



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Producción de cutinasas recombinantes de *Cladosporium tenuissimum* A3.1.1
potencialmente relacionadas con la degradación de poliuretano en *Pichia pastoris*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Brenda Sofía Jiménez Arreola

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera
Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Dra. Georgina Garza Ramos Martínez	Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México. Marzo, 2024



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado:

Producción de cutinasas recombinantes de *Cladosporium tenuissimum* A3.1.1 potencialmente relacionadas con la degradación de poliuretano en *Pichia pastoris*.

que presenté para obtener el grado de ----Maestría ----- es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi programa de posgrado, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de graduación.

Atentamente

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir "B. Jiménez Arreola".

Brenda Sofía Jiménez Arreola
311238819

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM por brindarme la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la realización de este trabajo de investigación de la Maestría en Ciencias Bioquímicas desde agosto 2021 hasta julio 2023.

Al apoyo dado por DGAPA PAPIIT-UNAM (IN223317 y IN227620), al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP de la Facultad de Química UNAM (5000-9117) y al programa CONACYT FORDECYT-PRONACES (101737), otorgados a la Dra. Herminia Loza Tavera.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por darme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación. Por su paciencia, dedicación y guía durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo, enseñanzas y consejos que sirvieron para guiarme en la realización de este trabajo y afrontar los desafíos encontrados.

A la Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares y la Dra. Georgina Garza Ramos Martínez, miembros de mi comité tutor, por sus sugerencias durante la realización de este trabajo de investigación.

A la M.C. Itzayana Chavarría Quintanilla por la generación del transcriptoma de *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 en condiciones diferenciales de crecimiento.

A la M.C. Ana Paulina García Bernal por su análisis y datos generados de proteínas codificadas por genes sobreexpresados durante el crecimiento de *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 en poliuretano.

A la Dra. Marcela Ayala Aceves por brindarnos la cepa de *Pichia pastoris* X-33 wt con la que se trabajó en este proyecto.

A la Dra. Amelia Farrés González Sarabia por otorgarnos una alícuota de Zeocina™ con la cual se pudo iniciar este proyecto.

A la Dra. Carmina Montiel Pacheco y su estudiante de Doctorado Jonathan Trapala Reyna, por sus consejos con base en su experiencia trabajando con *P. pastoris* y por el préstamo de su electroporador y microondas para la PCR de colonia.

Al Dr. Elpidio García Ramírez por su apoyo y guía en el montaje del experimento de purificación de las enzimas recombinantes y Western Blot.

A todos los miembros del jurado de examen, quienes revisaron y realizaron valiosas observaciones sobre el presente escrito que sirvieron para enriquecer el trabajo. Muchas gracias por su tiempo y dedicación.

A mis compañeros y compañeras del laboratorio por sus consejos, enseñanzas y por su valiosa amistad.

A Ale y Tete, y a Luisa, aunque ya no esté, por todo su cariño y cuidados de siempre.

A Roxana y Arturo, mi más profundo agradecimiento por su comprensión, apoyo, enseñanzas y por el amor incondicional que siempre me han brindado.

A Karen y Miriam, eterno agradecimiento por su complicidad, cariño, consejos y por siempre estar.

A Fran, con infinita admiración, agradecimiento y amor, gracias por la confianza, el apoyo y la ternura. Por ser motor y motivo.

Índice

1. Resumen	7
2. Introducción	10
3. Antecedentes	22
4. Hipótesis	28
5. Objetivos	28
5.1 Objetivo general	28
5.2 Objetivos particulares	28
6. Estrategia experimental	29
7. Materiales y métodos	30
7.1 Confirmación de los genes a expresar de manera recombinante	30
7.2 Sistema de expresión	31
7.2.1 Síntesis de genes de las enzimas de A3.I.1 expresadas en Impranil® y clonación en el vector pPICZαA	31
7.2.2 Vector pPICZα	31
7.2.3 Transformación en <i>E. coli</i>	32
7.2.4 Transformación en <i>P. pastoris</i> X-33	33
7.3 Expresión de proteínas recombinantes	34
7.3.1 Detección de proteínas recombinantes fracciones extracelular y citoplasmática	35
7.3.2 Detección de las proteínas recombinantes en la fracción membranal	35
7.3.3 Purificación de proteínas recombinantes	35
7.3.4 Detección de proteínas recombinantes por ensayo de Western Blot	36
7.4 Sustratos para ensayos enzimáticos	37
8. Resultados y discusión	40
8.1 Identificación de la cutinasa previamente identificada con actividad “degradadora de Impranil®” en sobrenadantes de <i>C. tenuissimum</i> cepa A3.I.1 contra el genoma de A3.I.1	40
8.2 Síntesis de los genes que codifican las proteínas de tipo cutinasa de A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® y clonación en el vector pPICZαA	42
8.2.1 Predicción del péptido señal de las proteínas de <i>C. tenuissimum</i> cepa A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® seleccionadas para su producción recombinante	42
8.2.2 Identificación de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en las proteínas de <i>C. tenuissimum</i> cepa A3.I.1 seleccionadas para su producción recombinante	47
8.2.3 Diseño de las secuencias de las enzimas de A3.I.1 para su clonación en el vector pPICZαA	51

8.3. Propagación de los plásmidos recombinantes de las enzimas de A3.I.1 en <i>E. coli</i> DH5 α y TOP10	53
8.3.1 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α y TOP10 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-6816 y pPICZ α A-7317	53
8.3.2 Transformación de <i>E. coli</i> TOP10 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-6962 y pPICZ α A-8471	56
8.4 Transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con los plásmidos recombinantes	58
8.4.1. Primera transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-6816 y pPICZ α A-7317	58
8.4.2 Primera transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-6962 y pPICZ α A-8471	59
8.4.3 Segunda transformación de <i>P. pastoris</i> X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-7317, pPICZ α A-6816, pPICZ α A-8471 y pPICZ α A-6962	61
8.5 Confirmación de fenotipo de colonias transformantes de <i>Pichia pastoris</i> X-33	63
8.6 Análisis de transformantes de <i>P. pastoris</i> X-33 por PCR de colonia	64
8.6.1 PCR de los plásmidos recombinantes	64
8.6.2 PCR de colonias transformadas (segunda transformación) de <i>Pichia pastoris</i> X-33 resistentes a Zeocina TM	66
8.7 Expresión de proteínas recombinantes	72
8.7.1 Expresión de proteínas recombinantes 7317, 6816, 8471 y 6962 (primera transformación)	72
8.7.2 Expresión de proteínas recombinantes 7317, 6816, 8471 y 6962 (segunda transformación e integración confirmada por PCR)	74
8.8. Purificación y ensayo de Western Blot de bandas candidatas de proteínas recombinantes 7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3 (segunda transformación e integrantes confirmados por PCR)	81
9. Conclusiones	92
10. Perspectivas	92
11. Referencias	93
12. Anexos	107

Abreviaturas

A3.I.1	<i>Cladosporium tenuissimum</i> cepa A3.I.1
BLASTp	herramienta básica de búsqueda de alineación local para proteínas
DO	densidad óptica
g	gravidades
kDa	kilodalton
MM	medio mínimo mineral
MM-dextrosa	medio mínimo mineral con dextrosa
MM-Impranil®	medio mínimo mineral con Impranil®
MS/MS	espectrometría de masas en tándem
Mt	millones de toneladas
CASE	recubrimientos, adhesivos, selladores y elastómeros
FTIR-S	espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a masas
HMMR	modelos ocultos de Markov
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IMAC	cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados
kV	kilovolts
Log2FC	veces de cambio en la expresión génica
NCBI	Centro nacional de información biotecnológica
ORF	marcos abiertos de lectura
PBS	polibutileno succinato
PBSA	polibutileno succinato adipato
PDB	<i>protein data bank</i>
PE-PU	poliéster poliuretano
PLA	ácido poliláctico
PS-PU	poliéster poliuretano
PU	poliuretano
PE	polietileno
PP	polipropileno
PVC	cloruro de polivinilo
PET	tereftalato de polietileno
PS	poliestireno
PA	poliamidas
PC	policarbonato
PMMA	polimetacrilato de metilo
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida
SMRT	secuenciación de molécula única en tiempo real
U	unidades
v/v	relación volumen-volumen
wt	Wild type (silvestre)

1. Resumen

La producción mundial de plásticos alcanzó las 400.3 Mt en 2022 y la Unión Europea y Norte América contribuyeron con el 14% y 17% de dicha producción, respectivamente (*Plastics Europe, 2023*). Debido a la baja susceptibilidad del poliuretano (PU) a factores físicos, químicos y biológicos y a su gran versatilidad estructural, resulta complejo tratar sus residuos, por lo que la generación y acumulación de éstos se ha vuelto una problemática ambiental muy grave. Se ha recurrido a la investigación sobre la biodegradación del PU ya que ésta suele ser más respetuosa con el ambiente que la degradación química o la incineración. Existen varios registros de biodegradación del PU por bacterias y hongos en la literatura, sin embargo, aún queda un amplio campo por explorar. A partir de muestras medioambientales, en nuestro laboratorio se aisló un hongo filamentoso identificado como *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1, capaz de crecer en el barniz de PS-PU Impranil® como única fuente de carbono. Anteriormente se identificó una cutinasa involucrada en la degradación del Impranil® (Álvarez-Barragán *et al.* 2016). Considerando que el hongo *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 fue muy activo en la degradación del barniz de PS-PU Impranil®, se secuenció su genoma y se identificaron siete genes de cutinasas extracelulares y seis genes de acetilxilano esterasas (AXE), de las cuales cinco son extracelulares, empleando un modelo oculto de Márkov (HMM) del dominio de cutinasas alojado en la base de datos Pfam (PF01083). Seis cutinasas extracelulares mostraron similitud con proteínas capaces de degradar poliésteres sintéticos (2372, 6962, 7317, 8471, 9593 y 12076), por lo que se sugirió que podrían tener actividad degradativa sobre el PU (Chavarría-Quintanilla, 2021). También en nuestro laboratorio, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes por RNA-Seq, de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 cultivado en medios con el barniz de PS-PU Impranil® y dextrosa como únicas fuentes de carbono, a las dos semanas de cultivo (Chavarría-Quintanilla, 2021). Los genes de las cutinasas 6962, 7316, 7317 y 8471 y de la acetilxilano esterasa 6816 fueron sobreexpresados diferencialmente con valores de Log₂FC de 1.460, 1.147, 3.117, 5.346 y 2.286 respectivamente, en medios con Impranil® como única fuente de carbono a las dos semanas de cultivo (García Bernal, 2023).

Las cutinasas tienen un alto potencial de aplicación en procesos industriales y en la química ambiental ya que pueden llevar a cabo la degradación de insecticidas y diversos polímeros sintéticos, por lo que su uso permite eliminar sustancias contaminantes presentes en el ambiente. Debido a esto, la producción de estas proteínas de manera recombinante en bacterias como *Escherichia coli* o levaduras como *Pichia pastoris* es una estrategia para ampliar sus aplicaciones biotecnológicas. Debido a que existen pocos estudios de cutinasas que degradan PU, en este trabajo se buscó producir y purificar esterasas (cutinasas y una acetilxilano esterasa) de *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 potencialmente relacionadas con la degradación de PU utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Se realizó el análisis bioinformático y diseño de las secuencias de interés de los genes de las cutinasas 7317, 8471 y 6962

así como de la AXE 6816 de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1, con lo que se generaron los plásmidos recombinantes pPICZαA-6816, pPICZαA-6962, pPICZαA-7317 y pPICZαA-8471 para la expresión de las proteínas antes mencionadas incluyendo sus regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs). Se pudo establecer un sistema de expresión en *P. pastoris* X-33 para la proteína 7317. Las otras tres proteínas de interés (6816, 6962 y 8471) no se lograron producir de manera recombinante. Sin embargo, se evaluaron diversos parámetros de cultivo que se espera sean útiles para que dichas proteínas se logren expresar y purificar en futuros proyectos. Así mismo, se llevó a cabo la selección de sustratos tipo PU y poliésteres sintéticos de interés para caracterizar las proteínas recombinantes de A3.I.1 en trabajos futuros. A pesar de las dificultades enfrentadas en este trabajo y a no haber podido realizar los ensayos enzimáticos inicialmente previstos, se espera que los experimentos realizados y los resultados obtenidos sirvan de base para la futura producción y caracterización bioquímica de las enzimas de A3.I.1 de interés, contribuyendo así al estudio de proteínas con potencial capacidad de degradar PU.

Abstract

Global plastics production reached 400.3 Mt in 2022 and the European Union and North America contributed with 14% and 17% of the production, respectively (*Plastics Europe*, 2023). Due to the low susceptibility of polyurethane (PU) to physical, chemical and biological factors, and to its wide structural versatility, it is complex to treat its waste, therefore, its generation and accumulation has become a very serious environmental problem. Biodegradation of PU is usually more environmentally friendly than chemical degradation or incineration. There are several published works on PU biodegradation by bacteria and fungi, however, there is still a wide field to explore. From environmental samples, in our laboratory, a filamentous fungus identified as *Cladosporium tenuissimum* strain A3.I.1, capable of growing on the PS-PU varnish Impranil® as the only carbon source, was isolated. A cutinase involved in the degradation of Impranil® was previously identified (Álvarez-Barragán *et al.* 2016). Considering that the fungus *C. tenuissimum* strain A3.I.1 was very active in the degradation of the Impranil® PS-PU varnish, its genome was sequenced and seven extracellular cutinase and six acetylxylan esterase ORFs were identified using a hidden Markov model (HMM) of the cutinase domain hosted in the Pfam database (PF01083). Six extracellular cutinases showed structural similarity with proteins capable of degrading synthetic polyesters (2372, 6962, 7317, 8471, 9593 and 12076), so these could have degradative activity over PU (Chavarría-Quintanilla, 2021). A differential gene expression analysis was carried out with RNA-Seq of *C. tenuissimum* strain A3.I.1 grown in media with Impranil® and dextrose as the only carbon sources, at two weeks of cultivation (Chavarría-Quintanilla, 2021). The genes encoding the cutinases 6962, 7316, 7317 and 8471 and the acetylxylan esterase 6816 were differentially overexpressed with Log2FC values of 1.460, 1.147, 3.117, 5.346 and 2.286 respectively, in media with Impranil® as the only carbon source (García Bernal, 2023).

Cutinases have a high potential for application in industrial processes and environmental chemistry since they can carry out the degradation of insecticides and various synthetic polymers, so their use allows the removal of polluting substances present in the environment. Due to this, the production of these as recombinant proteins in bacteria such as *Escherichia coli* or yeast such as *Pichia pastoris* expand the biotechnological applications of cutinases. Since there are few studies of cutinases that degrade PU, this project sought to produce and purify esterases (cutinases and an acetylxylylan esterase) from *Cladosporium tenuissimum* strain A3.I.1 potentially related to PU degradation using the *Pichia pastoris* expression system. The bioinformatics analysis and design of the sequences of interest of the cutinase genes 7317, 8471 and 6962 as well as the AXE gene 6816 of *C. tenuissimum* strain A3.I.1 were carried out. The recombinant plasmids pPICZ α A-6816, pPICZ α A-6962, pPICZ α A-7317 y pPICZ α A-8471 were generated for the expression of the aforementioned proteins including their intrinsically disordered regions (IDRs). An expression system could be established in *P. pastoris* X-33 for protein 7317. The other three proteins of interest (6816, 6962 and 8471) were not successfully produced. Nonetheless, various culture parameters were evaluated that are expected to be useful so that these proteins can be expressed and purified in future projects. Also, the selection of PU-type substrates and synthetic polyesters of interest was carried out to characterize the recombinant proteins of A3.I.1 in future projects. Despite the difficulties faced in this work and not having been able to carry out the initially planned enzymatic assays, it is expected that the experiments carried out and the results obtained will serve as a basis for the future production and biochemical characterization of the A3.I.1 enzymes of interest, thus contributing to the study of proteins with the potential ability to degrade PU.

2. Introducción

2.1. Plásticos: definición, tipos y estadísticas de producción

Los plásticos son polímeros sintéticos obtenidos a partir de derivados de petróleo. Éstos se clasifican en: plásticos termoestables, que son los que pueden fundirse y moldearse al momento de su fabricación, como el poliuretano (PU), poliésteres insaturados, resinas epóxicas, ésteres de vinilo, silicona, resinas fenólicas, resinas acrílicas, entre otros; y termoplásticos, que son los que se pueden fundir y moldear más de una vez, como el polietileno (PE), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC), tereftalato de polietileno (PET), poliestireno (PS), poliamidas (PA), policarbonato (PC), polimetacrilato de metilo (PMMA), etc. Los plásticos se han convertido en fundamentales para casi todos los aspectos de la vida cotidiana. La producción mundial de plásticos alcanzó las 400.3 Mton en 2022 y la Unión Europea y Norte América contribuyeron con el 14% y 17% de dicha producción, respectivamente (*Plastics Europe, 2023*) (Fig. 1).

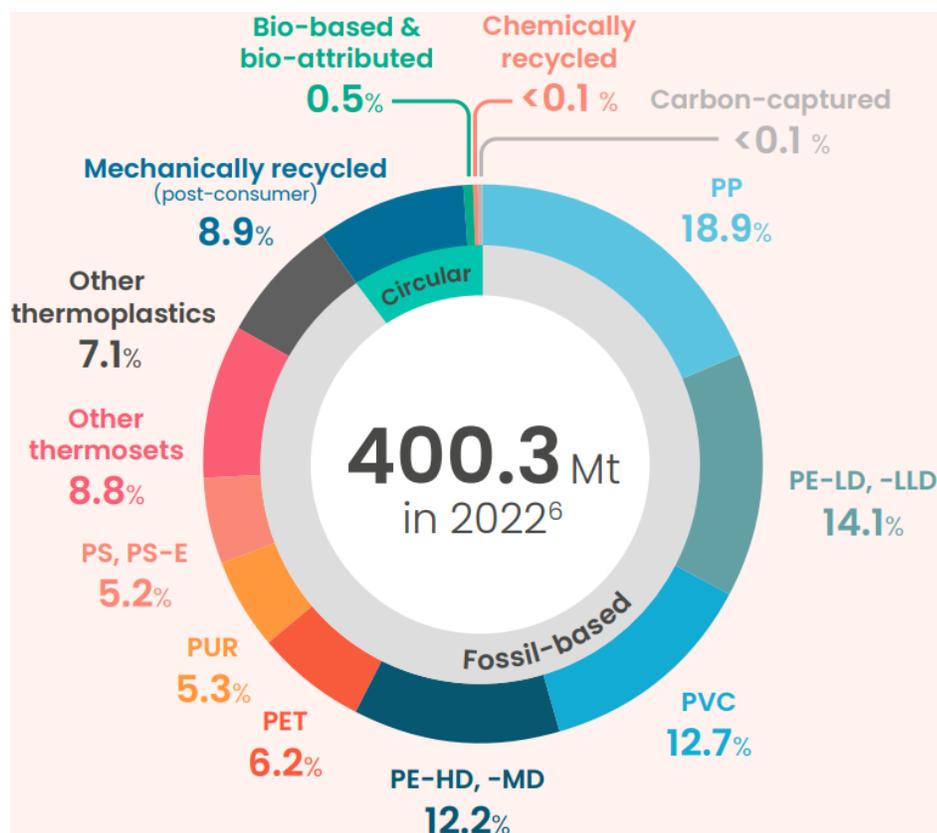


Fig. 1. Producción mundial de diferentes tipos de plásticos en 2022. PP (polipropileno), PE-LD (polietileno de baja densidad), PE-LLD (polietileno baja densidad lineal), PE-HD (polietileno de alta densidad), PE-MD (polietileno de mediana densidad), PVC (cloruro de polivinilo), PUR (poliuretano), PET (tereftalato de polietileno), PS (poliestireno), PS-E (poliestireno expandido). Tomado de *Plastics Europe 2023*.

2.2. Poliuretano (PU): aplicaciones, síntesis y problemática ambiental

El PU es un polímero sintético de gran versatilidad estructural clasificado como el sexto plástico más utilizado en el mundo (Liu *et al.*, 2021). El PU tiene una variedad de aplicaciones en diversas áreas, por ejemplo, espumas rígidas en aislantes térmicos para la construcción de edificios y aparatos de refrigeración, espumas flexibles en muebles, colchones y asientos de automóviles, en recubrimientos, adhesivos, selladores y elastómeros (CASE), en la industria textil (licras) y en suelas de zapatos. En 2022, el PU representó el 5.3% de los plásticos producidos a nivel mundial (*Plastics Europe*, 2022). Las espumas flexibles y rígidas representan respectivamente el 32% y el 36% de la producción mundial de PU. Los recubrimientos de PU proporcionan una capa de protección contra la intemperie, la abrasión y la corrosión, mientras que los elastómeros son tanto elásticos como flexibles y pueden adoptar cualquier forma deseada. La mayoría de estos materiales de PU están destinados a aplicaciones a largo plazo, por lo que están diseñados principalmente para resistir factores ambientales como la biodegradación, la abrasión o la degradación por rayos UV (Magnin *et al.*, 2020). Este polímero se sintetiza por reacciones de condensación entre diisocianatos y polioles (Fig. 2) y, a diferencia de los polímeros obtenidos por reacciones de polimerización, no está formado por monómeros idénticos repetibles, sino que consta de diferentes segmentos conectados por varios enlaces químicos. Su unidad más importante es el enlace uretano o carbamato ($-\text{NH}-\text{COO}-$). Una característica importante de los PU es la presencia de segmentos alternos rígidos o duros (isocianatos) y blandos o flexibles (polioles) (Kemona y Piotrowska, 2020). Dependiendo de las estructuras químicas de los polioles utilizados, los PU se pueden dividir en poliéster poliuretano (PS-PU) y poliéter poliuretano (PE-PU) (Ru *et al.*, 2020). Además, algunos PU también contienen en su estructura grupos carbonato y acrilato que les confieren mayor resistencia.

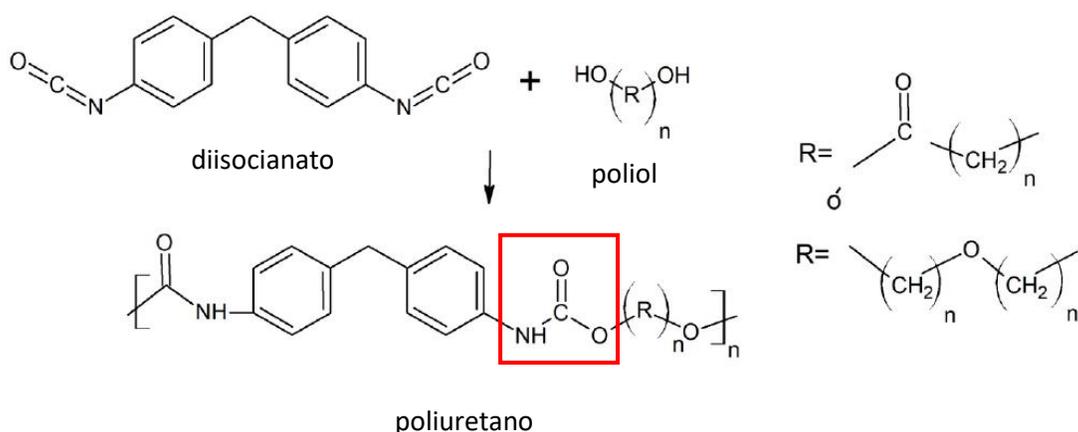


Fig. 2. Síntesis de poliuretano. Se enmarca el grupo uretano o carbamato con un recuadro rojo. Modificado de Kemona y Piotrowska, 2020.

Una alternativa para tratar los residuos de PU es la combustión, sin embargo, los productos de dicha combustión suelen ser tóxicos. Otra forma es el reciclaje, sin embargo, debido a su gran versatilidad estructural y a pesar de esfuerzos tanto de productores como de organismos legislativos, el reciclaje no es un método predominante para la disposición final de sus residuos, principalmente porque el PU reciclado pierde sus propiedades originales. Por lo que la forma más común de procesar sus desechos es el depósito de éstos en basureros (Kemoná y Piotrowska, 2020). Esta acumulación de residuos de PU en vertederos ha generado un problema ambiental muy importante. La degradación biológica y enzimática del PU es un campo de investigación en crecimiento con un alto potencial que podría responder a la necesidad de reciclaje de residuos de PU en los próximos años (Magnin *et al.*, 2020).

2.3. Microorganismos que degradan PU

La existencia de bacterias y hongos capaces de degradar algunos tipos de PU ha sido recopilada en diversas revisiones (Cregut *et al.*, 2013; Mahajan *et al.*, 2015; Sklenicková *et al.*, 2020; Kemoná y Piotrowska 2020; Magnin *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2021). Sin embargo, la biodegradación de este polímero sintético sigue siendo un desafío debido a su amplia versatilidad estructural. Las bacterias reportadas capaces de degradar PS-PU se identificaron principalmente como miembros de los géneros *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter* y *Corynebacterium* (Liu *et al.*, 2021). *Pseudomonas putida* A12 puede utilizar el barniz comercial de PS-PU Impranil® DLN, como única fuente de carbono degradando el 92% del sustrato en cuatro días, y por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR-S) se mostraron pruebas de la degradación (Peng *et al.*, 2014). Por su parte, *Comamonas* sp. TB-35 degradó completamente 50 mg de PS-PU sólido (en forma de cubos) en un plazo de 7 días cuando el polímero se suministró como única fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Por otro lado, tanto *Bacillus subtilis* MZA-75 como *Pseudomonas aeruginosa* MZA-85 no solo pueden utilizar PS-PU como la única fuente de carbono, sino que también son capaces de mineralizar completamente los productos intermedios 1,4-butanodiol y ácido adípico en CO₂ y H₂O (Shah *et al.*, 2013a, b). Además, mediante el cultivo simultáneo de las dos cepas en un cultivo mixto, se observó la pérdida de peso del 40% del PS-PU en 30 días (Shah *et al.*, 2016). En la Tabla 1 se enlistan éstas y otras bacterias con capacidad de degradar PU ordenadas por orden alfabético.

Tabla 1. Bacterias degradadoras de poliuretano (PU).

Bacteria	Tipo de PU	Referencias
<i>Acinetobacter gerveri</i> P7	PS-PU (Impranil®)	Howard <i>et al.</i> , 2012
<i>Alicyclophillus</i> sp. BQ1	recubrimiento de PS-PU	Oceguera-Cervantes <i>et al.</i> , 2007
<i>Alicyclophillus</i> sp. BQ8	recubrimiento de PS-PU	Oceguera-Cervantes <i>et al.</i> , 2007
	espumas de PS-PU	Pérez-Lara <i>et al.</i> , 2016
<i>Arthrobacter</i> sp.	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2008a
<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> ATCC 31012	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> NAV-2	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Arthrobacter globiformis</i>	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Bacillus</i> sp.	PS-PU (Impranil®)	li <i>et al.</i> , 1998
	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2008a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	poli(éter-urea)-PU	Rafiemanzelat <i>et al.</i> , 2015
<i>Bacillus pumilus</i> NMSN-1d	PS-PU (Impranil®)	Nair y Kumar, 2007
<i>Bacillus subtilis</i> MZA-75	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2016
	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2013b
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>	espumas de PS-PU	Cangemi <i>et al.</i> , 2008
<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35	PS-PU termoplástico	Akutsu <i>et al.</i> , 1998; Nakajima-Kambe <i>et al.</i> , 1997; Nakajima-Kambe <i>et al.</i> , 1995
	PE-PU termoplástico	Nakajima-Kambe <i>et al.</i> , 1995
<i>Corynebacterium</i> sp.	PS-PU termoplástico	Kay <i>et al.</i> , 1993
	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2008a
	espumas de PS- PU	Kay <i>et al.</i> , 1991
<i>Escherichia coli</i>	poli(éter-urea)-PU	Rafiemanzelat <i>et al.</i> , 2013
<i>Micrococcus</i> sp.	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2008a
	poli(éter-urea)-PU	Rafiemanzelat <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas</i> sp.	espumas de PS-PU	Spontón <i>et al.</i> , 2013
	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2008a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	poli(amido-amina)-PU	Gogoi y Karak, 2015
	PS-PU termoestable	Duarah <i>et al.</i> , 2016
	PS-PU (Impranil®)	Mukherjee <i>et al.</i> , 2011
	poli(éster-amida)-PU	Gogoi y Karak, 2017
	espumas de PS-PU	Cooney, 1969; Edmonds y Cooney, 1968
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 13388	espumas de PS-PU	Kay <i>et al.</i> , 1991
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	PS-PU termoplástico	Fernandes <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MTCC 7814	PS-PU termoestable	Bayan y Karak, 2017; Gogoi y Karak, 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MZA-85	PS-PU termoplástico	Shah <i>et al.</i> , 2016; Shah <i>et al.</i> , 2013a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NAV-6	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas cepacia</i>	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> ATCC 55729	espumas de PS-PU	Gautam <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	recubrimiento de PE-PU	Crookes-Goodson <i>et al.</i> , 2013
	PS-PU (Impranil®)	Howard y Blake, 1998; Vega <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	PS-PU (Impranil®)	Biffinger <i>et al.</i> , 2014
	PE-PU termoplástico	Barlow <i>et al.</i> , 2016
<i>Pseudomonas putida</i>	PS-PU (Impranil®)	Peng <i>et al.</i> , 2014
<i>Pseudomonas putida</i> ATCC 17484	recubrimiento de PS-PU	El-Sayed <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Moléculas modelo de PU	Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> , 2006
<i>Staphylococcus aureus</i>	Poli(éter-urea)-PU	Rafiemanzelat <i>et al.</i> , 2013
<i>Staphylococcus epidermidis</i> KH 11	PE-PU termoplástico	Jansen <i>et al.</i> , 1991

En cuanto a los hongos reportados con capacidad de degradar PU, se han encontrado una amplia gama de géneros como *Aspergillus*, *Pestalotiopsis*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* (revisado en Magnin *et al.*, 2020). Se ha reportado que una cepa de *A. flavus* aislada del suelo de un relleno sanitario mostró una excelente capacidad de biodegradación y pudo utilizar un PS-PU como única fuente de carbono, lo que resultó en una pérdida de peso del 60% después de 30 días (Mathur y Prasad, 2012). En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, se reportaron ocho cepas de hongos que crecieron en un medio mineral con un barniz de PS-PU (Impranil® DLN) como única fuente de carbono y degradaron entre un 74% y un 87% del Impranil® DLN en dos semanas. Los seis mejores degradadores pertenecían al complejo *Cladosporium cladosporioides* y los otros dos fueron identificados como *Aspergillus fumigatus* y *Penicillium chrysogenum* (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). De manera similar, *Aspergillus* sp. S45 aislado de un vertedero también utiliza un PS-PU como única fuente de carbono, reduciendo el peso inicial en un 20% (Osman *et al.*, 2018). Por otro lado, la mayoría de los hongos capaces de degradar espumas de PE-PU son miembros de los géneros *Cladosporium*, *Aspergillus* y *Alternaria* (Filip, 1979; Matsumiya *et al.*, 2010; Álvarez-Barragán *et al.*, 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Hongos degradadores de poliuretano (PU).

