclado (Wei & Zimmerman, 2017).

Lo anterior ha generado que se preste más atención al impacto ambiental de la basura plástica acumulada, el cual es grave y aún no se conocen todas sus consecuencias. Se reconoce que el desarrollo de estrategias para degradar al PET es de vital importancia, aunque es un objetivo complicado debido a su estructura y composición: es un polímero heteroatómico de alto peso molecular cuyos monómeros son el etilenglicol y el ácido tereftálico (TPA) unidos por enlaces éster (Fig. 3). Presenta una alta proporción de unidades aromáticas de tereftalato, que reducen la movilidad de la cadena, lo cual hace que su hidrólisis sea extremadamente difícil. Es un termoplástico semicristalino compuesto por regiones cristalinas con moléculas altamente empaçadas y regiones amorfas con microestructuras desorganizadas (Wei *et al.*, 2022).

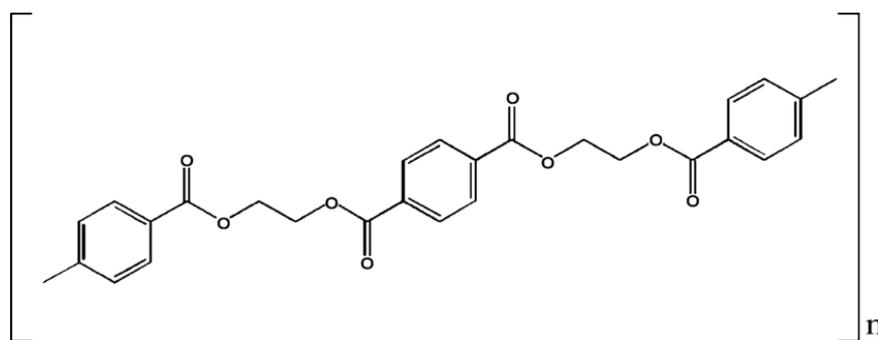


Figura 3. Estructura molecular del PET. Fischer-Colbrie *et al.*, 2004.

Los métodos de degradación química incluyen glicólisis, metanólisis, hidrólisis, aminólisis y amoniólisis, mientras que los físicos son fotodegradación U.V., degradación térmica y degradación oxidativa. Estos métodos requieren generalmente altas temperaturas de reacción y usualmente producen más contaminación ambiental (Joo *et al.*, 2018). Además, estos procesos de reciclaje resultan en la pérdida de las propiedades mecánicas del PET y generan impactos ambientales y económicos negativos, por lo que la síntesis *de novo* se prefiere y los desechos de PET continúan acumulándose (Tournier *et al.*, 2020).

Después de décadas de ser considerado no biodegradable, ha ocurrido un cambio de paradigma en los últimos años, con la publicación de estudios reportando su despolimerización monomérica *in vivo* e *in vitro*, con tasas de reacción más rápidas observadas en los procesos catalizados por enzimas que en aquellos donde se usaron microorganismos (Machado de Castro *et al.*, 2019).

El uso de enzimas para la degradación del PET es una opción conveniente debido a su renovabilidad, no toxicidad, especificidad y acción bajo condiciones de presión y temperatura templada; representando una alternativa de reciclaje de polímeros amigable con el ambiente (Kaabel *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

A la fecha, se reconocen dos tipos de enzimas que pueden actuar sobre el PET: las enzimas modificadoras de superficie, que actúan sobre la superficie del polímero e incrementan su hidrofiliidad, pero no tienen efecto en su morfología; entre ellas podemos encontrar lipasas, carboxil esterases, proteasas y cutinasas. El segundo grupo son las hidrolasas de PET, que son capaces de romper los bloques internos del PET y cambiar su estructura. Estas enzimas muestran gran afinidad por la superficie del polímero y alta especificidad por sus los enlaces éster. Todas las hidrolasas de PET conocidas pertenecen a la familia de las cutinasas (Kawai *et al.*, 2019; Castro-Rodríguez *et al.*, 2023).

### 1.3 Importancia de la termoestabilidad en la aplicación de las cutinasas

La aplicación industrial de las enzimas está usualmente limitada por su poca estabilidad bajo condiciones de reacción que difieren de las de los ambientes normales o típicos para ellas (Sharma *et al.*, 2019). En este contexto, la estabilidad se define como la resistencia de las enzimas a la desnaturalización o pérdida de actividad causada por distintos tipos de estrés como presión, exposición a desnaturalizantes o inhibidores y altas temperatura (Shirke *et al.*, 2016). En particular, la termoestabilidad de las enzimas es deseable ya que las cinéticas de reacción más productivas están generalmente favorecidas por altas temperaturas (Ban *et al.*, 2021).

En el caso particular de las cutinasas, la eficiencia para hidrolizar poliésteres es altamente dependiente de parámetros como grado de la cristalinidad del polímero, tamaño de la partícula, inhibición causada por los productos de la hidrólisis y temperatura de reacción (Castro-Rodríguez *et al.*, 2023), en especial, que la enzima funcione por arriba de la temperatura de transición vítrea del sustrato o  $T_g$ , que es aquella en la que la movilidad y flexibilidad de las cadenas incrementa considerablemente, así, el sitio activo de la enzima tiene mayor acceso a los grupos lábiles, incrementando su biodegradabilidad (Then *et al.*, 2015). El valor de  $T_g$  del PET es de aproximadamente 80°C, pero disminuye a 60-65°C en solución debido a que el agua se difunde entre las cadenas del polímero, aumentando su movilidad (Kawai *et al.*, 2019).

La termoestabilidad de las enzimas está predeterminada estructuralmente (Ban *et al.*, 2021) y se ha comprobado la importante relación entre la configuración y la termoestabilidad por medio de estudios comparativos de estructuras cristalográficas de proteínas mesófilas y termófilas, teniendo estas últimas características distintivas (Xu *et al.*, 2020). El conocimiento de estas características y la forma en la que afectan a la estructura y estabilidad de las proteínas permite que las modificaciones estructurales realizadas por medio de ingeniería de proteínas sea un enfoque efectivo y confiable para el diseño de enzimas (Machado de Castro *et al.*, 2019).

## 1.4 Características estructurales que contribuyen a la termoestabilidad

### 1.4.1 Puentes de hidrógeno

Los puentes de hidrógeno (HB, por sus siglas en inglés) son factores importantes para la estabilización de la estructura secundaria. De acuerdo con estudios cristalográficos, las enzimas termófilas tienen más HBs que las mesófilas (Tompa *et al.*, 2016) y la presencia de HBs más favorables es la explicación fisicoquímica más citada para el aumento de termoestabilidad. Además, se ha demostrado que fortalecer las redes existentes formadas por estas interacciones y agregar nuevos HBs intraproteína y proteína-solvente por medio de mutaciones en los aminoácidos, tiene un efecto positivo sobre la estabilidad y sigue siendo, hoy en día, la principal modificación a la que se recurre para mejorar la termoestabilidad (Khan, 2021).

### 1.4.2 Puentes salinos

Los puentes salinos (PS), también conocidos como pares iónicos, se forman entre residuos de aminoácidos con cargas opuestas cuando están suficientemente cerca para experimentar atracción electrostática, típicamente a menos de 4 Å de distancia (Ban *et al.*, 2021). Se localizan normalmente en la superficie de las proteínas y juegan un papel importante en la termoestabilidad de la estructura terciaria, particularmente a temperaturas altas, debido a que, en general, rigidizan la estructura y así contribuyen a la estabilidad frente a estrés térmico. Las proteínas hipertermófilas suelen poseer más PSs que las mesófilas y su estabilidad depende más de estas interacciones que de HBs e interacciones hidrofóbicas (Folch *et al.*, 2008).

Debido a que no todos los PSs contribuyen a la estabilidad y que aún es difícil predecir las posiciones en las que los cambios a residuos cargados resultarán efectivos para formar un PS deseable, la identificación de residuos flexibles en la estructura de la proteína y su reemplazo por residuos cargados es la estrategia más usada para introducir PSs (Ban *et al.*, 2020). La mayoría de las mutaciones predichas computacionalmente tienden a eliminar los parches hidrofóbicos de la superficie de la proteína e introducir PSs superficiales. Las conformaciones geométricas específicas deben tomarse en cuenta para el diseño, en particular para filtrar las mutaciones potenciales obtenidas *in silico*, pues los PSs no siempre sirven para estabilizar, incluso pudiendo generar el efecto contrario (Lee *et al.*, 2016).

### 1.4.3 Interacciones aromáticas

Las interacciones aromáticas (IAs), también conocidas como apilamiento Pi, o apilamiento P-P, son un tipo de interacción no covalente entre dos anillos aromáticos con una distancia de menos de 7 Å. Se considera un mecanismo importante de estabilización de la estructura proteica, pues las IAs, al presentar características tanto de puentes de hidrógeno como de interacciones hidrofóbicas, pueden aportar fuerzas de van de Waals e interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Tatko & Waters, 2002). Pero, estas interacciones requieren una orientación específica de los dos anillos aromáticos

(apilamiento en capas o bordes enfrentados) y normalmente existen dentro de una red y no por sí solas, por lo que el diseño de IAs puede ser complicado. Los métodos más eficientes para introducir IAs potenciales son por medio de evolución dirigida y rigidizar los sitios flexibles (Xu *et al.*, 2020).

#### 1.4.4 Interacciones hidrofóbicas

Las interacciones hidrofóbicas (IHs) tienen un papel crucial en el plegamiento de las proteínas y la estabilización, particularmente de la estructura terciaria. La presencia de más IHs normalmente resulta en una tasa más baja de desnaturalización térmica a temperaturas altas, porque este tipo de interacciones se estabiliza o se hace más fuerte cuando la temperatura aumenta (Rathi *et al.*, 2015; Chakravorty *et al.*, 2017). En las proteínas termófilas, hay una gran cantidad de residuos cargados en el exterior y un incremento de residuos hidrofóbicos en el centro, comparado con sus contrapartes mesófilas (Sammond *et al.*, 2016).

La introducción de IHs se ha probado efectiva en la estabilización de distintas proteínas a altas temperaturas. Al incrementar la hidrofobicidad interna se favorece la alta compactación del centro, que ya es hidrofóbico, y esto contribuye a la termoestabilidad (Kim *et al.*, 2012). Además, hay un alto número de reportes en la literatura donde se explica el efecto estabilizador de ciertas mutaciones en términos de sus efectos hidrofóbicos (Silva *et al.*, 2018).

Lograr el aumento en la termoestabilidad por mutaciones simples, especialmente al azar, que incrementen las IHs es un trabajo complejo, pues la mayoría de las enzimas silvestres ya tienen un centro hidrofóbico suficientemente compacto. A pesar de esto, se han desarrollado métodos prometedores para generar proteínas termoestables, como los procesos de detección de defectos en la hidrofobicidad de los centros proteicos, asistidos computacionalmente, seguidos por la introducción de residuos no polares más grandes para rellenar las cavidades, o la remoción de los factores de inestabilidad, como residuos cargados enterrados o HB incompletos (Singh *et al.*, 2019).

### 1.4.5 Interacciones covalentes: Puentes disulfuro

Los puentes disulfuro (PDs) tiene un papel importante en el plegamiento de las proteínas y la estabilización de la estructura terciaria. Muchos estudios han revelado que, especialmente en enzimas termofílicas, los puentes disulfuro son vitales para la termoestabilidad (Then *et al.*, 2016). Sin embargo, hay estudios que sugieren que algunos puentes contribuyen poco a la estabilidad de la proteína e incluso pueden desestabilizarla, por lo que la ingeniería PDs no siempre lleva a resultados satisfactorios (Siddiqui *et al.*, 2005).

La ubicación de los PDs y sus efectos en el plegamiento deben ser considerados para eliminar los efectos adversos que podría conllevar la adición de estas estructuras. Por eso, existe hoy en día un protocolo de ingeniería que filtra PDs problemáticos basándose en la estructura geométrica (distancia, ángulos diédricos e impedimento estérico), flexibilidad local (energía desestabilizante, factor B y RMSD) y ubicación (lejos de la región funcional) (Jo *et al.*, 2016).

### 1.4.6 Aumento de prolinas y/o de disminución de glicinas

La glicina presenta la mayor entropía conformacional, representando una fuente de inestabilidad. Las mutaciones de glicina a alanina dentro de  $\alpha$  hélices pueden contribuir a la termoestabilidad porque la alanina tiene una alta propensión a formar hélices y por su ponderación entrópica (Scott *et al.*, 2007; Yoo *et al.*, 2017). Por otro lado, las prolinas tienen una estructura cíclica (anillo de pirrolidina) en su cadena lateral, lo que le aporta una rigidez conformacional extraordinaria (Klinger *et al.*, 2020). Entonces, la estabilización entrópica por medio de sustituciones es un método atractivo para estabilizar enzimas, particularmente las adaptadas al frío (psicrófilas), y para ello se deben elegir sitios de sustitución adecuada con una alta preferencia hacia prolinas, como bucle, segundas posiciones de los giros  $\beta$  y las posiciones N1 de  $\alpha$  hélices, tomando en cuenta la estructura. Además, para predecir mutaciones que incrementen prolinas y/o disminuyan glicinas es útil enfocarse en rigidizar los sitios flexibles (Xu *et al.*, 2020).

### 1.4.7 Introducción de sitios de glicosilación

La glicosilación es una de las modificaciones postraduccionales más importantes. Es la unión covalente de un oligosacárido a una proteína y ocurre en eucariontes. Este tipo de modificación puede impedir la desnaturalización y agregación térmica, así como disminuir la susceptibilidad a degradación proteolítica, mejorando la estabilidad conformacional de la proteína o imponiendo impedimentos estéricos que inhiben las interacciones proteína-proteína (Zhou & Qiu, 2018). La estabilización por glicosilación depende del número de sitios de glicosilación y su ubicación. Existen dos clases principales de glicosilación natural, O-glicosilación, que ocurre en el oxígeno de cadenas laterales de serina o treonina, y N-glicosilación, que ocurre en el nitrógeno de la cadena lateral de asparagina, encontrada en la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (Shirke *et al.*, 2018)

La ingeniería de sitios de glicosilación puede aportar una solución práctica contra la agregación térmica, y es un nuevo enfoque usado actualmente para mejorar la estabilidad térmica de las enzimas. El área donde se encuentre el sitio de glicosilación determinará directamente si esta modificación puede mejorar la termoestabilidad. El alineamiento de secuencias y la identificación *in silico* de residuos potencialmente accesibles al solvente son herramientas comunes para la introducción de sitios de glicosilación (Reslan *et al.*, 2020).

## 1.5 Estrategias de diseño de nuevas proteínas

Los métodos de ingeniería de proteínas incluyen evolución dirigida, ingeniería racional/semiracional y diseño *de novo*. En el presente trabajo nos enfocaremos en las estrategias racionales/semiracionales, las cuales se basan en la comprensión de la relación entre secuencia/estructura y función de proteínas. Estas pueden dividirse en diseño basado en secuencia y diseño basado en estructura.

### 1.5.1 Diseño basado en secuencia

El diseño basado en secuencia se basa en un análisis de secuencias de proteínas homólogas, mesófilas y termófilas, para poder relacionar la secuencia de la proteína con su termoestabilidad e identificar puntos críticos potenciales que afecten la termoestabilidad (Lehman *et al.*, 2000). Se caracteriza por no necesitar construir grandes bibliotecas de mutantes y, a comparación con el diseño basado en secuencia, requiere menor conocimiento sobre la estructura de la proteína. Este enfoque, seguido por análisis estructural *in silico*, puede identificar mutaciones potencialmente estabilizadoras, por lo que es una de las estrategias más usadas para la ingeniería de proteínas termoestables, en especial aquellas sin estructura conocida disponible (Singh *et al.*, 2020). Las estrategias dentro de esta categoría incluyen comparación de secuencias con distintos grados de termoestabilidad, análisis de consenso y reconstrucción de secuencias ancestrales:

La comparación de secuencias homologas requiere el alineamiento múltiple de secuencias, en el cual se seleccionan secuencias de enzimas con propiedades catalíticas diferentes y se seleccionan residuos diferentes que puedan ser beneficiosos para la estabilidad de la enzima (Li & Tang, 2020).

El análisis de consenso se basa en que, evolutivamente, aquellos residuos que no aportan estabilidad a las enzimas cambian con más frecuencia que aquellos que sí lo hacen, por lo que este enfoque consiste en la obtención de una secuencia consenso, resultado del alineamiento de distintas secuencias homologas y la posterior sustitución de residuos consenso en la proteína de interés que no se encuentren ya en ella (Chi *et al.*, 2023). La reconstrucción de secuencias ancestrales es uno de los enfoques del diseño de proteínas basado en secuencia que puede generar variantes altamente termoestables, reemplazando secuencias modernas con residuos ancestrales identificados por inferencia a partir de árboles filogenéticos de enzimas homólogas existentes (Merkel & Sterner, 2016).

### 1.5.2 Diseño basado en estructura

Por otro lado, el diseño basado en estructura usa la estructura proteica para modelar interacciones moleculares y predecir sustituciones específicas. Se le da especial atención a las regiones flexibles en las proteínas, las cuales son potencialmente iniciadoras de desnaturalización a altas temperaturas. Debido a esto, el enfoque de rigidizar los sitios flexibles en las proteínas es de los más usados hoy en día para la termoestabilización. Este enfoque se basa en la detección de regiones termosensibles y el uso de algoritmos computacionales como FoldX y Rosetta\_ddg (Maguire *et al.*, 2018).

### 1.6 Predicción de la termoestabilidad por $\Delta\Delta G$

La energía libre tiene un papel central en la termodinámica, cinética y por ende, en la estabilidad de una enzima. Cuando no hay información experimental al respecto, se usan comúnmente métodos computacionales para predecir los cambios en la energía libre ( $\Delta\Delta G$ ) por introducción de mutaciones (Aldeghi *et al.*, 2019; Valanciute *et al.*, 2023).

Estos métodos pueden ser clasificados en cuatro categorías generales: potenciales físicos, potenciales estadísticos, potenciales empíricos y métodos de aprendizaje automático. Los primeros tres métodos comparten la característica de depender de funciones de energía (Cheng *et al.*, 2006).

Los potenciales físicos, depende de dinámicas moleculares para simular los campos de fuerza atómicos de una estructura proteica y sus trayectorias de plegamiento para obtener niveles relativos de energía libre. Requiere un gran poder computacional para poder llevarse a cabo (Chen *et al.*, 2020a).

Los potenciales estadísticos, derivan funciones potenciales usando análisis estadísticos de las propensiones ambientales, frecuencias de sustitución y correlación de contacto de los veinte residuos para hacer predicciones, desde una base de datos de estructuras proteicas conocidas (Cheng *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2020a). Su exactitud predictiva es comparable con la de los acercamientos de potenciales físicos y un ejemplo de este tipo de acercamiento es el servidor web MAESTRO (Laimer *et al.*, 2015).

Los potenciales empíricos derivan funciones de energía usando una combinación ponderada de términos de energía física, estadística y descriptores estructurales, además se ajustan las ponderaciones con datos de energía experimental (Cheng *et al.*, 2006). Un ejemplo de este tipo de acercamiento es el servidor web CUPSAT (Parthiban *et al.*, 2007)

Los métodos de aprendizaje automático incluyen máquinas de vectores de soporte (SVM por sus siglas en inglés), redes neuronales artificiales, árboles de decisión, y bosques aleatorios, se usan actualmente para resolver problemas bioinformáticos y pueden ser usados para hacer predicciones por medio del entrenamiento exhaustivo de información relevante (Chen *et al.*, 2020a). Ejemplos de este tipo de acercamiento son los servidores web DeepDDG se basa en redes neuronales artificiales (Cao *et al.*, 2019), PremPS se basa en árboles de decisión (Chen *et al.*, 2020b), MUPRO se basa en SVM (Cheng *et al.*, 2006), I-mutant se basa en redes neuronales y SVM (Capriotti *et al.*, 2005) y iSTABLE (Chen *et al.*, 2020a).

Desde una perspectiva de ajuste de datos, los métodos de aprendizaje automático y los métodos de potenciales empíricos aprenden funciones para predecir cambios energéticos a partir de datos experimentales, pero en lugar de ajustarse a una combinación lineal de términos energéticos, el acercamiento de aprendizaje automático puede aprender funciones no lineales más complejas de información de mutaciones, secuencia de residuos e información estructura. Lo cual es deseable para para capturar interacciones complejas locales y no locales que afectan la estabilidad de las proteínas (Cheng *et al.*, 2006).

## 1.7 Medición experimental de la termoestabilidad

En general, la termoestabilidad de una enzima puede ser caracterizada por su temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) o su periodo de vida media ( $t_{1/2}$ ). La  $T_m$ , caracteriza la reversibilidad de la desnaturalización de las estructuras secundarias y terciarias de una proteína y se considera uno de los parámetros más informativos sobre termoestabilidad, mientras que la  $t_{1/2}$  se refiere al tiempo que le toma a la enzima retener la mitad de su actividad residual a cierta temperatura, lo que indica la estabilidad cinética de una enzima (Xu *et al.*, 2020).

Adicionalmente, la temperatura en la que la mitad de la actividad residual se retiene después de x minutos ( $T_{50x}$ ) es un indicador usado comúnmente para determinar si la inactivación es termodependiente. También se usan la temperatura óptima de reacción enzimática ( $T_{opt}$ ) y la temperatura máxima en la curva de estabilidad, para medir la termoestabilidad (Saqib *et al.*, 2018).