Hongo	Tipo de PU	Referencia
<i>Alternaria</i> sp.	PS-PU termoplástico	Magnin <i>et al.</i> , 2018
<i>Alternaria solani</i> Ss.1-3	PS-PU termoplástico	Ibrahim <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria</i> sp. PURDK2	espumas de PE-PU	Matsumiya <i>et al.</i> , 2010
<i>Alternaria tenuissima</i>	PE-PU termoplástico	Oprea <i>et al.</i> , 2018
<i>Agaricus bisporus</i>	PU	Brunner <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus</i> sp.	espumas de PS-PU	Cangemi <i>et al.</i> , 2008
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU termoplástico	Mathur y Prasad, 2012
<i>Aspergillus fumigatus</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	PS-PU termoplástico	Osman <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus niger</i>	espumas de PE-PU	Filip, 1979
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 9642	PS-PU termoplástico	Kanavel <i>et al.</i> , 1966
<i>Aspergillus</i> sección flavi	PS-PU termoplástico	Magnin <i>et al.</i> , 2018
<i>Aspergillus tubingensis</i>	PS-PU termoplástico	Khan <i>et al.</i> , 2017
<i>Aureobasidium pullulans</i>	PS-PU (Impranil®)	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Chaetomium globosum</i>	PS-PU termoestable	Oprea y Doroftei, 2011
	PS-PU termoplástico	Oprea <i>et al.</i> , 2016
<i>Cladosporium</i> sp.	PS-PU (Impranil®)	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
	espumas de PE-PU	Cooney, 1969
<i>Cladosporium tenuissimum</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Cladosporium asperulatum</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Cladosporium halotolerans</i> 6UPA1	PS-PU	Zhang <i>et al.</i> , 2022
<i>Cladosporium herbarum</i>	espumas de PE-PU	Filip, 1979
<i>Cladosporium montecillanum</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Cryptococcus laurentii</i>	PS-PU (Impranil®)	Zicht, 2017
<i>Colletotrichum fructicola</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Curvularia senegalensis</i>	PS-PU (Impranil®)	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Embarria clematidis</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Exophiala jeanselmei</i>	molécula modelo de uretano	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Fusarium solani</i>	PS-PU (Impranil®)	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Gliocladium roseum</i>	PS-PU termoplástico	Shuttleworth y Seal, 1986
<i>Halobyssothecium obiones</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Marasmius oreades</i>	PU	Brunner <i>et al.</i> , 2018
<i>Murilenthecium clematidis</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Nodosphaeria multiseptata</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Leptosphaeria</i> sp.	PU	Brunner <i>et al.</i> , 2018
<i>Roussoella scabrispora</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Sclerostagonospora lathyri</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Ophiosimulans tanacetii</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Penicillium chrysogenum</i>	PS-PU (Impranil®)	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
	espumas de PE-PU	Álvarez-Barragán <i>et al.</i> , 2016
<i>Pestalotiopsis microspora</i>	PS-PU (Impranil®)	Russell <i>et al.</i> , 2011
<i>Pseudomassariosphaeria bromicola</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Populacrescentia foricesenensis</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Pseudophaeosphaeria rubi</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Vagicola chlamydospora</i>	PS-PU (Impranil®)	Khruengsai <i>et al.</i> , 2022
<i>Xepiculopsis graminea</i>	PU	Brunner <i>et al.</i> , 2018

2.4. Enzimas que atacan al PU

El ataque de bacterias y hongos al PU está mediado principalmente por la acción enzimática de hidrolasas como esterasas, cutinasas, ureasas, proteasas y amidasas (Magnin *et al.*, 2019). Las esterasas son la principal clase de enzimas (EC 3.1.n.n) implicadas en la degradación de PS-PU, al hidrolizar los enlaces éster en los segmentos blandos del polímero, lo que conduce a la liberación de ácidos carboxílicos y alcoholes (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2017; Kang *et al.*, 2011). Otras esterasas como lipasas (EC 3.1.1.n) (Fang *et al.*, 2014; Schöne *et al.*, 2016) o cutinasas (EC 3.1.1.74) (Schmidt *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2013) han sido reportadas como capaces de atacar PS-PU. Las cutinasas y lipasas tienen un plegamiento α/β , con un sitio activo que consiste en una tríada catalítica compuesta por una serina, una histidina y un ácido aspártico o en algunos casos un ácido glutámico. En las cutinasas, la serina catalítica está expuesta al disolvente y no hay una tapa hidrofóbica sobre el sitio activo como en el caso de las lipasas. Las cutinasas son capaces de hidrolizar *p*-nitrofenil ésteres que varían de cuatro a dieciocho carbonos, siendo el butirato (cuatro carbonos) el sustrato preferido para la mayoría de ellas. Estas enzimas también pueden degradar poliésteres de alto peso molecular, triglicéridos artificiales y realizar reacciones de esterificación y transesterificación sin mostrar activación interfacial, como ocurre en el caso de las lipasas (Martínez *et al.*, 1994). Las lipasas son principalmente activas contra sustratos insolubles en agua, como los triglicéridos compuestos por ácidos grasos de cadena larga y *p*-nitrofenil ésteres de cadena larga como el palmitato de dieciséis carbonos (Bornscheuer *et al.*, 2002). Se ha propuesto que las esterasas pueden hidrolizar el enlace uretano, a través de un mecanismo que da como productos ácido carbámico y alcohol después de la hidrólisis (Mahajan y Gupta, 2015; Wei y Zimmermann, 2017). Sin embargo, este mecanismo no parece concebible debido a la inestabilidad del ácido carbámico que inmediatamente se descompone quedando una amina y liberando una molécula de dióxido de carbono (Ionescu, 2005; Ozaki, 1972). Debido a que la mayoría de los ensayos que estudian esterasas utilizan como sustrato PS-PU, no ha sido posible diferenciar entre la hidrólisis de los enlaces éster de los polioles y la hidrólisis de los enlaces éster de los grupos uretano o carbamato del polímero. Por otro lado, algunos trabajos han reportado que proteasas y amidasas, que hidrolizan enlaces peptídicos y enlaces amida, pueden hidrolizar enlaces uretano o carbamato presentes en el PU (Phua *et al.*, 1987; Magnin *et al.*, 2019). En cuanto a la propuesta de que las ureasas (EC 3.5.1.5) pueden romper el enlace carbamato, éstas hidrolizan los enlaces urea en polímeros de poli(éter-urea)-PU, liberando aminas y dióxido de carbono, pero no hay evidencias que indiquen que actúan cortando el grupo carbamato (Phua *et al.*, 1987). También, en el trabajo de Akutsu-Shigeno *et al.* (2006), aislaron e identificaron una bacteria (*Rhodococcus equi* cepa TB-60) que degrada compuestos de uretano. La cepa TB-60 degradó el dibutil éster de ácido toluen-2,4-dicarbámico (TDCB) y acumuló toluen diamina (TDA) como producto de degradación. Se purificó una enzima secretada por esta

bacteria descrita como una uretano hidrolasa (Akutsu-Shigeno *et al.*, 2006), cuyo peso molecular se estimó en 55 kDa. La enzima purificada hidrolizó compuestos de uretano alifáticos así como aromáticos. La enzima catalizó la hidrólisis de anilidas, amidas y ésteres, así como del TDCB, éster dibutílico del ácido dicarbámico de metilen bisfenil (MDCB) y éster dibutílico del ácido hexametilen dicarbámico (HDCB). La enzima se caracterizó como una nueva amidasa/esterasa, por su capacidad de atacar enlaces éster y enlaces amida de grupos carbamato.

Hasta el momento, la degradación enzimática del PU representa un gran desafío. La mayoría de las hidrolasas de PU identificadas hasta la fecha actúan principalmente sobre PS-PU e hidrolizan enlaces éster de los polioles en los segmentos blandos del PU (Liu *et al.*, 2021). Sin embargo, en un estudio reciente se observó que la cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) tiene actividad de hidrólisis sobre diferentes enlaces, como enlaces éster, uretano o carbamato y amida de diferentes sustratos modelo. En este estudio se observó que la actividad medida fue mayor con los sustratos que presentan enlace éster que la obtenida utilizando sustratos que contienen enlace uretano o amida (Di Bisceglie *et al.*, 2022). Estos resultados son valiosos porque indican que las cutinasas son enzimas con el potencial de atacar no solo los enlaces éster de los polioles del PU, sino también los enlaces éster de los grupos carbamato o uretano de este polímero. Por otro lado, los escasos estudios en la ruptura del grupo carbamato del PU no han determinado en qué enlace son cortados, si solamente pueden ser cortados por actividades que reconocen enlaces C-N no peptídico o por actividades que reconocen enlaces éster (RCOOR' , donde R puede ser un átomo de hidrógeno, un grupo alquilo o un grupo arilo y R' puede ser un grupo alquilo o un grupo arilo, pero no un átomo de hidrógeno). En la Tabla 3 se muestran algunas de las enzimas reportadas en la biodegradación de PU, y las posibles reacciones de degradación enzimática del PU se muestran en la Fig. 3.

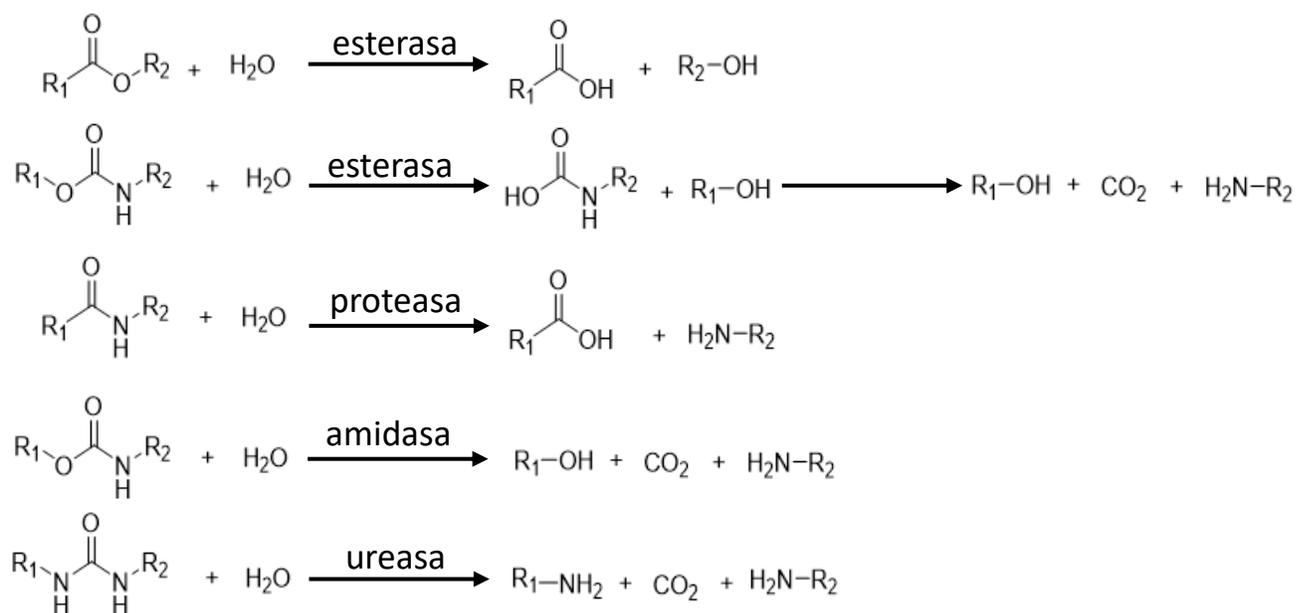


Fig. 3. Reacciones propuestas para la degradación enzimática de PU. Modificado de Magnin *et al.*, 2020.

Tabla 3. Enzimas degradadoras de poliuretano (PU).

Número EC	Enzima (Microorganismo)	Tipo de PU	Referencia
EC 3	hidrolasa Tcur0390 (<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183)	PS-PU termoplástico	Schmidt <i>et al.</i> , 2017b
	hidrolasa Tcur1278 (<i>Thermomonospora curvata</i> DSM43183)	PS-PU termoplástico	Schmidt <i>et al.</i> , 2017b
EC 3.1	esterasa (<i>Bacillus subtilis</i>)	PS-PU (Impranii®)	Rowe y Howard, 2002
	esterasa (<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35)	PS-PU (Impranii®)	Allen <i>et al.</i> , 1999
	esterasa (<i>Curvularia senegalensis</i>)	PS-PU (Impranii®)	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
	esterasa E3576	PS-PU (Impranii®)	Magnin <i>et al.</i> , 2019
		PS-PU termoplástico	Magnin <i>et al.</i> , 2019
	esterasa (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	PS-PU (Impranii®)	Biffinger <i>et al.</i> , 2015
	esterasa PudA (<i>Comamonas acidovorans</i> TB-35)	PS-PU termoplástico	Akutsu <i>et al.</i> , 1998; Nomura <i>et al.</i> , 1998
esterasa PulA (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	PS-PU (Impranii®)	Ruiz y Howard, 1999	
EC 3.1.1	lipasa (<i>Cryptococcus</i> sp. MTCC 5455)	PS-PU termoplástico	Thirunavukarasu <i>et al.</i> , 2015
	lipasa	poli(éster-éter)-PU termoplástico	Feng <i>et al.</i> , 2017
	lipasa AK	PS-PU termoplástico	Zhou <i>et al.</i> , 2012
		poli(éster-éter)-PU termoestable	Jiang <i>et al.</i> , 2007
	lipasa PS	policarbonato-PU termoplástico	Chen <i>et al.</i> , 2016
		PS-PU termoplástico	Xu <i>et al.</i> , 2014
	lipasa (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	poli(éster-éter)-PU termoplástico	Zhou y Xie, 2017
		PS-PU termoestable	Schöne <i>et al.</i> , 2016
	lipasa (<i>Pseudomonas</i> sp.)	PS-PU (Impranii®)	Biffinger <i>et al.</i> , 2015
		PS-PU termoplástico	Daemi <i>et al.</i> , 2016
lipasa PueA (<i>P. chlororaphis</i>)	PS-PU (Impranii®)	Howard <i>et al.</i> , 2007; Hung <i>et al.</i> , 2016; Langlois y Howard, 2002; Ruiz <i>et al.</i> , 1999; Stern y Howard, 2000	

Tabla 3. Enzimas degradadoras de PU (continuación).

Número EC	Enzima (Microorganismo)	Tipo de PU	Referencia
EC 3.1.1	lipasa PueB (<i>P. chlororaphis</i>)	PS-PU (Impranil®)	Howard <i>et al.</i> , 2007; Howard <i>et al.</i> , 2001; Hung <i>et al.</i> , 2016; Ruiz <i>et al.</i> , 1999)
	lipasa (<i>Rhizopus arrhizus</i>)	PS-PU termoplástico	Tokiwa <i>et al.</i> , 1988
	lipasa (<i>Rhizopus delemar</i>)	PS-PU termoplástico	Tokiwa <i>et al.</i> , 1988
	lipasa (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	poli(éster-urea)-PU termoplástico	Fang <i>et al.</i> , 2014
PS-PU termoestable		Wu <i>et al.</i> , 2016	
EC 3.1.1.1	esterasa	PE-PU termoplástico	Smith <i>et al.</i> , 1987
	esterasa de hígado de porcino	PS-PU termoplástico	Li y Yang, 2006
EC 3.1.1.3	lipasa (<i>Candida antarctica</i>)	PS-PU termoplástico	Takamoto <i>et al.</i> , 2001
		recubrimiento de PS-PU	Liu <i>et al.</i> , 2016
	lipasa (<i>Candida cylindracea</i>)	PS-PU termoplástico	Kim y Kim, 1998
	lipasa (<i>Candida rugosa</i>)	PS-PU termoplástico	Li <i>et al.</i> , 2015
		PS-PU (Impranil®)	Gautam y Yanful, 2007b
	esterasa de páncreas de porcino	espumas de PS-PU	Ng <i>et al.</i> , 2017
PS-PU termoplástico		Brzeska <i>et al.</i> , 2015	
EC 3.1.1.13	colesterol esterasa	poli(éster-urea)-PU termoplástico	Santerre <i>et al.</i> , 1993; Santerre <i>et al.</i> , 1994; Wang <i>et al.</i> , 1997a
		poli(éster-urea)-PU termoplástico	Santerre <i>et al.</i> , 1994
		policarbonato-PU termoplástico	Christenson <i>et al.</i> , 2006; Tang <i>et al.</i> , 2001a, 2001b; Tang <i>et al.</i> , 2003
		PS-PU termoplástico	Woo <i>et al.</i> , 2000
EC 3.1.1.74	cutinasa LCC	PS-PU termoplástico	Schmidt <i>et al.</i> , 2017b
	cutinasa TfCut 2 (<i>Thermobifida fusca</i> KW3)	PS-PU termoplástico	Schmidt <i>et al.</i> , 2017b
		PS-PU termoestable	Wu <i>et al.</i> , 2016
cutinasa HiC (<i>Humicola insolens</i>)	PS-PU	Di Bisceglie <i>et al.</i> , 2022	
EC 3.4	proteasa (<i>Bacillus</i> sp.)	PS-PU (Impranil®)	Biffinger <i>et al.</i> , 2015
EC 3.4.11.1	leucina aminopeptidasa	PS-PU termoplástico	Ratner <i>et al.</i> , 1988
		PE-PU termoplástico	Ratner <i>et al.</i> , 1988
EC 3.4.14.1	Catepsina C	PE-PU termoplástico	Smith <i>et al.</i> , 1987
EC 3.4.21.1	Quimiotripsina	poli(éster-éter)-PU termoplástico	Ciardelli <i>et al.</i> , 2004
		poli(éster-urea)-PU termoplástico	Elliott <i>et al.</i> , 2002
EC 3.4.22.2	Papaína	poli(éster-urea)-PU termoplástico	Zhao <i>et al.</i> , 1987
		PS-PU termoplástico	Ratner <i>et al.</i> , 1988; Yamamoto <i>et al.</i> , 2007
		PE-PU termoplástico	Campinez <i>et al.</i> , 2013; Ferris <i>et al.</i> , 2010; Phua <i>et al.</i> , 1987; Ratner <i>et al.</i> , 1988; Smith <i>et al.</i> , 1987
		elastómero poli(éster-uretano-urea)	Marchant <i>et al.</i> , 1987
EC 3.5.1.4	amidasa E4143	PS-PU termoplástico	Magnin <i>et al.</i> , 2019
	poliamidasa (<i>Nocardia farcinica</i>)	PS-PU termoplástico	Gamerith <i>et al.</i> , 2016
EC 3.5.1.5	ureasa	PE-PU termoplástico	Phua <i>et al.</i> , 1987

A pesar de que se han realizado diversos estudios de la biodegradación del PU, a la fecha, la degradación de este polímero utilizando enzimas no es eficiente para el desarrollo de procesos de reciclaje (Magnin *et al.*, 2020), por lo que la identificación y el estudio de enzimas degradadoras de PU sigue siendo un nicho de investigación muy activo. En ese sentido, se reportó una mejora en la eficiencia de las reacciones enzimáticas de degradación, empleando una mezcla de dos enzimas comerciales con diferentes actividades, esterasa (E3576) y amidasa (E4143), que generó una mejor hidrólisis de un PS-PU termoplástico que la acción de solo una de ellas, gracias al efecto sinérgico entre estas dos enzimas, donde los enlaces éster de los polioles fueron atacados por la esterasa liberando moléculas de masa molecular baja que contenían enlaces uretano, que luego fueron hidrolizados por la amidasa (Magnin *et al.*, 2019). Con este tipo de enfoque, una estrategia para el análisis de la degradación enzimática se basa en la producción de proteínas recombinantes. En general, la producción de proteínas recombinantes permite obtener cantidades altas de la proteína de interés y facilitar su purificación, comparada con la purificación directamente del microorganismo que las produce. Además, esta técnica permite introducir cambios para mejorar la especificidad y actividad, simplificar los ensayos de detección y ampliar la gama de aplicaciones biotecnológicas. Este proyecto inicialmente buscaba estudiar la capacidad de degradar moléculas tipo PU por cutinasas fúngicas empleando la expresión heteróloga de éstas como herramienta. Sin embargo, debido a dificultades enfrentadas en el proyecto que se explicarán en la sección de resultados, solamente se logró abordar la producción de las proteínas recombinantes en el sistema de *Pichia pastoris* quedando como perspectivas para futuros proyectos la caracterización bioquímica mediante ensayos enzimáticos empleando los sustratos sugeridos en el presente trabajo.

3. Antecedentes

En nuestro laboratorio se estudia el proceso biodegradativo que llevan a cabo algunos microorganismos capaces de atacar PU. En el laboratorio, se aisló un hongo filamentoso identificado como *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1, a partir de muestras medioambientales. Este hongo es capaz de crecer en el barniz de PS-PU Impranil® como única fuente de carbono. Con el propósito de identificar los cambios estructurales en el Impranil® llevados a cabo por la actividad de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1, se realizó un análisis por FTIR-S de un medio mineral (MM) con Impranil® como única fuente de carbono (MM-Impranil®), inoculado con A3.I.1, comparándolo con un control sin inocular y se observó disminución en las señales del espectro asociados a los grupos carbonilo, amida y éter (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). Los análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) de la degradación del Impranil® mostraron la hidrólisis de los enlaces éster y uretano del polímero, al observar diversos productos de degradación del polímero (comunicación personal). Además, se detectaron actividades de esterasa extracelular y ureasa en el cultivo en Impranil® (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). Esta cepa también fue capaz de degradar espumas de PE-PU generando hasta un 65% de pérdida de peso seco de la espuma (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). Posteriormente, por purificación a partir de la fracción extracelular de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1, fue posible identificar una cutinasa involucrada en la degradación del Impranil® (Álvarez-Barragán, 2016).

Las cutinasas (E.C. 3.1.1.74) son enzimas extracelulares de la clase serina esterases que presentan el plegamiento característico de la superfamilia de las α/β hidrolasas. Llevan a cabo la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos en su sustrato natural, que es la cutina (Fig. 4), y su tríada catalítica está conformada por Ser-His-Asp (Fig. 5). Algunas de estas enzimas son capaces de degradar polímeros sintéticos complejos como ácido poliláctico (PLA), poli- ϵ -caprolactona (PLC), polihidroxibutirato (PHB), polibutilensuccinato (PBS) o polibutilensuccinato-adipato (PBSA) y recientemente se han publicado algunos estudios de cutinasas que degradan PU. Por ejemplo, las cutinasas LCC, TfCut2, Tcur1278 y Tcur0390 mostraron un gran potencial de degradación de PET y PU (Schmidt *et al.*, 2017b). El hecho de que las cutinasas puedan estar involucradas en la descomposición de varios poliésteres podría atribuirse a la capacidad de estas enzimas de atacar polímeros (Schmidt *et al.*, 2017b). En otro estudio, se demostró la hidrólisis de películas de PS-PU por la cutinasa de *Humicola insolens* (Di Bisceglie *et al.*, 2022). Las cutinasas tienen un alto potencial de aplicación en procesos industriales y en la química ambiental ya que pueden llevar a cabo la degradación de insecticidas, ftalatos y polímeros sintéticos (Murphy *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2005). Debido a esto, la producción de estas proteínas de manera recombinante en bacterias o levaduras es una estrategia para ampliar sus aplicaciones biotecnológicas (Tabla 4). La expresión heteróloga ha permitido incrementar la actividad específica y facilitar la obtención de estas enzimas (Kwon *et al.*, 2009; Seman *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2002).

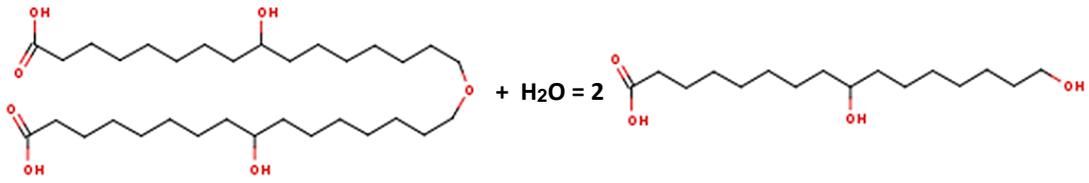


Fig. 4. Reacción general de las cutinasas. Tomado de la base de datos BRENDA Enzymes (Chang *et al.*, 2021).

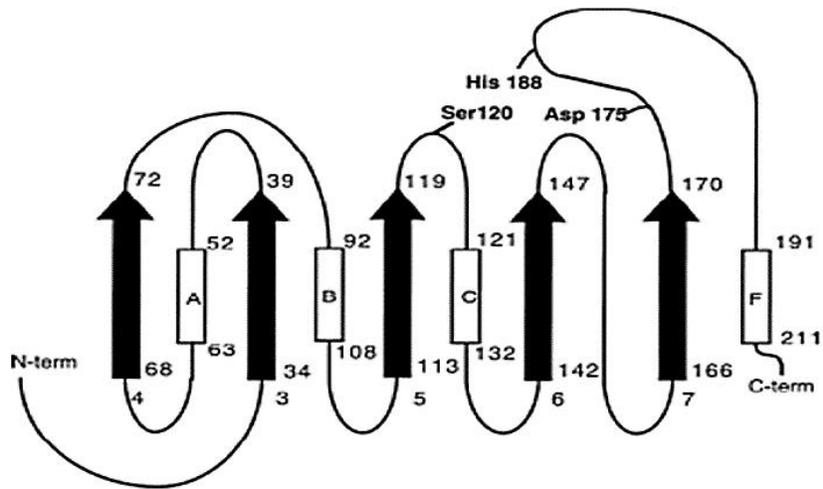


Fig. 5. Diagrama del plegamiento α/β de la cutinasa de *Fusarium solani*. Se indica la tríada catalítica, las cinco cadenas β (flechas negras numeradas) y cuatro hélices α (marcadas A, B, C y F). Tomada de Egmond y de Vlieg, 2000.

Tabla 4. Cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos.

Enzima (Accesion)	Microorganismo	Vector	Hospedero recombinante	Sustrato	Referencia
cutCsp (BAC67242)	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	pG-1	<i>S. cerevisiae</i> YPH499	PLA (ácido poliláctico), PBS (polibutilen succinato)	Masaki <i>et al.</i> , 2005
cutAory (P52956)	<i>Aspergillus oryzae</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	PCL (policaprolactona)	Liu <i>et al.</i> , 2009.
Tcel_Cut1 (ADV92526), Tcel_Cut2 (ADV92527), Tfus42_Cut1 (ADV92528)	<i>Thermobifida cellulosilytica</i> , <i>Thermobifida fusca</i>	pET26b(+)	<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	PET (polietilen tereftalato)	Herrero <i>et al.</i> , 2011
Talb_Cut1 (ADV92525)	<i>Thermobifida alba</i> DSM43185	pET26b(+)	<i>E. coli</i> BL21-Gold (DE3)	PET	Ribitsch <i>et al.</i> , 2012
Abra_Cut (AAA03470), Afum_Cut (XP_755273), Fsol_Cut (AAA33334)	<i>Alternaria brassicicola</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Fusarium solani</i>	pPICZα	<i>P. pastoris</i>	PCL	Baker <i>et al.</i> , 2012
Svir_Cut190 (BAO42836)	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	pQE80L	<i>E. coli</i> (DE3)	PET, PBSA (polibutilen succinato-coadipato)	Kawai <i>et al.</i> , 2014
cutFoxy (EXK81749)	<i>Fusarium oxysporum</i>	pET22b(+)	<i>E. coli</i> BL21	PET	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
Fsol_Cut (AAA33334)	<i>F. solani</i>	pPICZα	<i>P. pastoris</i> X33	PLA, PBSA, PCL	Hu <i>et al.</i> , 2016.
AnigCUT2 (AKE48475)	<i>Aspergillus niger</i>	pPICZαC	<i>P. pastoris</i> X33	PCL	Al-Tammar <i>et al.</i> , 2016
Tcel_Cut1 (ADV92526)	<i>T. cellulosilytica</i>	pPICZαB	<i>P. pastoris</i> KM71H	PET, PBS	Gamerith <i>et al.</i> , 2017
Fsol_synth (ASK40094), Afum_synth (ASK40095)	<i>F. solani</i> , <i>A. fumigatus</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i> X33	PCL	Ping <i>et al.</i> , 2017
LC_Cutinase (CUM11140), Tfus_Cut2 (CDN67547)	metagenoma, <i>T. fusca</i> KW3	pET22b(+)	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	PS-PU Impranii®	Schmidt <i>et al.</i> , 2017b
Mthe_CUT (XP_003663956.1)	<i>Myceliophthora thermophila</i> 42464	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	PCL	Yang <i>et al.</i> , 2018
Fsol_Cut (AAA33334), HiC (ABC06408)	<i>F. solani</i> , <i>Humicola insolens</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i> KM71	PMA (polimetil acrilato), PEA (polietil acrilato)	Hong <i>et al.</i> , 2019
Talb_Est119 (6AID)	<i>T. alba</i> AHK119	pQE80L	<i>E. coli</i> (DE3)	PLA	Kitadokoro <i>et al.</i> , 2019
Fsol_Cut (AAA33334)	<i>F. solani</i>	pPICZα	<i>P. pastoris</i> X33	PCL	Shi <i>et al.</i> , 2020
Mror_CUT1 (ESK97883)	<i>Moniliophthora roreri</i>	pET22b(+)	<i>E. coli</i> BL21	PCL, PET	Vázquez-Alcántara <i>et al.</i> , 2021
Cfla_CLE (BAT32793)	<i>Cryptococcus flavus</i> GB-1			PBSA	Watanabe <i>et al.</i> , 2015
Tcel_Cut1 (ADV92526), HiC (ABC06408)	<i>T. cellulosilytica</i> , <i>H. insolens</i>			Ecoflex y derivados	Perz <i>et al.</i> , 2016
HiC (ABC06408)	<i>H. insolens</i>			PET	de Castro <i>et al.</i> , 2017
HiC (ABC06408)	<i>H. insolens</i>			PS-PU	Di Bisceglie <i>et al.</i> , 2022

En nuestro laboratorio se intentó clonar el gen codificante de la cutinasa con actividad degradadora de Impranil® de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1, a partir de la síntesis de cDNA y amplificación por PCR con *primers* degenerados (Domínguez Malfavón, 2017, comunicación personal), para su posterior expresión en un sistema recombinante, pero no se logró su amplificación. Muy probablemente la imposibilidad de recuperar la secuencia del gen con esta estrategia fue debido a que la cutinasa está codificada en los genomas de hongos por una familia multigénica. Por lo tanto, considerando que el hongo *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 fue muy activo en la degradación del barniz de PS-PU Impranil®, se decidió secuenciar su genoma con el propósito inicial de identificar el gen de la cutinasa que ataca al PU. El genoma fue secuenciado por las técnicas Illumina, PacBio y Hi-C, encontrándose que tiene un tamaño aproximado de 33.69 Mbp. Para identificar los genes de cutinasas en el genoma anotado de A3.I.1, se empleó un modelo oculto de Márkov (HMM) del dominio de cutinasas, el cual también incluye a las acetilxilano esterasas (AXEs), alojado en la base de datos Pfam (PF01083). La búsqueda se realizó con HMMER 3.0 hmsearch en el proteoma predicho de *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 utilizando como valor de corte un E-value 10^{-3}. Se identificaron siete genes de cutinasas, todas extracelulares, y seis genes de acetilxilano esterasas, de las cuales cinco son extracelulares. Seis cutinasas extracelulares mostraron similitud con proteínas capaces de degradar poliésteres sintéticos (2372, 6962, 7317, 8471, 9593 y 12076), por lo que se sugirió que podrían tener actividad degradativa sobre el PU (Chavarría-Quintanilla, 2021). Los resultados del análisis por LC/MS/MS, de una proteína purificada con actividad degradadora de Impranil®, indicaron que la enzima codificada era una cutinasa (Álvarez-Barragán, 2016), y correspondía al gen 6962 (Chavarría Quintanilla, 2021). Esta cutinasa tiene alta similitud con la cutinasa de *Aspergillus oryzae* (cutAory) degradadora de PCL, PBS y PBSA (Liu *et al.*, 2009). Las cutinasas 2372, 8471 y 9593 son similares a la proteína bacteriana tipo cutinasa que degrada PLA y PBS de *Cryptococcus* sp. S-2 (cutCsp) (Masaki *et al.*, 2005). La cutinasa 7317 también es similar a la cutinasa de *A. oryzae* que degrada PCL, PBS y PBSA y la cutinasa 12076 es similar a la cutinasa de *Humicola insolens* que degrada PET (HiC) (de Castro *et al.*, 2017) (Pérez Vargas, tesis de Maestría en C. Bioquímicas, en proceso).

Por otro lado, se determinó que la actividad degradadora de Impranil® de proteínas extracelulares de cultivos de A3.I.1 inoculados con conidias germinadas es inducible al observar que, al utilizar un medio de cultivo control de composición conocida (MM) pero con dextrosa (0.13 mM) como única fuente de carbono, no se observó la actividad degradadora de Impranil®, mientras que en MM-Impranil® (0.5%) la actividad fue detectada durante las primeras tres semanas de crecimiento. A la cuarta semana, esta actividad también se presentó en medio con dextrosa, aunque en baja expresión (Chavarría-Quintanilla, 2021).

Asimismo, se realizó un análisis de expresión diferencial de genes por RNA-Seq, de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 cultivado en medios con el barniz de PS-PU Impranil® y dextrosa como únicas fuentes de carbono, a las dos semanas de cultivo (Ruiz-Reyes, 2019; Chavarría-Quintanilla, 2021). Los genes de la acetilxilano esterasa 6816 y de las cutinasas 6962, 7316, 7317 y 8471 fueron sobreexpresados con valores de Log2FC de 2.286, 1.460, 1.147, 3.117 y 5.346 respectivamente en medios con Impranil® como única fuente de carbono a las dos semanas de cultivo (García Bernal, 2023, tesis de Maestría en C. Bioquímicas).

Pocos trabajos han abordado el efecto de las cutinasas sobre la degradación de PU. Schmidt *et al.*, 2017b demostraron la hidrólisis de dispersiones de PS-PU (Impranil® DLN) y de cubos de PS-PU termoplástico (Elastollan B85A-10 y C85A-10) por acción de las cutinasas TfCut2, LCC, Tcur0390 y Tcur1278. La degradación del Impranil® DLN por acción de las cuatro cutinasas se analizó mediante un ensayo turbidimétrico. TfCut2 y Tcur0390 mostraron las constantes de velocidad de hidrólisis más altas, de 0.026 s^{-1} , para Impranil® DLN. La constante de adsorción K más alta se obtuvo con TfCut2 (0.188 mg^{-1}), lo que indica su fuerte afinidad por Impranil® DLN. En cuanto a la degradación del PS-PU termoplástico, Schmidt y colaboradores (2017) detectaron pérdidas de peso significativas del Elastollan B85A-10 y C85A-10 como resultado de la degradación enzimática por acción de las cuatro cutinasas que analizaron. En un tiempo de reacción de 200 h a 70°C , la enzima LCC provocó pérdidas de peso de hasta 4.9%, y de 4.1% de Elastollan B85A-10 y C85A-10, respectivamente. La cromatografía de permeación en gel confirmó una degradación preferencial de las cadenas poliméricas más grandes y la microscopía electrónica de barrido reveló grietas en la superficie de los cubos de los PS-PU termoplásticos como resultado de la erosión enzimática de sus superficies. El análisis mediante FTIR indicó que las pérdidas de peso observadas fueron el resultado de la ruptura de los enlaces éster del polímero. Por otro lado, Di Bisceglie *et al.* 2022, investigaron la hidrólisis enzimática de un copolímero de PS-PU utilizando la cutinasa (HiC) de *Humicola insolens*. Incubaron películas de PS-PU con la cutinasa HiC a 50°C durante 168 h. La cutinasa HiC hidrolizó eficazmente el polímero, reduciendo el peso molecular promedio en número (Mn) y el peso molecular promedio en peso (Mw) en un 84% y un 42% respectivamente, demostrado mediante cromatografía de permeación en gel (GPC). Los análisis por microscopía electrónica de barrido mostraron grietas en la superficie de las películas de PS-PU como resultado de la erosión superficial enzimática. Además, el análisis FTIR mostró una reducción en las señales a 1725 cm^{-1} , 1164 cm^{-1} y 1139 cm^{-1} , lo que indica que la enzima HiC hidrolizó preferentemente los enlaces éster. El análisis de cromatografía líquida de tiempo de vuelo/espectrometría de masas (LC-MS-Tof) reveló la presencia, en el sobrenadante de incubación, de todos los constituyentes monoméricos del polímero, lo que sugiere que la enzima fue capaz de hidrolizar tanto los enlaces éster como los enlaces uretano del polímero.

Este proyecto tuvo como objetivo producir de manera recombinante y purificar las cutinasas y la acetilxilano esterasa sobreexpresadas cuando *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.1.1 se cultivó en el barniz de PS-PU Impranil®, las cuales podrían estar relacionadas con la degradación de PU, con el propósito a futuro de realizar ensayos enzimáticos sobre sustratos tipo PU y poliésteres sintéticos. Estos experimentos permitirán determinar si estas enzimas, que han sido seleccionadas de manera natural en el ambiente para la degradación de PU, son más efectivas en la degradación de este polímero que las que se usan actualmente en estos tipos de análisis las cuales no provienen de microorganismos con esta capacidad.

4. Hipótesis

Mediante el sistema de expresión heteróloga de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se producirán y purificarán proteínas recombinantes del hongo *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 con potencial actividad sobre poliésteres sintéticos y sustratos tipo poliuretano (PU).

5. Objetivos

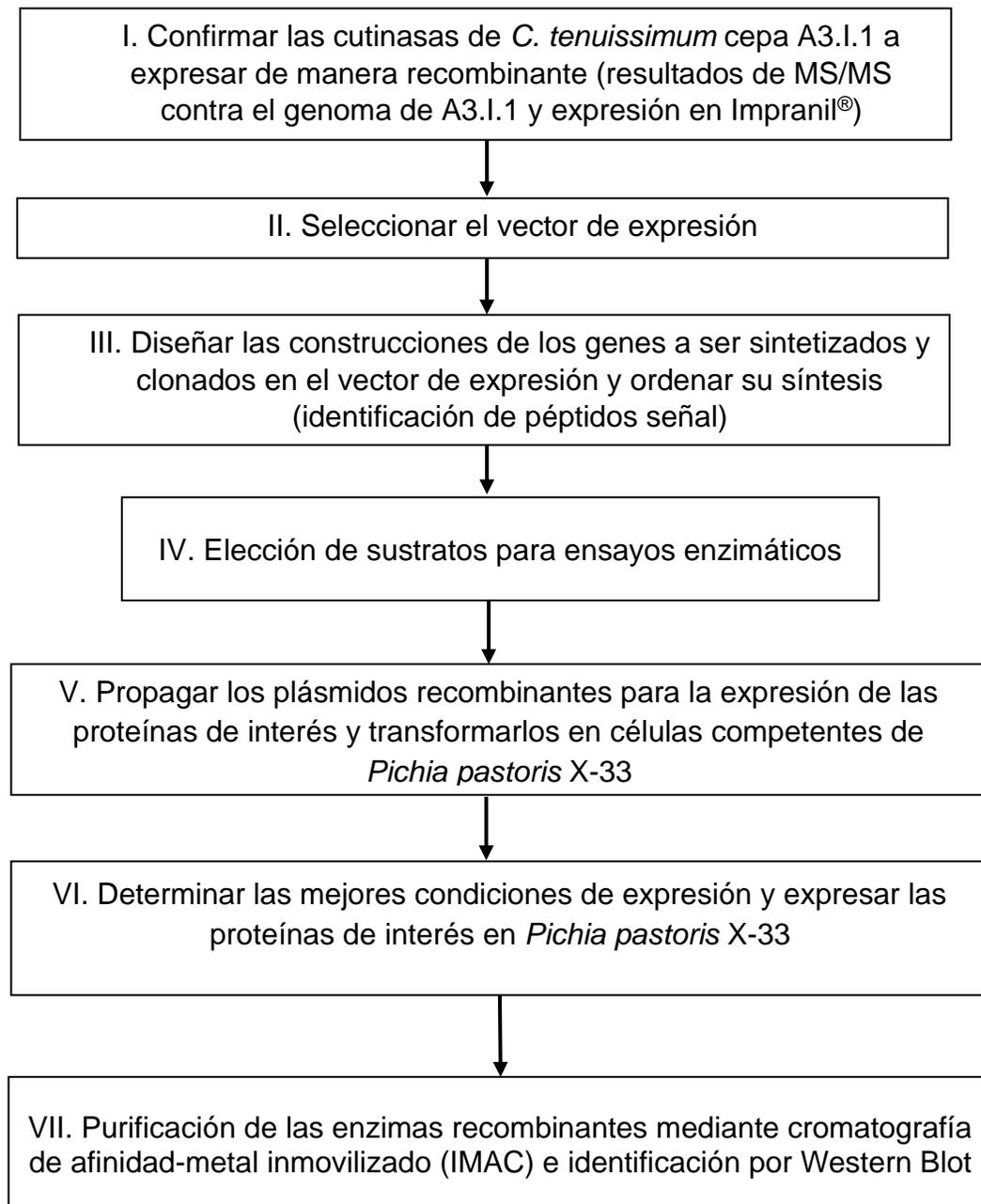
5.1 Objetivo General

Establecer las condiciones de cultivo de *Pichia pastoris* X-33 para la producción y purificación de las cutinasas y acetilxilano esterasa recombinantes de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 con potencial actividad sobre poliuretano.

5.2 Objetivos particulares

- I. Definir las proteínas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 a expresar de manera recombinante.
- II. Seleccionar el vector molecular más adecuado para la expresión de las proteínas recombinantes.
- III. Diseñar y obtener las construcciones de los genes a ser sintetizados y clonados en el vector de expresión.
- IV. Definir los sustratos a probar en futuros ensayos enzimáticos con base en los métodos para detectarlos y cuantificarlos.
- V. Propagar los plásmidos recombinantes para la expresión de las proteínas de interés y transformarlos en células competentes de *Pichia pastoris* X-33.
- VI. Determinar las condiciones de inducción para la expresión de las proteínas recombinantes de A3.I.1.
- VII. Purificar las proteínas recombinantes.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1 Confirmación de los genes a expresar de manera recombinante

Los criterios para la elección de las proteínas de A3.I.1 para su producción de manera recombinante fueron los siguientes (Tabla 5):

- La cutinasa de A3.I.1 con actividad degradadora de Impranil® previamente identificada en el laboratorio por LC/MS/MS (Álvarez-Barragán, 2016 y Chavarría Quíntanilla, 2021)
- Nivel de expresión diferencial en medio con Impranil® (Log2FC)
- Similitud estructural con cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos

Tabla 5. Enzimas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 con sobreexpresión en Impranil®.

Enzimas A3. I.1	Expresión en Impranil® (Log2FC)	Proteínas con similitud estructural					Puentes disulfuro
		ID PDB	Score	Identidad	Cobertura	E-value	
6962 (309 aa)	1.460	3GBS de <i>Aspergillus oryzae</i> , degrada PCL	184	48.73%	63%	1.00E-05	3
8471 (421 aa)	5.346	2CZQ de <i>Cryptococcus</i> sp. S-2, degrada PLA y PBS	260	61%	46%	1.00E-83	2
7317 (217 aa)	3.117	3GBS de <i>Aspergillus oryzae</i> , degrada PCL	97.1	36.08%	83%	1.00E-24	2
6816 (467 aa)	2.286	1BS9 de <i>Talaromyces purpureogenus</i> , no degrada poliésteres sintéticos	54.7	30.57%	33%	3.00E-08	3
7316 (287 aa)	1.147	1CUB de <i>Fusarium vanettenii</i> , no degrada poliésteres sintéticos	120	39.53%	68%	1.00E-32	2

La cutinasa 7316 se descartó porque su valor de Log2FC fue el más bajo, lo que indica una muy baja expresión diferencial en medio de cultivo con Impranil®, además de que no tiene similitud estructural con cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos. Debido a lo anterior se seleccionaron las enzimas de A3.I.1 6816, 6962, 7317 y 8471 para trabajar en este proyecto. También se eligió a la cutinasa de *Humicola insolens* con ID PDB: 4OYY e ID Uniprot: A0A075B5G4 degradadora de PET y PS-PU (Di Bisceglie *et al.*, 2022), comprada de la compañía Novozym® (No. de catálogo: 51032) como control positivo, para futuros ensayos enzimáticos. Se espera que esta cutinasa degrade los poliésteres sintéticos y los sustratos tipo PU que se utilicen en los ensayos enzimáticos.

7.2. Sistema de expresión

7.2.1. Síntesis de genes de las enzimas de A3.I.1 expresadas en Impranil® y clonación en el vector pPICZαA

Se seleccionó el sistema de expresión de la levadura *Pichia pastoris* debido a que las proteínas de interés son de origen fúngico. *Pichia pastoris* es un sistema con la capacidad de producir proteínas complejas mediante maquinaria subcelular de naturaleza eucariota que permite llevar a cabo modificaciones postraduccionales como la formación de enlaces disulfuro y procesos de glicosilación.

Los genes de las enzimas 6816, 6962, 7317 y 8471 de A3.I.1 se mandaron a sintetizar y clonar en el vector pPICZαA por la compañía GeneUniversal Inc. Las secuencias de estos genes se diseñaron sin los péptidos señal, pero con toda la secuencia de la proteína hasta el residuo carboxilo terminal. Además, se añadió la secuencia de reconocimiento a la enterocinasa para tener la posibilidad de remover las etiquetas de afinidad (c-myc y his-tag), localizadas en el carboxilo terminal, una vez purificadas las enzimas recombinantes, si fuera necesario. Los protocolos para la transformación de *E. coli* y *P. pastoris* así como para la expresión de las proteínas recombinantes que se llevaron a cabo en este trabajo se tomaron del manual EasySelect™ *Pichia* Expression Kit de Invitrogen (2010) con algunas modificaciones como se menciona más adelante.

7.2.2. Vector pPICZα

El sistema de expresión que se utilizó es el sistema pPICZα (EasySelect™ *Pichia* Expression Kit de Invitrogen, 2010) ya que contiene el promotor AOX1 para la expresión del gen de interés inducido por metanol. Además, cuenta con tres marcos de lectura (versiones A, B, C) y una señal de secreción del factor α para secretar la proteína recombinante al espacio extracelular. Cuenta también con la secuencia C-terminal codificando el epítipo c-myc y la etiqueta de polihistidinas (6xHis) para facilitar la purificación de la proteína recombinante. Asimismo, para la selección tanto en *E. coli* como en *Pichia pastoris*, cuenta con un gen de resistencia a Zeocina™ (Fig. 6).

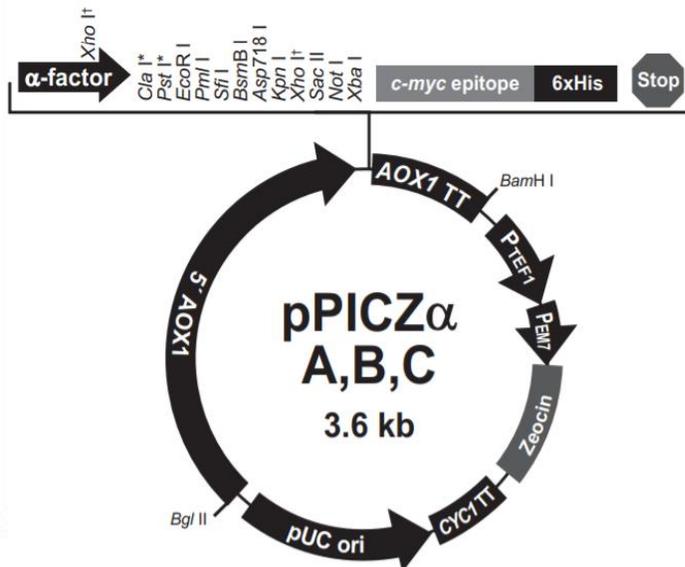


Fig. 6. Sistema de expresión pPICZ α . 5' AOX1: promotor AOX1; AOX1 TT: región de terminación de la transcripción AOX1; P_{TEF1}: promotor del gen del factor 1 de elongación de la transcripción de *Saccharomyces cerevisiae* que controla la expresión del gen de resistencia a Zeocina™ en *P. pastoris*; P_{EM7}: promotor procariótico sintético que controla la expresión constitutiva del gen de resistencia a Zeocina™ en *E. coli*; CYC1TT: región de terminación de la transcripción CYC1 que permite un procesamiento eficiente del gen de resistencia a Zeocina™; pUC ori: origen de replicación en *E. coli*. El sitio múltiple de clonación contiene la secuencia del factor α para excretar la proteína recombinante, 13 sitios de clonación y las secuencias para el epítipo *c-myc* y la secuencia para His. Tomado de Invitrogen (2010).

7.2.3. Transformación en *E. coli*

Una vez recibidos los genes de las enzimas de A3.I.1 clonados en el vector pPICZ α A, se propagó el vector por transformación en las cepas de *E. coli* DH5 α y TOP10 siguiendo el siguiente protocolo (Invitrogen, 2010):

1. Se prepararon células competentes de *E. coli* DH5 α y *E. coli* TOP10 utilizando CaCl₂
2. Se resuspendieron los plásmidos con los genes de las cutinasas de A3.I.1 clonados (5 μ g) en 50 μ L buffer TE (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA, pH 9) estéril para obtener una solución con una concentración de 100 ng/ μ L
3. Se llevó a cabo la transformación por choque térmico (45 s a 45°C y 2 min a 4°C) de 100 μ l de células competentes de *E. coli* con 2 μ L del plásmido
4. Se agregó medio LB bajo en sales (< 90 mM y pH 7.5) a las células para permitir su recuperación
5. Se plaquearon diferentes volúmenes del mix de las células transformadas en cajas Petri con medio LB bajo en sales con 25 μ g/mL de Zeocina™
6. Se incubaron durante la noche a 37°C y en oscuridad

7. Se seleccionaron colonias aisladas de células transformadas (resistentes a Zeocina™), se inocularon en 5 mL de medio LB bajo en sales con 25 µg/mL de Zeocina™ y se incubaron durante la noche a 37°C en oscuridad
8. Las clonas aisladas se almacenaron en glicerol.
9. Se confirmó la clonación correcta de los genes de interés aislando el DNA plasmídico y mediante ensayos con enzimas de restricción específicas (*EcoRI* y *XbaI*)

A partir de estas transformantes, se purificó suficiente DNA plasmídico para transformar *Pichia pastoris* (5-10 µg de plásmido por transformación).

7.2.4. Transformación en *P. pastoris* X-33

Se utilizó la cepa X-33 de *P. pastoris* para la expresión de las enzimas recombinantes. Se prepararon las células de *P. pastoris* para su transformación por electroporación siguiendo los siguientes pasos (Invitrogen, 2010):

1. Se digirieron ~5-10 µg de DNA plasmídico de las cutinasas de A3.I.1 con una enzima de restricción que no corta el gen de interés y que permitió la apertura de los vectores en la secuencia 5'AOX1 para una integración eficiente en el genoma de *Pichia pastoris* (*SacI* o *PmeI*)
2. Se realizó una electroforesis en un gel de agarosa de la reacción de digestión para corroborar que ésta se realizó de forma correcta
3. Una vez que el vector estuvo completamente digerido (abierto), se inactivó la reacción de digestión con calor
4. Se purificó el DNA digerido para eliminar las enzimas de restricción. El DNA purificado se utilizó inmediatamente o se almacenó a -20°C
5. Se cultivaron células de *Pichia pastoris* X-33 en 5 mL de medio YPD en tubos cónicos de 50 mL a 30°C durante la noche, con agitación a 220 rpm
6. Se inocularon 500 mL de medio fresco en un matraz de 2 L con 0.1-0.5 mL del cultivo y se cultivó nuevamente durante la noche hasta que se alcanzó una OD₆₀₀ = 1.3-1.5
7. Se centrifugaron las células a 1,500 x g por 5 min a 4°C y se resuspendió el pellet con 500 mL de agua fría estéril
8. Se centrifugaron las células como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en 250 mL de agua fría estéril
9. Se centrifugaron las células como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en 20 mL de sorbitol 1 M frío
10. Se centrifugaron nuevamente las células como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en 1 mL de sorbitol 1 M frío para obtener un volumen final de aproximadamente 1.5 mL. Las células se mantuvieron en hielo y se usaron el mismo día.

Para la electroporación de las células de *P. pastoris* se siguió el siguiente protocolo (Invitrogen, 2010):

1. Se mezclaron 40-80 μL de las células de *P. pastoris* previamente preparadas con 5-10 μg de DNA abierto (en 5-10 μL) y se transfirió la mezcla a una celda de 0.2 cm fría para electroporación
2. Se incubó la celda en hielo por 5 min
3. La celda se introdujo en el electroporador y se realizó la electroporación (1.5 kV, 400 Ω , 25 μF y 7-8 ms)
4. Inmediatamente después de agregó a la celda 1 mL de sorbitol 1M frío y se transfirió el contenido a un tubo estéril de 1.5 mL. Se incubó a 30°C sin agitación por 1-2 h
5. Se plaquearon diferentes volúmenes (10-200 μL) en placas con medio YPDS y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocina™ y se incubaron durante 3 a 10 días (hasta que se formen las colonias) a 30°C en oscuridad
6. Se seleccionaron colonias transformantes y se purificaron sembrándolas en placas nuevas con medio YPDS con 100 y/o 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Zeocina™

7.3. Expresión de proteínas recombinantes

Una vez obtenidas varias clonas recombinantes de *P. pastoris* X-33 con los genes de interés de A3.I.1 se llevaron a cabo los experimentos de inducción para la expresión de las enzimas recombinantes siguiendo los pasos siguientes (Invitrogen, 2010):

1. A partir de una colonia aislada, se inocularon 25 mL de medio BMGY en un matraz (baffleado o sin baffles) de 125 o 250 mL dependiendo del experimento realizado. Se llevó a cabo el cultivo a 28-30°C en incubadora con agitación (200-220 rpm) hasta que se alcanzó una $\text{OD}_{600} = 2-6$ (aproximadamente 16-18 horas)
2. Se cosecharon las células centrifugando a 1,500–3,000 $\times g$ durante 5 min a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet hasta una $\text{OD}_{600} = 1.0$ en medio BMMY para inducir la expresión
3. Se transfirió el cultivo a un matraz (baffleado o sin baffles) de 125, 250 o 1000 mL dependiendo del experimento realizado, se tapó el matraz con algodón y gasa estéril y se regresó a la incubadora
4. Se agregó metanol absoluto para alcanzar una concentración final de 0.5%, 1%, 2% o 3% cada 24 h (dependiendo del experimento realizado) para mantener la inducción
5. Se transfirieron 2 mL del cultivo de expresión a un tubo de microcentrífuga de 2 mL cada 24 h a los siguientes tiempos: 0 hasta 96 horas.
6. Se separaron las alícuotas en fracción extracelular y citoplasmática. Las fracciones extracelulares se obtuvieron centrifugando a 14,000 rpm por 10 min y separando el sobrenadante obtenido. Para las fracciones citoplasmáticas, se resuspendió el pellet obtenido en el paso anterior en 1 mL de buffer de fosfatos 50 mM pH 7. Se lisaron las células en frío usando ultrasonificación (Vibra Cell,

VCX 750, Sonics & Materials Inc.), 6 ciclos de pulsos de 15 s por 15 s de descanso a una amplitud de 21%. Se centrifugó la suspensión obtenida a 14,000 rpm durante 10 min.

7. Las diferentes fracciones se almacenaron a -80°C hasta el día de los ensayos de detección
8. Se analizaron ambas fracciones para determinar la expresión de la proteína de interés por SDS-PAGE

7.3.1. Detección de proteínas recombinantes fracciones extracelular y citoplasmática

Se analizó la expresión de las proteínas recombinantes de A3.I.1 mediante geles de SDS-PAGE siguiendo los pasos enlistados a continuación:

1. Se descongelaron las muestras extracelulares y citoplasmáticas en hielo
2. Se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Bradford en las fracciones extracelular y citoplasmática
3. Se concentraron las muestras a 30 µg de proteína en 20 µL y se añadieron 5 µL de buffer de carga del gel SDS-PAGE
4. Se hirvió durante 3 min, después se cargaron los 25 µL de la muestra en el gel

7.3.2. Detección de las proteínas recombinantes en la fracción membranal

1. Los pellets de las fracciones membranales se descongelaron en hielo, se resuspendieron con 400 µL de solución Tris 100 mM pH 7 con SDS 1% y se dejaron en agitación por 12 h a 4°C.
2. Se centrifugaron a 20,800 x g por 15 min a 4°C y se concentraron los sobrenadantes en centricones hasta 20 µL
3. Se añadió a cada muestra 5 µL de buffer de carga sin SDS y se calentaron a 95°C durante 10 min
4. Se agregaron 10 µL de solución Tris 100 mM pH 7 con SDS 1% y se mezcló la mezcla con una punta de micropipeta para disminuir la viscosidad de las muestras y poder cargarlas en los geles

7.3.3. Purificación de proteínas recombinantes

Se seleccionaron algunas alícuotas de las fracciones extracelulares para llevar a cabo la purificación de las proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad-metal inmovilizado (IMAC) para la etiqueta de polihistidina. La resina que se utilizó fue la Agarosa Ni-NTA de Invitrogen™. Se siguió el siguiente protocolo:

1. Se seleccionaron algunas alícuotas de fracciones extracelulares para purificar en la columna con resina de níquel. Se concentraron 250 µg de proteína total en 100 µL de buffer LEW (NaH₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM, pH 8)
2. Se mezclaron 100 µL de buffer LEW con 50 µl de resina Invitrogen™ Agarosa Ni-NTA en las columnas y se agitaron suavemente

3. Se equilibraron las columnas con 400 μL de buffer LEW (3 veces)
4. Se agregaron 100 μL de cada muestra a cada una de las columnas y se agitaron suavemente por 30 min
5. Se lavaron las columnas con 400 μL de buffer LEW y se recuperaron los lavados (flow through)
6. Se cuantificaron los lavados (flow though), se tomó el volumen que contuviera 40 μg de proteína total para cargar en el gel y se les añadió buffer de carga 5X
7. Se lavaron las columnas con 400 μL de buffer LEW
8. Se eluyeron las columnas con 400 μL de solución de elución (buffer LEW + EDTA 50 mM pH 8) y se recuperaron los eluatos
9. Se concentraron los eluatos con 50 μL de TCA 100% (concentración final 10%) y se centrifugó a 14,000 x g por 10 min
10. Se removió el TCA y se resuspendió el pellet con 20 μL de H_2O y 10 μL de buffer de carga 5X
11. Se realizó un análisis SDS-PAGE para determinar qué fracción(es) contenían la proteína de interés etiquetada con polihistidina

7.3.4. Detección de proteínas recombinantes por ensayo de Western Blot

Se llevó a cabo un análisis por Western Blot utilizando anticuerpos contra la etiqueta de histidinas de las muestras candidatas con las proteínas recombinantes. Las muestras analizadas fueron los sobrenadantes (fracciones extracelulares) sin purificar en columna de Ni de alícuotas previamente seleccionadas, las muestras purificadas en la columna de Ni y un control positivo (CDK-A con His tag). Se siguió el siguiente protocolo:

1. Los sobrenadantes sin purificar en columna (40 μg de proteína total), los lavados (flow through; 40 μg de proteína total), los eluatos (sin cuantificar) y un control positivo (CDK-A recombinante con His tag; 200 y 400 ng), se calentaron a 65°C en *heat block* por 3 min
2. Se cargaron las muestras en 2 geles Tricina-SDS-PAGE 10% y se llevó a cabo la electroforesis a voltaje constante (150 V) durante 1 h
3. Los geles de poliacrilamida fueron transferidos a membranas Immobilon® PVDF de Merck Millipore previamente solvatadas con MeOH absoluto e hidratadas con H_2O
4. La transferencia de las proteínas del gel a la membrana Immobilon® PVDF de Merck Millipore se llevó a cabo de manera semihúmeda a 4°C y a 30 V durante 3h seguido de 1h a 60 V
5. Las membranas se bloquearon con una solución al 5% de leche-PBS 1X + 1% Tween 20 durante 30 min en agitación
6. Las membranas se incubaron con el anticuerpo primario (anti his de ratón; Jackson ImmunoResearch) diluido en una solución al 5% de leche descremada en PBS 1X + 1% Tween 20 (1:40,000) por 12h a 4°C en agitación

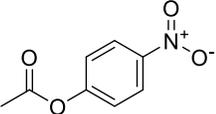
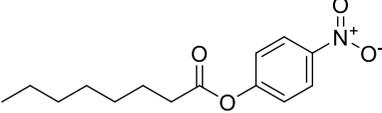
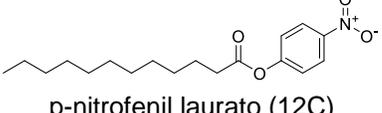
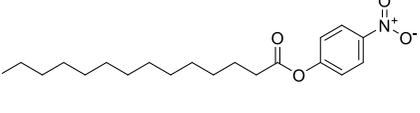
7. Terminado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS 1X + 1% Tween 20 por 10 min cada uno
8. Las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario (Jackson ImmunoResearch) anti-ratón acoplado a una peroxidasa durante 1h a temperatura ambiente y en agitación
9. Se repitieron los 3 lavados de 10 min y se bañaron las membranas con 1 mL de la solución de revelado por quimioluminiscencia (NZY Advanced ECL, peróxido y luminol)
10. Se lavaron las membranas y se incubaron con una dilución más concentrada de 1:7,500 de anticuerpo primario y secundario y se revelaron como en el paso anterior. Para la detección se empleó un ChemiDoc (Bio-Rad) con el objetivo de mejorar las señales débiles con un mínimo de ruido
11. Después del revelado, las membranas se lavaron con PBS 1X + 1% Tween 20 y se tiñeron con rojo de Ponceau y rojo Congo

7.4. Sustratos para ensayos enzimáticos

Originalmente, este trabajo pretendía realizar ensayos enzimáticos para caracterizar la actividad de las proteínas recombinantes sobre distintos sustratos de tipo éster y PU, una vez producidas y purificadas. Sin embargo, por problemas en la determinación de las condiciones adecuadas para la producción de proteínas recombinantes, no se alcanzaron a realizar estos ensayos. No obstante, se llevó a cabo la selección de sustratos de interés para caracterizar las proteínas recombinantes de A3.I.1 en futuros proyectos. En ese sentido, para definir los sustratos y las técnicas de medición de las actividades enzimáticas se consideró el tipo de instrumentación necesaria para detectar la actividad. Entre estas se encuentran, la espectrofotometría, pérdida de peso de películas de los polímeros a analizar, microscopía electrónica de barrido (SEM), carbono orgánico total (TOC), HPLC-MS y GC-MS. Se seleccionaron los sustratos a utilizar en los ensayos enzimáticos (Tabla 6) considerando:

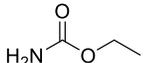
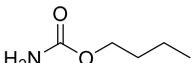
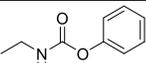
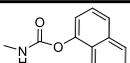
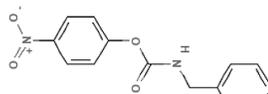
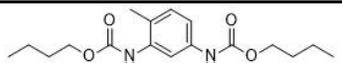
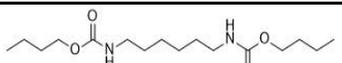
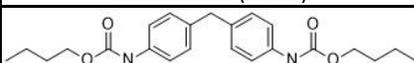
- i. Los que se utilizarían como controles positivos como p-nitrofenilésteres para medir la actividad esterasa.
- ii. Poliésteres sintéticos como controles positivos para determinar si las proteínas recombinantes tienen la capacidad de atacar y degradar enlaces éster de polímeros.
- iii. Compuestos relacionados estructuralmente con el PU.
 - a) Que contengan grupos éster
 - b) Que contengan grupo carbamato

Tabla 6. Controles positivos actividad esterasa y degradación de polímeros.