## 1.8 Ventajas de *Escherichia coli* como organismo de expresión de enzimas recombinantes

El estudio de proteínas para su aplicación biotecnológica requiere normalmente de su aislamiento de los componentes celulares y para esto se puede llevar a cabo su purificación, pero este enfoque puede ser complicado e ineficiente, en particular porque los organismos silvestres no sobreproducen las proteínas de interés. Pero la secuencia que codifica para la proteína puede ser clonada en un vector de expresión apropiado y ser transformado en un hospedero como *Escherichia coli* (Rosano *et al.*, 2019).

Hay muchos hospederos usados para la producción de proteínas recombinantes, tanto bacterias, levaduras, plantas y animales. *E. coli* es el principal sistema usado para la producción de proteínas recombinantes en bacterias, no solo para enzimas procariotas, si no, también eucariotas (Kaur *et al.*, 2018), ya que se considera el hospedero más fácil, rápido y barato para la producción de proteínas recombinantes (Hayat *et al.*, 2018). Su empleo para la expresión de proteínas recombinantes presenta muchas ventajas, como requisitos nutricionales simples (Dewin & Fuad, 2020) y, por ende, su capacidad para crecer en medios económicos bajo condiciones de crecimiento controladas (Kaur *et al.*, 2018). Presenta periodos muy cortos de duplicación y, debido a esta alta tasa de crecimiento, la selección de mutantes es fácil y conveniente. Además, las células de *E. coli* son altamente eficientes para recibir e incorporar DNA y expresar altas proporciones de proteínas recombinantes (Kaur *et al.*, 2018). Finalmente, existe una amplia disponibilidad de herramientas y métodos moleculares mejoradas (Terol *et al.*, 2020) debido a que su genética molecular y fisiología celular están bien caracterizadas (Dewin & Fuad, 2020).

Adicionalmente, algunas cepas de *E. coli*, como BL21, están mutadas para ser reguladas transcripcionalmente por el promotor P<sub>T7</sub>, de la RNA polimerasa del bacteriófago, la cual es cinco veces más rápida que la RNA polimerasa de la bacteria, por lo que es un organismo adecuado para la rápida generación de transcritos y sus correspondientes proteínas (Terol *et al.*, 2020) y, a diferencia de las cepas JM109 y DH5 $\alpha$ , BL21 es menos sensible a las condiciones de crecimiento, como alta concentración de glucosa, lo que le permite crecer a más altas densidades (Phue *et al.*, 2008).

Una ventaja más es la existencia de un amplio repertorio de vectores de expresión diseñados para esta bacteria. Usualmente, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se apoya en el uso de vectores de expresión pET, el cual es un sistema de expresión altamente conocido y estudiado que cuenta con un gran repertorio de variaciones y modificaciones (más de 103 vectores diferentes) (Shilling *et al.*, 2020).

## 2. Antecedentes

### 2.1 ANCUT1

#### 2.1.1 Clonación de *ancut1* en *Pichia pastoris* X-33 y caracterización bioquímica de ANCUT1 recombinante

En 2015 en el grupo de trabajo se realizó la clonación del gen *ancut1* de *Aspergillus nidulans* en el vector pPICZ $\alpha$ B y su posterior inserción al genoma de *Pichia pastoris* X-33 (Farrés *et al.*, 2021). Una vez que se obtuvo la enzima recombinante en *P. pastoris*, Solís Báez (2015) procedió a realizar su caracterización bioquímica. La figura 4 muestra que la actividad esterasa máxima en función de la temperatura de reacción se obtiene a 50°C y pH 9, empleando como sustrato p-nitrofenol.

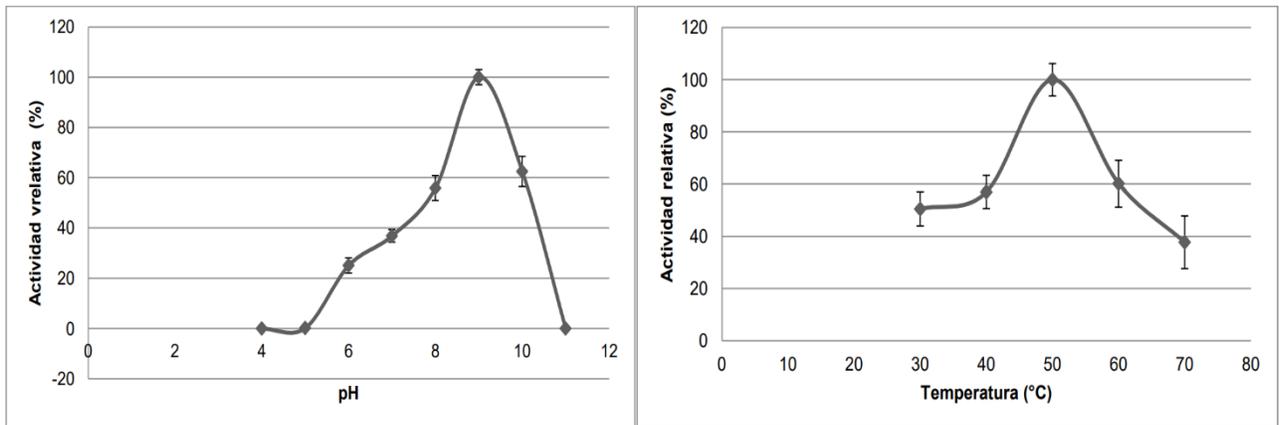


Figura 4. Actividad máxima de ANCUT1 producida en *Pichia pastoris* en función de pH y temperatura. La temperatura para determinar la actividad máxima en función del pH fue de 23°C, mientras que el valor de pH para la determinación de la actividad máxima en función de la temperatura fue de 7. (Soliz-Baez, 2015)

Además, se determinó la actividad volumétrica y específica hacia p-nitrofenol de la enzima después de 24 horas de inducción (Tabla 1).

Tabla 1. Determinación de la actividad volumétrica y específica de ANCUT1 recombinante de *A. nidulans* producida en *Pichia pastoris* obtenida del sobrenadante (Modificado de Soliz-Baez, 2015)

| Volumen de la fracción (mL) | Actividad volumétrica (U/mL) | Actividad específica (U/mg) |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 025                         | 1919.56                      | 6192.13                     |

### 2.1.2 ANCUT1 tiene capacidad para despolimerizar PET y disminuir su cristalinidad.

En 2018, Morales-García demostró la capacidad de ANCUT1 para disminuir la cristalinidad del PET después del tratamiento enzimático y demostró la importancia de un pretratamiento mecánico (molienda) para hacer más eficiente la degradación del poliéster, debido a su impacto en la disminución de la cristalinidad del polímero (Fig. 5).

Además, confirmó la capacidad de ANCUT1 para despolimerizar PET a monómeros, incluyendo TPA y bis-hidroxi etilen tereftalato (BHET) (Fig. 6).

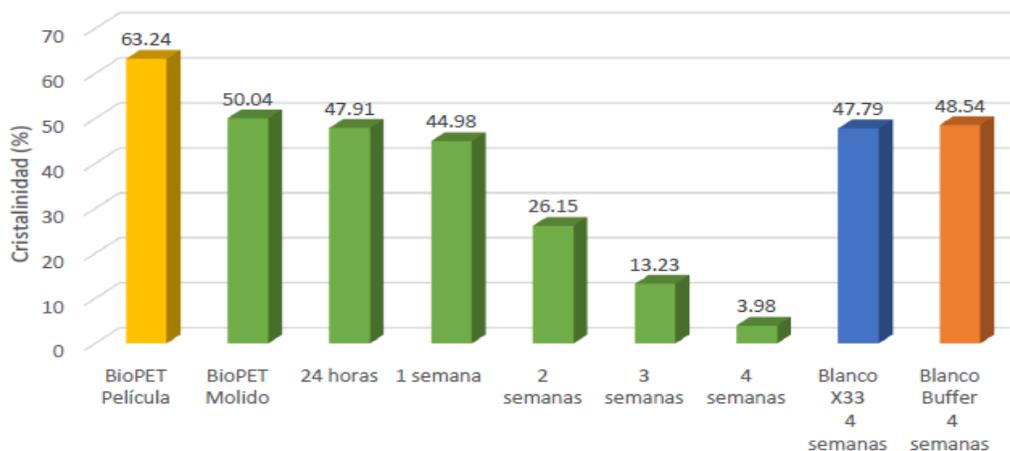


Figura 5. Disminución de la cristalinidad de PET tratado con ANCUT1 de *A. nidulans* producida en *P. pastoris*. Comparación de la cristalinidad del polímero BioPET antes y después del pretratamiento mecánico (dos primeras columnas) y tratamiento con ANCUT1 a 40°C por 4 semanas, determinado por calorimetría diferencial de barrido (Morales-García, 2018).

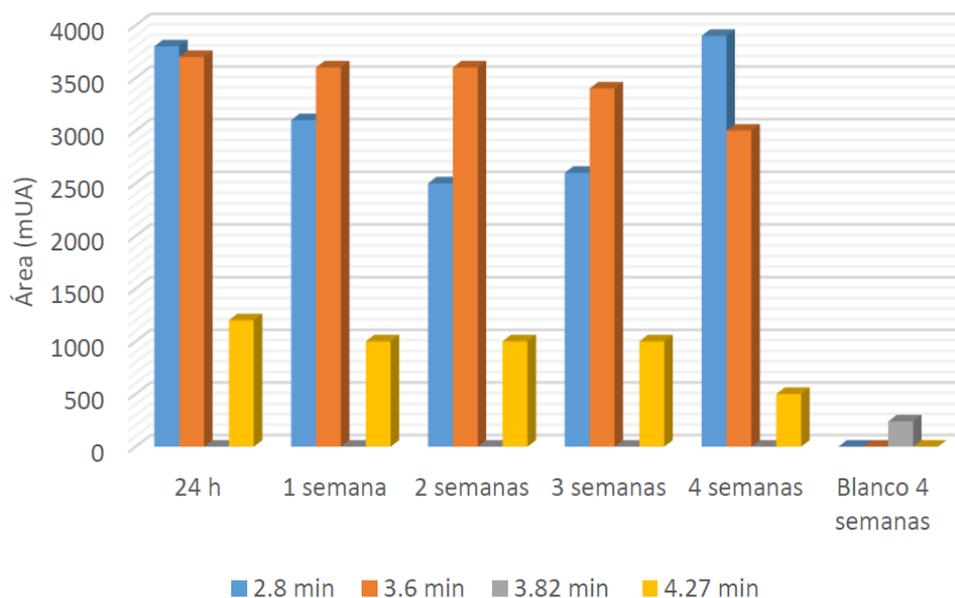


Figura 6. Productos de la reacción de PET tratado con ANCUT1 producida en *P. pastoris*. Tiempos de retención obtenidos de las muestras de la reacción de PET tratado con ANCUT1 a 40°C después de 24 horas y 1-4 semanas determinado con HPLC. El tiempo de retención 2.8 coincide con el del TPA y el de 3.6 coincide con el de BHET (Morales-García, 2018).

Los resultados obtenidos en estos trabajos antecedentes indicaban que, al modificarla, la enzima de *A. nidulans* podría competir con otras enzimas reportadas para la eficiente degradación de PET, como la cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) (Machado de Castro *et al.*, 2019), u otras, como las actinomicetales empleadas por la empresa Carbios (Tournier *et al.*, 2020), que también fueron modificadas para lograr aumentos en sus tasas de degradación.

Los aspectos relevantes por modificar eran el sitio de unión a PET, para lograr una mayor eficiencia de degradación, y la termoestabilidad, pues la degradación sería más eficiente si se llevara a cabo a temperaturas cercanas a la temperatura de transición vítrea del PET, superiores a 60 °C, ya que es cuando las cadenas del polímero se encuentran más accesibles para su despolimerización.

A continuación, se presentan elementos que permitieron diseñar la estrategia para modificar la termoestabilidad de la enzima de interés, los cuales consisten en herramientas de modelado y análisis de casos de éxito en la modificación de termoactividad de otras enzimas.

### 2.1.3 Modelado de ANCUT1 con Alpha Fold y predicción del sitio de unión a PET

El sistema de predicción de proteínas Alpha Fold está basado en redes neuronales profundas que unifican distintos campos del conocimiento como la biología estructural, física y aprendizaje profundo. Estas redes fueron entrenadas para predecir propiedades estructurales de las proteínas a partir de sus secuencias genéticas, particularmente, predicen las distancias entre pares de aminoácidos y los ángulos de sus enlaces peptídicos (Jumper *et al.*, 2021).

AlphaFold combina innovaciones de aprendizaje profundo para potenciar el conocimiento contenido en las bases de datos de secuencias y estructuras de proteínas de los últimos 50 años (Perrakis & Sixma, 2021).

Para predecir la estructura de una secuencia de aminoácidos, estos métodos dependen en gran medida de un análisis multisequencia usando información de estructuras peptídicas conservadas y un análisis de residuos emparejados evolutivamente, cuya lógica es que existe una Presión selectiva entre dos residuos que están en contacto en la estructura tridimensional, entonces, residuos que interactúan entre ellos, aunque en la secuencia se encuentren alejados, evolucionarán juntos para preservar la estructura y función (Perrakis & Sixma, 2021; Roney & Ovchinnikov, 2022)

Los análisis multisequencia brindan información extremadamente útil para predecir estructura de proteínas y, de esta forma la inteligencia artificial de AlphaFold fue capaz de aprender cómo se pliega espacialmente una secuencia de aminoácidos (Perrakis & Sixma, 2021).

Pero este sistema no ha resuelto por completo el problema de plegado de las proteínas y quedan muchos retos por enfrentar que provienen de las siguientes limitaciones: El requerimiento de análisis multisequencia para la predicción estructural es problemática pues a veces las proteínas tiene poco homólogos conocidos (Roney & Ovchinnikov, 2022); puede predecir la estructura de proteínas de una cadena con precisión pero esta precisión disminuye con el número de cadenas debido a que las interacciones entre unidades de multímeros o con otras proteínas no se encuentran en las bases de datos (Bryant *et al.*, 2022).

Además, no predice aspectos importantes en la estructura como unión de iones metálicos, coactores o ligandos, ni modificaciones postraduccionales y las cadenas laterales de los residuos en ocasiones no están adecuadamente situadas (Perrakis & Sixma, 2021).

Finalmente, la predicción de la posición relativa de los dominios de una cadena, cómo los dominios cambian su confirmación relativa en respuesta a estímulos y como los dominios cambian del desorden al orden aún no quedan elucidados por este sistema (David *et al.*, 2022)

En 2021, el Dr. Rodríguez Sotres generó un modelo de ANCUT1 con el sistema Alpha Fold y el mismo año el M. en C. Castro Rodríguez, realizó el docking de la enzima con el sustrato, encontrando la unión de un oligómero de 3 unidades de PET (3-PET) y obtuvo distintas poses de acoplamiento del oligómero a ANCUT1, optimizadas por medio de cálculos cuánticos. Se calculó, con el programa MOPAC, la energía de formación del complejo proteína-ligando con las distintas poses de acoplamiento y aquella con la menor entalpía de formación se presenta en la Fig. 7.

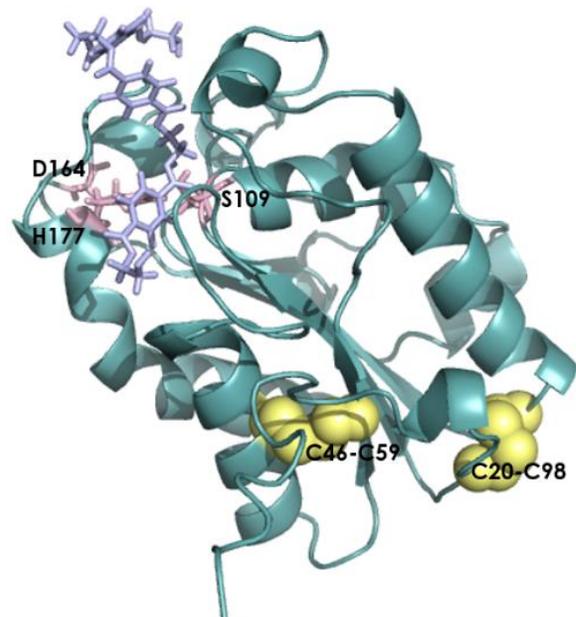


Figura 7. Modelo de ANCUT1 de *A. nidulans* obtenido con Alpha Fold, acoplado a PET. Se muestra con dos puentes disulfuro en amarillo (C20-C98, C46-C59), la triada catalítica en rosa (S109, D164, H177), y la unión al oligómero de tres unidades de PET (3PET), en morado.

## 2.2 Caracterización de las propiedades enzimáticas de la cutinasa de *Humicola insolens* (HiC), una enzima termófila homóloga a AN CUT1

En 2020 Su *et al.*, realizaron la caracterización bioquímica de la cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) y determinaron que su temperatura y valores de pH de máxima actividad son de 80°C y 8-9, respectivamente (Fig. 8). En su estudio se intentó mejorar la actividad enzimática para degradar poliacrilatos y polivinilacetato, por lo que se generaron variantes basadas en diseño *in silico*, que reducirían el impedimento estérico en la zona de unión al sustrato, obteniendo un aumento en su actividad con estas mutaciones.

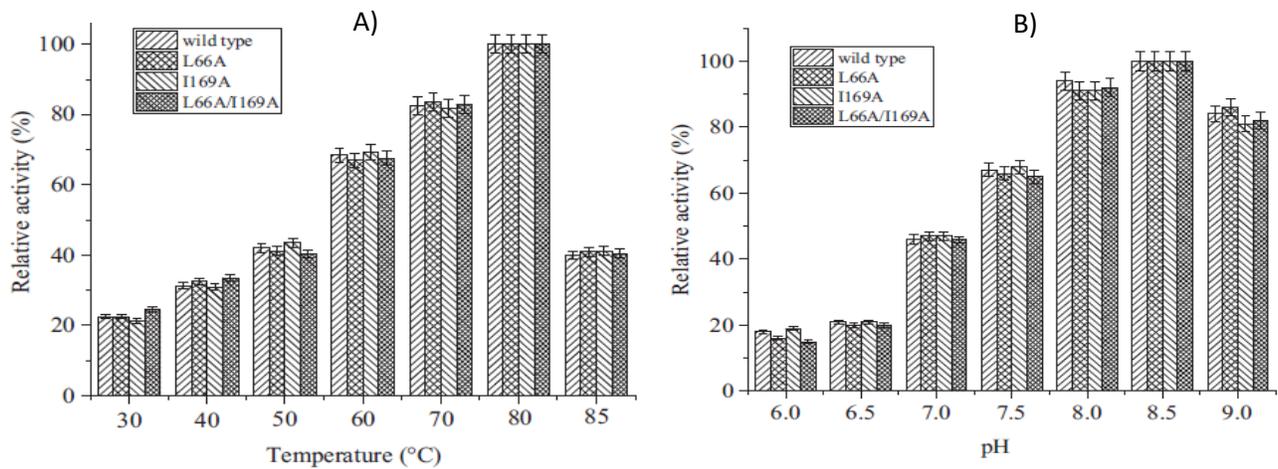


Figura 8. Caracterización de la cutinasa HiC, silvestre y mutantes. A) Actividad en función de temperatura. B) Actividad en función de pH (Su *et al.*, 2020)

## 2.3 Aumento de la termoestabilidad por ingeniería de proteínas

A continuación, se presentan algunos ejemplos de mejora de termoestabilidad empleando las metodologías antes descritas.

### 2.3.1 Mejora de la termoestabilidad por medio de diseño basado en estructura

#### 2.3.1.1 Aumento en la termoestabilidad de la cutinasa de *Aspergillus oryzae* (AOC) por diseño racional

En 2015, Shirke *et al.*, lograron la termoestabilización de la cutinasa de *Aspergillus oryzae* (AOC) por medio del software de diseño de proteínas, Rosetta, junto con un

diseño racional, introduciendo prolinas y puentes salinos, que llevaron a una mejora de 6°C en la  $T_m$  y aumentaron 10 veces la vida media de la actividad enzimática a 60°C. A pesar de esto, no se logró mejorar la tasa de actividad de la enzima ni su temperatura óptima.

### 2.3.1.2 Mejora de la termoestabilidad de una hidrolasa por introducción de argininas en su superficie

En 2018, Li *et al.*, trabajaron con una  $\alpha$ -L-rhamnosidasa de *Aspergillus niger*, y por medio de análisis *in silico*, se seleccionaron residuos de lisina superficiales y se mutaron por argininas, pues se ha comprobado que esa sustitución es efectiva para aumentar la termoestabilidad. Se evaluaron los cambios en la energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) y se seleccionaron aquellas con valores menores a  $-1$  kcal/mol. Se generaron las mutantes correspondientes simples y tres de cinco mostraron un incremento en termoestabilidad, manteniendo su actividad. Estos resultados coincidieron con un aumento en las interacciones intraproteína, que fueron evaluadas *in silico*, así como un aumento en el porcentaje de alfa hélices, evaluado con dicroísmo circular. Además, se realizaron dinámicas moleculares donde se observó un aumento en la estabilidad y en la rigidez de las mutantes (RMSD y RMSF) a 27, 47 y 67°C.

### 2.3.1.3 La ingeniería de un sitio de glicosilación inhibe la agregación térmica

En 2017, Shirke *et al.*, estudiaron la inactivación térmica de las enzimas AoC y la cutinasa de *Thielavia terrestris* (TtC) y observaron que, mientras que TtC es resistente a la agregación térmica, AoC es inactivada principalmente debido a esa agregación. Al analizar a profundidad TtC encontraron que presenta dos sitios de glicosilación, los cuales demostraron que le brindan termoestabilidad, por lo que introdujeron un sitio de glicosilación en AoC, lo cual ocasionó un aumento significativo en su actividad residual a 61°C. Pero, la  $T_m$  de AoC no aumentó.