Controles positivos	Técnica de detección	Referencia
p-nitrofenil ésteres		
 <p>p-nitrofenil acetato (2C)</p>	Espectrofotometría	Al-Tammar <i>et al.</i> , 2016.
 <p>p-nitrofenil octanoato (8C)</p>		
 <p>p-nitrofenil laurato (12C)</p>		
 <p>p-nitrofenil miristato (14C)</p>		
Polímeros sintéticos		
poli ε-caprolactona (PCL)	Pérdida de peso, SEM	Liu <i>et al.</i> , 2009.
Ácido poliláctico (PLA)	Pérdida de peso, espectrofotometría (emulsión)	Hu <i>et al.</i> , 2016.
Polietilentereftalato (PET)	HPLC, pérdida de peso	Machado <i>et al.</i> , 2017

Se propone la evaluación de la actividad de las proteínas recombinantes de *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1 sobre sustratos con enlaces carbamato de moléculas simples y de moléculas tipo poliuretano con el objetivo de determinar si las enzimas recombinantes tienen la capacidad de atacar los enlaces éster del grupo carbamato o uretano, ya que en estos compuestos los únicos enlaces éster son los presentes en los grupos carbamato (Tabla 7).

Tabla 7. Sustratos para probar en ensayos enzimáticos

Sustrato	Técnica de detección	Referencia
Carbamatos		
 Etil carbamato	Espectrofotometría	Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> , 2006.
 Butil carbamato		Masaki K. <i>et al.</i> , 2020.
 Etil fenil carbamato (EPC)		Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> , 2006.
 Carbaryl		Kamini <i>et al.</i> , 2018.
 p-nitrofenil-N-bencilcarbamato		Di Bisceglie <i>et al.</i> 2022.
Derivados de PU		
 dibutil éster de ácido toluen-2,4-dicarbámico (TDCB)	GC-MS	Akutsu-Shigeno <i>et al.</i> , 2006.
 dibutil éster de ácido hexametilen dicarbámico (HDCB)		
 dibutil éster de ácido metilen bisfenil dicarbámico (MDCB)		

8. Resultados y discusión

8.1. Identificación de la cutinasa previamente identificada con actividad “degradadora de Impranil®” en sobrenadantes de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 contra el genoma de A3.I.1

Si bien previamente en el laboratorio se identificó a la cutinasa con actividad "degradadora de Impranil®" por espectrometría de masas (Álvarez-Barragán, 2016) y luego se determinó que correspondía a la cutinasa codificada en el gen 6962 de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 (Chavarría-Quintanilla, 2021), con el objetivo de conocer los detalles del estudio y confirmar que además de la cutinasa 6962 no hubiera(n) otra(s) proteína(s) a la(s) que pertenecieran los péptidos obtenidos por MS/MS, se reanalizaron estos resultados, con nuevos datos proporcionados por el servicio que llevó a cabo este análisis (Roshanak 2018, comunicación personal). Se compararon los péptidos obtenidos en la espectrometría de masas de la banda de la cutinasa previamente identificada en el laboratorio contra el genoma de A3.I.1. Se usó un umbral de probabilidad de proteína del 90%, una cantidad mínima de 1 péptido por proteína y un umbral FDR de péptido del 1% y se tomaron los siguientes criterios para determinar qué proteína de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 con actividad “degradadora de Impranil®” estaba presente en la banda analizada por MS/MS: el número de espectros totales (número total de espectros asociados con la proteína en cuestión, incluidos los compartidos con otras proteínas), número de espectros únicos exclusivos (número de espectros únicos asociados solo con la proteína en cuestión) y el porcentaje de cobertura de la secuencia.

La cutinasa codificada en el gen 6962 de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1, en dos de los tres tratamientos, semitripsina y tripsina+quimiotripsina, se identificó con los mayores valores de espectros totales y espectros únicos exclusivos (Tabla 8), por lo que se confirma que esta cutinasa es la cutinasa con actividad “degradadora de Impranil®” previamente identificada en el laboratorio.

Tabla 8. Espectros comparados contra el genoma de A3.I.1. Se incluyen solo los resultados con %Spec mayor a 0.04.

Tratamiento	Gen A3. I.1	Prob	%Spec	#Pept	#Unique	#Spec	%Cov	m.w. (Da)	Modif PT	BlastP NCBI					Microorganismo
										Proteína (GenBank Accession)	Score	E-value	%ID	%Cov	
Semitripsina	6962	100	0.290	8	15	24	7.8	31055	Si	cutinasa (XP_023455429)	221	6.00E-74	58.38	63	<i>Cercospora beticola</i>
	3551	100	0.250	1	1	21	1.9	51328	No	peptidasa (XP_044661046)	508	8.00E-179	62.56	93	<i>Cercospora kikuchii</i>
	12455	100	0.072	5	6	6	38	25275	No	proteína de la pared celular (XP_035374944)	202	4.00E-69	58.9	69	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	7317	100	0.072	1	1	6	3.7	22156	No	cutinasa (XP_033553017)	172	9.00E-55	49.2	85	<i>Lindgomyces ingoldianus</i>
	10122	100	0.060	5	5	5	25	25335	No	proteína asociada al complejo I (XP_033462822)	267	5.00E-93	62.14	89	<i>Dissoconium aciculare</i>
	2305	100	0.048	4	4	4	17	44934	No	cloroperoxidasa (XP_018029853)	502	2.00E-179	62.12	92	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>
	3479	100	0.048	3	4	4	9.3	41670	Si	actina gamma (XP_007727665)	778	0	99.47	100	<i>Capronia coronata</i>
Tripsina-Quimiotripsina	6962	100	0.120	1	4	10	3.9	31055	Si	cutinasa (XP_023455429)	221	6.00E-74	58.38	63	<i>Cercospora beticola</i>
	2820	96	0.140	1	1	12	2.4	58054	No	transportador tipo MFS (XP_023451005)	471	4.00E-162	49.81	99	<i>Cercospora beticola</i>
	6836	99	0.060	1	1	5	1.7	53570	No	proteína no caracterizada (XP_033585490)	188	6.00E-50	31.53	94	<i>Neohortaea acidophila</i>
Tripsina	12455	100	0.072	5	6	6	38	25275	No	proteína de la pared celular (XP_035374944)	202	4.00E-69	58.9	69	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
	1712	100	0.060	5	5	5	11	43861	No	cloroperoxidasa (XP_003849425)	504	5.00E-180	63.38	100	<i>Zymoseptoria tritici</i>
	10122	100	0.060	5	5	5	25	25335	No	proteína asociada al complejo I (XP_033462822)	267	5.00E-93	62.14	89	<i>Dissoconium aciculare</i>
	2305	100	0.048	4	4	4	17	44934	No	cloroperoxidasa (XP_018029853)	502	2.00E-179	62.12	92	<i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i>
	3479	100	0.048	3	4	4	9.3	41670	Si	actina gamma (XP_007727665)	778	0	99.47	100	<i>Capronia coronata</i>

Prob: probabilidad de identificación de la proteína; %Spec: porcentaje de los espectros en la muestra; #Pept: número de péptidos únicos exclusivos; #Unique: número de espectros únicos exclusivos; #Spec: número de espectros totales; %Cov: Porcentaje de cobertura de secuencia; m.w.: masa molecular; %ID: porcentaje de identidad (BlastP NCBI); Modif PT: Modificación postraduccional.

8.2. Síntesis de los genes que codifican las proteínas de tipo cutinasa de A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® y clonación en el vector pPICZαA

8.2.1. Predicción del péptido señal de las proteínas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® seleccionadas para su producción recombinante

Como se mencionó en el apartado 7.1, se seleccionaron cuatro enzimas que se sobreexpresaron en Impranil® de A3.I.1 (6816, 6962, 7317 y 8471) para trabajar en este proyecto. La cutinasa 7316 de A3.I.1 se descartó porque, aunque tuvo sobreexpresión en medio con Impranil® su valor de Log2FC fue el más bajo (1.147) y no tiene similitud estructural con cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos. Como las proteínas seleccionadas son proteínas extracelulares, se identificaron sus péptidos señal para ser eliminados del diseño de las secuencias de genes a clonar. Para ello, se analizaron las secuencias de las enzimas 6816, 6962, 7317 y 8471 de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 expresadas en Impranil® con el software SignalP versión 5.0 y versión 6.0 (Almagro-Armenteros *et al.*, 2019). Además de analizar las secuencias de las enzimas de interés de A3.I.1, se analizaron también las secuencias de dos cutinasas reportadas en la literatura con la capacidad de degradar poliésteres sintéticos y que tienen la mayor similitud estructural con las cutinasas que se sobreexpresan en Impranil® de A3.I.1. Estas dos proteínas control son la 3GBS (cutinasa de *Aspergillus oryzae* que degrada PCL) y la 2CZQ (cutinasa de *Cryptococcus sp.* S-2 que degrada PLA).

En los cuatro genes analizados de A3.I.1 y en las dos proteínas control se predijo un péptido señal de tipo Sec/SPI, es decir péptidos de señal secretora “estándar” transportados por el translocón Sec y escindidos por la peptidasa de señal I (Lep), con una probabilidad mayor de 70%. Sin embargo, los sitios de escisión de los péptidos señal predichos fue diferente con los dos programas utilizados a excepción de la proteína 6816 cuya predicción del sitio de escisión del péptido señal fue la misma. Para las otras tres proteínas hubo una diferencia de 8 a 10 aminoácidos entre la predicción de SignalP-5.0 y la de SignalP-6.0. Por lo tanto, se utilizaron dos programas de predicción de péptido señal más, TargetP – 2.0 y DeepSig (Tabla 9). SignalP-5.0, TargetP-2.0 y DeepSig predijeron los mismos sitios de escisión del péptido señal, siendo los resultados de SignalP-6.0 los que difieren. Únicamente para la proteína 6816 de A3.I.1 se predijo el mismo sitio de escisión del péptido señal con los cuatro programas utilizados.

Tabla 9. Predicción de péptido señal de las enzimas de A3.I.1 sobreexpresadas en Impraniil® y enzimas degradadoras de poliésteres sintéticos (3GBS y 2CZQ).

SignalP – 5.0			
Proteína	Péptido señal Sec/SPI (probabilidad)	Sin péptido señal (probabilidad)	Sitio de escisión (probabilidad)
8471	0.9986	0.0014	20 y 21 (0.9505)
6962	0.9927	0.0073	16 y 17 (0.5615)
6816	0.8825	0.1175	20 y 21 (0.4544)
7317	0.9836	0.0164	19 y 20 (0.6542)
3GBS	0.9560	0.044	16 y 17 (0.6453)
2CZQ	0.9673	0.0327	19 y 20 (0.0327)
SignalP – 6.0			
Proteína	Péptido señal Sec/SPI (probabilidad)	Sin péptido señal (probabilidad)	Sitio de escisión (probabilidad)
8471	0.9998	0.0002	30 y 31 (0.682260)
6962	0.9998	0.0002	24 y 25 (0.910256)
6816	0.9999	0.0002	20 y 21 (0.978349)
7317	0.9998	0.0002	27 y 28 (0.760718)
3GBS	0.9998	0.0002	24 y 25 (0.819733)
2CZQ	0.9998	0.0002	34 y 35 (0.471575)
TargetP – 2.0			
Proteína	Péptido señal Sec/SPI (probabilidad)	Sin péptido señal (probabilidad)	Sitio de escisión (probabilidad)
8471	1.0	0	20 y 21 (0.8209)
6962	0.9996	0.0002	16 y 17 (0.6888)
6816	0.9985	0.0015	20 y 21 (0.7861)
7317	0.9994	0.0003	19 y 20 (0.6484)
3GBS	0.997	0.002	16 y 17 (0.7230)
2CZQ	0.9999	0.0001	19 y 20 (0.8023)
DeepSig			
Proteína	Señal predicha	Confiabilidad	Sitio de escisión
8471	Péptido señal	1.0	20
6962	Péptido señal	0.99	16
6816	Péptido señal	0.8	20
7317	Péptido señal	1.0	19
3GBS	Péptido señal	0.97	16
2CZQ	Péptido señal	1.0	19

Como un criterio más para definir el sitio de escisión preciso de los péptidos señal, se realizó el alineamiento de las secuencias del PDB de las enzimas 3GBS y 2CZQ con las correspondientes secuencias de sus genes depositadas en el GenBank y se señaló el péptido señal de acuerdo con las predicciones de SignalP versión 5.0 y 6.0 (Figura 7). La predicción del péptido señal con SignalP-5.0 coincidió con la estructura cristalizada de 3GBS (cutinasa de *Aspergillus oryzae*, degradadora de PCL), mientras que la predicción del péptido señal con SignalP-6.0 coincidió con la estructura cristalizada de 2CZQ (cutinasa de *Cryptococcus sp.* S-2, degradadora de PLA).



Fig. 7. Alineamientos de las secuencias de las enzimas degradadoras de poliésteres sintéticos. Secuencias de los genes completos depositadas en el GenBank (BAA07428 y BAC67242) con sus correspondientes secuencias del PDB (3GBS y 2CZQ).

Debido a que a las proteínas 3GBS y 2CZQ se les midió su actividad enzimática sobre poliésteres sintéticos experimentalmente (Liu *et al.*, 2009 y Masaki *et al.*, 2005 respectivamente), se decidió que para la determinación del péptido señal de las enzimas de A3.I.1 de interés se tomó en cuenta su similitud estructural con las enzimas degradadoras de poliésteres sintéticos, es decir, para las enzimas de A3.I.1 se eligió la predicción del péptido señal de la versión de SignalP que coincidió con la predicción del péptido señal de las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos a las que son similares. Las cutinasas 6962 y 7317 de A3.I.1 son similares a la cutinasa de *Aspergillus oryzae* (3GBS), la cutinasa 8471 de A3.I.1 es similar a la cutinasa de *Cryptococcus sp.* S-2 (2CZQ) y la acetilxilano esterasa 6816 de A3.I.1 es similar a la acetilxilano esterasa de *Talaromyces purpureogenus* (1BS9). Las relaciones filogenéticas entre estas enzimas se presentan en el árbol filogenético sin raíz de las enzimas de A3.I.1 candidatas a producir de manera recombinante y las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos

realizado con SeaView 4.0 (Gouy *et al.*, 2010) (Figura 8) y en la Tabla 10 se muestran sus valores de score, % identidad y % cobertura.

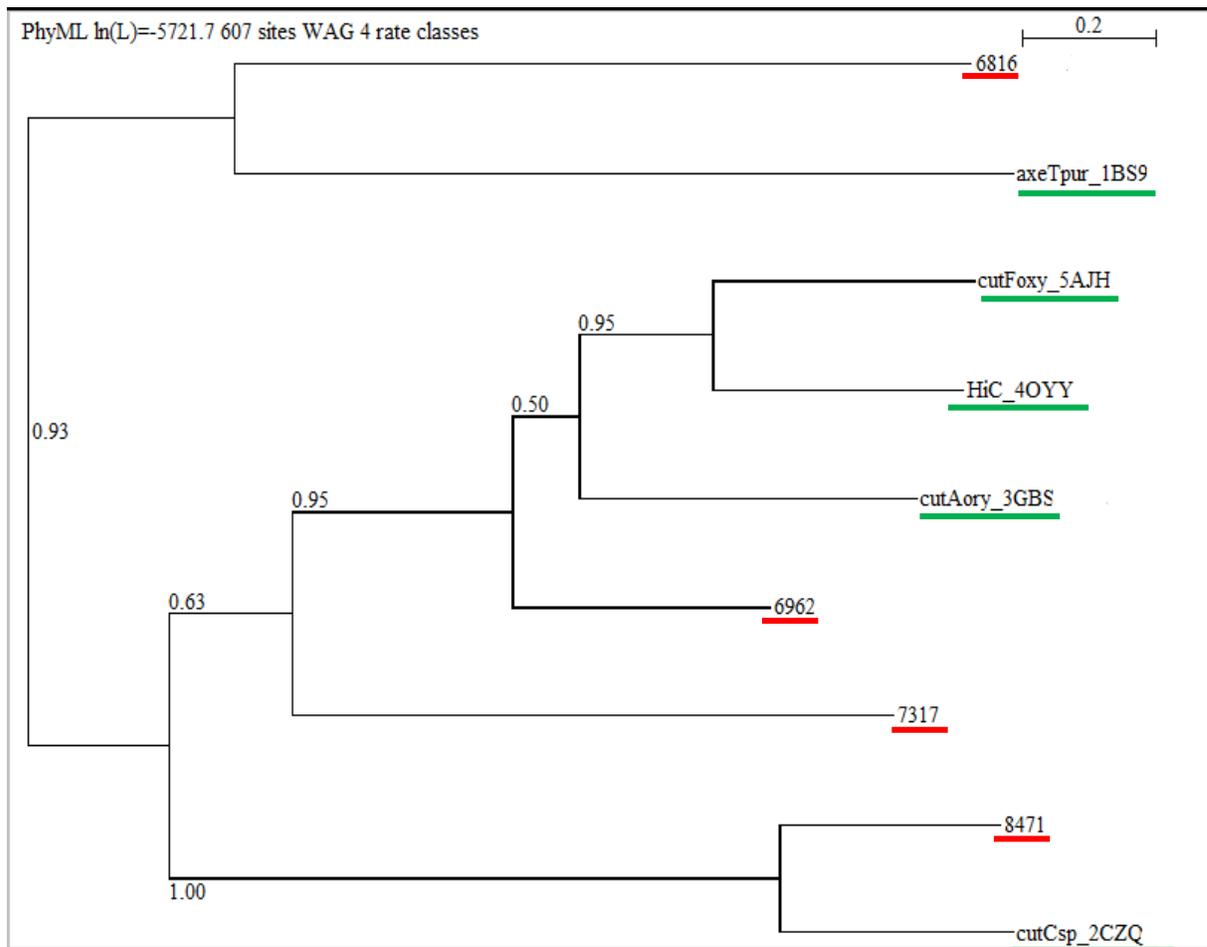


Fig. 8. Árbol filogenético sin raíz de cutinasas de A3.I.1 sobreexpresadas en medio con Impranil® y enzimas degradadoras de poliésteres sintéticos (secuencias del GB). Subrayado en rojo: cutinasas de A3.I.1 expresadas en Impranil® y subrayado en verde: cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos (cutFoxy: cutinasa de *Fusarium oxysporum*; HiC: cutinasa de *Humicola insolens*; cutAory: cutinasa de *Aspergillus oryzae*; cutCsp: cutinasa de *Cryptococcus* sp. S-2) y una acetilxilano esterasa (axeTpur: *Talaromyces purpureogenus*).

Tabla 10. Valores de calificación (*score*), identidad (%) y cobertura (%) para cutinasas de A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® y enzimas degradadoras de polímeros sintéticos y la acetilxilano esterasa (secuencias del GB) obtenidos con BlastP.

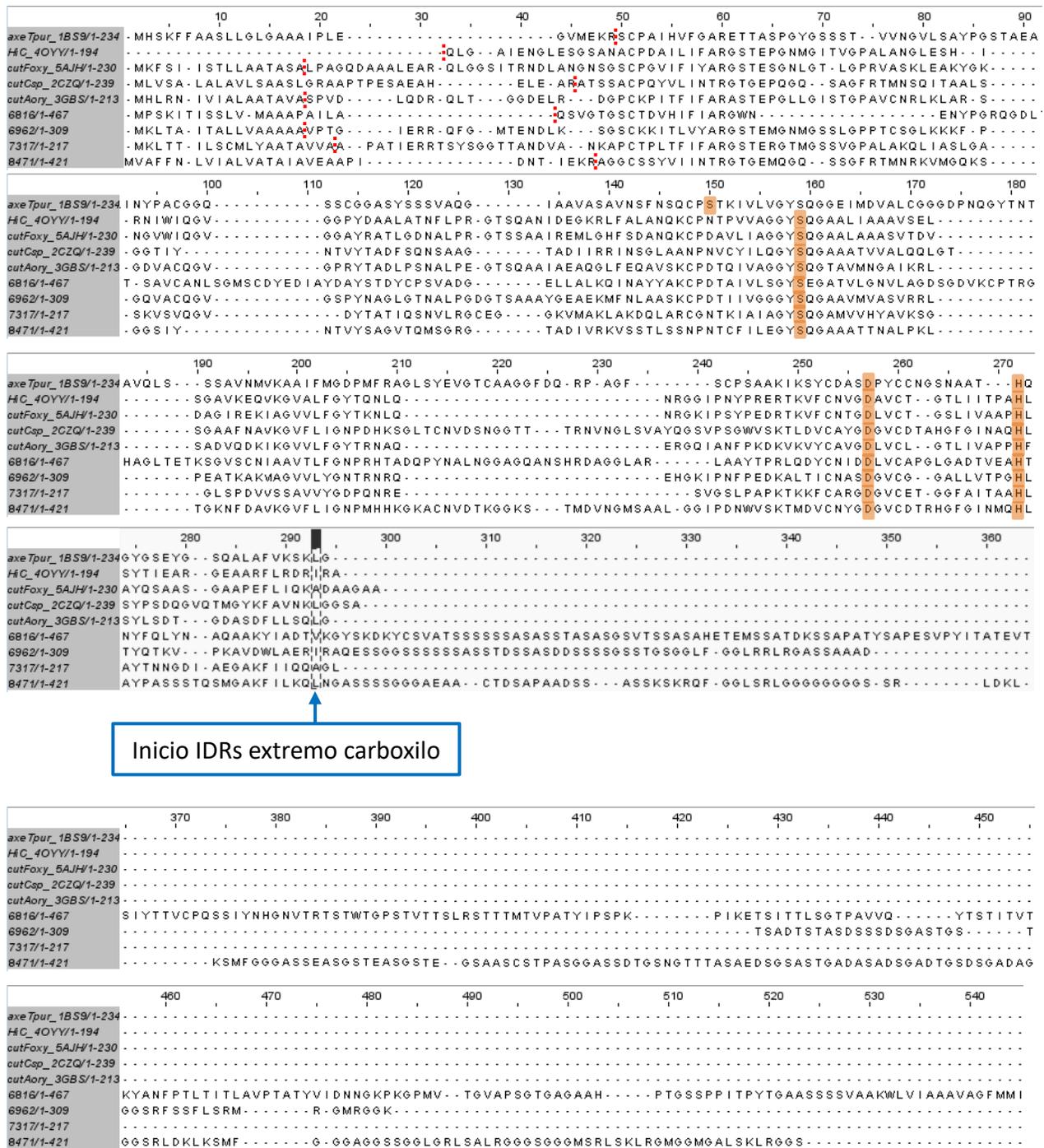
		Cutinasa cutAory_3GBS (P52956) <i>Aspergillus oryzae</i> Degrada PCL 213 aa	Cutinasa cutCsp_2CZQ (BAC67242) <i>Cryptococcus</i> sp. S-2 Degrada PLA 239 aa	Cutinasa cutFoxy_5AJH (EXK81749) <i>Fusarium oxysporum</i> Degrada PET 230 aa	Cutinasa HiC_4OYY (ABC06408) <i>Humicola insolens</i> Degrada PS-PU y PET 194 aa	Acetilxilano esterasa axeTpu_1BS9 (O59893) <i>Talaromyces purpureogenus</i> 234 aa
6962 309 aa	Score Id% Cov%	192 48.13% 69%	37 28.91% 32%	164 49.20% 58%	174 46.94% 62%	30.4 30.77% 40%
8471 421 aa	Score Id% Cov%	43.1 28.10% 32%	263 59.24% 48%	28.5 24.32% 26%	47.8 28.36% 44%	33.9 25.62% 32%
6816 467 aa	Score Id% Cov%	39.3 29.09% 23%	37.4 31.07% 21%	36.6 21.88% 38%	47 25.22% 45%	58.5 28.29% 49%
7317 217 aa	Score Id% Cov%	101 35.53% 99%	45.8 27.75% 81%	93.2 37.2% 88%	92.4 39.11% 76%	30.8 28.45% 37%

*Los valores de *Score* > 50 se resaltan en **bold**.

Estos resultados permitieron identificar las secuencias de los péptidos señal que no se tomarán en cuenta al momento de clonar los genes en el vector de expresión ya que éste cuenta con una señal de secreción de levadura para dirigir la expresión de las proteínas recombinantes al medio extracelular. Para las cutinasas 6962 y 7317 de A3.I.1, similares a la enzima 3GBS, se utilizó la predicción de péptido señal de acuerdo con SignalP – 5.0, para la cutinasa 8471 de A3.I.1, similar a la enzima 2CZQ, se utilizó la predicción de péptido señal de acuerdo a SignalP – 6.0 y para la acetilxilano esterasa 6816 de A3.I.1 se predijo el mismo sitio de escisión del péptido señal tanto con SignalP – 5.0 como para SignalP – 6.0.

8.2.2. Identificación de regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs) en las proteínas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 seleccionadas para su producción recombinante

Al analizar las secuencias de aminoácidos de las proteínas de A3.I.1 seleccionadas para su producción recombinante y las secuencias de las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos, se observó que tres de las proteínas de A3.I.1 tienen regiones de mayor extensión en el extremo carboxilo terminal con muchos aminoácidos polares, lo que sugirió que podrían ser regiones intrínsecamente desordenadas (IDRs). Las IDRs son segmentos polipeptídicos que normalmente contienen una mayor proporción de aminoácidos polares o cargados y tienen un efecto en el mecanismo de plegado de las proteínas, además, se ha sugerido que los residuos de las IDRs pueden modular la afinidad de unión de la proteína con su ligando (Babu 2016; Chong & Mir. 2021; Malagrino *et al.*, 2022). También, las IDRs pueden facilitar la formación de condensados moleculares que modulen la velocidad de la reacción y/o mejoren la especificidad (Banani *et al.*, 2017). Con el objetivo de identificar las posibles IDRs en el carboxilo terminal se realizó un alineamiento de las enzimas de A3.I.1 expresadas en Impranil® y las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos a las cuales tienen homología (Figura 9), en el alineamiento se señalan con líneas punteadas los sitios de escisión de los péptidos señal y también se señala el inicio de las IDRs. En modelos 3D construidos con AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021) de las proteínas 6816, 6962 y 8471 de A3.I.1 se observó que las IDRs en el extremo carboxilo no se pliegan ni adquieren una conformación ordenada y su calificación de pLDDT para dichas regiones fueron menores a 50, mientras que el modelo 3D de la proteína 7317 no mostró ninguna región desordenada (Pérez Vargas, tesis de Maestría en C. Bioquímicas, en proceso; Rocha Pino, 2024, comunicación personal).



Inicio IDRs extremo carboxilo

Fig. 9. Alineamiento de las enzimas degradadoras de poliésteres sintéticos y las enzimas de A3.I.1 sobreexpresadas en Impranil® (secuencias del GB). Líneas punteadas rojas: sitio de escisión del péptido señal. Recuadros naranjas: triada catalítica.

Con la asesoría del Dr. César Cuevas (Depto. Bioquímica, Fac. Química, UNAM) se realizó la predicción de IDRs de las proteínas 6816, 6962, 7317 y 8471 de A3.I.1 (Tabla 11) y las cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos (Tabla 12) con el programa Metapredict (Emenecker *et al.* 2021; <https://metapredict.net/>). Además, con el programa PSPREDICT (Chu *et al.* 2022; <http://www.pkumdl.cn:8000/PSPredictor/>) se predijo la probabilidad de las enzimas con IDRs de formar fases líquido-líquido o condensados moleculares (PSP Score > 0.5).

Tabla 11. Identificación de secuencias IDR en las enzimas de A3.I.1 que se producirán de manera recombinante.

Proteínas de <i>C. tenuissimum</i> cepa A3.I.1 expresadas en Impranil®				
ID	IDR (metapredict)	longitud IDR (aa)	PSP Score (solo IDR)	PSP Score (proteína completa)
6816	Si, en el extremo carboxilo	226 (48.4%)	0.6117	0.5564
6962	Si, en el extremo carboxilo	92 (30%)	0.998	0.9817
7317	Si, en el extremo amino	41 (18.9%)	0.007	0.2156
8471	Si, en el extremo carboxilo	197 (46.8%)	0.9959	0.994

*Con valores de PSP Score > 0.5, tanto de las IDRs como de las proteínas completas, se considera probable la formación de condensados moleculares. Celdas en azul fuerte presentan ambos valores > 0.5.

Con base en un análisis de las cutinasas reportadas en diversas publicaciones, se observó que la mayoría de las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos no tienen colas intrínsecamente desordenadas (Tabla 12). Incluso las cutinasas de referencia para este trabajo (cutAory/3GBS y cutCsp/2CZQ) no presentan IDRs. Interesantemente, en ninguno de los artículos donde reportan sus características o sus actividades hacen mención o estudian las IDRs.

Tabla 12. Identificación de colas IDR en las cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos.

Enzima (Accession)	Microorganismo	IDR (metapredict)	longitud IDR (aa)	PSP Score (IDR)	PSP Score (completa)	Sustratos	Referencia
Svir_Cut190 (BAO42836)	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	Si	53	0.1899	0.0729	PET, PBSA, PCL	Kawai <i>et al.</i> , 2014
AnigCUT2 (AKE48475)	<i>Aspergillus niger</i>	Si	59	0.9842	0.9131	PCL	Al-Tammar <i>et al.</i> , 2016
Talb_Est119 (6AID)	<i>T. alba</i> AHK119	Si	42	0.943	0.1212	PLA	Kitadokoro <i>et al.</i> , 2019
Cfla_CLE (BAT32793)	<i>Cryptococcus flavus</i> GB-1	Si (en el extremo N)	30	0.0687	0.4702	PBSA	Watanabe <i>et al.</i> , 2015
axeTpur (O59893)	<i>Talaromyces purpureogenus</i>	No	-	NA	0.7082	ésteres de acetilxilano	Ghosh <i>et al.</i> , 1999
cutCsp (BAC67242)	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	No	-	NA	0.4876	PLA, PBS	Masaki <i>et al.</i> , 2005
cutAory (P52956)	<i>Aspergillus oryzae</i>	No	-	NA	NA	PCL	Liu <i>et al.</i> , 2009.
Tcel_Cut2 (ADV92527), Tfus42_Cut1 (ADV92528)	<i>Thermobifida cellulositytica</i> <i>Thermobifida fusca</i>	No	-	NA	0.0481, 0.028	PET	Herrero <i>et al.</i> , 2011
Talb_Cut1 (ADV92525)	<i>Thermobifida alba</i> DSM43185	No	-	NA	0.0859	PET	Ribitsch <i>et al.</i> , 2012
Abra_Cut (AAA03470), Afum_Cut (XP_755273)	<i>Alternaria brassicicola</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	No	-	NA	0.0366, 0.1155	PCL	Baker <i>et al.</i> , 2012.
cutFoxy (EXK81749)	<i>Fusarium oxysporum</i>	No	-	NA	0.1253	PET, BHET	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
Fsol_Cut (AAA33334)	<i>Fusarium solani</i>	No	-	NA	0.0475	PLA, PBSA, PCL	Hu <i>et al.</i> , 2016.
Tcel_Cut1 (ADV92526)	<i>T. cellulositytica</i>	No	-	NA	0.028	PET, PBS, PHBV	Gamerith <i>et al.</i> , 2017
Fsol_synth (ASK40094), Afum_synth (ASK40095)	<i>F. solani</i> <i>A. fumigatus</i>	No	-	NA	0.0205, 0.1155	PCL	Ping <i>et al.</i> , 2017
LC_Cutinase (CUM11140), Tfus_Cut2 (CDN67547)	Metagenoma <i>T. fusca</i> KW3	No	-	NA	0.5074, 0.5074	PS-PU Impranil	Schmidt <i>et al.</i> , 2017
Mthe_CUT (XP_003663956.1)	<i>Myceliophthora thermophila</i> 42464	No	-	NA	0.0086	PCL	Yang <i>et al.</i> , 2018
Mror_CUT1 (ESK97883)	<i>Moniliophthora roreri</i>	No	-	NA	0.0259	PES, PCL, PET	Vázquez-Alcántara <i>et al.</i> , 2021
HiC (ABC06408)	<i>H. insolens</i>	No	-	NA	NA	PS-PU	Di Bisceglie <i>et al.</i> , 2022

*Con valores de PSP Score > 0.5, tanto de las IDRs como de las proteínas completas, se considera probable la formación de condensados moleculares. Celdas en azul fuerte presentan ambos valores > 0.5.

De las cuatro enzimas de A3.I.1 cuyos genes se expresan en medio con Impranil[®], tres tienen IDR en el carboxilo terminal (8471, 6962 y 6816) y una en el amino terminal y de muy poca longitud (7317). No se ha propuesto ninguna función para las colas IDR en las cutinasas, pero para otras proteínas se ha sugerido que podría fomentar la formación de condensados moleculares que podrían modular la velocidad de la reacción (Babu 2016, Clerc *et al.* 2021, Malagrino *et al.* 2022). Las enzimas de A3.I.1 expresadas en Impranil[®] con secuencias IDR se clonaron incluyendo estas regiones intrínsecamente desordenadas, para llevar a cabo su expresión heteróloga manteniendo la estructura nativa de las proteínas. Resulta interesante que las cutinasas de A3.I.1 que se sobreexpresan en Impranil[®] y tienen los segmentos IDR en el carboxilo terminal presentan valores de PSP score tanto de la IDR como de la proteína completa mayor a 0.5, lo que sugiere fuertemente que dichas proteínas podrían formar agregados en fase líquido-líquido que fomentarían una mayor actividad de esas cutinasas. Dado que de las tres cutinasas que se han estudiado previamente y que presentan extremos IDR (Kawai *et al.*, 2014, Al-Tammar *et al.*, 2016, Kitadokoro *et al.*, 2019) solo la de *Aspergillus niger* (AnigCUT2), tiene los dos valores del PSP score mayor a 0.5, podría ser que las proteínas de A3.I.1 tuvieran una posible ventaja en la degradación de polímeros. Por otro lado, la AXE de *Talaromyces purpureogenus* (axeTpur) no presenta IDR mientras que la de A3.I.1 tiene IDR en el carboxilo terminal y ambos de sus PSP score fueron mayor a 0.5, sugiriendo la posible formación de condensados moleculares.

8.2.3. Diseño de las secuencias de las enzimas de A3.I.1 para su clonación en el vector pPICZ α A

El vector de expresión que se utilizó es el vector pPICZ α A (Invitrogen, 2010), el cual contiene el promotor AOX1 para la expresión del gen de interés inducida por metanol, la señal de secreción del factor α para dirigir la expresión secretada de proteína recombinante, el gen de resistencia a Zeocina[™] para la selección tanto en *E. coli* como en *P. pastoris* y la etiqueta de c-myc y de histidinas para facilitar la purificación de la proteína recombinante. En la Figura 10 se muestra el sitio de clonación múltiple de pPICZ α A y los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI* que se utilizarán para clonar los genes de interés.

5' end of AOX1 mRNA 5' AOX1 priming site

811 AACCTTTTTT TTTATCATCA TTATTAGCTT ACTTTCATAA TTGGGACTGG TTCCAATTGA

871 CAAGCTTTTGG ATTTTAAACGA CTTTAAACGA CAACTTGAGA AGATCAAAAA ACAACTAATT

931 ATTCGAAACG **ATG** AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA
Met Arg Phe Pro Ser Ile Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala

983 TCC TCC GCA TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA
Ser Ser Ala Leu Ala Ala Pro Val Asn Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala

α -factor signal sequence

1034 CAA ATT CCG GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
Gln Ile Pro Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe

1085 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT
Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly Leu Leu Phe

*Xho I**

1136 ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC
Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Ala Lys Glu Glu Gly Val Ser Leu

Kex2 signal cleavage *EcoR I* *Pml I* *Sfi I* *BsmB I Asp718 I*

1187 GAG AAA AGA GAG GCT GAA GCT GAATTCAC GTGGCCAG CCGGCCGTC TCGGATCGGT
Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala

Ste13 signal cleavage

Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I *c-myc epitope*

1244 ACCTCGAGCC GCGGCGGCC GCCAGCTTC TA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu

polyhistidine tag

1299 GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT TGA GTTTGTAGCC
Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His ***

1351 TTAGACATGA CTGTTCTCA GTTCAAGTTG GGCACCTACG AGAAGACCGG TCTTGCTAGA

3' AOX1 priming site

1411 TTCTAATCAA GAGGATGTCA GAATGCCATT TGCCTGAGAG ATGCAGGCTT CATTTTGTAT

3' polyadenylation site

1471 ACTTTTTTAT TTGTAACCTA TATAGTATAG GATTTTTTTT GTCATTTTGT TTCTTCTCGT

Fig. 10. Sitio de clonación múltiple de pPICZ α A. Los sitios de restricción usados para clonar los genes de interés están señalados en un recuadro rojo e indican su sitio de escisión. Tomado de Invitrogen, 2010.

Se diseñaron y se enviaron a sintetizar las secuencias de los genes de las proteínas de interés de A3.1.1 para su clonación en pPICZ α A en fase con el factor α , los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoR*I y *Xba*I, el sitio de reconocimiento a enterocinasa (para eliminar las etiquetas de afinidad en caso de ser requerido), y las secuencias de c-myc y his-tag (Anexo 1; Figuras A1.1-A1.4).

8.3. Propagación de los plásmidos recombinantes de las enzimas de A3.I.1 en *E. coli* DH5 α y TOP10

8.3.1. Transformación de *E. coli* DH5 α y TOP10 con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-6816 y pPICZ α A-7317

Se inició con la propagación del plásmido pPICZ α A-6816 en *E. coli* DH5 α y del plásmido pPICZ α A-7317 en *E. coli* DH5 α y TOP10. Se llevó a cabo la transformación como se menciona en el apartado 7.2.3. A las 24 h de incubación se observaron colonias blancas pequeñas en las placas de las transformantes. En el control (células y buffer TE) no se observaron colonias a las 24 h de incubación.

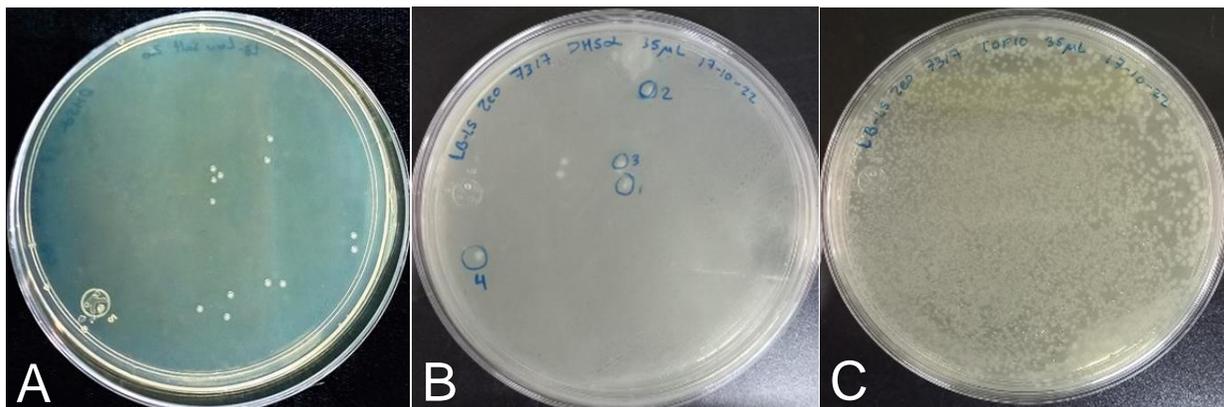


Fig. 11. Colonias transformantes en medio LB bajo en sales con Zeocina™ a una concentración final de 25 μ g/mL. A) *E. coli* DH5 α pPICZ α A-6816; B) *E. coli* DH5 α pPICZ α A-7317; C) *E. coli* TOP10 pPICZ α A-7317.

Se aislaron colonias individuales transformantes con el plásmido pPICZ α A-6816, se realizaron cultivos de toda la noche (12 horas) en medio LB bajo en sales con Zeocina™ [25 μ g/mL] y se obtuvo el DNA plasmídico (miniprep).

Con el objetivo de confirmar la presencia del gen de la enzima 6816 de A3.I.1 se realizó el ensayo de doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* (NEB) y *XbaI* (ThermoFisher). Se realizó la digestión de 0.6 μ g de DNA plasmídico obtenido de los cultivos de las colonias transformantes 13 y 30 con *EcoRI* y se incubó a 37°C por 90 min. Se purificó el DNA digerido y se realizó la segunda digestión con *XbaI* incubando a 37°C por 45 min. Se inactivó la reacción de digestión por calor (65°C) y se llevó a cabo una movilidad electroforética en gel de agarosa 1% para visualizar los tamaños del plásmido e inserto (Figura 12).

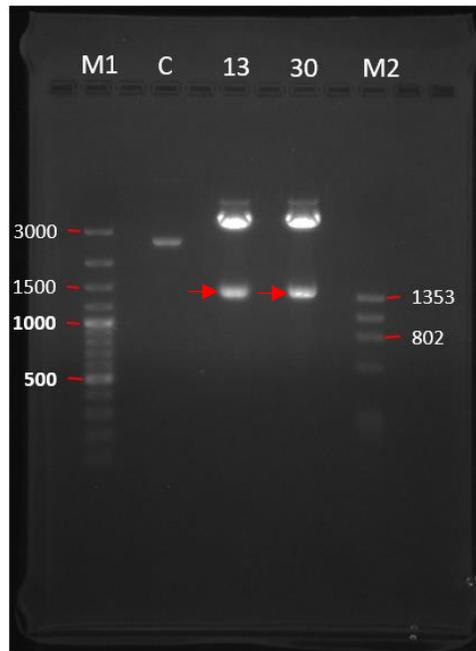


Fig. 12. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la doble digestión del plásmido pPICZ α A-6816. M1: GeneRuler™ 100-3000 pb; M2: marcador Φ X174RF DNA/Hae III 72-1353 pb; C: plásmido sin digerir; 13: colonia #13 de 6816; 30: colonia #30 de 6816. La banda referente al inserto (1370 pb) se señala con una flecha roja.

El tamaño esperado del inserto (gen 6816) era de 1370 pb y el del plásmido vacío de 3593 pb, por lo que una vez confirmada la presencia del gen de la proteína 6816 de A3.I.1 se procedió a obtener una mayor cantidad de plásmido mediante midiprep (Tabla 13) para la transformación de *P. pastoris* X-33.

Tabla 13. Rendimientos de plásmido pPICZ α A-6816 obtenido (midiprep)

Colonia transformante (cepa receptora de <i>E. coli</i>)	DNA (μ g)	Pureza 260/230	Pureza 260/280
13 (DH5 α)	173.8	2.02	1.87
13 (DH5 α)	41.2	2.07	1.88

Los rendimientos obtenidos son bajos con respecto a lo indicado en el manual del kit de midiprep (200–400 μ g, ZymoPURE™II Plasmid Midiprep Kit). Sin embargo, se obtuvo la cantidad suficiente de plásmido (5-10 μ g) pPICZ α A-6816 para la transformación de *P. pastoris* X-33.

Por otro lado, se aislaron dos colonias transformantes con el plásmido pPICZ α A-7317 y se obtuvo el DNA plasmídico (miniprep). Los rendimientos de DNA plasmídico

obtenidos tanto de células transformantes DH5 α y TOP10 fueron similares. Con el objetivo de confirmar la presencia del gen de la cutinasa 7317 de A3.I.1 se realizó el ensayo de doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*-HF (NEB) y *XbaI* (NEB). Se realizó la digestión del DNA plasmídico obtenido de los cultivos de las posibles colonias transformantes 1 y 2 del gen de la cutinasa 7317 utilizando 1.8 μ g de DNA y se corrió una electroforesis en gel de agarosa 1% para visualizar los tamaños del plásmido e inserto (Figura 13).

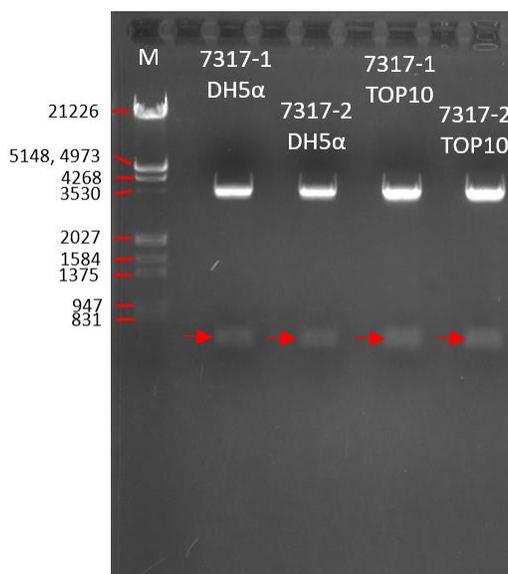


Fig. 13. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la doble digestión del plásmido pPICZ α A-7317. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564-21226 pb. La banda referente al inserto (623 pb) se señala con una flecha roja.

Se confirmó el tamaño esperado del inserto (gen 7317) en 623 pb y el tamaño esperado del plásmido “vacío” en 3593 pb, por lo que una vez confirmada la presencia del gen de la cutinasa 7317 de A3.I.1 se procedió a obtener una mayor cantidad de plásmido (Tabla 14) para la transformación de *P. pastoris* X-33.

Tabla 14. Rendimientos de plásmido pPICZ α A-7317 obtenido (midiprep)

Colonia transformante	DNA (μ g)	Pureza 260/230	Pureza 260/280
1 (DH5 α)	98.8	2.1	1.85
2 (TOP10)	11.8	1.9	2.0

Con ambas cepas de *E. coli* se obtuvo la cantidad suficiente de plásmido pPICZ α A-6816 para la transformación de *P. pastoris* X-33.

8.3.2. Transformación de *E. coli* TOP10 con los plásmidos recombinantes pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471

Inicialmente, se tuvieron algunos problemas para propagar ambos plásmidos en *E. coli* DH5α. Sin embargo, se pudieron resolver satisfactoriamente al realizar la propagación en *E. coli* TOP10. Se llevó a cabo la transformación de células competentes de *E. coli* TOP10 con los plásmidos pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471 como se menciona en el apartado 7.2.3. A las 24 h de incubación se observaron colonias transformantes (Figura 14).

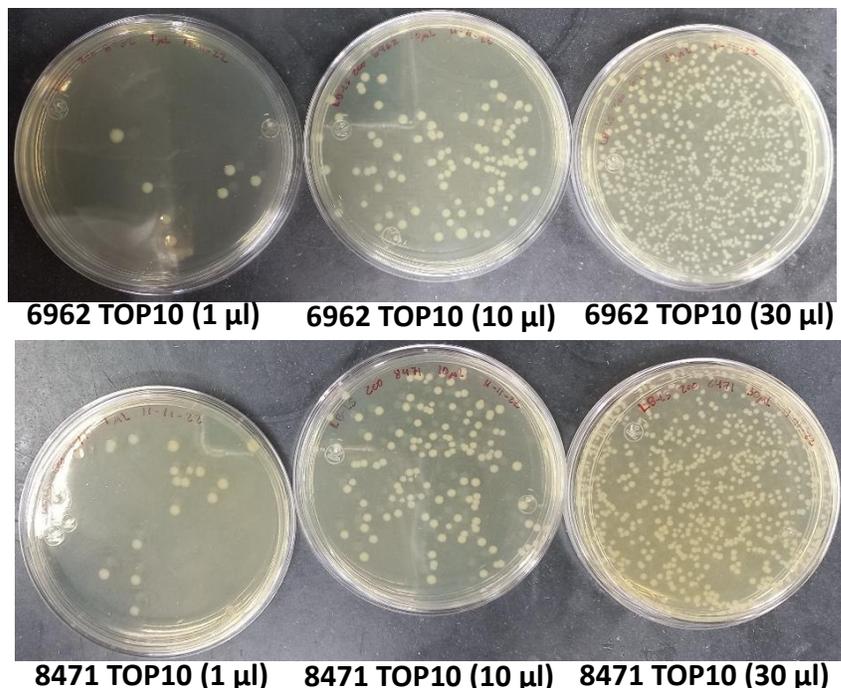


Fig. 14. Colonias *E. coli* TOP10 transformantes pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471 en medio LB bajo en sales con Zeocina™ a una concentración final de 25 µg/mL

Se aislaron dos colonias de *E. coli*, posibles transformantes y se inocularon en 5 mL de medio LB bajo en sales con Zeocina™ y se cultivaron a 37°C en oscuridad durante la noche para obtener DNA plasmídico (miniprep).

Con el objetivo de confirmar la presencia de los genes de las cutinasas 6962 y 8471 de A3.I.1 se realizó el ensayo de doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*-HF (NEB) y *XbaI* (NEB). Se realizó la digestión del DNA plasmídico obtenido de los cultivos de las posibles colonias transformantes 1 y 2 de ambos genes utilizando 0.6 µg de DNA y se corrió una electroforesis en gel de agarosa 0.8% para visualizar los tamaños del plásmido e inserto (Figura 15).

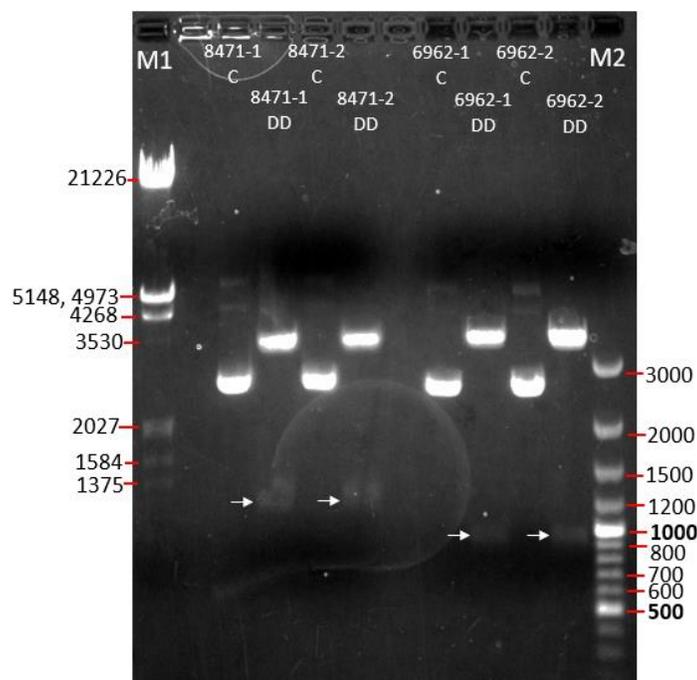


Fig. 15. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la doble digestión de los plásmidos pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471. M1: Lambda DNA/EcoRI+HindIII 564-21226 pb; 8471-1 C: plásmido sin digerir de la transformante 1 pPICZαA-8471; 8471-1 DD: doble digestión de plásmido de la transformante 1 pPICZαA-8471; 8471-2 C: plásmido sin digerir de la transformante 2 pPICZαA-8471; 8471-2 DD: doble digestión de plásmido de la transformante 2 pPICZαA-8471; 6962-1 C: plásmido sin digerir de la transformante 1 pPICZαA-6962; 6962-1 DD: doble digestión de plásmido de la transformante 1 pPICZαA-6962; 6962-2 C: plásmido sin digerir de la transformante 2 pPICZαA-6962; 6962-2 DD: doble digestión de plásmido de la transformante 2 pPICZαA-6962; M2: marcador ΦX174RF DNA/Hae III 72-353 pb. Bandas referentes a los insertos son señaladas con flechas blancas (8471 de 1202 pb y 6962 de 908 pb).

Para ambos genes se hicieron midipreps para obtener la cantidad suficiente de plásmido recombinante para la transformación de *P. pastoris* X-33 (Tabla 15).

Tabla 15. Rendimientos de plásmido pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471 obtenido

Colonia transformante (cepa receptora de <i>E. coli</i>)	DNA (μg)	Pureza 260/230	Pureza 260/280
6962, 1 (TOP10)	41.6	2.14	1.85
6962, 2 (TOP10)	54.8	2.05	1.88
8471, 1 (TOP10)	39.4	2.15	1.90
8471, 2 (TOP10)	36.2	2.2	1.86

8.4. Transformación de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos recombinantes

8.4.1. Primera transformación de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZαA-6816 y pPICZαA-7317

Se digirieron 12 µg de DNA plasmídico de ambos genes utilizando las enzimas de restricción *PmeI* (NEB) para pPICZαA-6816 y *SacI* (NEB) para pPICZαA-7317 y se corroboró que la apertura se llevara a cabo correctamente tomando una alícuota de la reacción que se eluyó en un gel de agarosa 0.8%. Además de la digestión, se realizó una reacción de doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*-HF (NEB) y *XbaI* (NEB) para ambos plásmidos, se digirieron 0.6 µg del plásmido pPICZαA-6816 y 1.8 µg del plásmido pPICZαA-7317.

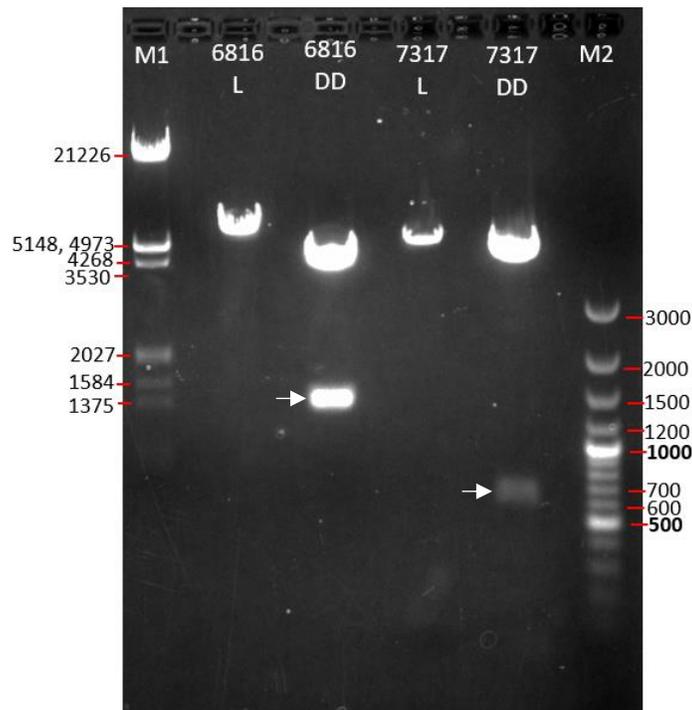


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la digestión de los plásmidos pPICZαA-6816 y pPICZαA-7317. M1: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564-21226 pb; 6816 L: plásmido pPICZαA-6816 digerido con *PmeI*; 6816 DD: doble digestión de plásmido pPICZαA-6816 con *EcoRI*-HF y *XbaI*; 7317 L: plásmido pPICZαA-7317 digerido con *SacI*; 7317 DD: doble digestión de plásmido pPICZαA-7317 con *EcoRI*-HF y *XbaI*; M2: marcador ΦX174RF DNA/*HaeIII* 72-1353 pb. Bandas referentes a los insertos son señaladas con flechas blancas (6816 de 1370 pb y 7317 de 623 pb).

En la Figura 16 se observan que las bandas de los plásmidos digeridos (abiertos) están ligeramente arriba de los tamaños esperados, 4963 pb para el plásmido pPICZ α A-6816 y 4216 pb para el plásmido pPICZ α A-7317. Sin embargo, los tamaños de los insertos de los genes de las cutinasas 6816 y 7317 coinciden con los tamaños esperados, en 1370 pb y 623 pb respectivamente, por lo que se procedió a realizar la transformación de *P. pastoris* X-33 electrocompetentes y se llevó a cabo la electroporación de 40 μ L de células como se menciona en el apartado 7.2.4. A los 7 días de incubación se observaron colonias transformantes de ambos genes (Figura 17).

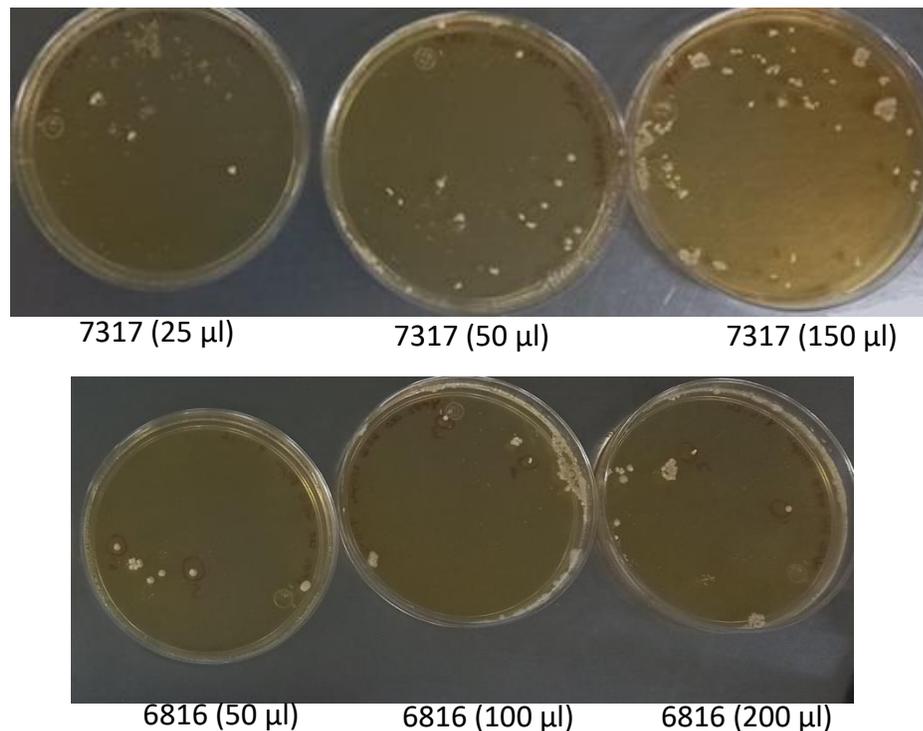


Fig. 17. Colonias transformantes de *P. pastoris* X-33 con pPICZ α A-7317 y pPICZ α A-6816 en medio YPDS con Zeocina™ a una concentración final de 100 μ g/mL

Se tomaron 6 colonias de cada gen y se resembraron en cajas con medio YPDS y Zeocina™ a una concentración final de 100 μ g/mL. Las placas se incubaron a 30°C por 3-5 días para seleccionar colonias aisladas y posteriormente iniciar la inducción de proteína recombinante.

8.4.2. Primera transformación de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471

Se digirieron 12 µg de DNA plasmídico de ambos genes utilizando la enzima de restricción *SacI* (NEB) y se corroboró que la digestión se llevara a cabo correctamente tomando una alícuota de la reacción que se eluyó en un gel de agarosa 0.8%. Como en el caso anterior, además de la reacción de linearización, se realizó la doble digestión con las enzimas de restricción *EcoRI*-HF (NEB) y *XbaI* (NEB) de 0.6 µg de cada plásmido.

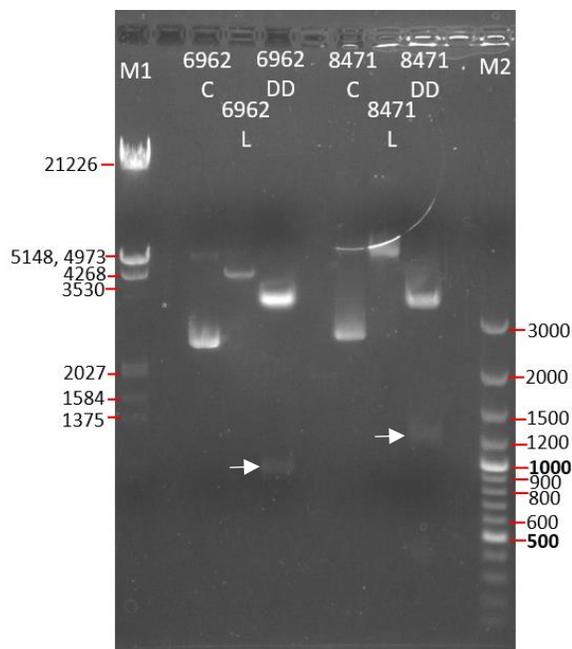


Fig. 18. Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de la digestión de los plásmidos pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471. M1: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564-21226 pb; C: plásmidos sin digerir; L: plásmidos digeridos con *SacI*; DD: doble digestión de plásmidos con *EcoRI*-HF y *XbaI*; M2: marcador ΦX174RF DNA/*HaeIII* 72-1353 pb. Las bandas referentes a los insertos se señalan con flechas blancas (6962 de 908 pb y 8471 de 1202 pb).

En la Figura 18 se observa que las bandas referentes a los plásmidos abiertos están aproximadamente en los tamaños esperados, ~4501 pb para el plásmido pPICZαA-6962 y ~4795 pb para el plásmido pPICZαA-8471. Así mismo, los tamaños de los insertos de los genes de las cutinasas 6962 y 8471 coinciden con los tamaños esperados en 908 pb y 1202 pb respectivamente, por lo que se procedió a realizar la transformación de *P. pastoris* con ambos plásmidos abiertos.