### 2.3.1.4 El reemplazo de un sitio de unión a calcio por un puente disulfuro aporta estabilidad térmica

Then y colaboradores, en 2016, reemplazaron en la hidrolasa TfCut2 de *Thermobifida fusca* un sitio de unión a calcio con un puente disulfuro para eliminar la dependencia de su termoestabilidad a calcio. Con esto, se logró aumentar la termoestabilidad, incrementando 24.9°C su T<sub>m</sub> y 13.2°C la temperatura de inactivación media, aumentando, así mismo, su actividad catalítica hacia PET (Fig. 9).

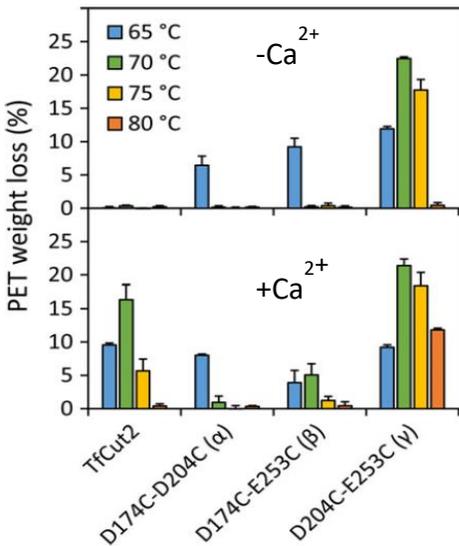


Figura 9. Hidrólisis de PET por TfCut2. Se identificó un sitio de unión a calcio en los residuos E253, D204 y D174, por lo que se generaron las tres combinaciones posibles de introducción de puentes disulfuro (variantes  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ). Se observa un aumento en la pérdida de peso de PET a 65°C en las tres variantes y a 70, 75 y 80°C para la variante  $\gamma$  en comparación con TfCut2 nativa en ausencia de Ca<sup>2+</sup>. Además, se observa un aumento en la pérdida de peso de PET en la variante  $\gamma$  a 70, 75 y 80°C en comparación con TfCut2 nativa y variantes  $\alpha$  y  $\beta$  en presencia de Ca<sup>2+</sup>. Esto, atribuible a la sustitución del sitio de unión de Ca<sup>2+</sup> por un puente disulfuro (Modificado de Then *et al.*, 2016).

### 2.3.1.5 Obtención de la hidrolasa de PET más eficiente hasta la fecha

En 2020, Tournier y colaboradores, obtuvieron una enzima que hidroliza PET a sus monómeros, casi en su totalidad, en 10 horas. Usando a la cutinasa de rama de hojas (LCC, por sus siglas en inglés), la cual fue identificada en 2012 por Sulaiman *et al.*, en un análisis metagenómico y pertenece a un procarionte no identificado.

Por medio de la sustitución de un sitio de unión a calcio por un puente disulfuro (Fig. 10) obtuvieron una T<sub>m</sub> de 94.5 °C, 9.8°C más que la silvestre (Fig. 11), y con una disminución de 28% en la actividad. A la variante resultante se le adicionaron después mutaciones en los aminoácidos de unión a sustrato de LCC, con lo que se obtuvo una cutinasa

altamente eficiente, con alta termoestabilidad y actividad enzimática sin comparación al momento.

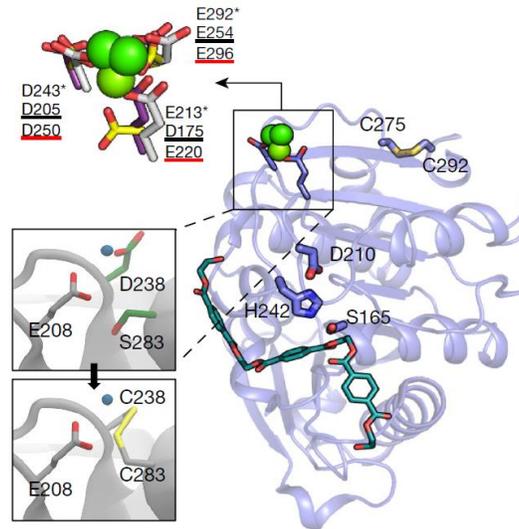


Figura 10. Búsqueda de sitios de unión de iones divalentes en LCC y adición de un puente disulfuro. Se muestra la estructura de la enzima en diagrama de listón donde se señalan los residuos de la triada catalítica (D210, H242 y S165), así como el sitio de unión de PET, cuya estructura se observa de color verde. Debido a que en la estructura de LCC obtenida por rayos X no se observó directamente algún sitio de unión a iones metálicos divalentes (esferas verdes) que pudiera estabilizarla, tal sitio se encontró en cutinasas homólogas de *Thermobifida alba* (estructura en color morado y residuos de unión indicados con asteriscos), *Thermobifida cellulolysitica* (estructura en color amarillo y residuos de unión subrayados en color negro) y *Saccharomonospora viridis* (estructura en color gris y residuos de unión subrayados en color rojo) (esquina superior izquierda) cutinasas, así se encontró su posición equivalente en LCC (D238, S283 y E208), confirmando que era un sitio de unión a  $\text{Ca}^{2+}$  (esfera azul) (esquina inferior izquierda, recuadro superior) y se procedió a su sustitución por un puente disulfuro en los residuos D238C/S283C (esquina inferior izquierda, recuadro inferior) (Modificada de Tournier, *et al.*, 2020).

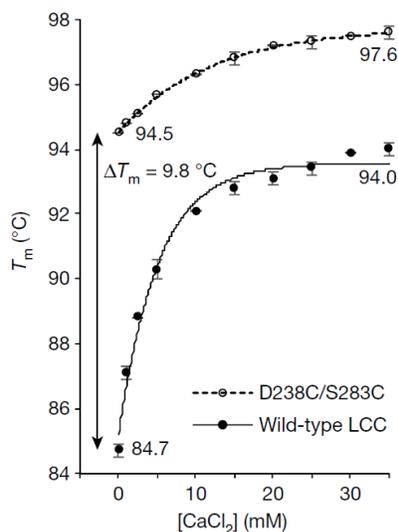


Figura 11. Determinación de la  $T_m$  de LCC nativa y variante D238C/S283C por fluorimetría diferencial de barrido en función de la concentración de  $\text{CaCl}_2$ . Se observa un aumento de  $9.8^\circ\text{C}$  en la  $T_m$  de LCC nativa (línea sólida y puntos negros) en presencia de 30 mM de  $\text{CaCl}_2$  mientras que la variante de LCC (línea punteada y puntos abiertos) presenta, en ausencia de calcio, una  $T_m$  similar a la enzima nativa en presencia de 30 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Este aumento se atribuye a la introducción del segundo puente disulfuro en el sitio de unión a calcio de la variante (Modificada de Tournier, *et al.*, 2020).

## 2.3.2 Mejora de la termoestabilidad por medio de diseño basado en secuencia

### 2.3.2.1 Estudio de los cambios en las propiedades térmicas y cinéticas de tres variantes alélicas de una hidrolasa $\alpha/\beta$

Existen tres variantes alélicas de la  $\beta$ -amilasa (hidrolasa  $\alpha/\beta$ ) de la cebada, Sd2L, Sd1 y Sd2H, las cuales poseen distintas propiedades cinéticas y de termoestabilidad, siendo esta última propiedad baja, mediana y alta respectivamente. En 2001, Ma *et al.*, analizaron cómo contribuyen las sustituciones de aminoácidos a las distintas propiedades de cada variante, encontrando que las sustituciones de aminoácidos hidrofóbicos por aminoácidos hidrofílicos contribuían a la termoestabilidad de las enzimas, particularmente una sustitución de leucina a serina en la variante Sd2H, en un residuo presente en un bucle alejado del sitio catalítico, completamente expuesto al solvente, le permite retener mayor actividad enzimática con el aumento de temperatura. Los investigadores atribuyeron esa capacidad mejorada a que la cadena lateral de la serina presenta un grupo hidroxilo que puede formar puentes de hidrógeno con el solvente, lo cual puede aportar estabilidad energética a la enzima. Se correlaciona, entonces, el aumento de la termoestabilidad con las propiedades hidrofílicas de la enzima, particularmente, el aumento en las interacciones de la superficie de la proteína con el agua que la rodea.

### 2.3.2.2 Estudio de las bases moleculares de las propiedades térmicas de una fumarasa

Lin *et al.*, en 2007, estudiaron y compararon las fumarasas C homólogas de *Streptomyces thermovulgaris* (stFUMC), una enzima termoestable a 50°C, y de *Streptomyces coelicolor* (scFUMC), una enzima mesófila. Hicieron la comparación de secuencias y encontraron que, aunque ambas enzimas tienen el mismo porcentaje de residuos cargados (23%), había 5 residuos hidrofílicos únicos en stFUMC, lejos del sitio catalítico y en la superficie de la proteína. Hicieron las mutaciones correspondientes, observando un aumento en la  $T_{opt}$  de todas las mutantes y manteniendo su actividad, e incluso incrementándola en dos de las mutantes simples lo cual demostró la importancia

de la posición estratégica de residuos para mantener la actividad catalítica, termoactividad y termoestabilidad de la enzima. Atribuyendo este aumento en la estabilidad a la formación de puentes de hidrógeno nuevos.

### 3. Justificación

La alta acumulación de PET a nivel mundial, en basureros y en ambientes naturales, hacen necesario encontrar formas más eficientes de tratar los desechos, para reutilizarlos o para degradarlos. Pero la naturaleza recalcitrante del PET hace complicada su escisión monomérica. A pesar de esto, hay reportes de sistemas biológicos y enzimas capaces de biodegradarlo, siendo la ANCUT1 un ejemplo de ello. Por lo que es importante centrarse en el estudio de la optimización de los factores que afectan su actividad, como la termoestabilidad, para, así, lograr obtener una enzima altamente eficiente en la degradación de PET a monómeros que puedan ser reutilizados y cerrar el ciclo de consumo, hacia una economía circular.

#### 4. Hipótesis

Si se sustituyen residuos de la cutinasa I de *Aspergillus nidulans*, ANCUT1, por residuos específicos presentes en una cutinasa altamente termoestable y homóloga (HiC), se puede mejorar la termorresistencia de ANCUT1 y así podría actuar a temperaturas cercanas a la de transición vítrea del PET, incrementando su actividad catalítica hacia este polímero.

## 5. Objetivos

Estudiar la termoestabilidad de ANCUT1 *in silico* e *in vitro* y proponer variantes que tengan potencial de termoestabilidad más alta, basadas en un modelo *in silico* de la enzima.

### 5.1 Objetivos particulares

- Encontrar características a modificar para mejorar la termoestabilidad de la enzima
- Llevar a cabo las modificaciones necesarias y comprobar sus efectos en la estabilidad de la enzima *in silico* e *in vitro*
- Determinar la actividad de la enzima modificada a temperaturas cercanas a la de la transición vítrea del PET

## 6. Estrategia general

El presente trabajo consistió en tres etapas (Fig. 12):

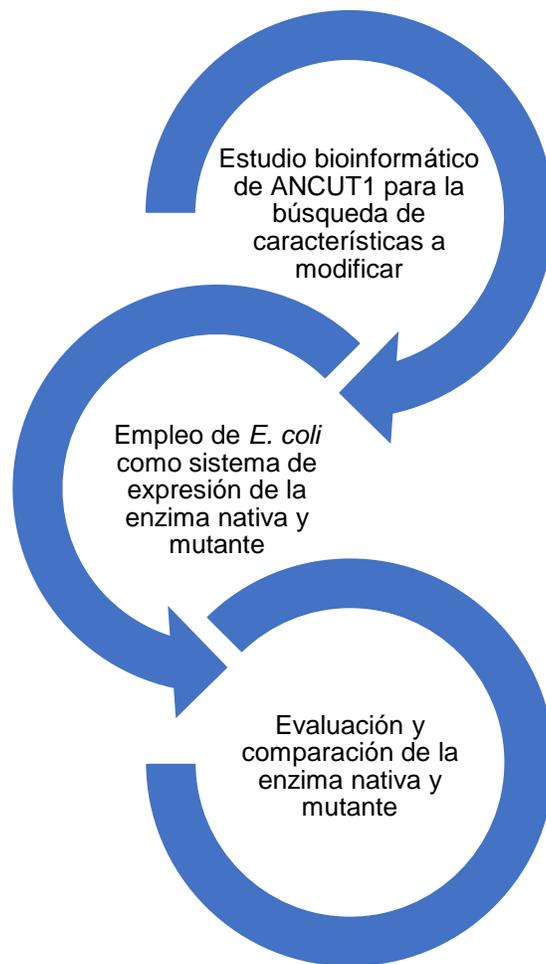


Figura 12. Estrategia general usada en el presente trabajo

## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Análisis bioinformático

#### 7.1.1 Alineamiento de secuencias

Las secuencias de *ancut1* y HiC se alinearon con el servidor ClustalW (<https://embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html>) para buscar diferencias entre sus residuos y seleccionar aquellos ausentes en *ancut1* que podrían aumentar su termoestabilidad. Los alineamientos se visualizaron en el software BioEdit.

#### 7.1.2 Predicción del cambio en la estabilidad por introducción de una sustitución

##### 7.1.2.1 Análisis del cambio de energía libre de Gibbs ( $\Delta\Delta G$ ) por método rápido

Se evaluó la  $\Delta\Delta G$  de las variantes con distintos servidores web: CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de/index.jsp>), DDG (<http://protein.org.cn/ddg.html>), PremPS (<https://lilab.jysw.suda.edu.cn/research/PremPS/>), MUpro (<https://www.ics.uci.edu/~baldig/mutation.html>), MAESTROweb (<https://pbwww.services.came.sbg.ac.at/maestro/web>), iSTABLE (<http://ncblab.nchu.edu.tw/iStable2/mutant.php>) y I-Mutant (<https://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) (en estos dos últimos servidores se usó sólo la secuencia de la proteína).

##### 7.1.2.2 Análisis de interacciones intramoleculares

Se realizó la predicción de las interacciones intramoleculares en las variantes donde las mutaciones fueran favorables (con base en las predicciones de  $\Delta\Delta G$ ), por medio del servidor web Protein Interactions Calculator (<http://pic.mbu.iisc.ernet.in/>).

### 7.2 Cepas y medios de cultivo usados

En este trabajo se usaron las cepas DH5 $\alpha$  y BL21 DE3 pLySS de *Escherichia coli* de Invitrogen™.

Los medios de cultivo usados se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Medios de cultivo usados

| Nombre del medio                                | Composición   | Antibióticos         |
|---|---|----------------------|
| SOC (Super Optimal broth + Catabolic repressor) | Tryptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl <sub>2</sub> 10 mM, MgSO <sub>4</sub> 10 mM, glucosa 20 mM | Ninguno              |
| Caldo LB (Luria-Bertani)                        | Tryptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%.  | Ampicilina 100 µg/mL |
| Agar Luria-Bertani                              | Adición de 15 g/L de agar al caldo LB   | Ampicilina 100 µg/mL |

## 7.3 Preparación de células competentes

### 7.3.1 Células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes

**Precultivo:** Se inocularon 5 mL de caldo LB sin antibióticos con la cepa de *E. coli* DH5α y se incubó a 37°C con 300 rpm por ~16 horas.

**Cultivo:** Se inocularon 50 mL de medio LB sin antibióticos con 500 µL del precultivo, en un matraz de 250 mL, a 37°C y 300 rpm por ~2.5 horas, hasta que alcanzó una densidad óptica mayor a 0.2, sin rebasar 0.4, y se colocaron en hielo por 25 minutos. Pasado el tiempo de incubación en hielo, se centrifugó en un tubo Falcon estéril de 50 mL por 10 minutos a 8,000 rpm y 4°C, y se descartó el sobrenadante.

**Lavados con CaCl<sub>2</sub>:** El pellet se resuspendió en 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío (4°C) y se incubó por 25 minutos en hielo. Pasado el tiempo, se centrifugó por 10 minutos a 8,000 rpm, 4°C y se decantó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 2.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío. Finalmente, se agregaron 375 µL de glicerol 100% frío (concentración final de 15%), se hicieron alícuotas de 100 µL en tubos previamente enfriados y se almacenaron a -70°C.

## 7.4 Transformación de células

### 7.4.1 Transformación de DH5 $\alpha$

Se temperaron en hielo 80  $\mu$ l de las células quimiocompetentes y se agregaron 5  $\mu$ l del vector a clonar, mezclando con micropipeta. Se colocó el tubo en hielo por 20 minutos, pasado el tiempo se transfirió a un baño de agua a 42°C por 30 segundos y se regresó inmediatamente al baño de hielo por 5 minutos. Después, se agregaron 915  $\mu$ L de medio SOC a temperatura ambiente, incubando de 1-3 horas a 37°C con 300 rpm.

Pasado el tiempo de incubación, se plaquearon 100  $\mu$ l en agar LB con ampicilina 100  $\mu$ g/mL, incubando por ~18 horas a 37°C.

Una vez que se observó crecimiento en las placas, se resembraron las colonias individuales y a esas colonias se les realizó la comprobación de la clonación por medio de extracción de plásmido o pruebas de PCR.

## 7.5 Purificación de DNA

### 7.5.1 Extracción y purificación de plásmidos

Para confirmar la transformación de las células o para uso en las reacciones de digestión y posterior ligación, se realizaron extracciones de plásmidos, inoculando en 5 mL de caldo LB las colonias de *E. coli* DH5 $\alpha$ , creciéndolas por ~16 horas a 37°C con 300 rpm. Pasado el tiempo de cultivo, se centrifugó el cultivo a 8000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y se siguió el protocolo del kit de minipreparación de plásmidos GeneJET de Thermo Fisher™.

### 7.5.2 Purificación de productos de ligación o PCR

Para la purificación de productos de PCR a secuenciar o productos de digestión, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (con bromuro de etidio 0.008%), a 90 V por ~50 minutos. Las bandas se cortaron en el transiluminador y se siguió el protocolo del kit de extracción de gel GeneJET Thermo Fisher™.

## 7.6 Concentración de los productos de purificación

Para concentrar el DNA obtenido de la purificación se utilizó el equipo concentrador DNA PLUS de Heto, modelo DNA plus vr/mini, a 55°C por 40 minutos.

## 7.7 Reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) y oligonucleótidos usados para ellas

### 7.7.1 Amplificación para confirmar la presencia del vector pET22 en *E. coli* DH5α y BL21

Para confirmar la correcta transformación de las células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α y BL21 con el vector de expresión pET22, tanto vacío como clonado con el gen *ancut1* optimizado para expresión en esta bacteria, se realizaron amplificaciones de la región promotora y terminadora de la RNA polimerasa T7 contenidas en el vector. Las secuencias de los oligonucleótidos se indican en la tabla 3.

El DNA se obtuvo a partir de la ebullición por 10 minutos a 95°C de 100 µL de agua con un poco de biomasa recién obtenida de las colonias candidatas y posterior centrifugación de los restos celulares.

La amplificación se realizó con la DNA polimerasa AccuPOL™ de Ampliqon, en reacciones de 10 µL, usando concentraciones finales de: *buffer* 1X, oligonucleótidos 0.5 µM, dNTPs 200 µM, DNA genómico ~100 ng y 2.5 U de enzima.

El programa de amplificación se llevó a cabo por el equipo “PCR system 9700” de Applied Biosystems y fue el siguiente: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 54°C por 40 seg, 72°C por 30 segundos, y finalmente, 1 ciclo a 72°C por 10 min.

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para amplificar secuencia entre promotor y terminador de T7 en vector pET22.

| Oligo         | Secuencia 5'-3'          |
|---------------|--------------------------|
| T7 promotor   | AAATTAATACGACTCACTATAGGG |
| T7 terminador | GCTAGTTATTGCTCAGCGG      |

## 7.8 Reacciones de digestión y ligación

### 7.8.1 Digestión de pET22 y pUCIDT-AMP

Se digirieron 5 µg del vector de expresión pET22 y 11 µg del vector pUCIDT-AMP portador del gen *ancut1* optimizado para su expresión en *E. coli*. Las digestiones se realizaron con los plásmidos concentrados en reacciones de 40 µL con *buffer* Tango 1X, 10 U de enzima NcoI y 20 U de XhoI. La reacción se colocó a 37°C por 16 horas.

Posteriormente, se realizó la desfosforilación del vector pET22b para prevenir su recircularización, con la fosfatasa alcalina termosensible FastAP (1 U/µL) de Thermo Scientific™ en una reacción de 50 µL con *buffer* 1X, 5 U de enzima y los 40 µL de la reacción de digestión. La reacción se colocó a 37°C por 20 minutos. Pasado el tiempo, se inactivó la enzima a 80°C por 20 minutos. Finalmente, se realizó la purificación de gel de las reacciones de digestión, tanto del plásmido pET22b como del fragmento de DNA y una vez purificados, se concentraron para su posterior uso en la reacción de ligación.

### 7.8.2 Ligación

Se ligó el gen *ancut1* optimizado para expresión en *E. coli* (nativo y codificante para la variante K53I) con el vector pET22, en una reacción de 20 µL con *buffer* 1X, 100 ng del vector digerido y purificado, 65 ng del gen digerido y purificado y 5 Weiss U de la enzima Ligasa de DNA T4 de Thermo Scientific™. Se incubó a temperatura ambiente (~23°C) por 10 minutos y pasado el tiempo se inactivó la enzima a 65°C por 10 minutos. Se usaron 5 µL de la reacción para transformar células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α.