Se prepararon células de *P. pastoris* X-33 electrocompetentes y se llevó a cabo la electroporación de 40 µL de células como se menciona en el apartado 7.2.4. Después de 7 días de incubación se observaron colonias transformantes de ambos genes (Figura 19),

se tomaron 6 colonias de cada gen, se resembraron en cajas con medio YPDS y Zeocina™ a una concentración final de 100 µg/mL. Las placas se incubaron a 30°C por 3-5 días para posteriormente seleccionar colonias aisladas.

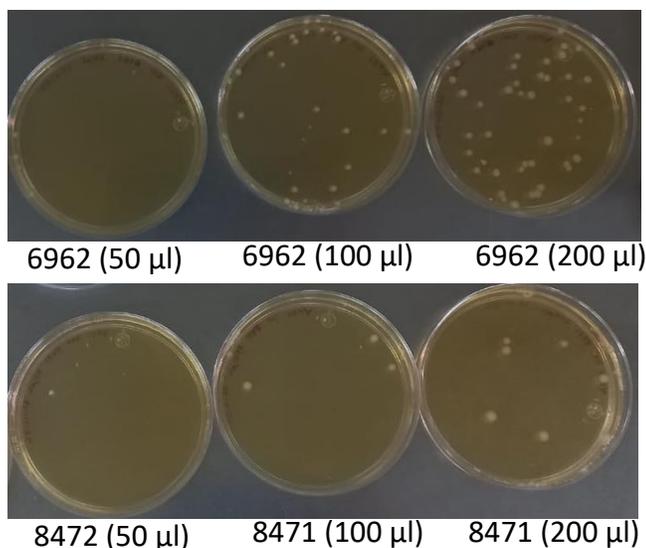


Fig. 19. Colonias transformantes de *P. pastoris* X-33 con pPICZαA-6962 y pPICZαA-7317 en medio YPDS con Zeocina™ a una concentración final de 100 µg/mL

8.4.3. Segunda transformación de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZαA-7317, pPICZαA-6816, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6962

Las inducciones con las colonias de *Pichia pastoris* resistentes a Zeocina™ de la primera transformación no resultaron exitosas ya que en los geles SDS-PAGE no se observaron las bandas de las proteínas de interés, como se explicará en la sección 8.7.1. Debido a esto se realizó una segunda transformación de nuevas células competentes de *P. pastoris* X-33 con los plásmidos recombinantes pPICZαA-7317, pPICZαA-6816, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6962. Se digirieron 10 µg de DNA plasmídico de los cuatro genes utilizando la enzima *SacI* (NEB) para los plásmidos de los genes 7317, 6962 y 8471 y la enzima *PmeI* (NEB) para el plásmido del gen 6816. Se corroboró que la digestión se llevara a cabo correctamente tomando una alícuota de la reacción que se corrió en un gel de agarosa (Figura 20).

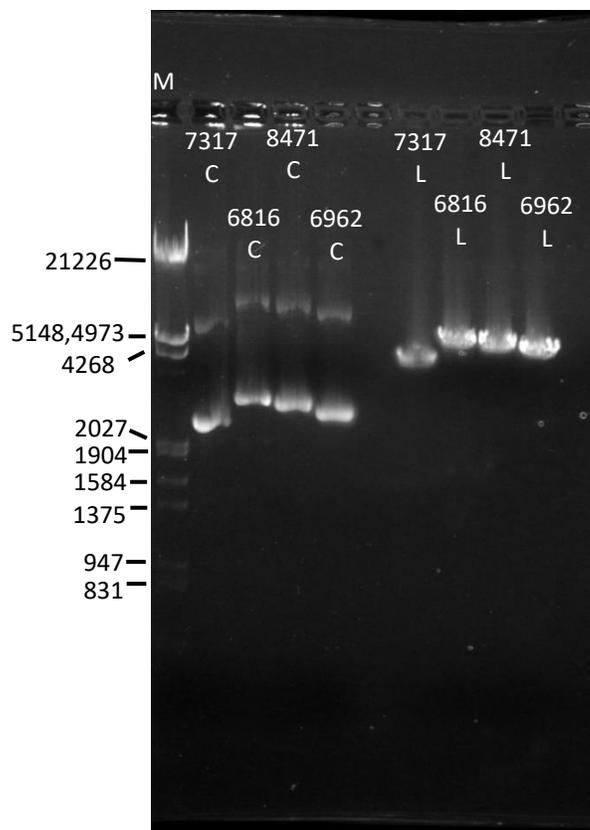


Fig. 20. Electroforesis en gel de agarosa 1% de la digestión de los plásmidos pPICZ α A-7317, pPICZ α A-6816, pPICZ α A-8471 y pPICZ α A-6962. M: Lambda DNA/EcoRI+HindIII 564 a 21226 pb; C: plásmidos sin digerir; L: plásmidos abiertos.

En la Figura 20 se observa que las bandas referentes a los plásmidos abiertos están aproximadamente en los tamaños esperados. Una vez abiertos los plásmidos recombinantes se llevó a cabo la electroporación de las células competentes de *P. pastoris* X-33. Se sembraron 100 y 200 μ L de las células transformadas en placas con medio YPDS con ZeocinaTM [100 μ g/mL] y estas se incubaron por 5 días a 30°C en oscuridad. Una vez que se formaron las colonias transformantes (Figura 21) se seleccionaron 10 colonias de cada gen y se purificaron sembrando en placas nuevas con medio YPDS con el doble de concentración de ZeocinaTM [200 μ g/mL] para hacer la selección de transformantes más astringente. Estas placas se incubaron a 30°C por 5 días en oscuridad.

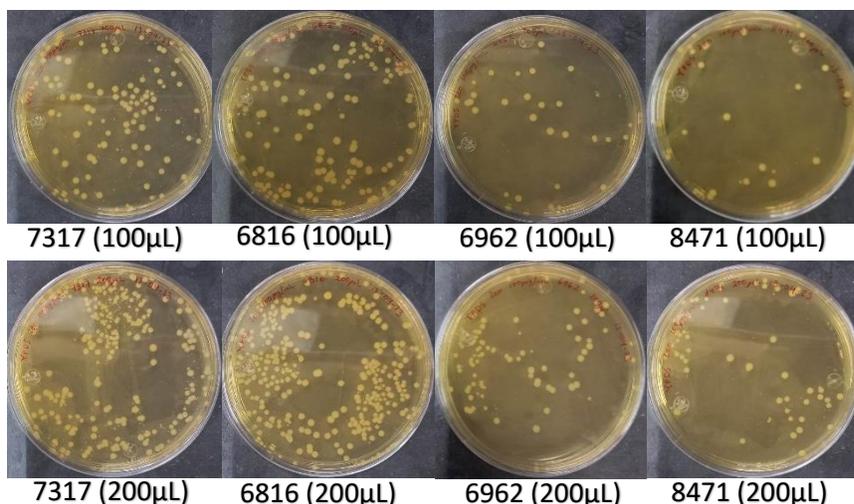


Fig. 21. Colonias transformantes de *P. pastoris* X-33 con pPICZαA-7317, pPICZαA-6816, pPICZαA-6962 y pPICZαA-8471 en medio YPDS con ZeocinaTM a una concentración final de 100 µg/mL.

8.5. Confirmación de fenotipo de colonias transformantes de *Pichia pastoris* X-33

Con el objetivo de confirmar que las transformantes de *Pichia pastoris* con los genes de interés pudieran utilizar MeOH como única fuente de carbono (Mut+) se realizó el análisis de confirmación de fenotipo. Se aislaron colonias Zeo^R de los cuatro genes de interés y se sembraron en placas MM (medio mínimo con MeOH 0.5%) y MD (medio mínimo con dextrosa 2%). Para los genes 7317 y 6816 se analizaron 4 colonias y para los genes 6962 y 8471 se analizaron 6 colonias transformantes. Como control positivo Mut+ se analizaron colonias de *Pichia pastoris* X-33 sin transformar (wt). Todas las cajas se incubaron a 30°C durante 2 días.

La transformación de cepas X-33 de *P. pastoris* con construcciones abiertas favorece la recombinación cruzada única en el locus AOX1. Se espera que la mayoría de las transformantes sean Mut+, sin embargo, con la presencia de las secuencias AOX1 en el plásmido, existe la posibilidad de que también se produzca una recombinación en la región 3'AOX1, alterando el gen AOX1 de tipo silvestre (wt) y creando transformantes MutS (lento crecimiento en MeOH). Como se observa en la Figura 22, las colonias de *Pichia pastoris* X-33 sin transformar y las colonias transformantes con los 4 genes de interés, crecieron normalmente en ambas placas, por lo que se confirmó que todas son cepas Mut+, ya que las cepas MutS se esperaba que crecieran normalmente en la placa MD y con poco o ningún crecimiento en la placa MM que contiene 0.5% de metanol.

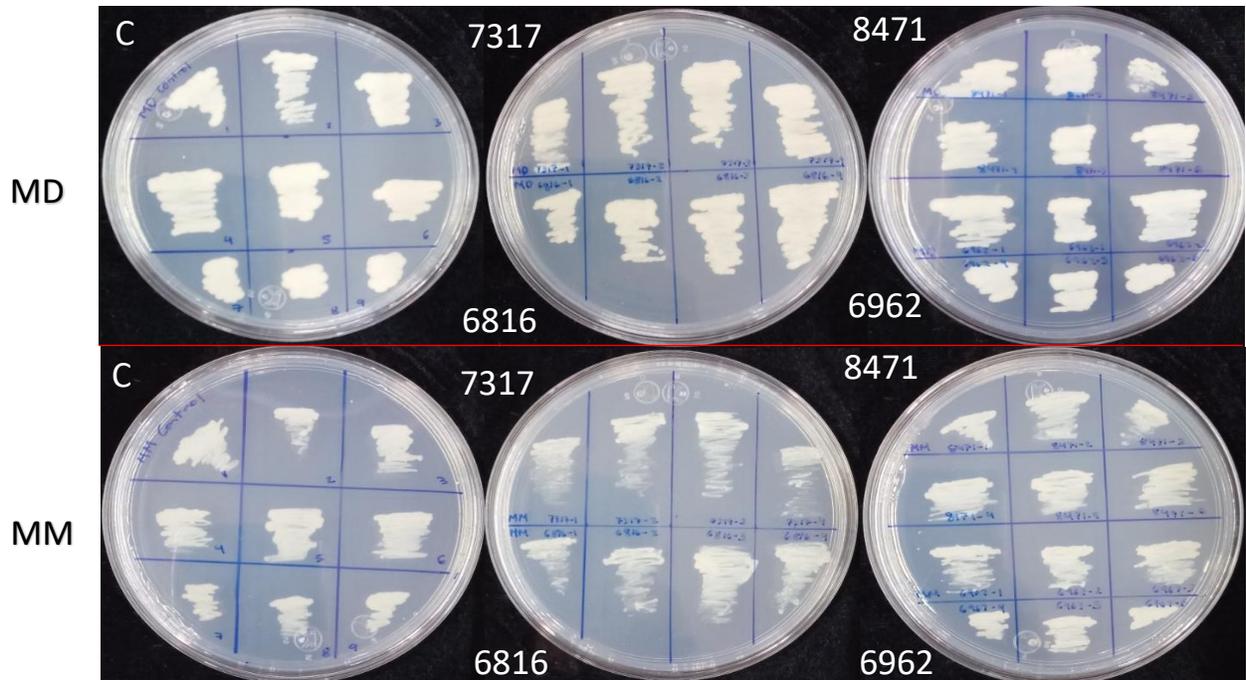


Fig. 22. Ensayo de confirmación de fenotipo de colonias transformantes de *Pichia pastoris* X-33 (dos días de crecimiento). C: control (*P. pastoris* X-33 sin transformar); MD: medio mínimo con dextrosa al 2%; MM: medio mínimo con MeOH al 0.5%. Ambos medios no contienen Zeocina™.

8.6. Análisis de transformantes de *P. pastoris* X-33 por PCR de colonia

8.6.1. PCR de los plásmidos recombinantes

Con el objetivo de determinar la T_m adecuada para los análisis de PCR de colonia, primeramente, se amplificaron los cuatro genes de interés mediante PCR de los plásmidos recombinantes. Para determinar la mejor temperatura de alineamiento de los *primers*, se analizaron cuatro diferentes temperaturas de alineamiento: 57°C, 63°C, 65°C y 67°C. Para amplificar los insertos de los cuatro genes de interés insertados en el vector pPICZαA, se emplearon los iniciadores 5'AOX1 (GAC TGG TTC CAA TTG ACA AGC) y 3'AOX1 (GCA AAT GGC ATT CTG ACA TCC). Se realizaron reacciones de 25 μL conformadas por los siguientes componentes:

Buffer Taq (10X) – 2.5 μL
 dNTPs (10mM) – 0.25 μL
 Forward primer 5'AOX1 (10 pmol/μL) – 1.25 μL
 Reverse primer 3'AOX1 (10 pmol/μL) – 1.25 μL
 MgCl₂ (25 mM) – 2 μL
 DNA plasmídico – 4 ng
 Taq pol (5 U/μL) – 0.25 μL
 H₂O – para llegar a 25 μL

Las muestras se corrieron bajo el programa descrito en la tabla 16.

Tabla 16. Programa para PCR de plásmidos recombinantes

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalización	95°C	30 s	30
Hibridación	57, 63, 65, 67 °C	30 s	
Extensión	72°C	2 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Como los *primers* utilizados son iniciadores que amplifican un segmento del vector además de los genes de interés, los tamaños esperados de cada producto de PCR incluyen el segmento pPICZαA 5' AOX1 de 588 pb + el inserto de cada gen.

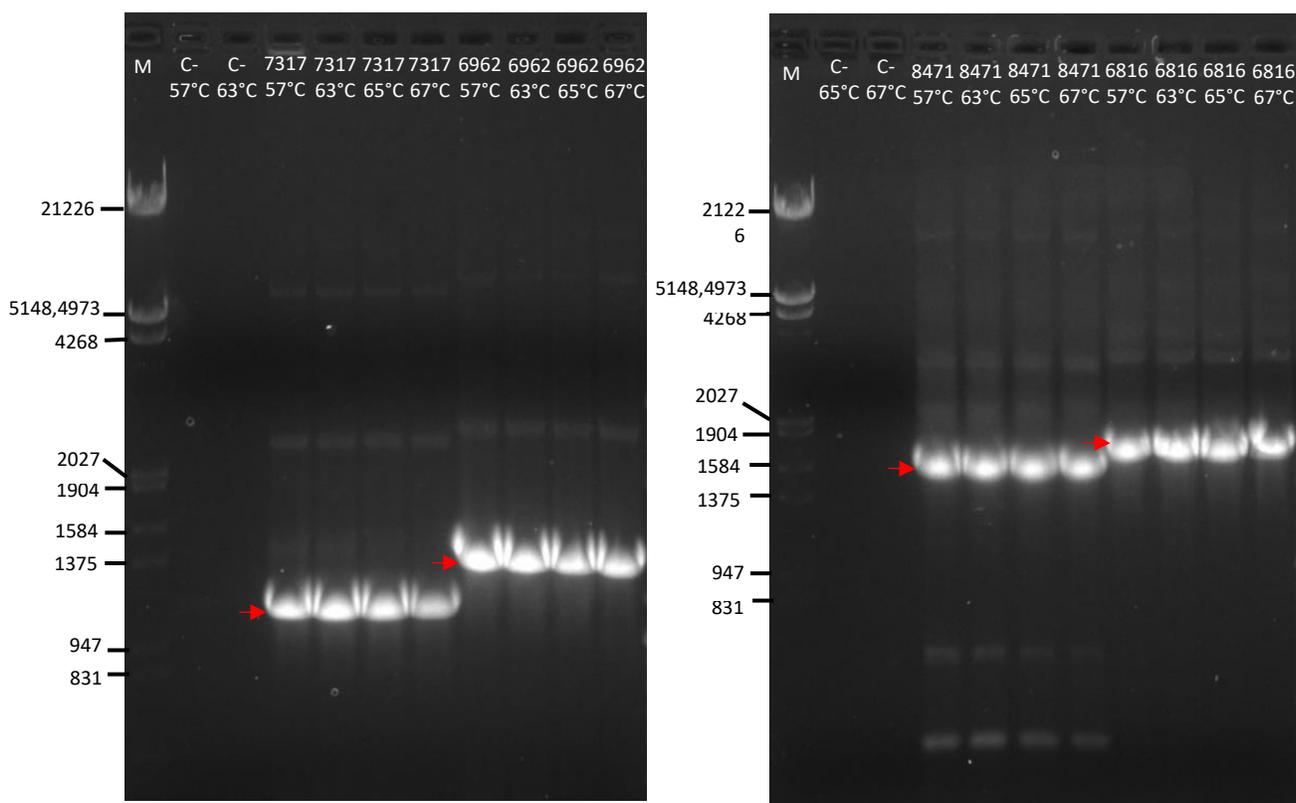


Fig. 23. Electroforesis en gels de agarosa 1% de los productos de PCR de los plásmidos pPICZαA-7317, pPICZαA-6816, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6962. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564 a 21226 pb; C-: control negativo (sin DNA). Las bandas referentes a los amplicones en los tamaños esperados se señalan con flechas rojas (7317 de 1211 pb (588 pb + 623 pb del inserto); 6962 de 1496 pb (588 pb + 908 pb del inserto); 8471 de 1790 pb (588 pb + 1202 pb del inserto) y 6816 de 1958 pb (588 pb + 1370 pb del inserto)).

En la Figura 23 se observa que no hubo diferencia en los productos obtenidos con las diferentes temperaturas de hibridación a las cuales se llevaron a cabo las reacciones de PCR. Las bandas más intensas se observan en los tamaños esperados en todos los casos: pPICZ α A-7317 en 1211 pb, pPICZ α A-6962 en 1496 pb, pPICZ α A-8471 en 1790 pb y pPICZ α A-6816 en 1958 pb. Considerando estos resultados se decidió realizar los análisis de PCR de colonia de *P. pastoris* transformada, con una T_m de 70°C para disminuir la amplificación de bandas inespecíficas.

8.6.2. PCR de colonias transformadas (segunda transformación) de *Pichia pastoris* X-33 resistentes a Zeocina™

Con el objetivo de confirmar que las colonias transformadas de *P. pastoris* resistentes a Zeocina™ tuvieran integrado correctamente en su genoma los plásmidos recombinantes, se llevó a cabo el análisis por PCR de colonia. Se utilizó el método de lisis “en seco”, el cual consiste en tomar con una punta de micropipeta estéril parte de la colonia a analizar y colocarla en un tubo de PCR estéril y, posteriormente, calentarlo en un microondas con una potencia de 800-1000 Watts, por 2 min, con el fin de lisar las células y liberar el DNA. Posteriormente se agregan al tubo 20 μ L del mix de reacción y se lleva a cabo la PCR en el termociclador, bajo las condiciones mencionadas en el apartado anterior. Este método fue recomendado por Jonathan Trapala Reyna, estudiante de Doctorado de la Dra. Carmina Montiel (Facultad de Química, UNAM) quien tiene experiencia trabajando con *P. pastoris*.

En primera instancia se realizó la PCR de colonia con seis colonias de *P. pastoris* X-33 sin transformar (wt), con el objetivo de perfeccionar la toma de inóculo adecuada, ya que si se toma demasiado material de colonia este puede interferir en la reacción y dar un falso negativo. Para cepas Mut+ de *P. pastoris*, como la X-33, se esperaba ver como producto amplificado una banda correspondiente al gen AOX1 de aproximadamente 2.2 kb (Invitrogen pPICZ α A, B, and C User Manual, 2010). En la Figura 24 se observan para las clonas 1, 5 y 6 bandas de un tamaño un poco mayor a 2 kb referentes al gen AOX1, aunque se esperaba que fueran de un tamaño de ~2.2 kb, se infiere que estas bandas son referentes al gen AOX1 ya que son las únicas bandas que se observan. Sin embargo, para las clonas 2, 3 y 4 no se observa bandas del gen AOX1 probablemente debido a un error en la cantidad de inóculo muestreado.

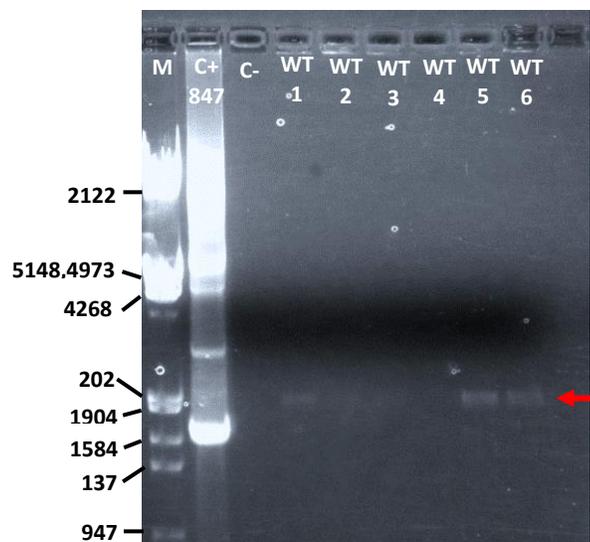


Fig. 24. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos de PCR de colonia de colonias *P. pastoris* X-33 wt sin transformar. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564-21226 pb; C+: control positivo de reacción (plásmido pPICZαA-8471); C-: control negativo (sin DNA); números 1-6: número de colonia analizada. La flecha roja indica el amplicón esperado (aprox. 2 kb).

Posteriormente, se llevó a cabo el mismo análisis con 10 colonias transformadas de *P. pastoris* resistentes a Zeocina™ de cada gen. Como controles positivos se utilizaron los plásmidos recombinantes como DNA molde. Como controles negativos se utilizaron una reacción sin DNA y una con material de colonia de *P. pastoris* wt. Se llevó a cabo la reacción bajo las mismas condiciones descritas en el apartado 8.6.1.

Para las colonias transformantes de *P. pastoris* que tuvieran el plásmido integrado en su genoma se esperaban dos bandas como producto de la amplificación. Una banda correspondiente al gen AOX1 de ~2.2 kb y una banda correspondiente al inserto + los 588 pb del segmento 5'AOX1. En la Figura 25 se observa que, para las colonias transformantes con el plásmido pPICZαA-7317, no se ven bandas correspondientes al gen AOX1. Sin embargo, para las clonas 1, 5, 9 y 10 se ven las bandas de 1211 pb correspondientes al inserto (623 pb) + 588 pb, por lo que se consideró que tienen integrado en su genoma el gen de la proteína de interés. En cuanto a las colonias transformantes con el plásmido pPICZαA-6816, sí se ven algunas bandas correspondientes al gen AOX1 y las clonas 2, 4, 6 y 7 presentan bandas de 1958 pb correspondientes al inserto (1370 pb) + el segmento de 588 pb.

Para las colonias transformantes con el plásmido pPICZαA-8471, únicamente la clona 2 tiene integrado en su genoma el gen de interés ya que se ve una banda de 1790 pb correspondientes al inserto (1202 pb) + 588 pb (Figura 26). En cuanto a las colonias transformantes con el plásmido pPICZαA-6962 las clonas 3, 5, 7, 9 y 10 muestran las bandas de 1496 pb correspondientes al inserto (908 pb) + 588 pb.

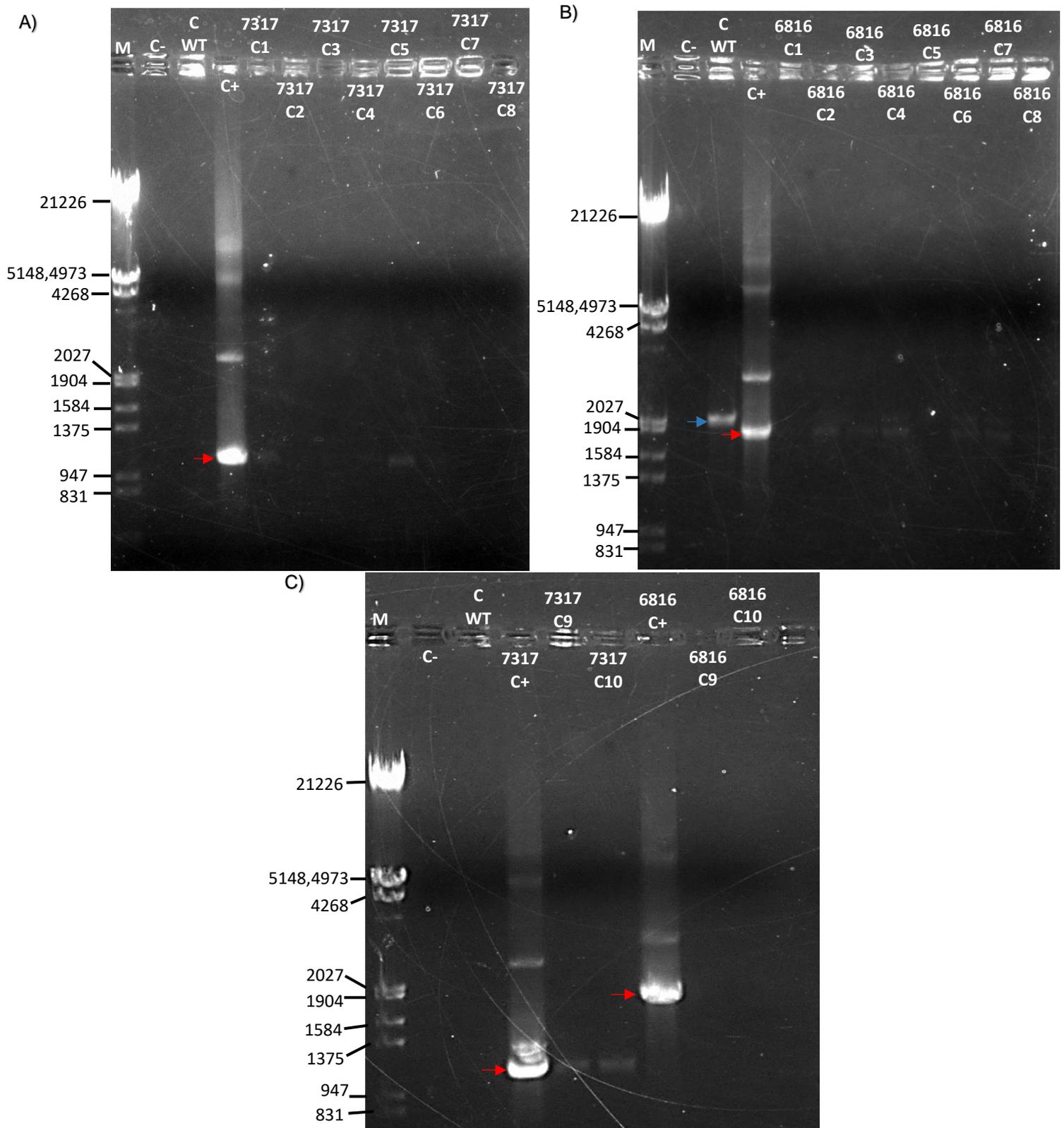


Fig. 25. Electroforesis en geles de agarosa 1% de los productos de PCR de colonia de colonias *P. pastoris* X-33 transformadas con pPICZ α A-7317 y pPICZ α A-6816. M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III 564 a 21226 pb; C-: sin DNA; C WT: muestra con colonia *P. pastoris* sin transformar; C+: plásmidos clonados con genes de interés; C1 –C10: número de clona Zeo^R. Flecha roja: pPICZ α A 5'AOX1 (588 pb) + inserto (7317 de 1211 pb y 6816 de 1958 pb); Flecha azul: banda gen AOX1 (aprox. 2 kb).

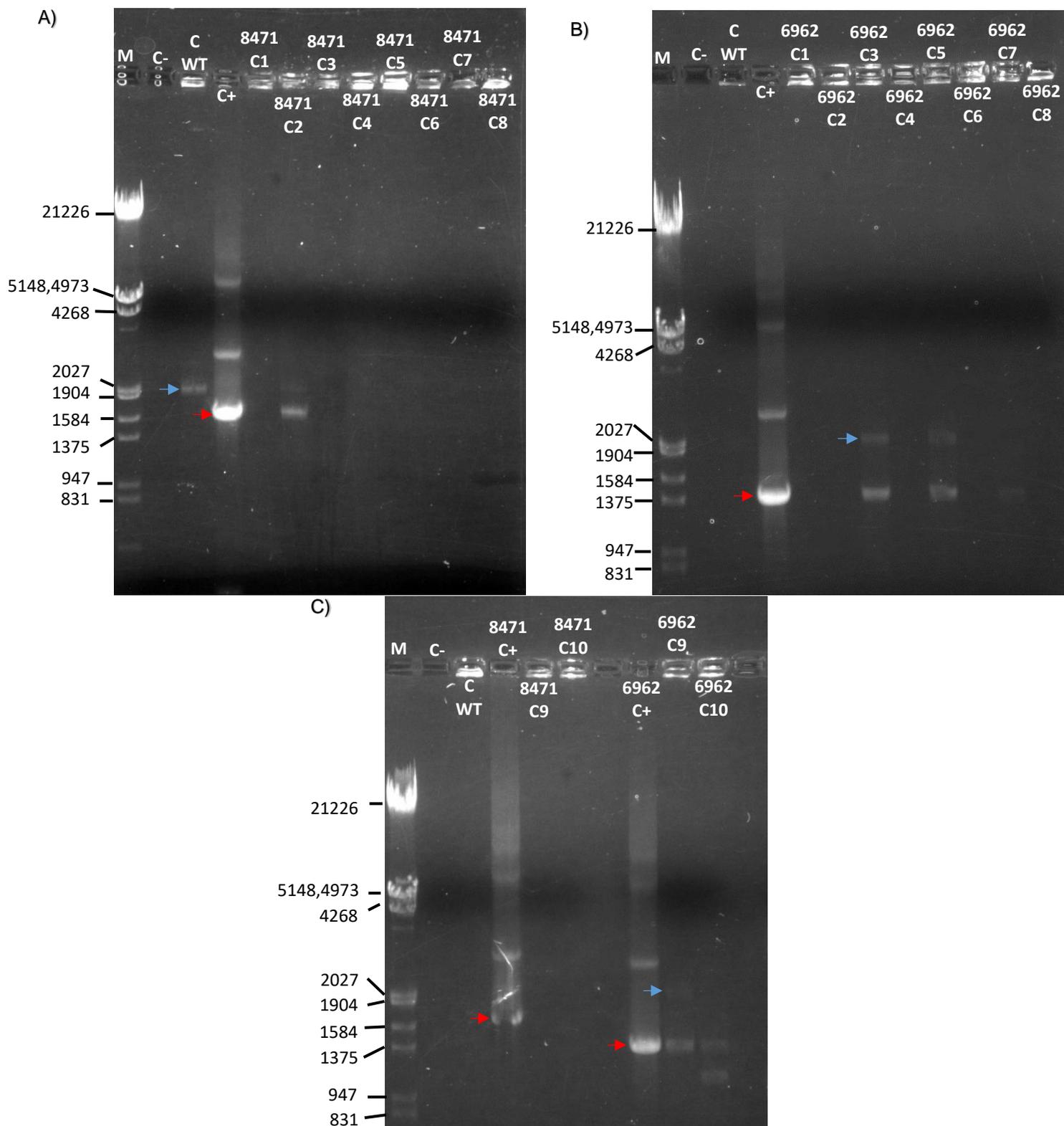


Fig. 26. Electroforesis en geles de agarosa 1% de los productos de PCR de colonia de colonias *P. pastoris* X-33 transformadas con pPICZαA-8471 y pPICZαA-6962. M: Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III 564 a 21226 pb; C-: sin DNA; C WT: muestra con colonia *P. pastoris* sin transformar; C+: plásmidos clonados con genes de interés; C1 –C10: número de clona Zeo^R. Flecha roja: pPICZαA 5' AOX1 (588 pb) + inserto (8471 de 1790 pb y 6962 de 1496 pb); Flecha azul: banda gen AOX1 (aprox. 2 kb).

Es importante mencionar que las colonias negativas en el PCR de colonia pueden ser falsos negativos debido a un error en la cantidad de inóculo empleado (demasiado material de colonia que haya podido interferir en la reacción). Esto se infiere porque algunas colonias de *P. pastoris* wt utilizadas como control no muestran la banda correspondiente al gen AOX1. Para descartar que sean falsos negativos, se repitieron las PCR tomando una menor cantidad de material de colonia (Figura 27).

Se descartaron varias colonias *P. pastoris* Zeo^R como falsos negativos al repetir las PCR de colonia con una menor cantidad de inóculo. Sin embargo, aún hubo colonias que no mostraron las bandas correspondientes al inserto + 588 pb y al gen AOX1. Quizá estas colonias son falsos negativos ya que aún se debe perfeccionar la toma de inóculo para la reacción de PCR de colonia para la lisis en seco, o bien son colonias negativas. Las colonias confirmadas con los plásmidos recombinantes integrados fueron para pPICZαA-7317 las colonias 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10; para pPICZαA-6816 las colonias 1, 4, 6 y 7; para pPICZαA-8471 las colonias 1, 2, 3 y 8 y para pPICZαA-6962 las colonias 1, 3, 5, 8 y 9.

Se eligieron tres de estas colonias de cada gen para llevar a cabo la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes.

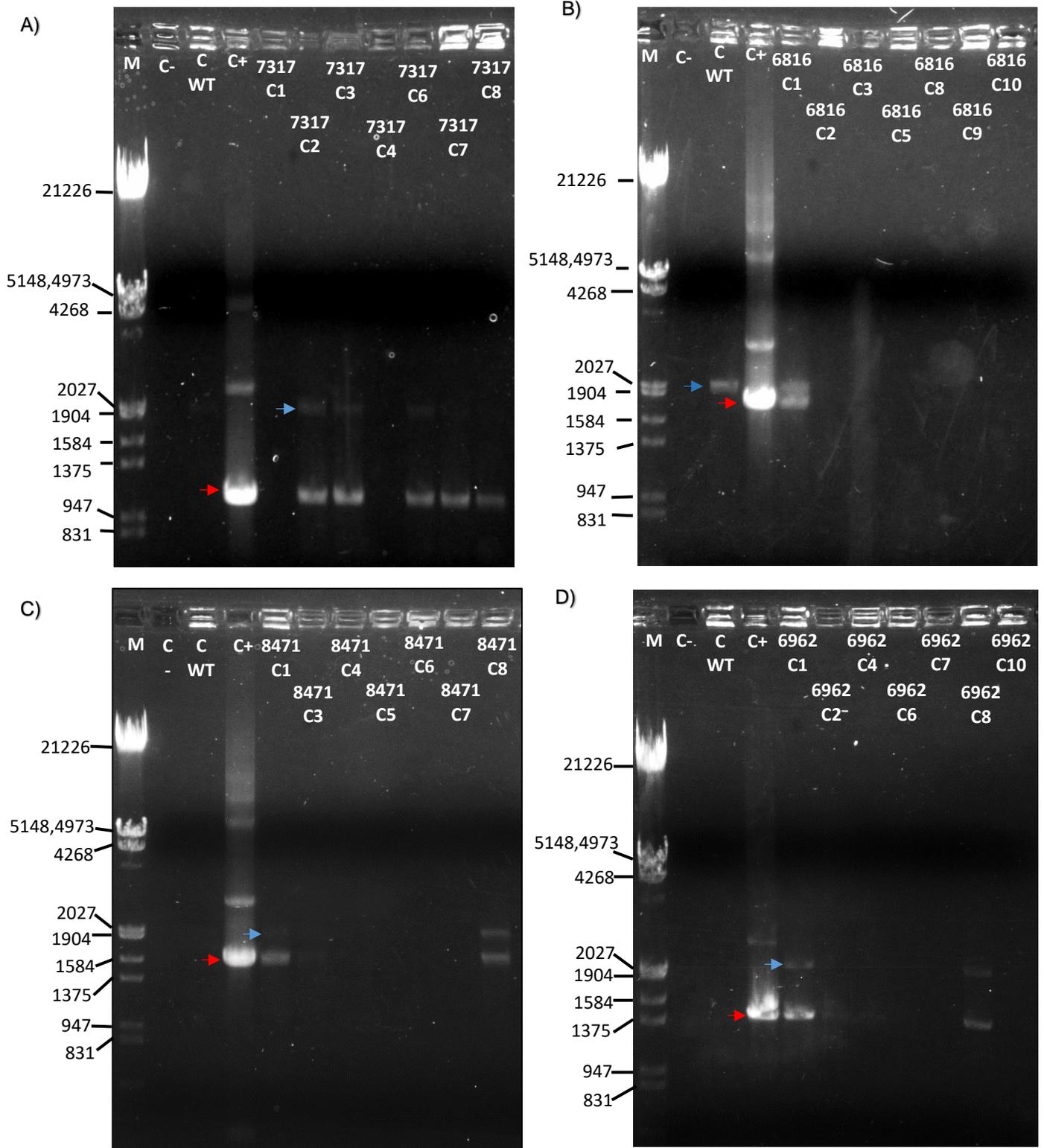


Fig. 27. Electroforesis en geles de agarosa 1% de los productos de PCR de colonia de colonias *P. pastoris* X-33 transformadas con A) pPICZαA-7317, B) pPICZαA-6816, C) pPICZαA-8471 y D) pPICZαA-6962. M: Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* 564 a 21226 pb; C-: sin DNA; C WT: muestra con colonia *P. pastoris* sin transformar; C+: plásmidos clonados con genes de interés; C1 –C10: número de clona Zeo^R. **Flecha roja: pPICZαA 5'AOX1 (588 pb) + inserto (7317 de 1211 pb, 6816 de 1958 pb, 8471 de 1790 pb y 6962 de 1496 pb); **Flecha azul:** banda gen AOX1 (aprox. 2 kb).**

8.7. Expresión de proteínas recombinantes

8.7.1. Expresión de las proteínas recombinantes 6816, 6962, 7317 y 8471 (primera transformación)

Se llevaron a cabo cuatro experimentos de inducción de colonias transformantes de *P. pastoris* Zeo^R pero sin confirmación de la integración de los insertos en el genoma por PCR, esto debido a que en ese momento se consideró como suficiente criterio de selección la resistencia a la ZeocinaTM. Al realizar los geles SDS-PAGE no se observó la expresión de las proteínas recombinantes. A continuación, se explican brevemente los cuatro experimentos de inducción llevados a cabo y las gráficas de concentración de proteína total y las imágenes de los resultados de los geles SDS-PAGE se muestran en el Anexo 4.

Primero, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes 6816 y 7317. Se inocularon dos colonias transformadas con cada gen y la inducción se llevó a cabo a 30°C en 25 mL de medio BMMY con una concentración final de metanol del 0.5% en matraces de 250 mL no baffeados. Al no estar baffeados los matraces la velocidad de agitación fue de 250 rpm para promover una aireación adecuada. Se tomaron alícuotas del cultivo a las 0, 6, 18, 42, 66, 90 y 108 h. Se agregó MeOH absoluto (99.8%) para llegar a una concentración final de 0.5% cada 24 h para mantener la inducción. Se cosecharon las células, se lisaron y cargaron 30 µg de fracción proteica tanto extracelular como citoplasmática en geles SDS-PAGE (Figuras A4.2 y A4.3 del Anexo 4). No se observaron bandas de sobreexpresión de las proteínas de interés.

También se realizó un segundo experimento de inducción de la expresión de las proteínas recombinantes 6962 y 8471. Se inocularon una colonia transformada con cada gen y en esta ocasión la inducción se llevó a cabo en matraces baffeados de 1 L para mejorar la aireación. Al igual que en el experimento anterior, la inducción se llevó a cabo a 30°C en 70 mL de medio BMMY con una concentración final de metanol del 0.5% y una velocidad de agitación de 250 rpm. Se cosecharon las células, se lisaron y se tomaron alícuotas del cultivo a las 0, 6, 10, 22, 32, 46, 56, 70 y 80 h. Se agregó MeOH cada 24 h para mantener la inducción. Se cargaron 30 µg de fracción proteica tanto extracelular como citoplasmática en geles SDS-PAGE (Figura A4.5 del Anexo 4). Nuevamente no se observaron bandas de expresión de las proteínas de interés.

Como los resultados no fueron positivos, se propuso realizar un screening de inducción de las proteínas recombinantes empleando dos concentraciones de inductor diferentes, 0.5% y 1% de metanol. Se inocularon cuatro colonias transformantes distintas de cada uno de los cuatro genes de interés. La inducción se llevó a cabo en matraces baffeados de 125 mL a 30°C con 25 mL de medio BMMY y una velocidad de agitación de 220 rpm. Se tomaron alícuotas del cultivo a las 0 y 48 h. Se agregó MeOH cada 24 h para mantener la inducción. Se cargaron 30 µg de fracción proteica tanto extracelular como citoplasmática en geles SDS-PAGE (Figura A4.8, A4.9, A4.10 y A4.11 del Anexo 4). No se observó la expresión de las proteínas recombinantes.

Se llevó a cabo un experimento de inducción más con las colonias de *P. pastoris* Zeo^R obtenidas de la primera transformación aumentando la concentración de inductor a 2% y 3% de MeOH. Se inocularon dos colonias transformantes de cada gen. La inducción se llevó a cabo en matraces baffleados de 125 mL a 30°C en 25 mL de medio BMMY y una velocidad de agitación de 220 rpm. Se tomaron alícuotas del cultivo a las 0, 48 y 96 h. Se agregó MeOH cada 24 h para mantener la inducción y nuevamente se cosecharon las células, se lisaron y se cargaron 30 µg de las fracciones proteicas tanto extracelular como citoplasmática en geles SDS-PAGE (Figura A4.14 del Anexo 4). Incrementando la concentración de inductor tampoco se observó la expresión de las proteínas recombinantes. Se hipotetizó que la no expresión de las proteínas recombinantes se podría deber a que en la transformación de las células de *P. pastoris*, los plásmidos no se integraron correctamente en el genoma de *Pichia* y las transformantes podían crecer en medio con ZeocinaTM pero sin poseer los genes de interés. En ese sentido, es importante mencionar que la transformación de la cepa X-33 con plásmidos abiertos favorece la recombinación cruzada simple en el locus AOX1, provocando que la mayoría de las transformantes tengan fenotipo Mut+ (Figura 28), sin embargo, con la presencia de las secuencias AOX1 en los plásmidos, existe la posibilidad de que también se produzca una recombinación en la región 3'AOX1, interrumpiendo el gen AOX1 de tipo wt y creando transformantes con fenotipo MutS (utilización lenta de metanol). La pérdida del gen AOX1 y la pérdida de la mayor parte de la actividad de la alcohol oxidasa de la célula de *Pichia*, da como resultado una reducción en la capacidad de las células para metabolizar el metanol. Por lo tanto, las células muestran un crecimiento deficiente en medio con MeOH y bajos niveles de inducción. Debido a lo anterior, se realizó la segunda transformación de *P. pastoris* X-33 (confrontar sección 8.5), y se confirmó el fenotipo Mut+. También se confirmó la inserción de los plásmidos recombinantes en el genoma de *Pichia* por análisis de PCR de colonia (ver sección 8.6).

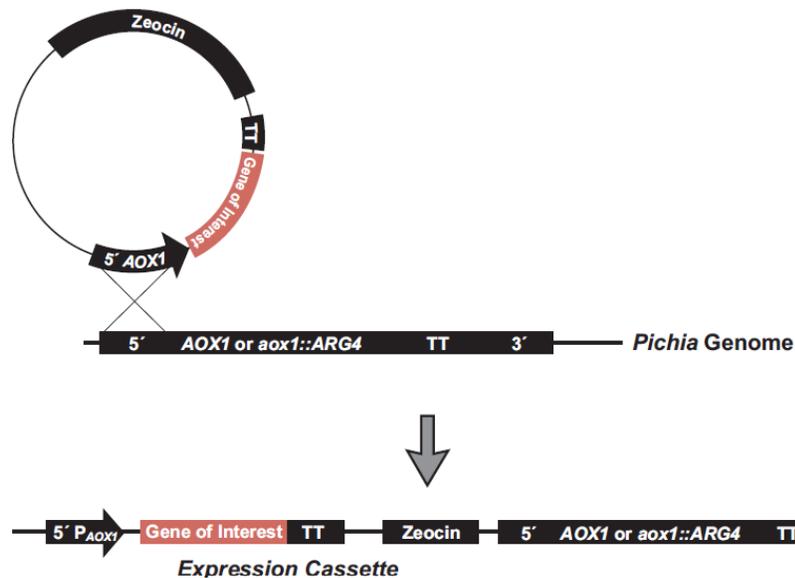


Fig. 28. Recombinación e integración de plásmido en *Pichia*. Resultado de una inserción del plásmido 5' en el locus *AOX1* intacto (Mut+) y la ganancia de P_{AOX1} , el gen de interés y el gen de resistencia a Zeocina™. Tomado de Invitrogen, 2010.

La levadura *Pichia pastoris* se puede transformar con DNA tanto circular como abierto, sin embargo, si se utiliza DNA circular es necesario emplear una mayor cantidad de DNA (Invitrogen, 2010), por lo que en este trabajo se optó por digerir el DNA transformante (con el gen de interés) para abrir la molécula y una vez corroborada la completa apertura del DNA con una electroforesis, se detuvo la reacción de digestión por calor y se purificó el DNA digerido para la transformación de *Pichia* (ver sección 7.2.4).

8.7.2. Expresión de proteínas recombinantes 7317, 6816, 8471 y 6962 (segunda transformación e integración confirmada por PCR)

Se llevó a cabo la inducción de la expresión de las cuatro proteínas de interés siguiendo el protocolo mencionado en el apartado 7.3. Se eligieron tres colonias Zeo^R confirmadas por PCR con los insertos integrados. Se inocularon tres colonias de cada gen (7317-5, 7317-9 y 7317-10; 6816-4, 6816-6 y 6816-7; 8471-2, 8471-3 y 8471-8; 6962-3, 6962-5 y 6962-9) por duplicado ya que se probaron dos concentraciones diferentes de inductor (metanol al 0.5% y al 1%). Esta inducción se llevó a cabo en matraces baffleados de 125 mL, se tomaron alícuotas del cultivo cada 24 horas (desde las 0 h hasta las 96 h) y se separaron las fracciones extracelular y citoplasmática. Al igual que en las inducciones anteriores, se cuantificó la proteína total por el método de Bradford (Figuras 29 y 30) para posteriormente concentrar 30 µg de proteína para cargar las muestras en geles de poliacrilamida SDS-PAGE (Figuras 31 y 32). A diferencia de las inducciones anteriores, este experimento se llevó a cabo a 28°C y se agregó metanol cada 12 horas para mantener el estímulo de inducción.

En la figura 29, se observa que para las tres clonas de los genes 6962, 7317 y 8471 hubo una mayor concentración de proteínas extracelulares en las fracciones obtenidas de la inducción con una concentración final de 1% de MeOH. La concentración de proteínas extracelulares de las tres clonas del gen 6816 no mostró una tendencia diferenciada con respecto a la concentración de metanol. Para las inducciones de los genes 6962 y 7317 la concentración de proteínas extracelulares aumenta conforme pasa el tiempo de cultivo. Para la inducción del gen 6816 se observa una mayor concentración de proteínas extracelulares a las 48 h de cultivo. En cuanto a la concentración de proteínas extracelulares de la inducción del gen 8471, no se observa una tendencia temporal en la que la concentración de proteínas extracelulares sea mayor, ya que para la clona 2 fue mayor la concentración de proteínas extracelulares a las 48 h y para las clonas 3 y 8 a las 96 h.

En cuanto a las fracciones citoplasmáticas, en la figura 30 se observan picos de una mayor concentración de proteínas citoplasmáticas a los tiempos de cultivo de 48 y 72 h. No se observó ninguna dependencia clara de la concentración de metanol empleada para inducción y la concentración de proteína citoplasmática generada. Se seleccionaron una de las tres clonas de cada gen (7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3) y se procedió a realizar electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida al 12% para visualizar las bandas de las proteínas de interés.

Tanto en los geles de SDS-PAGE de proteínas extracelulares (Figura 31) como en los de proteínas citoplasmáticas (Figura 32), si bien se observan posibles bandas distintas en comparación con el tiempo 0 h que pudieran corresponder a las proteínas recombinantes (bandas candidatas), no se observan con la intensidad que se esperaría de bandas de proteínas sobreexpresadas. Esto indica que o bien no hay expresión de las proteínas recombinantes, o su expresión está ocurriendo a muy bajo nivel y no es posible detectarlas por la tinción de Coomassie, a la concentración de proteína analizada. No se observan diferencias en los patrones proteicos inducidos con metanol al 0.5% o al 1%.

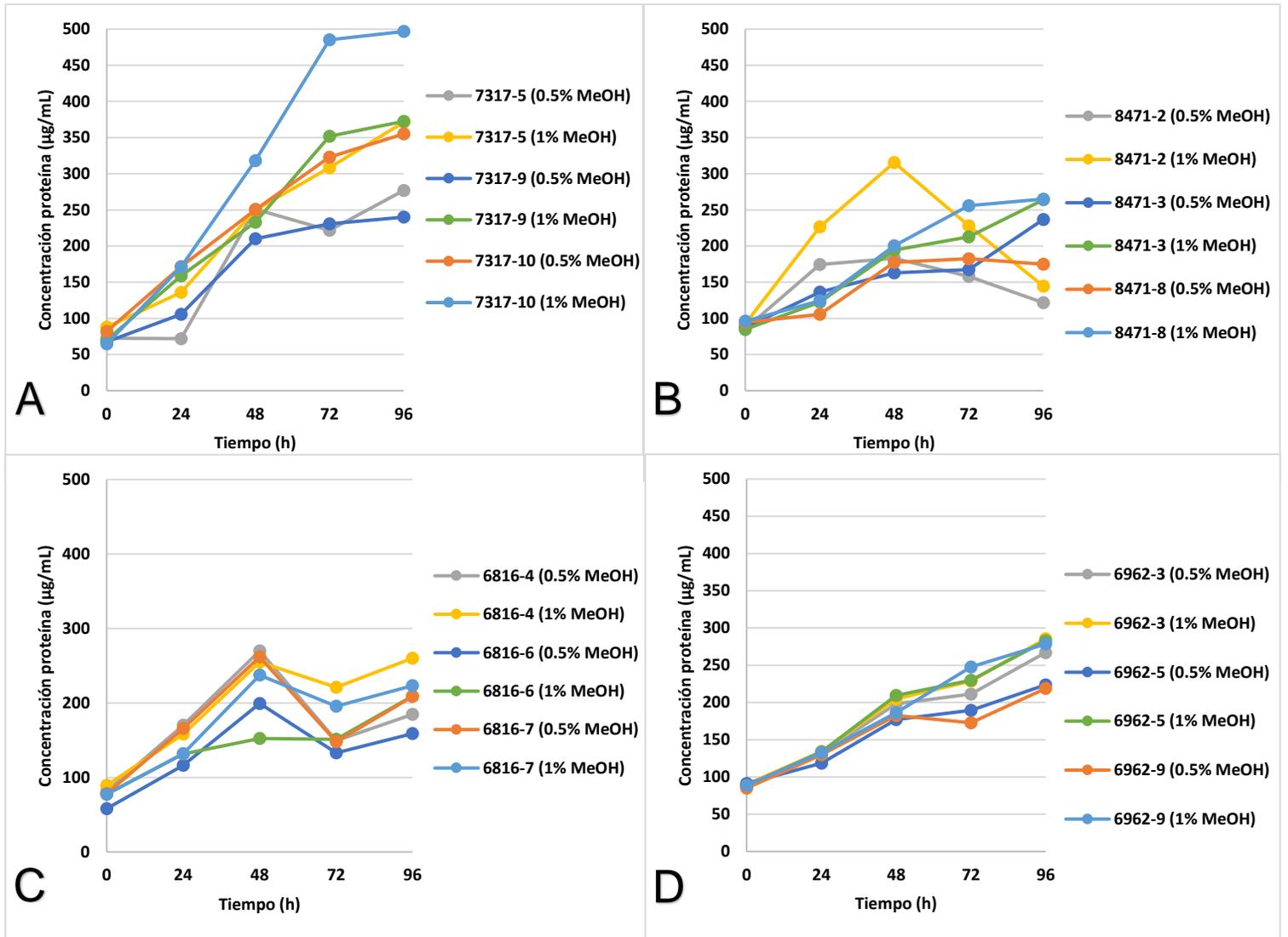


Fig. 29. Curvas de concentración de proteína total en fracción extracelular: A) inducción de la proteína 7317; B) inducción de la proteína 8471; C) inducción de la proteína 6816 y D) inducción de la proteína 6962.

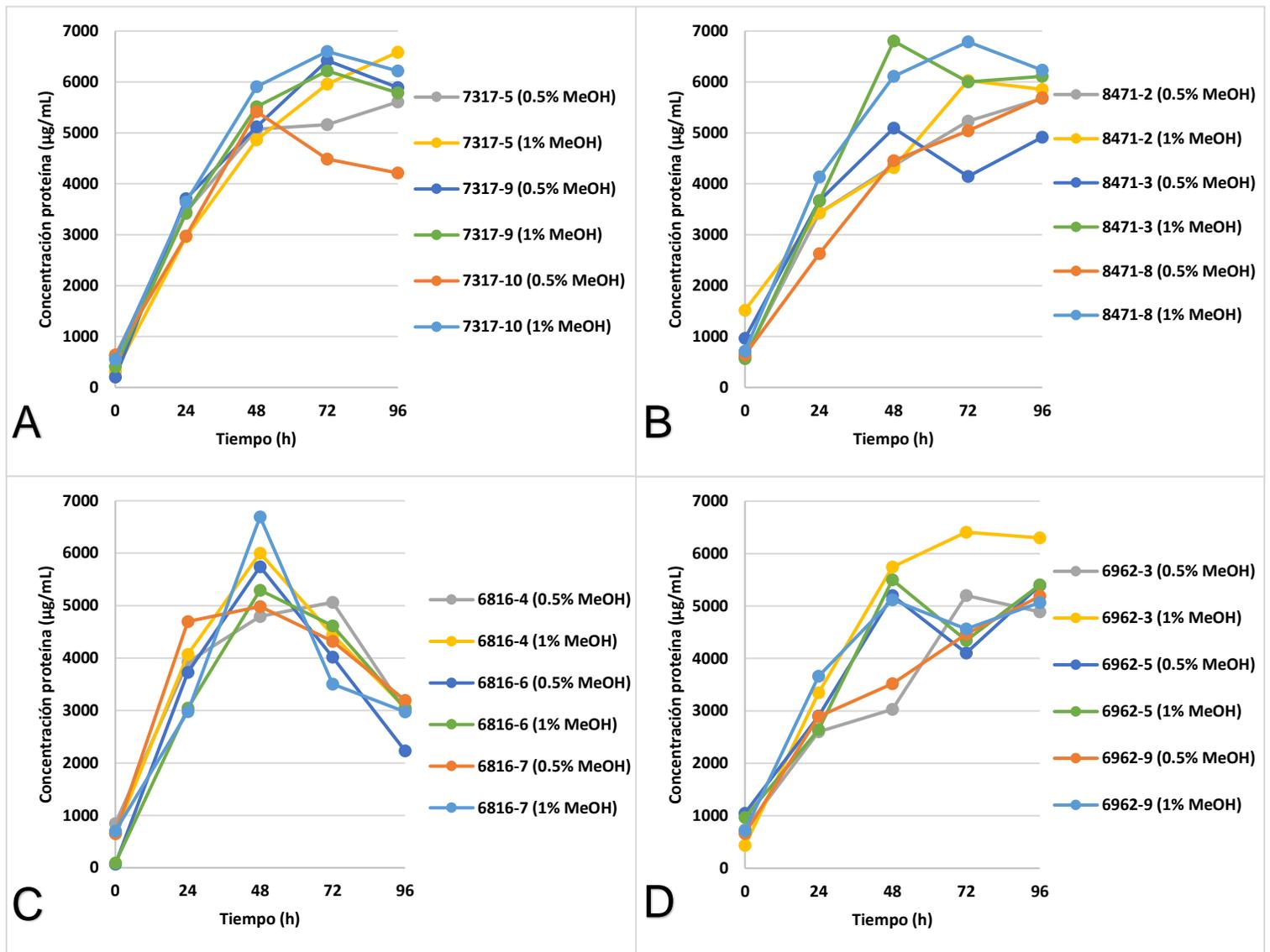


Fig. 30. Curvas de concentración de proteína total en fracción citoplasmática: A) inducción de la proteína 7317; B) inducción de la proteína 8471; C) inducción de la proteína 6816 y D) inducción de la proteína 6962.

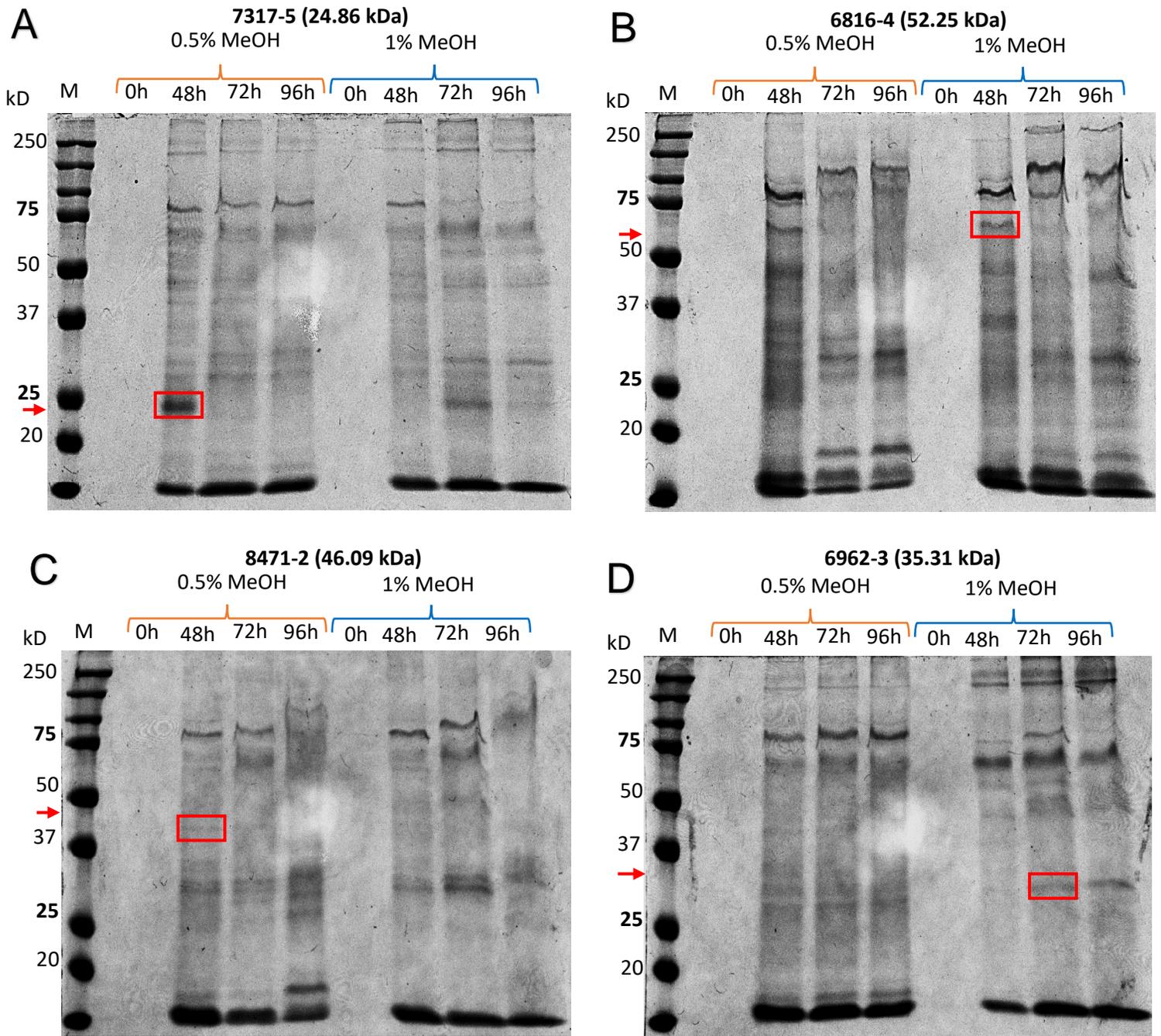


Fig. 31. Geles de SDS-PAGE de proteínas extracelulares de *P. pastoris* X-33 transformada con los plásmidos recombinantes y cultivada en BMMY. Se corrieron 30 μ g de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-5; B) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-4; C) concentrado proteico de la inducción de la proteína 8471-2 y D) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6962-3. **Enmarcado en rojo:** bandas candidatas de proteínas de interés recombinantes.