## 7.9 Secuenciación

La secuenciación realizó por la empresa Macrogen. Se usaron los oligonucleótidos presentados en la tabla 3 en una concentración de 100 µM.

## 7.10 Expresión y extracción de ANCUT1 nativa y variante K53I en *E. coli*

### 7.10.1 Diseño y síntesis del gen *ancut1* optimizado para expresión en *E. coli*

El diseño del gen *ancut1* optimizado para expresión en *E. coli* se realizó tomando como referencia el gen optimizado para expresión en *P. pastoris*, reemplazando los codones por aquellos de uso preferencial de *E. coli*.

Después se agregaron a los extremos del gen los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NcoI y XhoI, para poder clonarlo en el vector pET22.

También se disminuyó la proporción de guaninas-citocinas a 54%, en los primeros 8 codones, ya que se ha demostrado la importancia del contenido GC en el extremo 5', exactamente en estos primeros 8 codones, para mejorar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* (Dewi & Fuad, 2020).

Además, fue necesaria la adición de un par de bases nitrogenadas (adeninas) después del sitio de reconocimiento de NcoI para poder conservar al gen *ancut1* dentro del marco de lectura del plásmido. La síntesis del gen se llevó a cabo por medio de la empresa Integrated DNA Technologies, Inc. Para obtener el gen codificante de la variante K53I se realizó la sustitución de un solo codón.

### 7.10.2 Producción de ANCUT1

**Precultivo:** Se inocularon 5 mL de caldo LB con las cepas de *E. coli* BL21 portadoras del vector pET22b-*ancut1* nativa y K53I, con ampicilina 100 µg/mL, incubando a 37°C con 300 rpm por ~16 horas.

**Cultivo:** Se inocularon 25 mL de caldo LB + ampicilina 100 µg/mL con 250 µL de los precultivos (por separado), en un matraz de 250 mL, a 37°C con agitación de 300 rpm, hasta alcanzar una O.D.<sub>600nm</sub> de 0.6-0.7 (~2.5 horas).

**Inducción:** Al alcanzar la O.D.<sub>600nm</sub> necesaria, se indujo la expresión del gen con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 0.4 mM por 3 horas a 30°C, con agitación a 300 rpm.

## 7.10.3 Extracción

### 7.10.3.1 Obtención de sobrenadante

Pasado el tiempo de inducción, se decantaron los cultivos en tubos Falcon y se centrifugaron durante 15 minutos a 4°C con 8500 rpm. El sobrenadante se guardó para su posterior análisis y concentración.

### 7.10.3.2 Choque osmótico para extracción de proteínas de periplasma

Con este método se obtiene la fracción periplásmica, donde también se encuentra ANCUT1, debido a que está acompañada de la secuencia líder pelB, cuya secuencia codificante también se encuentra en el vector pET22b.

Una vez obtenido el sobrenadante, se resuspendió el sedimento celular en 30 ml de Tris-HCl 30 mM pH 8 con sacarosa al 20%. A continuación, se agregaron 60 µL de EDTA pH 8, 0.5 M y se resuspendió el pellet lentamente con micropipeta. Una vez que se resuspendió adecuadamente, se agitó lentamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado el tiempo de agitación, se centrifugó a 4 ° C durante 10 min a 10000 rpm y se desechó el sobrenadante, mientras que el pellet se resuspendió en 30 ml de MgSO<sub>4</sub> 5 mM frío agitando lentamente durante 10 min en hielo. Una vez resuspendido, se centrifugó a 4°C durante 10 min a 10000 rpm. Finalmente, se transfirió el sobrenadante con la fracción periplásmica a otro tubo y los restos celulares (sin la fracción de periplasma) se resuspendieron en 1 mL de Tris-HCl 50 mM pH 9 y se almacenaron también para su análisis.

## 7.11 Estudio de ANCUT1 producida en *E. coli*

### 7.11.1 Concentración

Se usó la celda de ultrafiltración Amicon™ Bioseparations Stirred Cells de MilliporeSigma™ con una membrana de celulosa con límite de exclusión de 10 kDa y se concentró tanto la fracción periplásmica como el sobrenadante del cultivo.

### 7.11.2 Identificación

La presencia de la enzima en las distintas fracciones obtenidas se confirmó por medio de electroforesis en gel, en un gel de poliacrilamida Laemmli, con un gel concentrador al 4% y uno separador al 12%. Se cargaron 4  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular y 10  $\mu\text{g}$  de muestra con *buffer* de carga (con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol). Se inició la corrida con un voltaje de 80 V por 25 minutos y después se incrementó a 160 V por ~70 minutos. Se desmontó el sistema, se sacó el gel y se enjuagó con abundante agua destilada. Se colocó en un contenedor y se adicionó el volumen suficiente de azul de Coomassie para que cubrir el gel completamente. Se dejó tiñendo durante la noche y al día siguiente se destiñó con una solución de metanol 40% y ácido acético 10%, hasta que las bandas se pudieran distinguir claramente.

### 7.11.3 Determinación cualitativa de actividad

Se determinó cualitativamente la actividad *in situ* de las enzimas por medio de zimogramas.

Primero, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida Laemmli, con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12%. Se cargan 4  $\mu\text{L}$  de marcador de peso molecular y 10  $\mu\text{g}$  de muestra con *buffer* de carga (con SDS).

Se inició con un voltaje de 80 V por 25 minutos y después se incrementó a 160 V por ~70 minutos. Se desmontó el sistema, se sacó el gel y se enjuagó con abundante agua destilada.

Se separó del gel el carril del marcador de peso molecular, el cual se tiñó por separado con azul de Coomassie y se destiñó con una solución de metanol 40% y ácido acético 10%. El resto del gel se incubó con agitación a temperatura ambiente durante la noche con 25 mL *buffer* de fosfatos de sodio 50 mM pH 7. Al día siguiente se desechó el *buffer* anteriormente adicionado y se colocó en 25 mL de una solución de Tritón al 0.5% con *buffer* de fosfatos de sodio 50 mM pH 7, agitando por 30 min. Pasado el tiempo se quitó la solución y se hicieron tres lavados con agua destilada. Posteriormente, se le añadió una solución con 4 mg de  $\alpha$ -Naftil acetato, disueltos en 1 mL de acetona y llevados a un

volumen de 25 mL con *buffer* de fosfatos 50 mM a pH 7, agitando por 30 minutos más. Pasado el tiempo, se quitó la solución y se hicieron 4 ó 5 lavados con agua destilada. Finalmente, se colocaron una en una solución con 10 mg de Fast Red TR, 100 µL de Tritón X-100 y 25 mL de *buffer* de fosfatos 50 mM pH 7. Se agitaron hasta observar la presencia de bandas y en ese momento se retiró la solución y se hacen lavados con agua destilada.

#### 7.11.4 Cuantificación de proteína total

La cuantificación de proteína total se realizó con el método de Bradford.

Se añaden a todas las celdas necesarias 40 µL de reactivo de Bradford y, posteriormente, se cargan 160 µL del blanco y las muestras diluidas, mezclando con micropipeta. Se deja reposar 5 minutos y se toma lectura en el lector de placas Epoch™ de Bio Teck.

#### 7.11.5 Determinación cuantitativa de actividad

La lectura de actividad en placa se realizó en el equipo Epoch™ de Bio Teck, determinando la liberación de productos de la actividad esterasa de ANCUT1 nativa y variante K53I por 10 minutos. Colocando 170 µL de *buffer* Tris-HCl pH 9 50 mM, en cada pozo, junto con 10 µL de la enzima diluida y agregando 20 µL de p-nitrofenil butirato (pNPB) 1 mM.

#### 7.11.6 Estudio de termoestabilidad

##### 7.11.6.1 Determinación de la temperatura de inactivación media

Para establecer la temperatura de inactivación media de las enzimas se determinó la actividad residual de las enzimas empleando como sustrato pNPB. Se incubaron muestras de 400 µL con los sobrenadantes concentrados de ANCUT1 nativa y K53I (por separado) a una concentración de 0.1 mg en *buffer* Tris-HCl pH 9 50 mM, en un gradiente de temperatura de 35 a 90°C (incrementos de 5°C) por 60 minutos, tomando muestras de 80 µL a los 15, 30 y 60 minutos. Cada muestra tomada se incubó por 5 minutos en

hielo y después, a temperatura ambiente por al menos 15 minutos, antes de determinar cuantitativamente la actividad residual con el método descrito anteriormente.

#### 7.11.6.2 Determinación de actividad enzimática en función de la temperatura hacia pNPB

Antes de comenzar la determinación, se ajustó el pH del *buffer* Tris HCL 50 mM para tenerlo al mismo pH (9) en todas las temperaturas trabajadas.

Para determinar la actividad en función de la temperatura de ANCUT1 hacia pNPB se incubaron muestras de 1 mL, con 0.001 mg de los concentrados enzimáticos, *buffer* Tris HCL pH 9 50 mM y pNPB a una concentración final de 0.1 mM. Además, se incubaron blancos del *buffer* con el sustrato con una concentración final de 0.1 mM. La incubación se realizó en un gradiente de 40-90°C (incrementos de 5°C) por 5 minutos e inmediatamente se realizó la medición de los productos de la reacción en el equipo Epoch™ de Bio Teck por 10 minutos, colocando 200 µL de muestra en cada pozo y habiendo marcado previamente el volumen frío en las puntas usadas para medir esas muestras.

#### 7.12 Análisis estadísticos

Para determinar si había diferencias significativas en los resultados obtenidos de actividad residual y actividad en función de la temperatura de las dos enzimas estudiadas, se llevaron a cabo pruebas t de Student para encontrar el valor p entre dos valores y pruebas ANOVA para encontrar el valor p entre más de dos valores. Las pruebas estadísticas se realizaron con ayuda de un calculador web en: <https://www.socscistatistics.com/tests/>

## 8. Resultados y Discusión

A continuación, se presentan los resultados obtenidos en cada etapa del presente trabajo junto con su análisis y discusión.

### 8.1. Análisis *in silico* de la proteína e identificación de sitios a modificar

Existe una relación muy cercana entre la estructura molecular de una proteína y su estabilidad (Iannuzzelli *et al.*, 2022). Hay estudios en los que se comparan las estructuras de proteínas mesófilas y termófilas que demuestran la relación tan importante entre conformación y termoestabilidad (Xu *et al.*, 2019).

Por otro lado, la termoestabilización de enzimas representa una meta muy importante para la ingeniería de proteínas, ya que aumenta considerablemente las condiciones de reacción disponibles para biocatálisis y otras aplicaciones biotecnológicas (Iannuzzelli *et al.*, 2022). Entonces, para estudiar la termoestabilidad de una enzima, conocer la forma en la que sus modificaciones pueden afectar su estabilidad y actividad y eventualmente lograr su termoestabilización, es importante conocer su estructura.

Para ANCUT1 no se cuenta con un modelo cristalográfico, pero sí se cuenta con un modelo *in silico*, generado por inteligencia artificial con el sistema Alpha Fold, el cual es un método computacional capaz de predecir la estructura de proteínas con alta precisión,

aún en casos en los que no hay estructuras similares conocidas. Se basa en un acercamiento novedoso de aprendizaje automático que incorpora conocimiento físico y biológico sobre la estructura proteica en un algoritmo de aprendizaje profundo (Jumper *et al.*, 2021; Fowler & Williamson, 2022).

La existencia de este modelo nos permite apoyarnos de herramientas bioinformáticas para explorar formas de hacerla más eficiente para determinados objetivos, en este caso, la despolimerización de PET.

Con respecto a la termoestabilidad de ANCUT1 recombinante en *P. pastoris*, las características estudiadas por Solíz-Baez en 2015 coinciden con lo reportado como típico para las cutinasas fúngicas: presentan buena estabilidad de 20-50°C y sus temperaturas óptimas se encuentran entre 40 y 50°C (Chen *et al.*, 2013; Usman *et al.*, 2023). A pesar de esto, existe una cutinasa fúngica termófila, que además tiene homología con ANCUT1 (56% de identidad): La cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) ha demostrado conservar actividad en altas temperaturas y bajo un amplio rango de valores de pH (Kjølbye *et al.*, 2019), teniendo una temperatura óptima de actividad hidrolasa de 80°C y presentando buena estabilidad a 70°C (Su *et al.*, 2020). Además, se encuentra dentro de los biocatalizadores más eficientes para la despolimerización de PET ya que puede ser usada como enzima única y lograr su degradación hasta los monómeros finales (Machado de Castro *et al.* 2019).

Debido a lo anterior y tomando en cuenta antecedentes en la literatura de optimización exitosa por diseño basado en secuencia (Ma *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007), se optó por usar este tipo de diseño para aumentar la termoestabilidad de ANCUT1.

### 8.1.1 Alineamiento de secuencias de residuos de ANCUT1 y una enzima homóloga altamente termoestable (HiC)

El primer paso en este proceso fue el alineamiento de las secuencias de ANCUT1 y HiC (Fig.13), que es una enzima homóloga altamente termoestable. En este alineamiento se encontró que hay 82 residuos idénticos, 27 conservados, es decir que las sustituciones son entre residuos con propiedades altamente similares, 13 semiconservados, es decir que las sustituciones son entre residuos con propiedades mínimamente parecidas, y 37 no conservados, es decir, que los residuos sustituidos no se parecen en absoluto. Estos

residuos no conservados fueron los elegidos para la búsqueda de las variantes, por lo que una vez identificados se procedió a realizar un descarte de aquellos correspondientes o adyacentes al sitio activo y al sitio de unión de PET, identificado por el M. en C. Castro Rodríguez (en proceso). Finalmente, el último criterio en el primer paso de selección de las variantes con mayor potencial de estabilidad fue el descarte en función de la ubicación de la sustitución y de sus posibles efectos negativos en la estabilidad de una enzima, por ejemplo, la sustitución de un residuo hidrofóbico por uno hidrofílico en el centro de la enzima o viceversa.



Figura 13. Alineamiento de secuencias de residuos de AN CUT1 y HiC. Las secuencias tienen un 56% de identidad. Los distintos grados de conservación se representan con asteriscos (residuos idénticos), dos puntos (sustituciones conservadas), puntos (sustituciones semiconservadas) y espacios vacíos (residuos no conservados).

### 8.1.2 Evaluación de termoestabilidad *in silico* del modelo de AN CUT1 generado con Alpha Fold

El siguiente paso fue la predicción de las interacciones intraproteína de las variantes seleccionadas anteriormente, debido a la importante relación entre la estabilidad de las proteínas y las interacciones de los residuos dentro de ellas (Gao *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2021): Se eligieron aquellas variantes en las que el total de las interacciones predichas fue mayor que en la enzima nativa y que, además, no presentara una cantidad grande de pérdidas en las categorías individuales de las interacciones (Tabla 4).

Tabla 4. Predicción de las interacciones intraproteína de ANCUT1, nativa y variantes.

|        | Interacciones hidrofóbicas | Puentes de hidrógeno | Interacciones iónicas | Interacción aromática-aromática | Interacción sulfuro-aromática | Interacciones catión-Pi | Total |
|--------|----------------------------|----------------------|-----------------------|---------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-------|
| Nativa | 136                        | 404                  | 30                    | 5                               | 2                             | 3                       | 580   |
| D138Y  | 137                        | 309                  | 23                    | 5                               | 1                             | 3                       | 478   |
| K53I   | 144                        | 422                  | 28                    | 5                               | 1                             | 4                       | 604   |
| S39I   | 144                        | 405                  | 28                    | 5                               | 1                             | 4                       | 587   |
| T24A   | 144                        | 400                  | 29                    | 5                               | 2                             | 3                       | 583   |
| T45A   | 146                        | 407                  | 27                    | 5                               | 2                             | 4                       | 591   |
| T121E  | 145                        | 426                  | 27                    | 5                               | 1                             | 4                       | 608   |

\* En color azul se muestran las variantes con interacciones totales mayores a la silvestre

Como último paso en el proceso de selección, se evaluó el efecto de las sustituciones individuales en la  $\Delta\Delta G$  de las variantes previamente seleccionadas. Esta evaluación se realizó con distintos servidores y programas y aquellas variantes con efectos favorables en la mayoría de los servidores se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Impacto en la estabilidad de ANCUT1 con distintas sustituciones de residuos, por predicción del  $\Delta\Delta G$ , en distintos servidores.

| Mutante | CUPSAT       | DNASTAR   | Ddg          | MuPro        | PremPS       | Maestro      | iStable   | I-Mutant  |
|---------|--------------|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------|-----------|
| T24A    | Desfavorable | No cambia | Desfavorable | Desfavorable | Desfavorable | Desfavorable | favorable | favorable |
| S39I    | favorable    | favorable | favorable    | Favorable    | favorable    | Desfavorable | favorable | favorable |
| T45A    | favorable    | favorable | Desfavorable | Desfavorable | Desfavorable | Desfavorable | favorable | favorable |
| K53I    | favorable    | favorable | favorable    | Favorable    | favorable    | Favorable    | favorable | favorable |
| T121E   | Desfavorable | No cambia | Desfavorable | Favorable    | Desfavorable | Favorable    | favorable | favorable |
| D138Y   | Desfavorable | favorable | favorable    | Favorable    | favorable    | Favorable    | favorable | favorable |

\*En azul se muestran las variantes en las que la mayoría de las predicciones de estabilidad fueron favorables

A pesar de tener distintas candidatas, se seleccionó aquella en la que todas las predicciones de  $\Delta\Delta G$  fueron favorables, la variante K53I. La ubicación de la sustitución, como se puede apreciar en la fig. 14, se encuentra en un residuo semi expuesto al solvente.

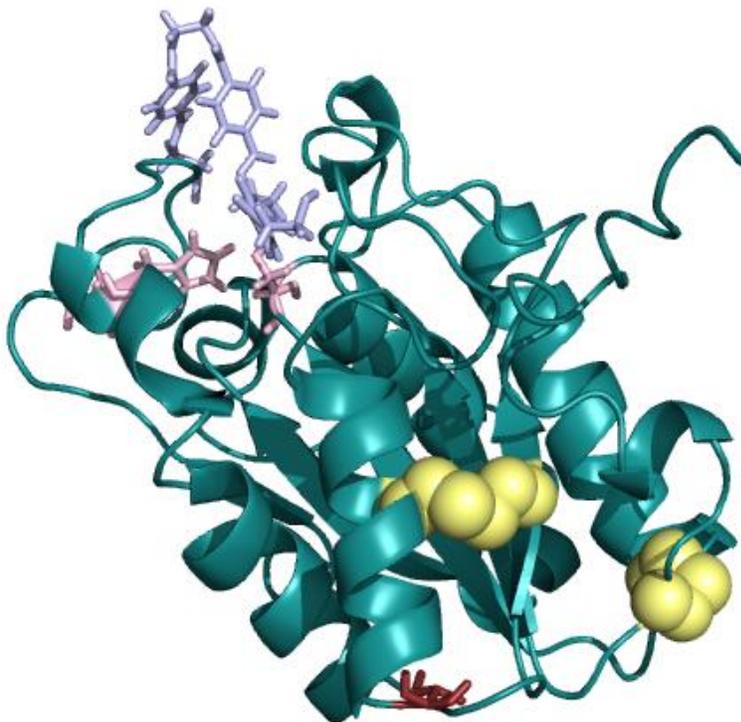


Figura 14. Modelo de AN CUT1 variante K53I. La ubicación de la sustitución se muestra en líneas color granate, los puentes disulfuro como esferas amarillas (C20-C98, C46-C59), la triada catalítica en líneas color rosa (S109, D164, H177), y el oligómero de tres unidades de PET (3PET), en líneas color morado.

## 8.2 Diseño del sistema de expresión en *E. coli*

El siguiente paso en el proyecto consistió en producir la enzima en *E. coli*, ya que, como se menciona en los antecedentes, solo había sido producida heterológamente en *P. pastoris*, pero presenta desventajas como dificultad para la aplicación de técnicas moleculares, especialmente para transformar y comprobar la integración de DNA exógeno al genoma. Además de requerir de un tiempo de 48 horas totales de cultivo, 24 de crecimiento y 24 de inducción (tiempo óptimo determinado por Solís-Baez, 2015). Por otro lado, *E. coli* es considerado uno de los organismos más atractivos para la expresión de proteínas recombinantes, procariontas y eucariotas, por razones como periodos generacionales cortos, de cerca de 20 minutos, sencillo cultivo en medios económicos, manejo genético y selección de mutantes muy accesibles. También puede incorporar

fácilmente DNA exógeno presente en plásmidos, lo cual se asocia con una alta tasa de expresión de proteínas recombinantes. Y casi 86% de las estructuras 3D presentes en el Protein Data Bank (PDB) han sido expresadas en esta bacteria (Fatima *et al.*, 2021).

### 8.2.1 Diseño de la secuencia de *ancut1* nativo, optimizado para expresión en *E. coli*

Se comenzó por cambiar los codones del gen *ancut1* para lograr el óptimo reconocimiento de la RNA polimerasa de *E. coli*. (Fig. 15) SOFTWARE, CODONES, ETC(ponerlo en la metodología). Además, se introdujeron a los extremos del gen los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción NcoI y XhoI, para lograr su clonación en el vector pET22b.

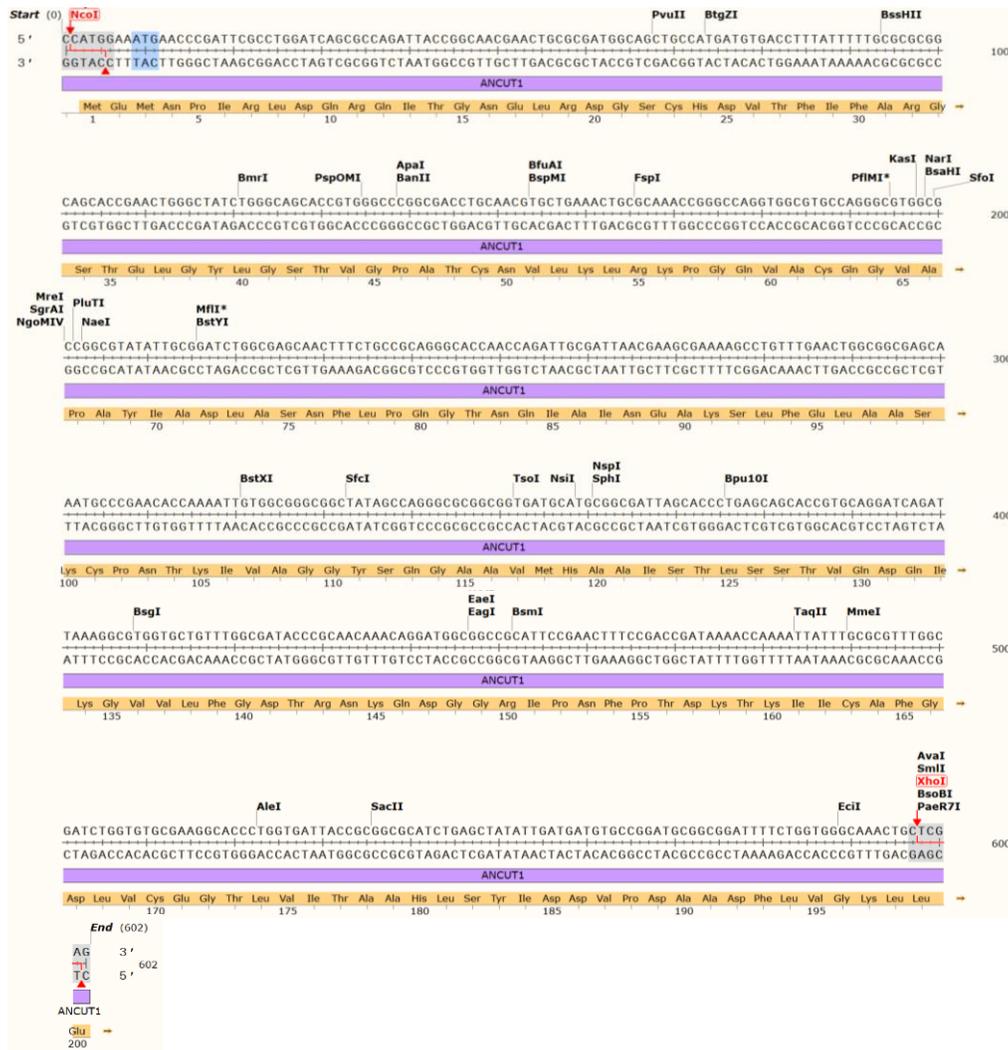


Figura 15. Secuencia de *ancut1* optimizada para expresión en *E. coli*. El gen tiene sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NcoI y XhoI señaladas a los extremos del gen. Resaltado en azul se encuentra el codón de inicio de la traducción de la enzima.

## 8.2.2 Diseño de la secuencia de *ancut1* nativo, optimizado para expresión en *E. coli*

Para obtener el gen codificante para la variante K53I, se introdujeron dos sustituciones de pares de bases a la secuencia nativa optimizada, indicadas en la fig. 16. Ambos genes fueron sintetizados por la compañía IDT y se recibieron clonados en vectores pUC.

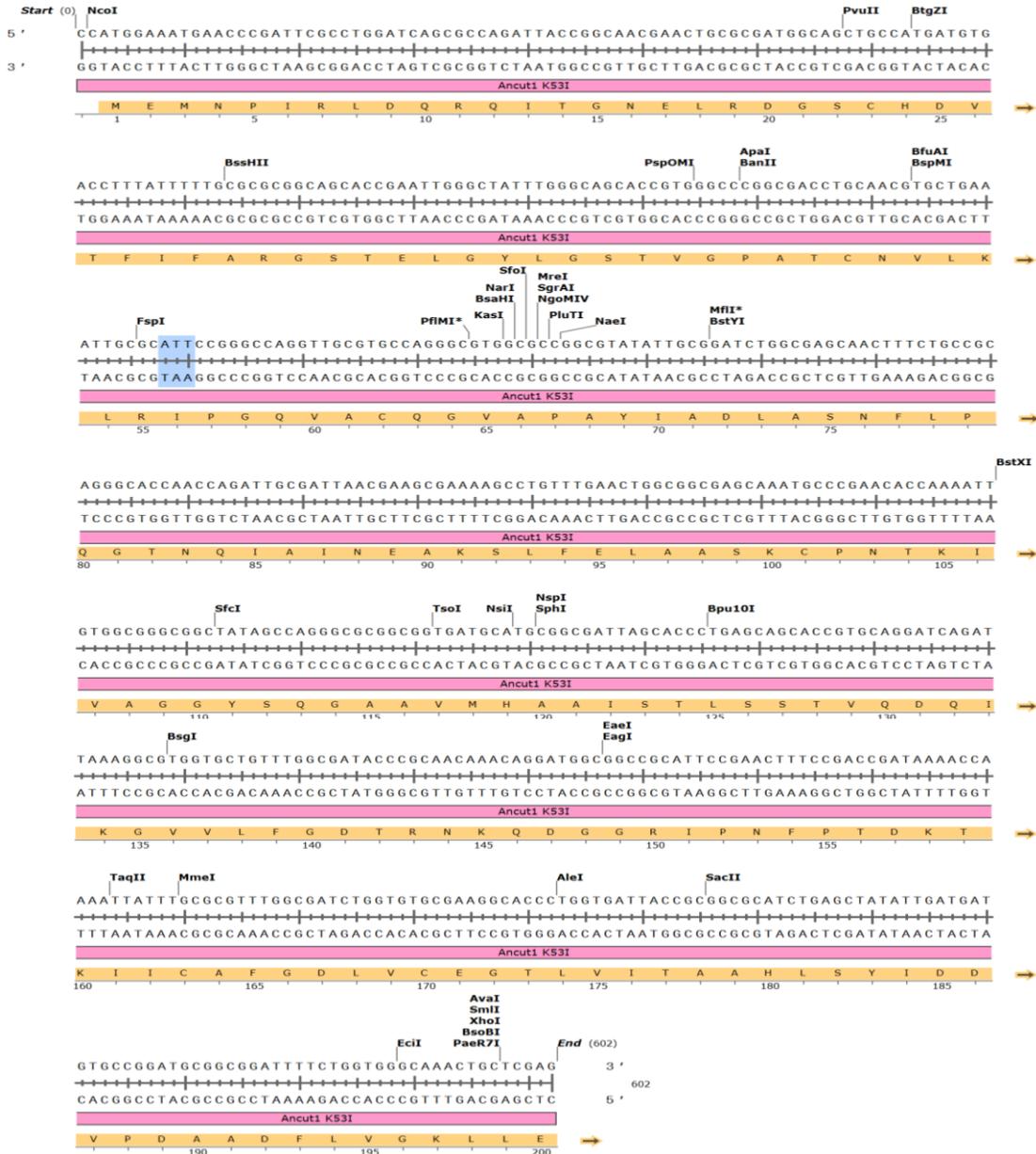


Figura 16. Secuencia de *ancut1*K53I con codones optimizados para expresión en *E. coli*. El gen tiene sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción NcoI y XhoI en sus extremos. Resaltado en azul se encuentra la ubicación de las sustituciones.

### 8.2.3 Clonación de los genes *ancut1* nativo y codificante para la variante K53I en el vector pET22b

El siguiente paso fue la digestión de estos vectores con las enzimas de restricción para obtener los fragmentos correspondientes a los genes de interés, así como la digestión del vector con las mismas enzimas para posteriormente realizar su ligación y la comprobación de la correcta ligación por medio de secuenciación.

Los genes de interés se diseñaron con dos sitios de reconocimiento en sus extremos, uno para la enzima NcoI y otro para XhoI, los cuales también se encuentran flanqueando la región del vector pET22b en la que se pretendía introducir el gen. Para lograr la clonación y construcción de los vectores pET22-Ancut1 y pET22-Ancut1 K53I, se digirieron los vectores pET22b, pUCIDT-Amp-*ancut1* y pUCIDT-Amp-*ancut1* K53I con las enzimas de restricción previamente mencionadas, estos últimos vectores contenían correspondientemente el gen nativo y mutado, sintetizados con los codones optimizados para *E. coli* y los sitios de restricción requeridos. Una vez digeridos se procedió a hacer la ligación de los genes de interés con el vector pET22b, obteniendo los plásmidos pET22-*ancut1* (Fig. 17) y pET22-*ancut1* K53I y se comprobó la correcta ligación por medio de secuenciación.

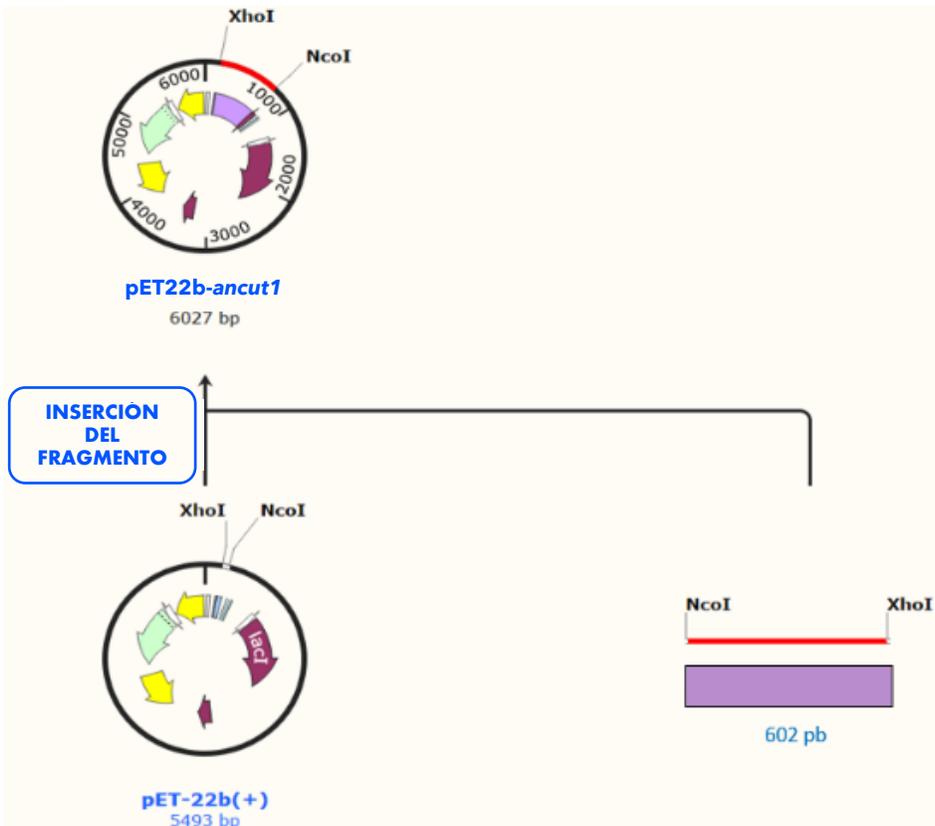


Figura 17. Esquema de la clonación del gen *ancut1* optimizado para expresión en *E. coli* en el vector pET22b

El vector pET22b posee características importantes, entre las cuales se encuentran la secuencia líder *pelB*, cuya función es la señalización de la excreción de la enzima recombinante al periplasma, el operador *lac*, que permite la inducción de la expresión del gen de interés en presencia de IPTG, el gen que confiere la resistencia a ampicilina, la secuencia que codifica para una cola de histidinas que permite rastrear y purificar la enzima y el promotor y terminador de la polimerasa de RNA T7, la cual permite generar transcritos del gen de manera más eficiente y rápida (Fig. 18).

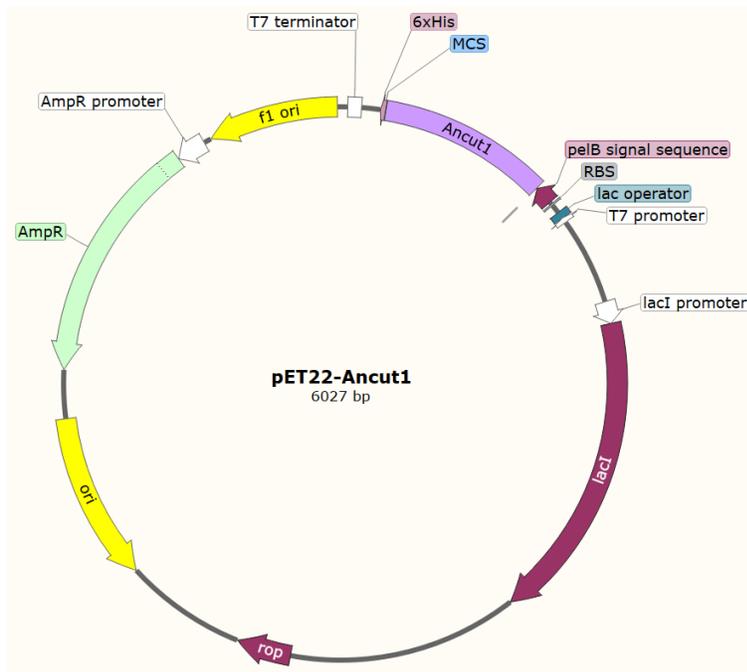


Figura 18. Esquema del vector pET22-*ancut1*.

La antes mencionada digestión de los vectores se comprobó por medio de una electroforesis (figura 19), en la que observamos la presencia de fragmentos con los tamaños esperados (carriles 2 y 4) y podemos diferenciarlos de los vectores sin digerir (carriles 1 y 3) con pesos más bajos debido a superenrollamiento del DNA.

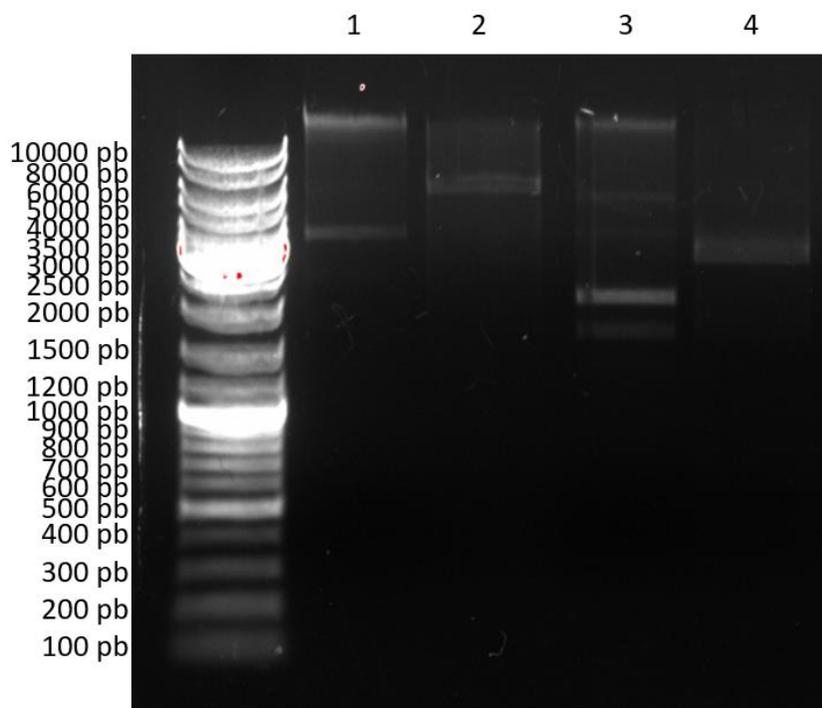


Figura 19. Doble digestión de pET22 y pUCIDT-AMP-*ancut1* con NcoI y XhoI. Carril 1. pET22 no digerido (~4000 pb). Carril 2. pET22 digerido (~5500 pb). Carril 3. pUCIDT-AMP-*ancut1* sin digerir (~2000 pb). Carril 4. pUCIDT-AMP-*ancut1* digerido (~2800 pb).

A continuación, las bandas fueron purificadas (Figura 20) para su posterior ligación y, finalmente, la construcción del vector de interés.

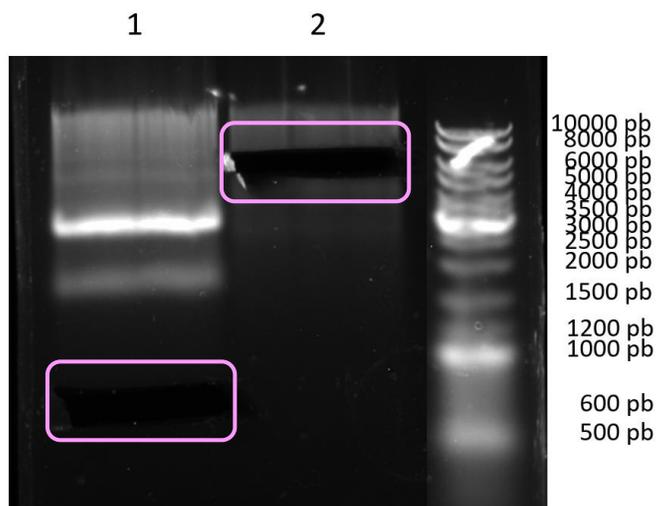


Figura 20. Recortes de bandas para la purificación de los fragmentos a ligar para generar el vector pET22-*ancut1*. Carril 1. pUCIDT-AMP-*ancut1* digerido NcoI y XhoI (~600 pb). Carril 2. pET22 digerido con NcoI y XhoI (~5500 pb). La ubicación de los fragmentos recortados se señala en los recuadros rosas.

Todo lo anterior se realizó también para el gen *ancut1* K531.

### 8.2.4 Transformación de *E. coli* DH5 con los vectores pET22b-*ancut1* y pET22b-*ancut1*K53I

Las construcciones pET22b-*ancut1* y pET22b-*ancut1* K53I se usaron para transformar a *E. coli* BL21.

La clonación de la bacteria se comprobó por medio de PCR de colonia en la que se usaron oligonucleótidos correspondientes al promotor y terminador de la polimerasa T7; estas secuencias se encuentran en el vector pET22b flanqueando la región en donde se deben encontrar los genes de interés clonados.

En la figura 21 se muestra el gel de agarosa obtenido después de la electroforesis de los amplicones, los cuales tienen el tamaño esperado (~830 pb) y con ello podemos comprobar la clonación de las bacterias con los vectores de interés.

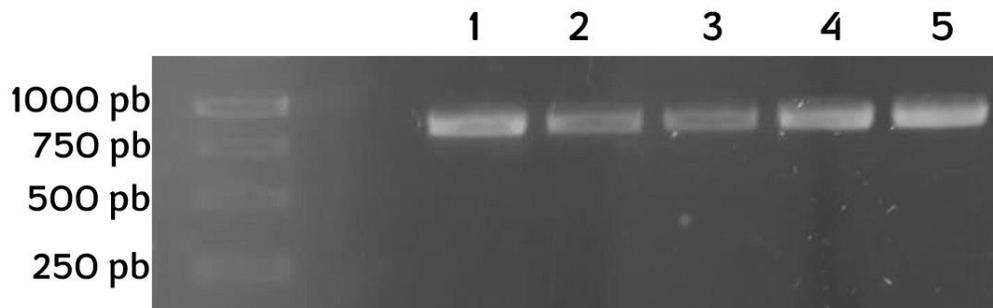


Figura 21. Comprobación de la transformación de *E. coli* con los productos de la ligación del vector pET22b y *ancut1* nativa y variante K53I. Carril 1-3. Productos de la amplificación de la región que contiene al gen *ancut1* (~860 pb). Carril 4-5. Productos de la amplificación de la región que contiene al gen *ancut1*K53I (~860 pb).

### 8.2.5 Estudio de ANCUT1 nativa y K53I producidas en *E. coli*

Una vez se comprobó que se tenían correctamente clonados los vectores pET22b-*ancut1* y pET22b-*ancut1*K53I, se procedió a la producción de las enzimas, para lo cual se tomaron como referencia las condiciones de producción y de inducción usadas para otras enzimas recombinantes en *E. coli* dentro del grupo de trabajo (Ortega-Escobar, 2017; Ibarra-Domínguez & Luna-Ávila, 2020) y en la literatura (Chen *et al.*, 2011), considerando también las condiciones indicadas en el manual de Novagen del sistema pET, 11<sup>a</sup> edición.

Se logró identificar a las enzimas por medio de perfiles de proteína (Figs. 22 y 23) en los que observamos una enzima del peso esperado de ~22 kDa en distintas fracciones del cultivo celular, incluyendo al sobrenadante, periplasma y los restos celulares y como control negativo se usó una cepa BL21 de *E. coli* clonada con el vector pET22b vacío.

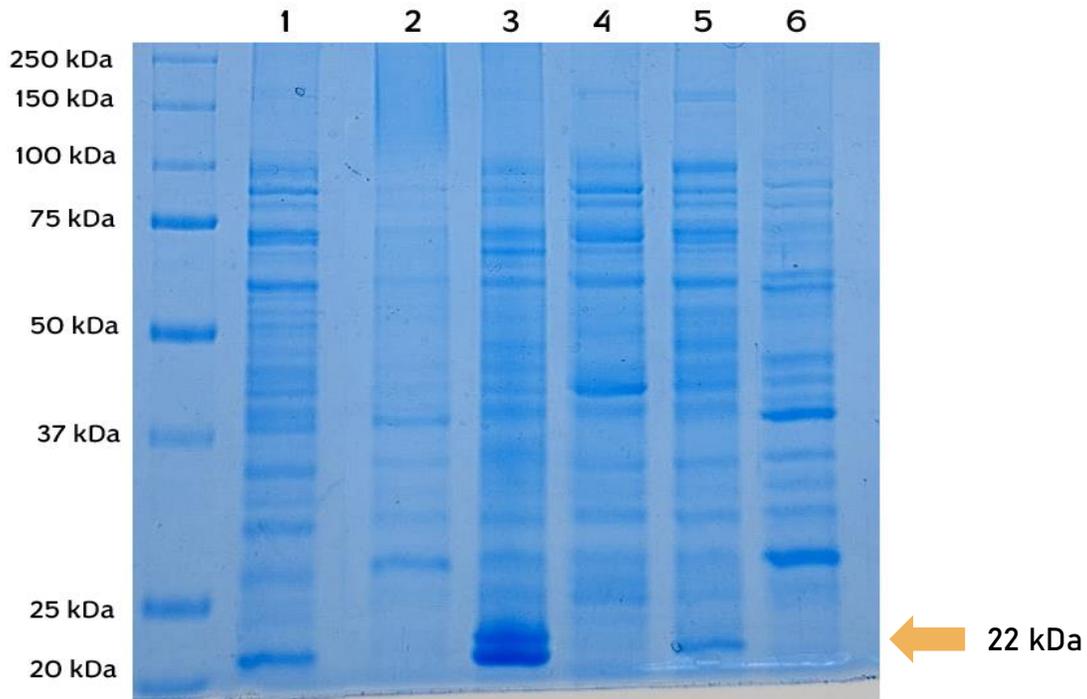


Figura 22. Perfiles de proteínas presentes en muestras de ANCUT1 nativa. Gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturalizantes. Carril 1: Sobrenadante. Carril 2: Control negativo de sobrenadante. Carril 3: Restos celulares. Carril 4: Control negativo de restos celulares. Carril 5: Periplasma. Carril 6: Control negativo de periplasma. Las muestras control provienen de cultivos de *E. coli* BL21 portadoras del vector pET22b vacío. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 30°C con 300 rpm.

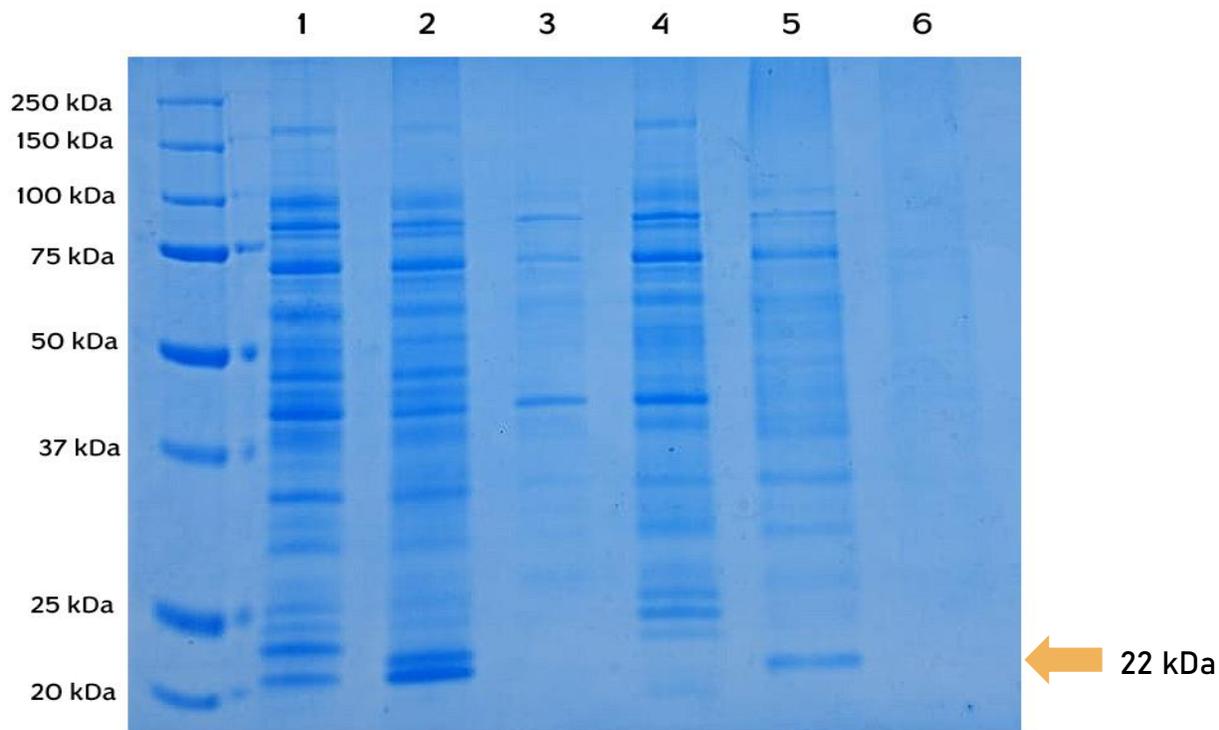


Figura 23. Perfiles de proteínas presentes en muestras de ACUT1 variante K53I. Gel de poliacrilamida al 12 % en condiciones desnaturilizantes. Carril 1: Periplasma. Carril 2: Restos celulares. Carril 3: Control negativo de periplasma. Carril 4: Control negativo de restos celulares. Carril 5: Sobrenadante. Carril 6: Control negativo de sobrenadante. Las muestras control provienen de cultivos de *E. coli* BL21 portadoras del vector pET22b vacío. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 30°C con 300 rpm.

Se comprobó la actividad de las enzimas de ~22 kDa por medio de zimogramas (Figs. 24 y 25), en los que se puede observar la actividad esterasa de las enzimas en todas las fracciones probadas. Debido a esto y por la conveniencia de no requerir ningún tipo de extracción, se decidió que los análisis posteriores se realizarían con la fracción correspondiente al medio extracelular.

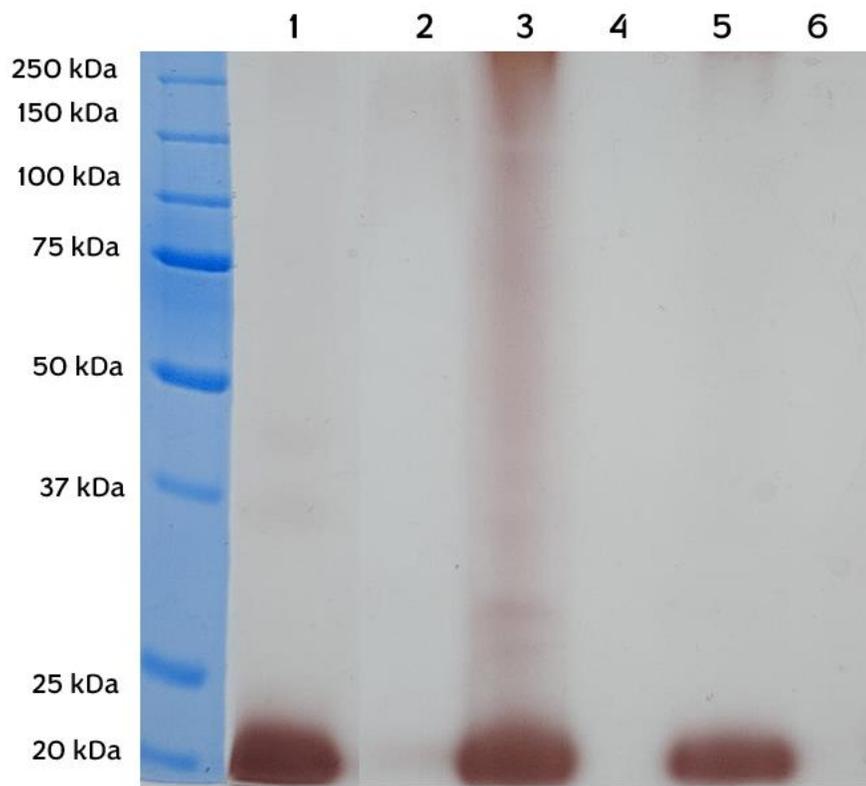


Figura 24. Zimograma de muestras de ANCUT1 nativa

Gel de poliacrilamida al 12 % renaturalizado. Carril 1: Sobrenadante. Carril 2: Control de sobrenadante. Carril 3: Restos celulares. Carril 4: Control de restos celulares. Carril 5: Periplasma. Carril 6: Control de periplasma. Las muestras control provienen de cultivos de *E. coli* BL21 portadoras del vector pET22b vacío. Las manchas rojas corresponden a los productos de la reacción enzimática. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 30°C con 300 rpm.

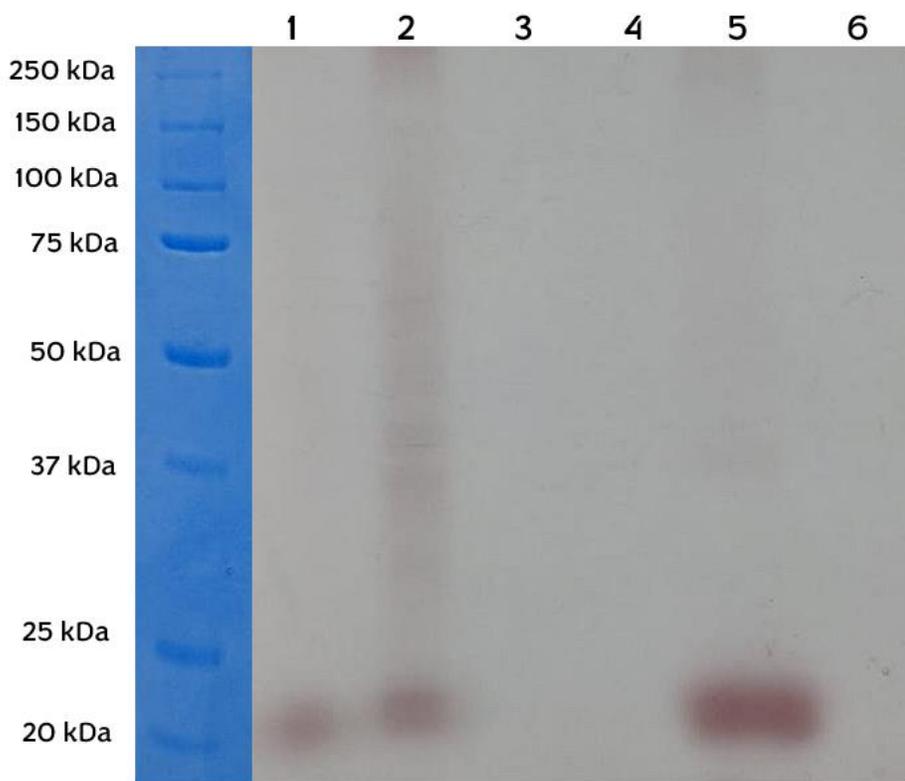


Figura 25. Zimograma de muestras de ANCUT1 K53I.

Gel de poliacrilamida al 12 % renaturalizado. Carril 1: Periplasma. Carril 2: Restos celulares. Carril 3: Control de periplasma. Carril 4: Control de restos celulares. Carril 5: Sobrenadante. Carril 6: Control de sobrenadante. Las muestras control provienen de cultivos de *E. coli* BL21 portadoras del vector pET22b vacío. Las manchas rojas corresponden a los productos de la reacción enzimática. Inducción realizada por 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 30°C con 300 rpm.

Debido a que se encontró una adecuada producción de la enzima con una inducción de tres horas, 30°C y 0.4 mM de IPTG, el resto de las producciones se realizaron bajo las mismas condiciones, pero no se realizó una optimización de la producción.

Con el sobrenadante se realizó la cuantificación de los productos de actividad esterasa de las enzimas ANCUT1 nativa y variante K53I producidas en *E. coli*, hacia pNPB, obteniendo su actividad específica y actividad volumétrica. Como se aprecia en la tabla 6, si bien la actividad volumétrica es similar para la nativa y la variante, no lo es la producción específica, indicando que de alguna manera la secuencia introducida con la mutación K53I afecta positivamente la expresión de proteínas.

Tabla 6. Actividad volumétrica y específica determinada para ANCUT1 nativa y variante hacia pNPB.

| ANCUT 1 | Volumen (mL) | Actividad volumétrica * (U/mL) | Desviación estándar | Actividad específica* (U/mg) | Desviación estándar |
|---------|--------------|--------------------------------|---------------------|------------------------------|---------------------|
| K53I    | 25           | 293.7                          | 13.3                | 4981.9                       | 195.5               |
| Nativa  | 25           | 217.8                          | 16.7                | 3873.4                       | 296.4               |

\*Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

\*\* Enzimas obtenidas a partir de una inducción de 3 horas, con 0.4 mM de IPTG a 30°C y 300 rpm.

Al comparar las actividades correspondientes a las enzimas producidas en *E. coli*, ANCUT1 nativa y variante K53I, podemos observar que los valores de actividad volumétrica y específica son significativamente mayores ( $p=0.024795$  y  $0.011112$ , respectivamente) para la variante K53I, lo cual podría estar indicando un inesperado aumento en la actividad de la variante concomitante con el aumento de la termoestabilidad. Otra posibilidad es que la mutación de la enzima fomente una mejor exportación al medio extracelular y eso sea lo que esté provocando el aumento en la actividad en el sobrenadante de la variante, lo cual coincide con lo observado en la fig. 25, en la que se observa una banda más intensa en el carril correspondiente al sobrenadante, a pesar de que la concentración de enzima en todos los carriles es la

misma. Entonces, para comprobar si realmente existe un incremento en la actividad de la variante en comparación con la nativa, se tiene que realizar la cuantificación de la actividad en todas las fracciones de los cultivos y de esta forma determinar el porcentaje de enzima que está siendo enviado fuera de la célula con respecto al total de enzima encontrado las tres fracciones. Si el porcentaje de enzima exportada al medio extracelular es similar entre la variante y la nativa, entonces podríamos afirmar que la primera sí tiene una capacidad catalítica mayor que su contraparte nativa, pero si se encuentra un porcentaje de enzima mucho más alto en el medio extracelular de la variante, entonces podemos asociar la diferencia entre los valores de actividad a una mayor presencia de la variante en el medio.

Pero, independientemente del motivo por el que tengamos mayores valores de actividad de la enzima ANCUT1 K53I, es posible afirmar que esta presenta una ventaja sobre la enzima nativa, ya sea por tener más actividad o por tener una mayor capacidad de exportación extracelular.

Además, de acuerdo con los valores anteriores, podemos observar que ambas enzimas presentan una alta actividad específica y una baja actividad volumétrica, lo cual indica que hay poca enzima en el sobrenadante, pero tiene una alta pureza (Bommarius & Riebel, 2002; Wu & Lin, 2010), por lo que aún es necesario encontrar las condiciones óptimas de producción de ANCUT1 en *E. coli* para que pueda ser comparable con la producción en la levadura, cuya actividad volumétrica corresponde a 1919.56 U/mL y actividad específica es 6192.13 U/mg en un cultivo de 25 mL. Pero podemos considerarlo como indicio del potencial de la bacteria para producir eficiente ANCUT1, ya que con una octava parte del tiempo de inducción en *P. pastoris*, se obtiene en *E. coli* más de la mitad del valor de actividad específica.

Adicionalmente, al observar una tabla comparativa de la actividad específica de distintas cutinasas hacia p-nitrofenol (Tabla 7), podemos observar que todas las versiones de ANCUT1 recombinante tienen los valores más altos, incluso la enzima producida en *E. coli* sin haber optimizado su producción presenta valores de actividad específica mayores que otras cutinasas estudiadas, lo que confirma el potencial de actividad de esta enzima.

Tabla 7. Comparación de la actividad específica de distintas cutinasas hacia p-nitrofenol

| Nombre de la cutinasa | Actividad específica (U/mg) | Organismo de expresión                     | Referencia                |
|-----------------------|-----------------------------|--|---------------------------|
| Rcut                  | 2,190                       | <i>E. coli</i> Rosetta-gami™ 2 (DE3) pLysS | Won <i>et al.</i> , 2022  |
| TtCutopt              | 2,322.40                    | <i>P. pastoris</i>                         | Duan <i>et al.</i> , 2019 |
| cutinasaNS            | 1,063.50                    | <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)          | Su <i>et al.</i> , 2013   |
| ANCUT1                | 3,873.40                    | <i>E. coli</i>                             | Presente trabajo          |
| ANCUT1 K53I           | 4,981.90                    | <i>E. coli</i>                             |                           |
| ANCUT1                | 6,192.10                    | <i>P. pastoris</i>                         | Solíz-Baez, 2015          |

### 8.3 Estudio de la termoestabilidad de Ancut1 nativa y variante K53I

Una vez que se confirmó la existencia de actividad en ambas enzimas, se procedió a realizar los análisis comparativos de termoestabilidad.

#### 8.3.1 Efecto de la temperatura en la actividad residual de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB

Como primer punto, se evaluó la actividad residual hacia pNPB de ambas enzimas a distintas temperaturas, de 35 a 90°C, esto nos permitió obtener gráficos donde tenemos los patrones correspondientes a la actividad residual después de 15, 30 y 60 minutos en cada una de las temperaturas probadas.

Se observa una diferencia interesante en los patrones de las temperaturas de 35-60°C, ya que para ANCUT1 nativa se tienen picos de actividad residual relativa en el primer tiempo en casi todas las temperaturas (Fig. 26), lo cual coincide con otros reportes de actividad relativa en los que hay una pérdida de actividad en el tiempo (Ma *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2009; Al-Tammar *et al.*, 2016; Shirke *et al.*, 2017; Shirke *et al.*, 2018). Esto es probablemente atribuible a la desnaturalización térmica de la enzima y su consecuente pérdida de actividad (Lam *et al.*, 2011). A 40 y 45°C, los picos de actividad residual relativa se encuentran a los 30 minutos.

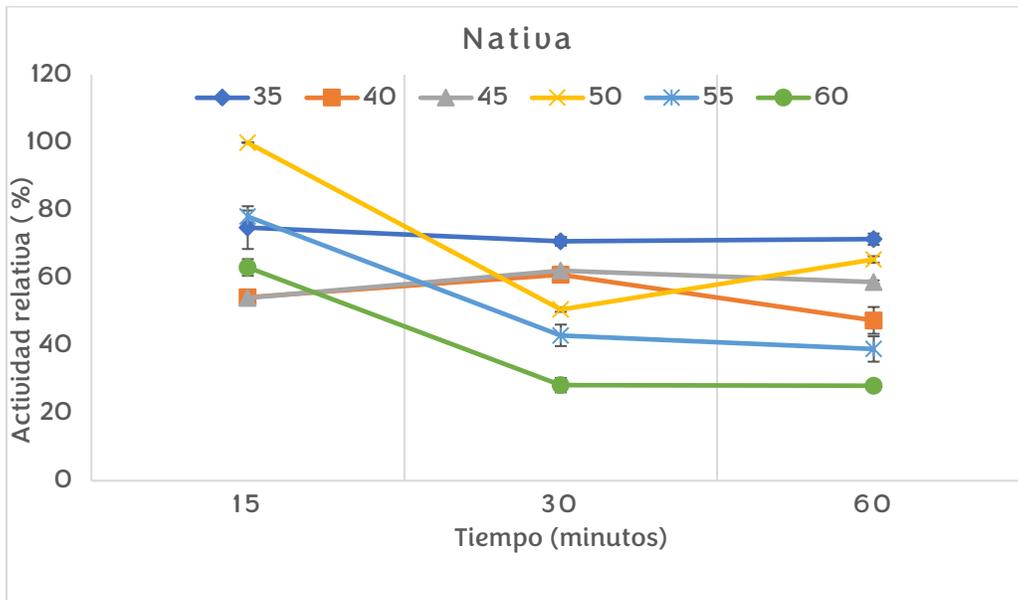


Figura 26. Actividad residual de ANCU1 nativa hacia pNPB de 35-60°C después de 15, 30 y 60 minutos. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

Mientras que para la variante K53I se observa un patrón opuesto, en el que tenemos el pico de actividad relativa a los 60 minutos en las temperaturas de 35 a 60°C (Fig. 27) (con excepciones a 40°C, en donde observamos una disminución gradual de la actividad residual relativa, y a 45°C, donde tenemos el pico de actividad, al igual que en la enzima nativa, a los 30 minutos).

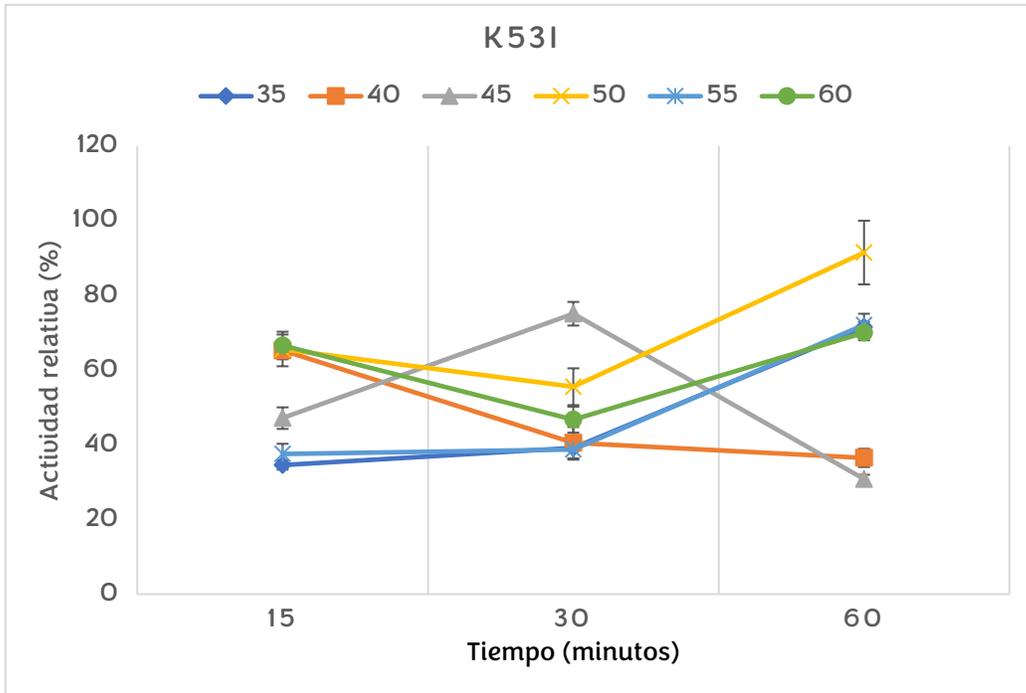


Figura 27. Actividad residual de ANcut1 K53I hacia pNPB de 35-60°C después de 15, 30 y 60 minutos. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones

El patrón diferente observado en la actividad residual de K53I a temperaturas de 35-60°C podría deberse a cambios conformacionales inducidos por el calor, que a su vez pueden tener un impacto importante en la actividad de la enzima, más específicamente, podría haber una activación térmica de la enzima, lo cual coincide con aspectos teóricos de las enzimas termófilas: Las interacciones extra estabilizantes de las enzimas termófilas aportan rigidez a la estructura, que a su vez hace a estas enzimas menos activas a temperaturas bajas (Lam *et al.*, 2011) y la activación térmica implica que hay un evento de traspaso de barreras energéticas de activación en las que la energía térmica proveniente de las altas temperaturas permite en las enzimas un cambio conformacional beneficioso que puede cambiar la rigidez antes mencionada y a su vez permitir una unión más eficiente entre el sustrato y la enzima (Cai & Hong, 2012; Hammes, 2012).

Para ANcut1 K53I parece que se necesita, bajo las condiciones probadas, incubación a temperaturas altas para llegar a su máxima actividad relativa, en un periodo de 60 minutos, por lo que es una posibilidad que esta enzima requiera los cambios conformacionales causados por el calor para incrementar su actividad catalítica. Pero para poder afirmar que hay una activación térmica de K53I y entender cómo funciona, es

importante estudiar su estructura bajo distintas condiciones de temperatura, para, a su vez, identificar qué cambios estructurales ocurren cuando la temperatura aumenta. Esto puede ser estudiado de manera *in vitro*, por medio de cristalografía de rayos X, calorimetría de barrido diferencial o usando medidas de dicroísmo circular. También, se pueden usar métodos *in silico*, por medio de simulaciones de dinámicas moleculares que permitan entender los cambios conformacionales de la enzima a distintas temperaturas y poder compararlos con su contraparte nativa.

Con respecto a las temperaturas más altas, de 65-90°C (Fig. 28 y 29), podemos observar que en general, tanto en la nativa como en la variante, la actividad residual va disminuyendo gradualmente. A pesar de esto, también es posible observar en el gráfico que la disminución de la actividad de la enzima K53I, es menos drástica que en la nativa, lo cual se ve reflejado en valores más altos de actividad residual en la variante, con diferencias significativas entre los valores obtenidos de ambas enzimas ( $p < 0.05$ ), excepto a los 15 minutos de 65°C ( $p=0.179$ ) y los tiempos 30 y 60 a 70°C ( $p=0.077$  y  $0.087$ , correspondientemente). Lo anterior nos permite afirmar que la termoestabilidad de la variante en las temperaturas de 65-90°C es mayor que la enzima silvestre bajo las condiciones probadas y con las excepciones antes mencionadas (65 y 70°C).

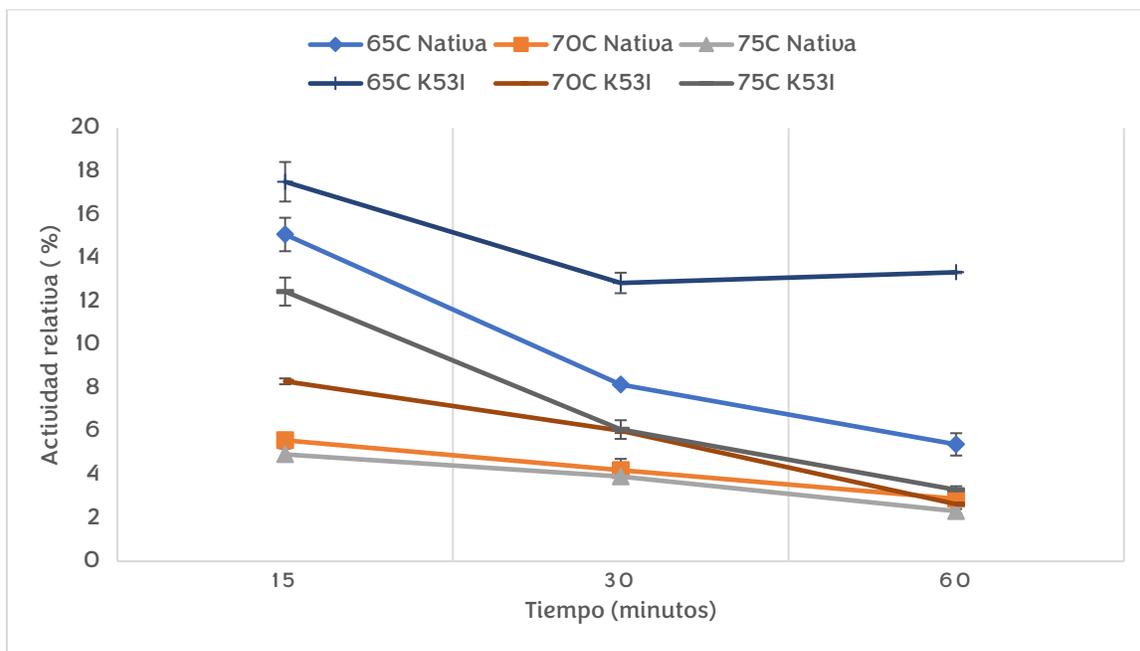


Figura 28. Comparación de la actividad residual de ANcut1 nativa y K53I hacia pNPB de 65-75°C después de 15, 30 y 60 minutos. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

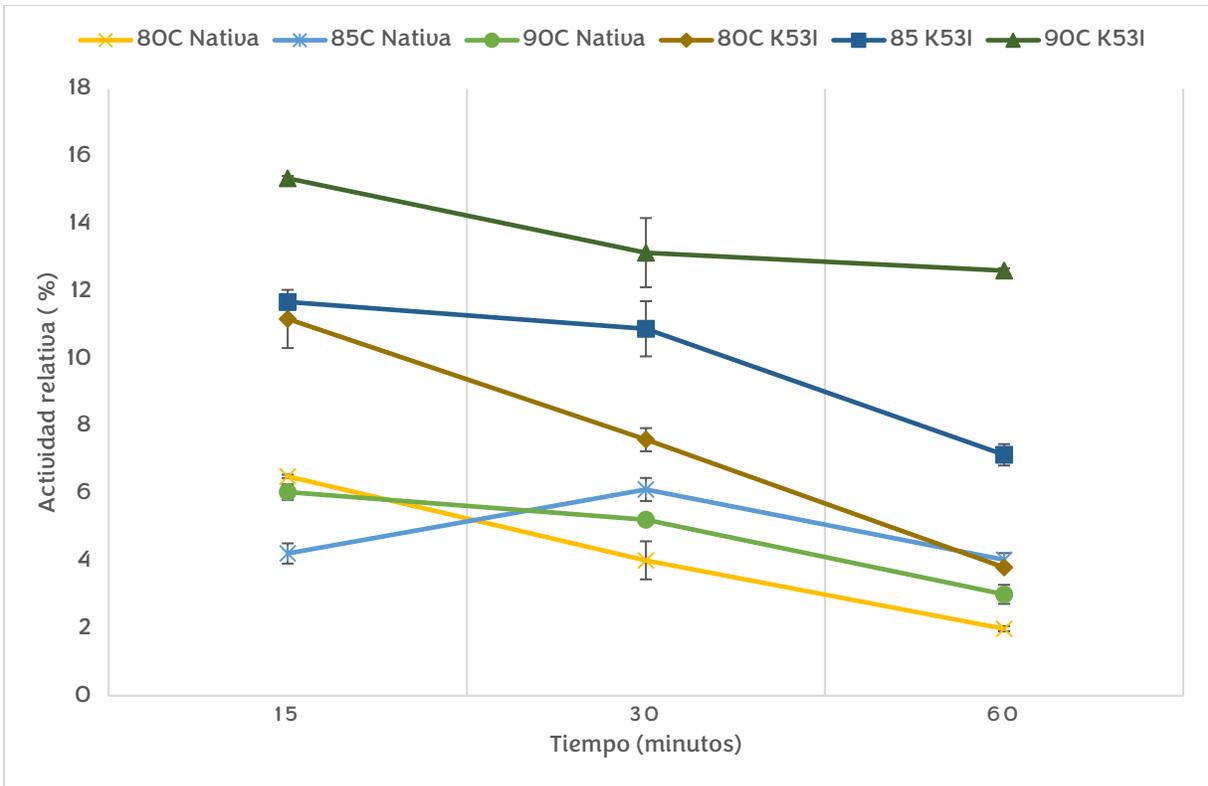


Figura 29. Comparación de la actividad residual de ANCU1 nativa y K53I hacia pNPB de 70-90°C después de 15, 30 y 60 minutos. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

Adicionalmente, se obtuvo un gráfico comparativo de la actividad residual relativa a 60 minutos de ANCU1 variante y nativa (Fig. 30) en el que podemos observar el aumento en la termoestabilidad de la variante K53I que se ve reflejado en una mayor actividad relativa comparado con la silvestre, en todas las temperaturas (con diferencias significativas  $p < 0.05$ ), con excepción de 35, 40, 50 y 70°C ( $p = 0.98, 0.14, 0.09$  y  $0.09$ , respectivamente) y 45°C, donde se observa una mayor actividad residual relativa en la enzima nativa ( $p = 0.002$ ).

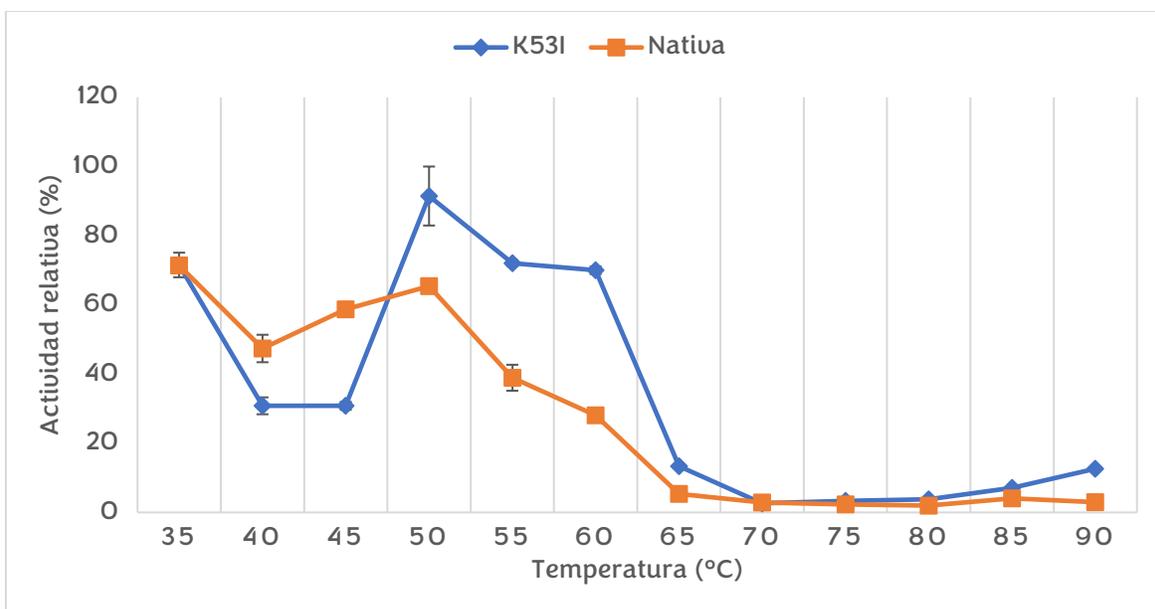


Figura 30. Comparación de actividad residual hacia pNPB de ANCUT1 nativa y K53I después de 60 minutos a distintas temperaturas (35-90°C). Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

### 8.3.2 Temperatura de máxima actividad de ANCUT1 nativa y K53I hacia pNPB

Se finalizó el estudio de la termoestabilidad recurriendo a la determinación de actividad en función de la temperatura, empleando como reacción modelo la hidrólisis del pNPB. Se llevaron a cabo las reacciones en un rango de 40 a 90°C. Mientras que para la enzima nativa se encontró una temperatura máxima a los 55°C (Fig. 31) ( $p < 0.05$  entre los valores obtenidos a 55°C y a cada una de las demás temperaturas), para la variante K53I se encontró el máximo entre 65 y 75°C (Fig. 32), sin diferencia significativa entre ellos ( $p < 0.05$  entre los valores obtenidos a esas temperaturas), en las condiciones probadas. Además, es importante resaltar que, en las temperaturas de 40, 45, 65-80°C, la actividad relativa es mayor en la variante que en la nativa, lo cual, además del notable incremento en su temperatura de máxima actividad (más de 10°C), nos permite confirmar que la variante K53I sí posee una mayor termoestabilidad que ANCUT1 nativa bajo las condiciones analizadas.

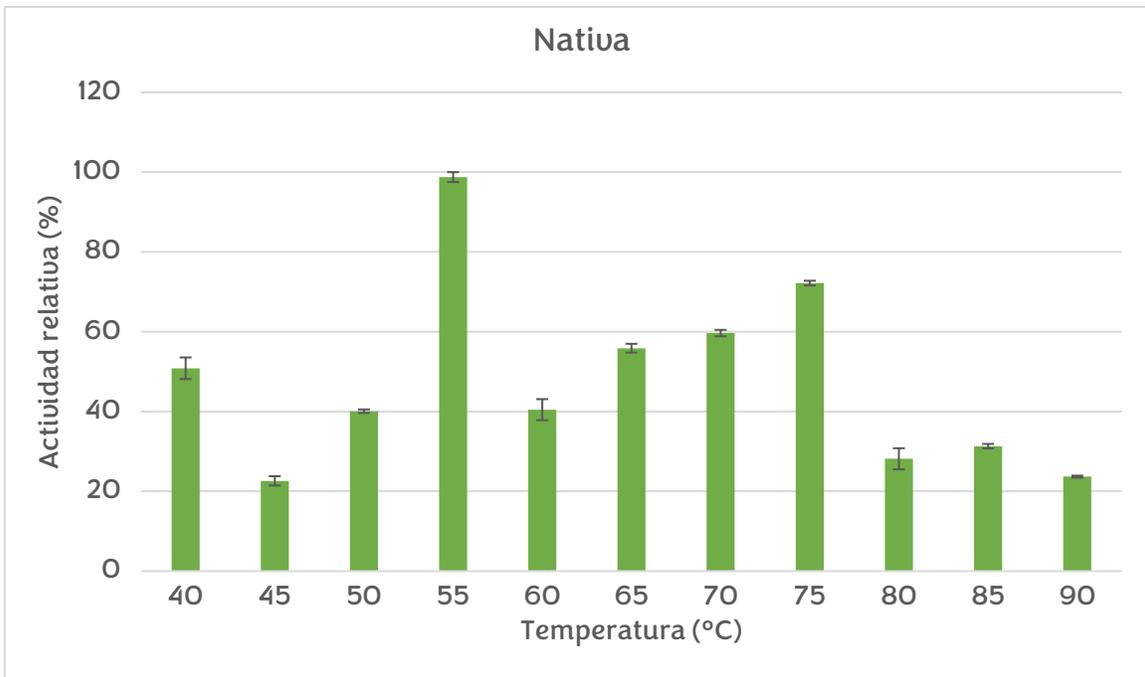


Figura 31. Actividad de AN CUT1 nativa hacia pNPB en función de la temperatura, de 40-90 °C. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

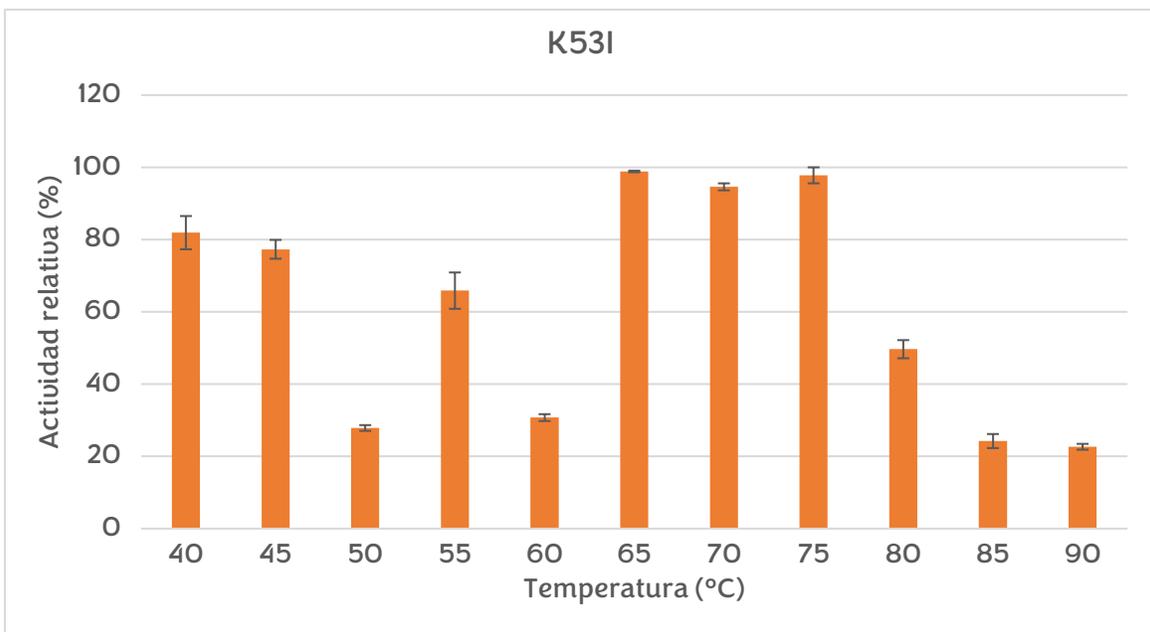


Figura 32. Actividad de AN CUT1 nativa hacia pNPB en función de la temperatura, de 40-90 °C. Valores obtenidos del promedio de tres repeticiones.

## 9. Conclusiones

Se comprobó que la sustitución de un residuo elegido por medio del alineamiento de dos secuencias con diferencias de termoestabilidad, un análisis estructural, la predicción de las interacciones intraproteína del  $\Delta\Delta G$  de las variantes posibles, genera una variante de ANCUT1 con mayor termoestabilidad que su contraparte nativa. El aumento en la estabilidad térmica de la variante K53I podría explicarse parcialmente con el aumento en las interacciones intraproteína predichas por los servidores usados a partir del modelo generado con Alpha Fold.

Se observó un aumento en la temperatura óptima de la variante K53I en comparación con la enzima recombinante ANCUT1 nativa, pasando de 55°C a un rango de 65-75°C, bajo las condiciones probadas. Además, se observó un patrón diferente de actividad residual en la variante K53I y en ANCUT1 nativa. La razón de esta diferencia debe ser explorada.

La comprobación del fenómeno fue posible gracias a que *E. coli* BL21 es capaz de producir ANCUT1 nativa y variante K53I, y que el vector pET22b permite exportarlas al medio extracelular.

## 10. Perspectivas

La enzima recombinante y su variante K53I deben ser purificadas para determinar sus características bioquímicas, catalíticas y termodinámicas y así explicar la razón de las diferencias observadas. Por otra parte, dado que el interés sobre el estudio de la enzima proviene de su capacidad de degradación de PET es necesario realizar pruebas de actividad contra el mismo con la variante, para comprobar si hay un incremento en la actividad de esta hacia el poliéster (en comparación con la nativa), a altas temperaturas, cercanas a la de transición vítrea del PET.

## 11. Referencias

Agrios, G. (2005) Chapter five - How pathogens attack plants, Editor: Agrios, G. *Plant Pathology* (Fifth Edition), Academic Press. Pp 175-205.

Aldeghi, M., de Groot, B. L., & Gapsys, V. (2019). Accurate calculation of free energy changes upon amino acid mutation. *Computational Methods in Protein Evolution*, 19-47.

Al-Tammar, K. A., Omar, O., Murad, A. M. A., & Bakar, F. D. A. (2016). Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*. *Open Life Sciences*, 11(1), 29-38.

Ban, X., Wu, J., Kaustubh, B., Lahiri, P., Dhoble, A. S., Gu, Z., & Li, Z. (2020). Additional salt bridges improve the thermostability of 1, 4- $\alpha$ -glucan branching enzyme. *Food chemistry*, 316, 126348.

Ban, X., Xie, X., Li, C., Gu, Z., Hong, Y., Cheng, L. & Li, Z. (2021). The desirable salt bridges in amylases: Distribution, configuration and location. *Food chemistry*, 354, 129475.

Bermúdez-García, E.; Peña-Montes, C.; Castro-Rodríguez, J.A.; González-Canto, A.; Navarro-Ocaña, A.; Farrés, A. ANCUT2, a thermo-alkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its potential applications. (2017) *Appl. Biochem. Biotechnol.* , 182, 1014–1036.

Bommarius, A. S., & Riebel, B. R. (2002). *Biocatalysis: fundamentals and applications*. Wiley-VCH.

Borgo, B., & Havranek, J. J. (2012). Automated selection of stabilizing mutations in designed and natural proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(5), 1494-1499.

Bryant, P., Pozzati, G., Zhu, W., Shenoy, A., Kundrotas, P., & Elofsson, A. (2022). Predicting the structure of large protein complexes using AlphaFold and Monte Carlo tree search. *Nature communications*, 13(1), 6028.

Cai, W., & Hong, H. (Eds.). (2012). *Protein-protein Interactions: Computational and Experimental Tools*. BoD–Books on Demand.

Cao, H., Wang, J., He, L., Qi, Y., & Zhang, J. Z. (2019). DeepDDG: predicting the stability change of protein point mutations using neural networks. *Journal of chemical information and modeling*, 59(4), 1508-1514.

Capriotti, E., Fariselli, P., & Casadio, R. (2005). I-Mutant2. 0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure. *Nucleic acids research*, 33(suppl\_2), W306-W310.

Castro-Rodríguez, J. A., Rodríguez-Sotres, R., & Farrés, A. (2023). Determinants for an Efficient Enzymatic Catalysis in Poly (Ethylene Terephthalate) Degradation. *Catalysts*, 13(3), 591.

Chakravorty, D., Khan, M. F., & Patra, S. (2017). Multifactorial level of extremostability of proteins: can they be exploited for protein engineering?. *Extremophiles*, 21(3), 419-444.

Chen, S., Liu, Z., Chen, J., & Wu, J. (2011). Study on Improvement of Extracellular Production of Recombinant *Thermobifida fusca* Cutinase by *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(2), 666–675.

Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology advances*, 31(8), 1754-1767.

Chen, C. W., Lin, M. H., Liao, C. C., Chang, H. P., & Chu, Y. W. (2020)a. iStable 2.0: predicting protein thermal stability changes by integrating various characteristic modules. *Computational and structural biotechnology journal*, 18, 622-630.

Chen, Y., Lu, H., Zhang, N., Zhu, Z., Wang, S., & Li, M. (2020)b. PremPS: Predicting the impact of missense mutations on protein stability. *PLoS computational biology*, 16(12), e1008543.

Cheng, J., Randall, A., & Baldi, P. (2006). Prediction of protein stability changes for single-site mutations using support vector machines. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 62(4), 1125-1132.

Chi, H., Zhu, X., Shen, J., Lu, Z., Lu, F., Lyu, Y., & Zhu, P. (2023). Thermostability enhancement and insight of L-asparaginase from *Mycobacterium* sp. via consensus-guided engineering. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *107*(7-8), 2321-2333.

David, A., Islam, S., Tankhilevich, E., & Sternberg, M. J. (2022). The AlphaFold database of protein structures: a biologist's guide. *Journal of molecular biology*, *434*(2), 167336.

Dewi, K. S., & Fuad, A. M. (2020). Improving the Expression of Human Granulocyte Colony Stimulating Factor in *Escherichia coli* by Reducing the GC-content and Increasing mRNA Folding Free Energy at 5'-Terminal End. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *10*(4), 610.

Diao, J., Hu, Y., Tian, Y., Carr, R., & Moon, T. S. (2023). Upcycling of poly (ethylene terephthalate) to produce high-value bio-products. *Cell Reports*, *42*(1), 111908.

Dong, Q., Yuan, S., Wu, L., Su, L., Zhao, Q., Wu, J. & Zhou, J. (2020). Structure-guided engineering of a *Thermobifida fusca* cutinase for enhanced hydrolysis on natural polyester substrate. *Bioresources and Bioprocessing*, *7*(1), 1-9.

Duan, X., Jiang, Z., Liu, Y., Yan, Q., Xiang, M., & Yang, S. (2019). High-level expression of codon-optimized *Thielavia terrestris* cutinase suitable for ester biosynthesis and biodegradation. *International journal of biological macromolecules*, *135*, 768-775.

Farrés, A. Peña Montes, C., Hernández, E., Morales, S., Sánchez, M. y Solís, I. (2021). Cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* para degradación de poliésteres. Patente Mexicana, Título 3800946

Fatima, K., Naqvi, F., & Younas, H. (2021). A Review: Molecular Chaperone-mediated Folding, Unfolding and Disaggregation of Expressed Recombinant Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *79*(2), 153–174.

Folch, B., Rooman, M., & Dehouck, Y. (2008). Thermostability of salt bridges versus hydrophobic interactions in proteins probed by statistical potentials. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *48*(1), 119-127.

Fowler, N. J., & Williamson, M. P. (2022). The accuracy of protein structures in solution determined by AlphaFold and NMR. *Structure*, *30*(7), 925-933. Gao, Y., Lu, X., Duan, L.

L., Zhang, J. Z., & Mei, Y. (2012). Polarization of intraprotein hydrogen bond is critical to thermal stability of short helix. *The Journal of Physical Chemistry B*, 116(1), 549-554.

Hammes, G. (2012). *Enzyme catalysis and regulation*. Elsevier. Pp 50-59

Hayat, S. M., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*): what we need to know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718-725.

Hendsch, Z. S., Jonsson, T., Sauer, R. T., & Tidor, B. (1996). Protein stabilization by removal of unsatisfied polar groups: computational approaches and experimental tests. *Biochemistry*, 35(24), 7621-7625.

Iannuzzelli, J. A., Bacik, J. P., Moore, E. J., Shen, Z., Irving, E. M., Vargas, D. A. & Fasan, R. (2022). Tuning enzyme thermostability via computationally guided covalent stapling and structural basis of enhanced stabilization. *Biochemistry*, 61(11), 1041-1054.

Ibarra-Domínguez, K.P. & Luna-Ávila, L. (2020) Elementos moleculares y bioquímicos para el análisis de la peptidoglucan hidrolasa bifuncional de 99-kda de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. UNAM.

Jo, B. H., Park, T. Y., Park, H. J., Yeon, Y. J., Yoo, Y. J., & Cha, H. J. (2016). Engineering de novo disulfide bond in bacterial  $\alpha$ -type carbonic anhydrase for thermostable carbon sequestration. *Scientific Reports*, 6(1), 1-9.

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), 1-12.

Jumper, J., & Hassabis, D. (2022). Protein structure predictions to atomic accuracy with AlphaFold. *Nature Methods*, 19(1), 11-12.

Kaabel, S., Therien, J. D., Deschênes, C. E., Duncan, D., Frišćić, T., & Auclair, K. (2021). Enzymatic depolymerization of highly crystalline polyethylene terephthalate enabled in moist-solid reaction mixtures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(29), e2026452118.

Kaur, J., Kumar, A., & Kaur, J. (2018). Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803-822.

Kawabata, T., Oda, M., & Kawai, F. (2017). Mutational analysis of cutinase-like enzyme, Cut190, based on the 3D docking structure with model compounds of polyethylene terephthalate. *Journal of bioscience and bioengineering*, 124(1), 28-35.

Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 4253-4268.

Khan, M. S. (Ed.). (2021). *Frontiers in Molecular Pharming* (Vol. 2). Bentham Science Publishers. Pp 66-76

Kim, T., Joo, J. C., & Yoo, Y. J. (2012). Hydrophobic interaction network analysis for thermostabilization of a mesophilic xylanase. *Journal of biotechnology*, 161(1), 49-59.

Kjølbye, L. R., Laustsen, A., Vestergaard, M., Periole, X., De Maria, L., Svendsen, A. & Schiøtt, B. (2019). Molecular modeling investigation of the interaction between *Humicola insolens* cutinase and SDS surfactant suggests a mechanism for enzyme inactivation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(5), 1977-1987.

Klingler, M., Hörmann, A. A., Rangger, C., Desrues, L., Castel, H., Gandolfo, P., & von Guggenberg, E. (2020). Stabilization strategies for linear minigastrin analogues: Further improvements via the inclusion of proline into the peptide sequence. *Journal of Medicinal Chemistry*, 63(23), 14668-14679.

Laimer, J., Hofer, H., Fritz, M., Wegenkittl, S., & Lackner, P. (2015). MAESTRO-multi agent stability prediction upon point mutations. *BMC bioinformatics*, 16(1), 1-13.

Lam, S. Y., Yeung, R. C., Yu, T. H., Sze, K. H., & Wong, K. B. (2011). A rigidifying salt-bridge favors the activity of thermophilic enzyme at high temperatures at the expense of low-temperature activity. *PLoS Biology*, 9(3), e1001027.

Lee, C. W., Wang, H. J., Hwang, J. K., & Tseng, C. P. (2014). Protein thermal stability enhancement by designing salt bridges: a combined computational and experimental study. *PloS One*, *9*(11), e112751.

Lehmann, M., Pasamontes, L., Lassen, S. F., & Wyss, M. (2000). The consensus concept for thermostability engineering of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-protein structure and molecular enzymology*, *1543*(2), 408-415.

Li, P., Anumanthan, A., Gao, X. G., Ilangovan, K., Suzara, V. V., Düzgüneş, N., & Renugopalakrishnan, V. (2007). Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *142*(2), 105-124.

Li, S., Yang, Q., & Tang, B. (2020). Improving the thermostability and acid resistance of *Rhizopus oryzae*  $\alpha$ -amylase by using multiple sequence alignment based site-directed mutagenesis. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *67*(4), 677-684.

Liang, X., & Zou, H. (2022). Biotechnological Application of Cutinase: A Powerful Tool in Synthetic Biology. *SynBio*, *1*(1), 54-64.

Lin, W., Chan, M., Goh, L. L., & Sim, T. S. (2007). Molecular basis for thermal properties of *Streptomyces thermovulgaris* fumarase C hinge at hydrophilic amino acids R163, E170 and S347. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *75*(2), 329-335.

Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P. J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G. & Montclare, J. K. (2009). Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *Journal of the American Chemical Society*, *131*(43), 15711-15716.

Ma, Y., Evans, D., Logue, S., & Langridge, P. (2001). Mutations of barley  $\beta$ -amylase that improve substrate-binding affinity and thermostability. *Molecular Genetics and Genomics*, *266*(3), 345-352.

Macauley-Patrick, S., Fazenda, M. L., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2005). Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, *22*(4), 249-270.

Machado de Castro, A., Carniel, A., Nicomedes Junior, J., da Conceição Gomes, A., & Valoni, É. (2017). Screening of commercial enzymes for poly (ethylene terephthalate)

(PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 44(6), 835-844.

Machado de Castro, A., Carniel, A., Stahelin, D., Junior, L. S. C., de Angeli Honorato, H., & de Menezes, S. M. C. (2019). High-fold improvement of assorted post-consumer poly (ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using *Humicola insolens* cutinase as a single biocatalyst. *Process Biochemistry*, 81, 85-91.

Maguire, J. B., Boyken, S. E., Baker, D., & Kuhlman, B. (2018). Rapid sampling of hydrogen bond networks for computational protein design. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 14(5), 2751-2760.

Martínez, A., & Maicas, S. (2021). Cutinases: characteristics and insights in industrial production. *Catalysts*, 11(10), 1194.

Merkl, R., & Sterner, R. (2016). Reconstruction of ancestral enzymes. *Perspectives in Science*, 9, 17-23.

Musil, M., Stourac, J., Bendl, J., Brezovsky, J., Prokop, Z., Zendulka, J., & Damborsky, J. (2017). FireProt: web server for automated design of thermostable proteins. *Nucleic acids research*, 45(W1), W393-W399.

Morales-García, S.L. (2018) Degradación de polietilen tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes AN CUT1 y AN CUT2 de *Aspergillus nidulans*. [Tesis de maestría no publicada]. UNAM

Nikolaivits, E., Kanelli, M., Dimarogona, M., & Topakas, E. (2018). A middle-aged enzyme still in its prime: recent advances in the field of cutinases. *Catalysts*, 8(12), 612.

Ortega-Escobar, A. I. (2017) Actividad antimicrobiana de enzimas recombinantes generadas a partir de una proteína bifuncional producida por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. Tesis de Licenciatura. UNAM

Parthiban, V., Gromiha, M. M., Hoppe, C., & Schomburg, D. (2007). Structural analysis and prediction of protein mutant stability using distance and torsion potentials: role of secondary structure and solvent accessibility. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 66(1), 41-52.

Perrakis, A., & Sixma, T. K. (2021). AI revolutions in biology: The joys and perils of AlphaFold. *EMBO reports*, 22(11), e54046.

Phue, J. N., Lee, S. J., Trinh, L., & Shiloach, J. (2008). Modified *Escherichia coli* B (BL21), a superior producer of plasmid DNA compared with *Escherichia coli* K (DH5 $\alpha$ ). *Biotechnology and bioengineering*, 101(4), 831-836.

Plastics-The Facts. (2022). Disponible online: [https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2022/10/PE-PLASTICS-THE-FACTS\\_V7-Tue\\_19-10-1.pdf](https://plasticseurope.org/wp-content/uploads/2022/10/PE-PLASTICS-THE-FACTS_V7-Tue_19-10-1.pdf) (se accedió el 30 de mayo del 2023). Rathi, P. C., Jaeger, K. E., & Gohlke, H. (2015). Structural rigidity and protein thermostability in variants of lipase A from *Bacillus subtilis*. *PloS One*, 10(7), e0130289.

Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein science*, 28(8), 1412-1422.

Reslan, M., Sifniotis, V., Cruz, E., Sumer-Bayraktar, Z., & Kayser, V. (2020). Enhancing the stability of adalimumab by engineering additional glycosylation motifs. *International journal of biological macromolecules*, 158, 189-196.

Roney, J. P., & Ovchinnikov, S. (2022). State-of-the-art estimation of protein model accuracy using AlphaFold. *Physical Review Letters*, 129(23), 238101.

Sammond, D. W., Kastelowitz, N., Himmel, M. E., Yin, H., Crowley, M. F., & Bomble, Y. J. (2016). Comparing residue clusters from thermophilic and mesophilic enzymes reveals adaptive mechanisms. *PLoS One*, 11(1), e0145848.

Saqib, A. A., & Siddiqui, K. S. (2018). How to calculate thermostability of enzymes using a simple approach. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46(4), 398-402.

Scott, K. A., Alonso, D. O., Sato, S., Fersht, A. R., & Daggett, V. (2007). Conformational entropy of alanine versus glycine in protein denatured states. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2661-2666.

Sharma, S., Vaid, S., Bhat, B., Singh, S., & Bajaj, B. K. (2019). Thermostable enzymes for industrial biotechnology, in advances in enzyme technology.

- Shilling, P. J., Mirzadeh, K., Cumming, A. J., Widesheim, M., Köck, Z., & Daley, D. O. (2020). Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in *Escherichia coli*. *Communications Biology*, 3(1), 214.
- Shirke, A. N., Basore, D., Butterfoss, G. L., Bonneau, R., Bystroff, C., & Gross, R. A. (2016). Toward rational thermostabilization of *Aspergillus oryzae* cutinase: insights into catalytic and structural stability. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 84(1), 60-72.
- Shirke, A. N., Su, A., Jones, J. A., Butterfoss, G. L., Koffas, M. A., Kim, J. R., & Gross, R. A. (2017). Comparative thermal inactivation analysis of *Aspergillus oryzae* and *Thielavia terrestris* cutinase: role of glycosylation. *Biotechnology and Bioengineering*, 114(1), 63-73.
- Shirke, A. N., White, C., Englaender, J. A., Zwarycz, A., Butterfoss, G. L., Linhardt, R. J., & Gross, R. A. (2018). Stabilizing leaf and branch compost cutinase (LCC) with glycosylation: mechanism and effect on PET hydrolysis. *Biochemistry*, 57(7), 1190-1200.
- Siddiqui, K. S., Poljak, A., Guilhaus, M., Feller, G., D'Amico, S., Gerday, C., & Cavicchioli, R. (2005). Role of disulfide bridges in the activity and stability of a cold-active  $\alpha$ -amylase. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 6206-6212.
- Silva, C., Martins, M., Jing, S., Fu, J., & Cavaco-Paulo, A. (2018). Practical insights on enzyme stabilization. *Critical reviews in biotechnology*, 38(3), 335-350.
- Singh, R. S., Singhanian, R. R., Pandey, A., & Larroche, C. (Eds.). (2019). *Biomass, biofuels, biochemicals: advances in enzyme technology*. Elsevier. Pp 67-82.
- Su, L., Woodard, R. W., Chen, J., & Wu, J. (2013). Extracellular location of *Thermobifida fusca* cutinase expressed in *Escherichia coli* BL21 (DE3) without mediation of a signal peptide. *Applied and environmental microbiology*, 79(14), 4192-4198.
- Su, L., Hong, R., Kong, D., & Wu, J. (2020). Enhanced activity towards polyacrylates and poly (vinyl acetate) by site-directed mutagenesis of *Humicola insolens* cutinase. *International Journal of Biological Macromolecules*, 162, 1752-1759.

Solíz-Baez, I. (2015) Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante Ancut1 producida en *Pichia pastoris*. [Tesis de licenciatura no publicada]. UNAM

Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J. J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1556-1562.

Terol, G. L., Gallego-Jara, J., Martínez, R. A. S., Vivancos, A. M., Díaz, M. C., & de Diego Puente, T. (2021). Impact of the expression system on recombinant protein production in *Escherichia coli* BL21. *Frontiers in Microbiology*, 12.

Tatko, C. D., & Waters, M. L. (2002). Selective aromatic interactions in  $\beta$ -hairpin peptides. *Journal of the American Chemical Society*, 124(32), 9372-9373.

Then, J., Wei, R., Oeser, T., Barth, M., Belisário-Ferrari, M. R., Schmidt, J., & Zimmermann, W. (2015). Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from *Thermobifida fusca*. *Biotechnology Journal*, 10(4), 592-598.

Then, J., Wei, R., Oeser, T., Gerdt, A., Schmidt, J., Barth, M., & Zimmermann, W. (2016). A disulfide bridge in the calcium binding site of a polyester hydrolase increases its thermal stability and activity against polyethylene terephthalate. *FEBS Open Bio*, 6(5), 425-432.

Tompa, D. R., Gromiha, M. M., & Saraboji, K. (2016). Contribution of main chain and side chain atoms and their locations to the stability of thermophilic proteins. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 64, 85-93.

Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E. & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(7802), 216-219.

Usman, N. J., Rodrid, K., Tuncharoen, N., Meegnoen, K., Pason, P., & Jongruja, N. (2023). Characterization of recombinant cutinase from *Thermobifida cellulositica* and its

application in tomato cutin degradation. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 102603.

Valanciute, A., Nygaard, L., Zschach, H., Jepsen, M. M., Lindorff-Larsen, K., & Stein, A. (2023). Accurate protein stability predictions from homology models. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 21, 66-73.

Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1302-1307.

Wei, R., von Haugwitz, G., Pfaff, L., Mican, J., Badenhorst, C. P., Liu, W., & Bornscheuer, U. T. (2022). Mechanism-based design of efficient PET hydrolases. *ACS catalysis*, 12(6), 3382-3396.

Won, S. J., Yim, J. H., & Kim, H. K. (2022). Functional production, characterization, and immobilization of a cold-adapted cutinase from Antarctic *Rhodococcus* sp. *Protein Expression and Purification*, 195, 106077.

Wu, J. C., & Lin, Y. H. (2010). Specific activity of enzymes. In *Enzyme kinetics: catalysis and control* (pp. 47-61). Wiley-VCH

Xu, H.; Yan, Q.; Duan, X.; Yang, S.; Jiang, Z. Characterization of an acidic cold-adapted cutinase from *Thielavia terrestris* and its application in flavor ester synthesis. *Food Chem.* 2015, 188, 439–445.

Xu, Z., Cen, Y. K., Zou, S. P., Xue, Y. P., & Zheng, Y. G. (2020). Recent advances in the improvement of enzyme thermostability by structure modification. *Critical reviews in biotechnology*, 40(1), 83-98.

Yang, Y., Min, J., Xue, T., Jiang, P., Liu, X., Peng, R., & Guo, R. T. (2023). Complete biodegradation of poly (butylene adipate-co-terephthalate) via engineered cutinases. *Nature Communications*, 14(1), 1645.

Yoo, Y. J., Feng, Y., Kim, Y. H., & Yagonia, C. F. J. (2017). Fundamentals of enzyme engineering. Pp. 130-132.

Zhang, Z., Huang, S., Cai, D., Shao, C., Zhang, C., Zhou, J., & Tan, T. (2022). Depolymerization of post-consumer PET bottles with engineered cutinase 1 from *Thermobifida cellulolytica*. *Green Chemistry*, 24(15), 5998-6007.

Zhou, Q., & Qiu, H. (2019). The mechanistic impact of N-glycosylation on stability, pharmacokinetics, and immunogenicity of therapeutic proteins. *Journal of pharmaceutical sciences*, 108(4), 1366-1377.