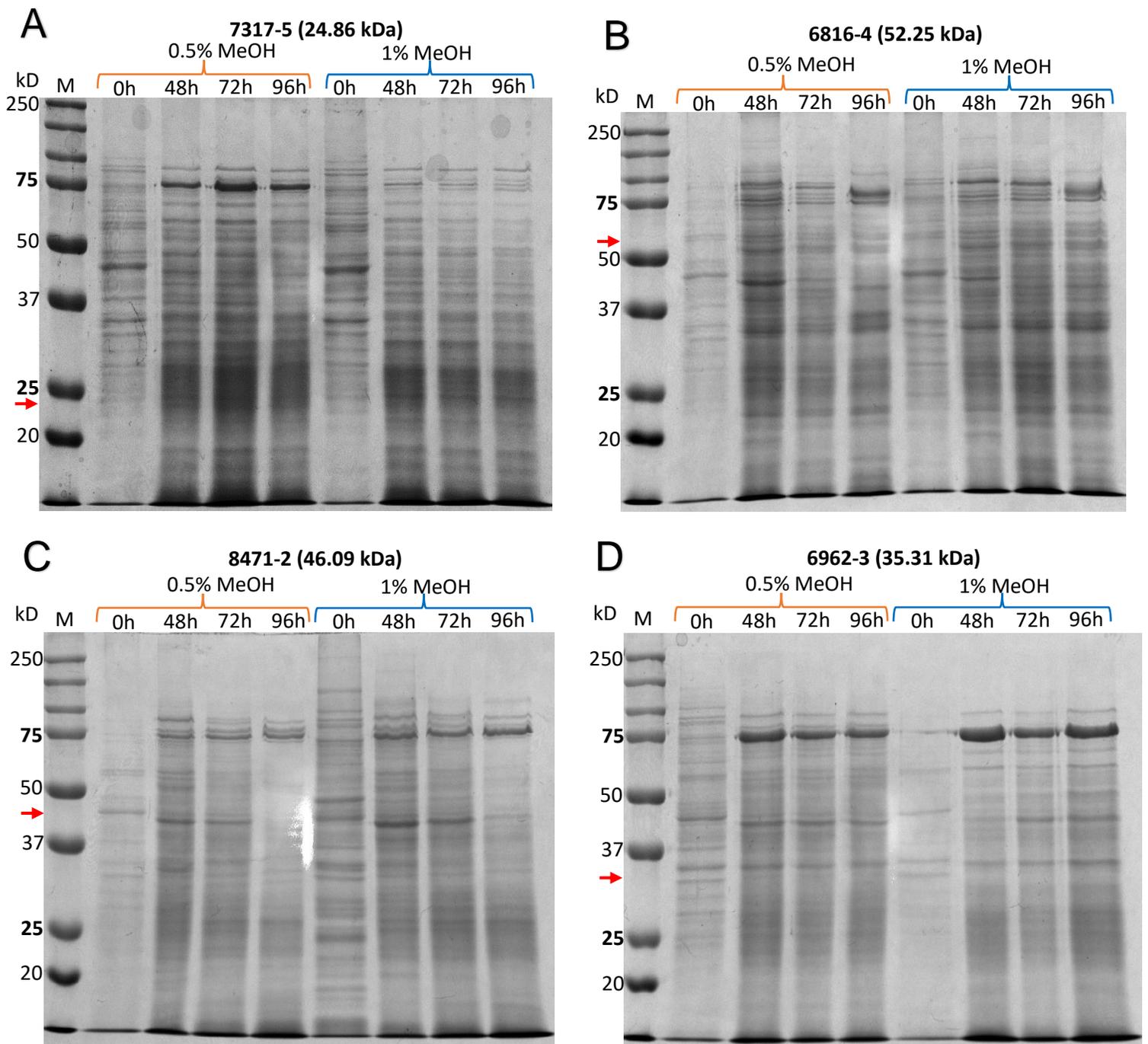


Fig. 32. Geles de SDS-PAGE de proteínas citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformada con los plásmidos recombinantes y cultivada en BMMY. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-5; B) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-4; C) concentrado proteico de la inducción de la proteína 8471-2 y D) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6962-3.

Debido a los resultados observados en los geles de SDS-PAGE tanto de las fracciones extracelulares como de las fracciones citoplasmáticas, en las que no se observaron bandas típicas de proteína sobreexpresada. Se decidió analizar las fracciones insolubles de esas mismas muestras (7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3) en SDS-PAGE, con el objetivo de explorar la posibilidad de que las proteínas de interés pudieran estar unidas a la membrana o en cuerpos de inclusión. Si bien esta es una posibilidad remota ya que las secuencias de las proteínas de interés se diseñaron en fase con el factor α que señala la secreción al medio extracelular de estas proteínas, se consideró la posibilidad. Las fracciones insolubles de las muestras 7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3 se analizaron como se describe en el apartado 7.3.2 empleando SDS al 1% para solubilizar las proteínas. Las muestras resultaron muy viscosas y como se observa en la Figura 33, los geles presentan poca resolución, sin embargo, no se observaron bandas que indicaran la presencia de las proteínas recombinantes en la fracción membranal.

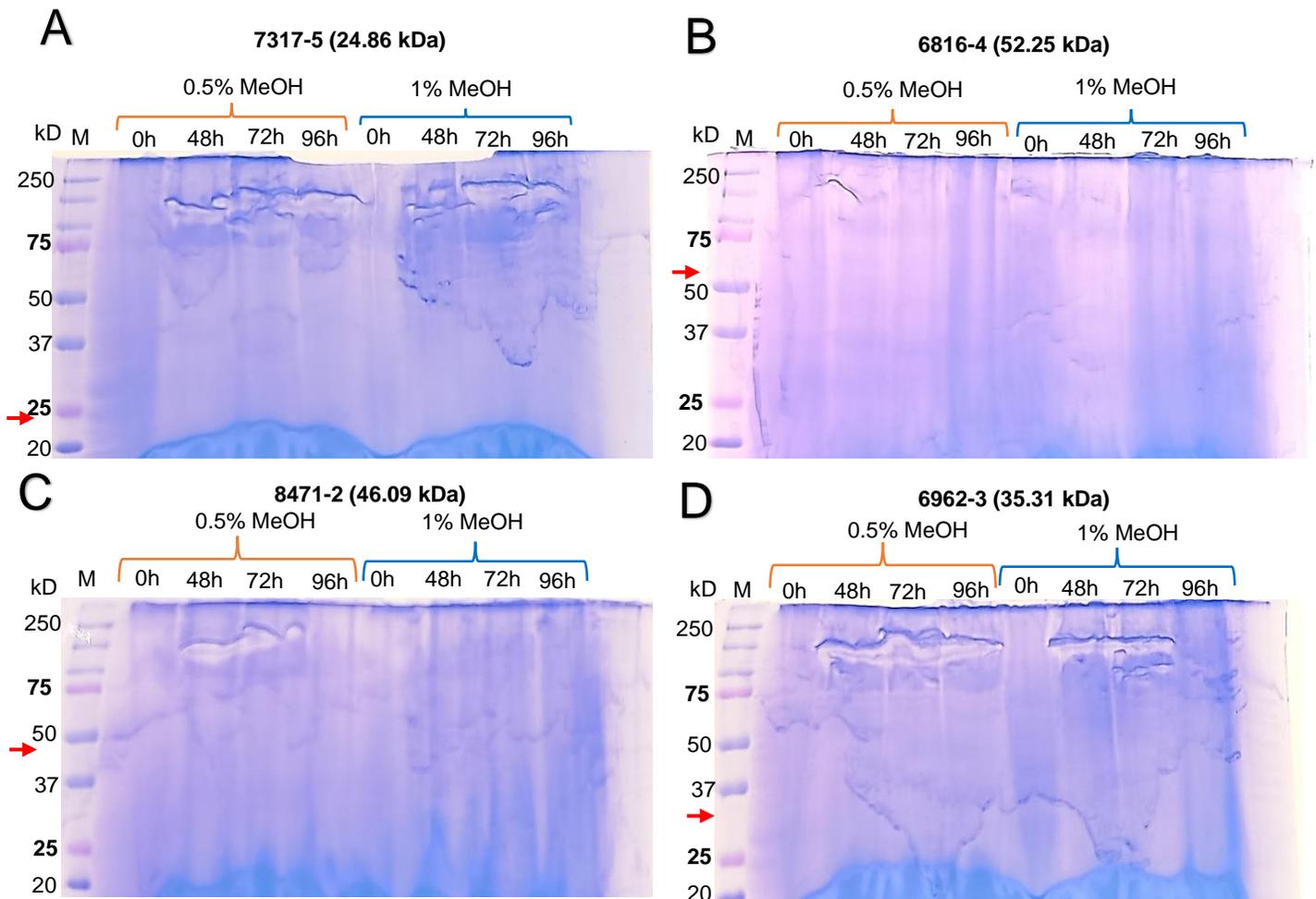


Fig. 33. Geles de SDS-PAGE de fracción insoluble (membranal) de *P. pastoris* X-33 transformada con los plásmidos recombinantes y cultivada en BMMY. Se corrieron 30 μ g de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). Concentrados proteicos de las inducciones: A) proteína 7317-5; B) proteína 6816-4; C) proteína 8471-2 y D) proteína 6962-3. Las flechas rojas señalan los tamaños esperados de las bandas de las proteínas recombinantes.

De los experimentos anteriores se concluyó que en la fracción citoplasmática y membranal no se observaron bandas candidatas de proteína recombinante. Sin embargo, en la fracción extracelular se observaron cuatro bandas candidatas que podrían ser de las proteínas recombinantes. Estas bandas candidatas se purificaron por columna de Ni y se analizaron por Western Blot utilizando anticuerpos contra etiqueta de histidinas con la colaboración del Dr. Elpidio García (Facultad de Química, UNAM).

8.8. Purificación y ensayo de Western Blot de bandas candidatas de proteínas recombinantes 7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3 (segunda transformación e integrantes confirmados por PCR)

Se llevó a cabo la purificación (IMAC) con columna utilizando la resina Invitrogen™ Agarosa Ni-NTA como se describe en el apartado 7.3.3 de las muestras extracelulares (bandas candidatas) obtenidas de las inducciones de las proteínas 7317-5 (0.5% MeOH, 48 h), 6816-4 (1% MeOH, 48h), 8471-2 (0.5% MeOH, 48h) y 6962-3 (1% MeOH, 72h). Se purificaron 250 µg de proteína total de cada muestra.

El análisis de Western Blot utilizando un anticuerpo primario de ratón anti-etiqueta de histidinas y un anticuerpo secundario anti-ratón (Jackson ImmunoResearch) se realizó como se describe en el apartado 7.3.4. Las muestras analizadas en este inmunoensayo fueron 40 µg de proteína total de fracciones extracelulares 7317-5, 6816-4, 8471-2 y 6962-3 sin purificar en la columna de Ni, 40 µg de proteína total no adsorbida por la resina, las muestras purificadas en la columna de Ni (sin cuantificar, se analizó todo el volumen obtenido) y un control positivo (CDK-A de ~37 kDa recombinante con etiqueta de histidinas).

A pesar de que en los geles SDS-PAGE teñidos con Coomassie (Figura 31) se observaron bandas candidatas a tener las cuatro proteínas recombinantes de interés, en el Western Blot utilizando anticuerpos contra etiquetas de histidinas únicamente se observó la banda de la proteína 7317-5 con etiqueta de histidinas en el tamaño esperado, sin embargo, las otras tres proteínas analizadas no fueron detectadas con el anticuerpo, y por lo tanto, se considera que no se expresaron (Figuras 34 y 35). Al utilizarse como control positivo una proteína recombinante CDK-A con etiqueta de histidinas y observarse una banda en su tamaño esperado, se concluye que la técnica funcionó adecuadamente, aunque es importante mencionar que la señal de la proteína 7317-5 se observó muy saturada, esto puede ser debido a una sobrecarga de muestra, demasiada cantidad de anticuerpo, una exposición demasiado larga durante el proceso de revelado o a un consumo rápido del sustrato. En la Figura 36 se presentan fotografías de las membranas Immobilon® PVDF teñidas con rojo de Ponceau y rojo Congo. La banda observada en el revelado del Western Blot de la proteína 7317-5 también aparece en el tamaño esperado de 24.86 kDa en las tinciones de rojo de Ponceau y rojo Congo.

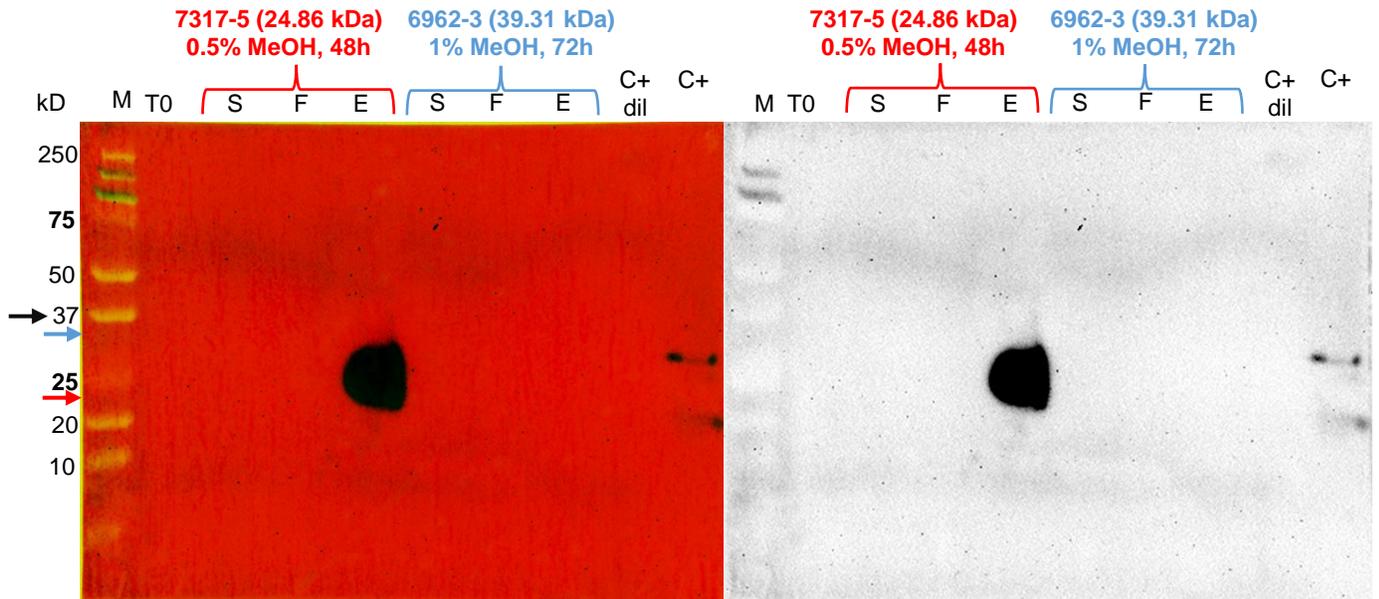
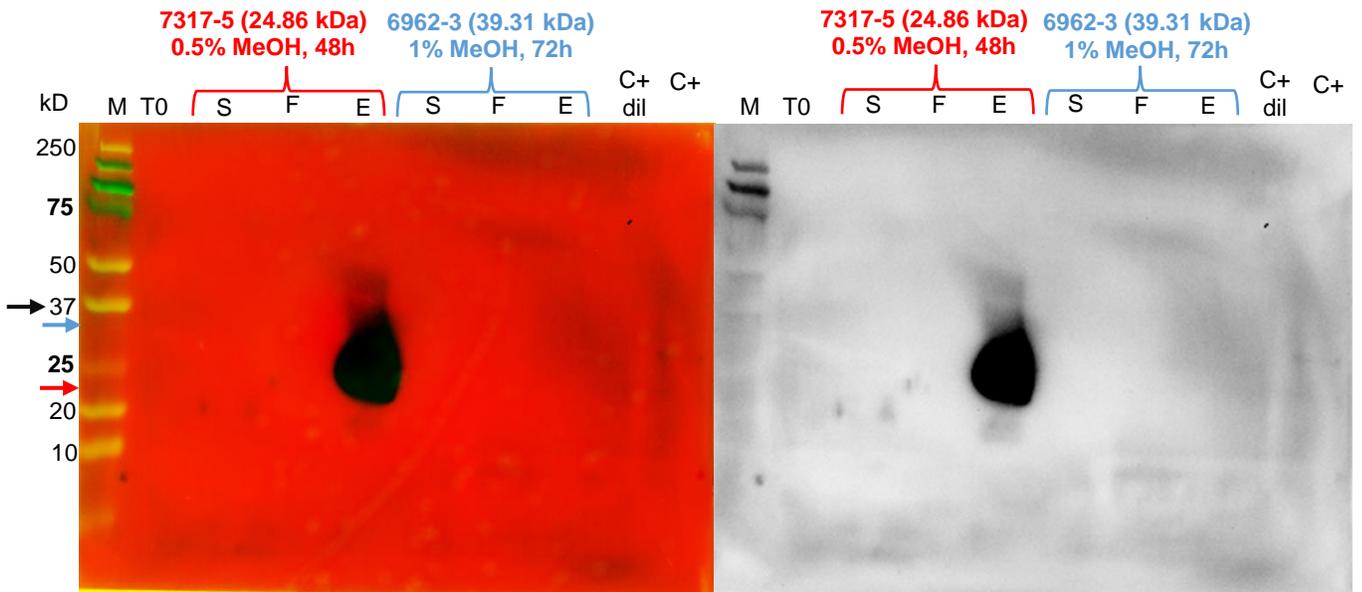
A**B**

Fig. 34. Western Blot de fracciones extracelulares candidatas con proteínas recombinantes 7317-5 y 6962-3. Se corrieron las muestras en gel Tricina-SDS-PAGE 10%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) Dilución Ac 1° y 2° de 1:40,000; B) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500. S: sobrenadante (sin purificar); F: lavado no unido; E: eluato; T0: sobrenadante al tiempo 0 h; C+ dil: CDK-A con His tag (37 kDa) diluida [200 ng]; C+: CDK-A con His tag (37 kDa) concentrada [400 ng]. Flechas: en color **negro** señala el tamaño esperado de la señal del control positivo, en color **azul** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 6962 y en color **rojo** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 7317.

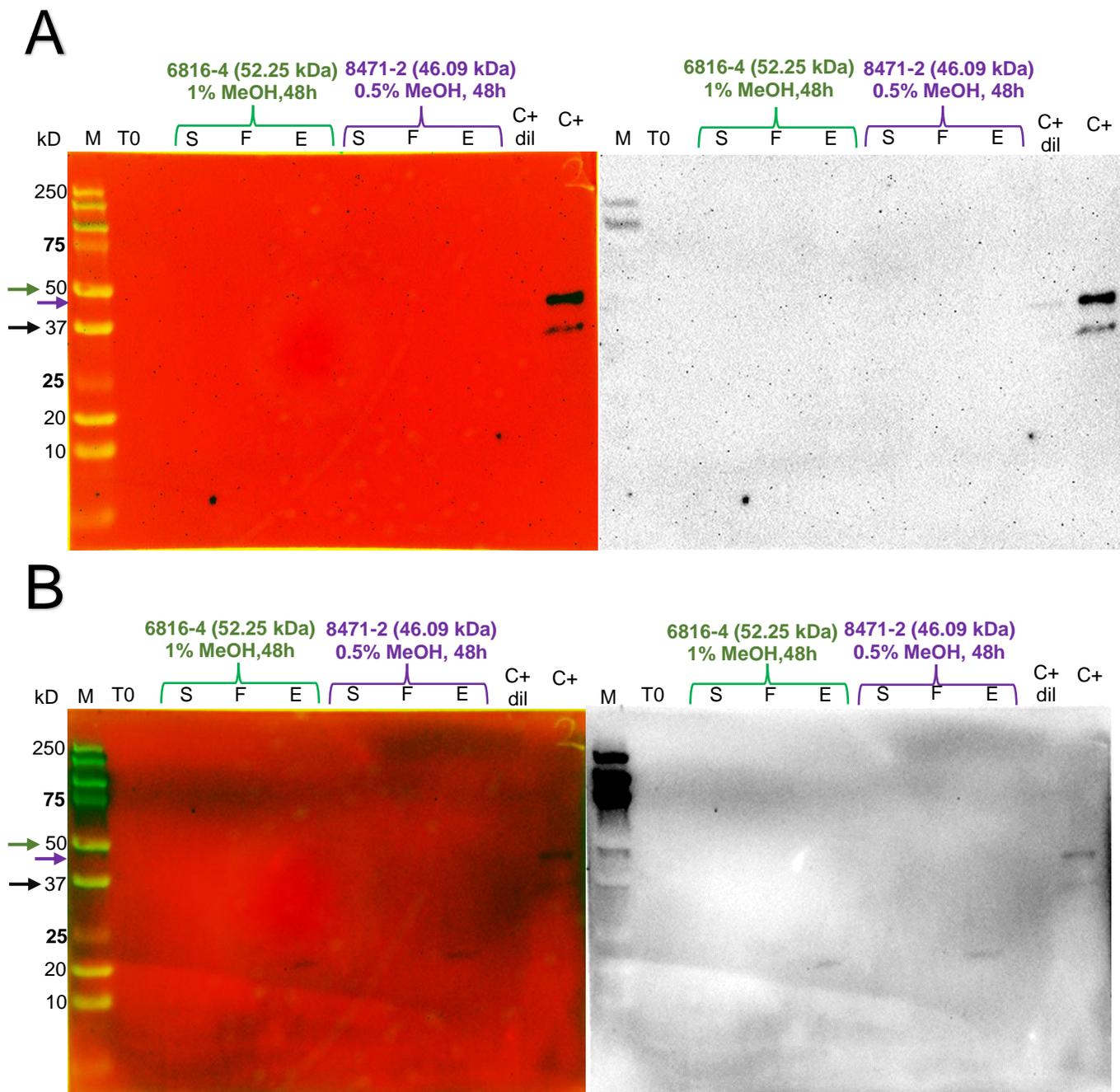


Fig. 35. Western Blot de fracciones extracelulares candidatas con proteínas recombinantes 6816-4 y 8471-2. Se corrieron las muestras en gel Tricina-SDS-PAGE 10%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) Dilución Ac 1° y 2° de 1:40,000; B) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500. S: sobrenadante (sin purificar con columna de Ni); F: lavado no unido; E: eluato; T0: sobrenadante al tiempo 0 h; C+ dil: CDK-A con His tag (37 kDa) diluida [200 ng]; C+: CDK-A con His tag (37 kDa) concentrada [400 ng]. Flechas: en color **negro** señala el tamaño esperado de la señal del control positivo, en color **verde** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 6816 y en color **morado** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 8471.

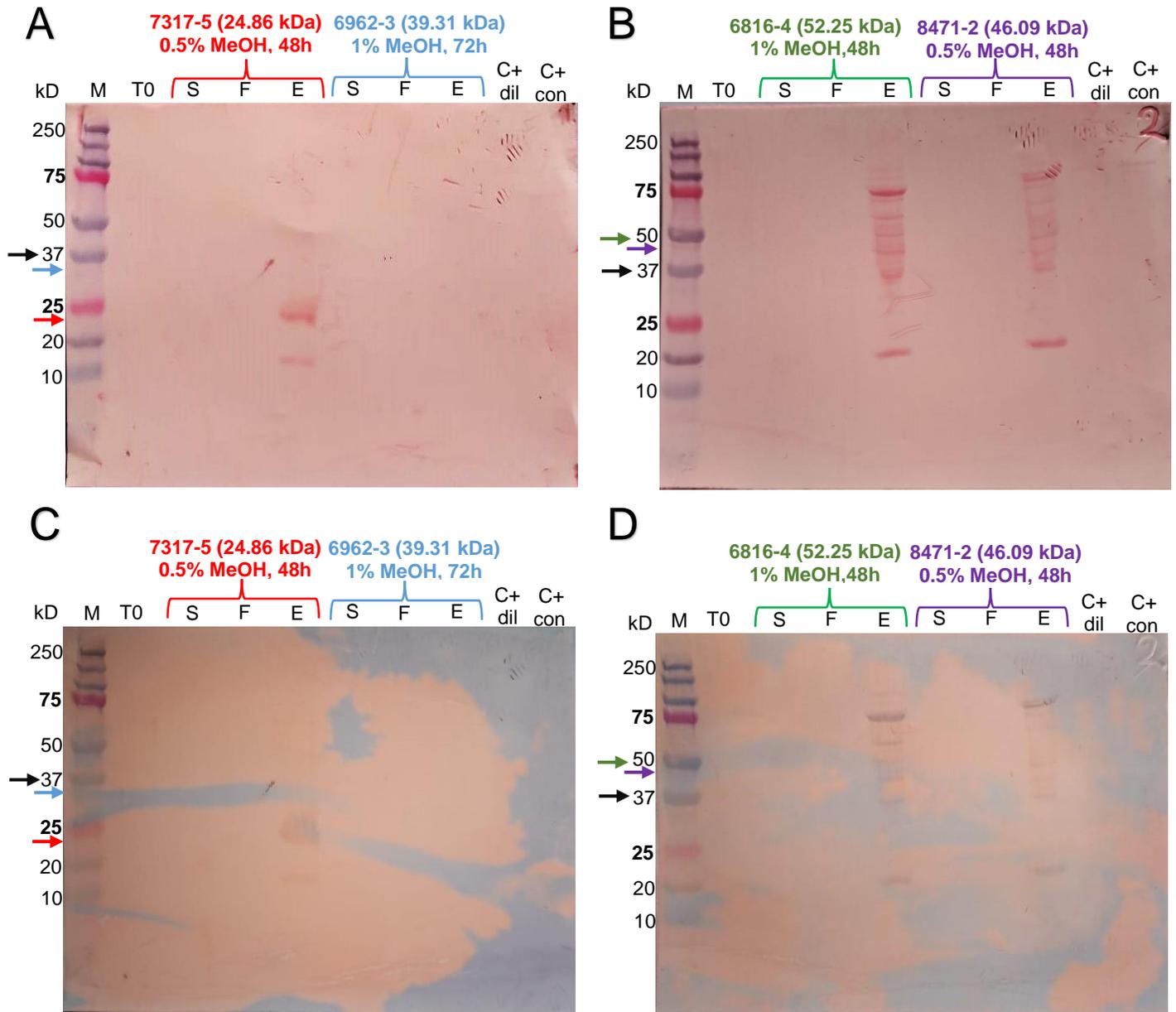


Fig. 36. Tinción con rojo de Ponceau (A, B) y rojo Congo (C, D) de las membranas obtenidas en el Western Blot de fracciones extracelulares candidatas con las proteínas recombinantes. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500 de proteínas de 7317-5 y 6962-3; B) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500 de proteínas de 6816-4 y 8471-2; C) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500 de proteínas de 7317-5 y 6962-3; D) Dilución Ac 1° y 2° de 1:7,500 de proteínas de 6816-4 y 8471-2. S: sobrenadante (sin purificar con columna de Ni); F: flow through; E: eluido; T0: sobrenadante al tiempo 0 h; C+ dil: CDK-A con His tag (37 kDa) diluida [200 ng]; C+ con: CDK-A con His tag (37 kDa) concentrada [400 ng]. Flechas: en color **negro** señala el tamaño esperado de la señal del control positivo, en color **azul** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 6962, en color **rojo** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 7317, en color **verde** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 6816 y en color **morado** señala el tamaño esperado de la señal de la proteína recombinante 8471.

Se analizaron por SDS-PAGE las muestras de las otras dos clonas de cada gen (fracción extracelular y citoplasmática de 7317-9, 7317-10, 6816-6, 6816-7, 8471-3, 8471-8, 6962-5 y 6962-9) que se indujeron para analizar si existen bandas candidatas de proteína recombinante. Estos resultados se encuentran en la sección del Anexo 5 (Figuras A5.1, A5.2, A5.3 y A5.4). En las fracciones extracelulares, únicamente se observan para la 7317-9 y la 7317-10 bandas candidatas a proteínas recombinantes tanto por estar en el tamaño esperado y comparando con los resultados anteriores de SDS-PAGE y Western Blot. Este resultado ayuda a confirmar que esta proteína fue la única que se expresó de manera recombinante, aunque en bajos niveles de expresión. En las fracciones citoplasmáticas no se observan bandas candidatas a proteínas recombinantes, ya que, si bien se observan algunas bandas que van aumentando en intensidad conforme al tiempo de cultivo cerca de los tamaños esperados, estas son comunes en los geles cargados con los concentrados proteicos de las cuatro proteínas de interés, por lo que se concluye que son proteínas endógenas de *Pichia*. Por lo tanto, se concluyó que la única proteína de interés sobreexpresada de manera recombinante fue la 7317.

Aunque el sistema de *Pichia pastoris* tiene muchos beneficios para la expresión de proteínas recombinantes, existen ciertas limitaciones para este sistema. Al ser las proteínas de interés de este trabajo de origen fúngico, se esperaba que el sistema de *P. pastoris* permitiera la expresión en altos rendimientos de dichas proteínas. Sin embargo, se ha reportado que si bien algunas proteínas no tienen problemas para ser expresadas en *P. pastoris*, otras pueden encontrar ciertos obstáculos relacionados con la estabilidad del RNA, la glicosilación, el plegamiento de las proteínas o la secreción (Ingram *et al.*, 2021).

Existen diferentes estrategias empleadas para superar dificultades en la expresión de proteínas recombinantes en *Pichia pastoris* reportadas en la literatura. Por ejemplo, dado que la señal de secreción del factor α dirige la translocación postraduccional a través de la membrana del RE, esta puede funcionar bien solo para algunas proteínas (Brake *et al.*, 1984). En ese sentido, se reportó que la prueba de GFP-HDEL puede confirmar si la translocación de proteínas del citoplasma al RE es el motivo de la disminución de la secreción. Esta prueba permite visualizar la ubicación de la proteína de fusión fluorescente, determinando así si los translocos en el RE están obstruidos, lo que conduce a la presencia de GFP-HDEL en el citoplasma (Barrero *et al.*, 2018). Si el paso de translocación es la causa de la baja secreción de las proteínas de interés, se sugiere utilizar una secuencia señal previa (Ost1) reemplazando la pre señal del factor α para mejorar la secreción de proteínas (Fitzgerald y Glick 2014). En el trabajo de Fitzgerald y Glick (2014) se observó que la secreción de proteínas fluorescentes modelo y de la lipasa BTL2 aumentaron con la señal de secreción modificada con la pre señal Ost1, sin embargo, también se reportó que para las proteínas que contienen muchos enlaces disulfuro es posible que no se plieguen rápidamente debido a su gran necesidad de modificación postraduccional, lo que reduce la posibilidad de mostrar una mejora cuando

se utiliza la secuencia Ost1. Por el contrario, para las proteínas que contienen menos enlaces disulfuro las posibilidades de una mayor secreción son más probables cuando se utiliza dicha secuencia. Dado que las proteínas 6816, 6962 y 8471 tienen de 2 a 3 puentes disulfuro, podría resultar positivo probar esta estrategia para mejorar la expresión de dichas proteínas. Por otro lado, también se ha reportado como estrategia para mejorar la secreción de proteínas heterólogas en *P. pastoris* la sobreexpresión de chaperonas como la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI), ya que son proteínas abundantes en el RE que ayudan al plegamiento y, por ende, facilitan el transporte de una amplia gama de proteínas secretadas (Brodsky y Skach 2011). En ese sentido, se reportó que en *P. pastoris* la sobreexpresión de BiP conduce a un aumento tres veces mayor en la secreción de la proteína ScFv (de interés en dicho trabajo) con respecto a la cepa que utilizaron como control, sin embargo, la sobreexpresión de PDI no tuvo un impacto positivo en la secreción (Damasceno *et al.*, 2007).

Otra estrategia empleada para incrementar la producción de proteínas recombinantes utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris* es la detección de transformantes de manera más eficiente. En este trabajo se realizó la detección de transformantes en matraces de 125 mL con agitación, sin embargo, se ha reportado en la literatura un procedimiento de screening más eficiente para incrementar la producción de proteínas recombinantes en *P. pastoris*. El Dr. Weis y colaboradores (Weis *et al.*, 2004; Weis 2019) produjeron un ensayo de detección en placa de 96 pozos como técnica de detección eficiente y de bajo costo que permite encontrar algunas cepas de *P. pastoris* adecuadas de manera consistente y reproducible. Las características de este ensayo incluyen una microplaca con 96 pozos cuadrados de fondo plano que actúan como deflectores para reducir la sedimentación celular, un agitador con alta velocidad y control de humedad, así como un sistema de lectura de placas para determinar la cantidad de proteína secretada en el medio. A diferencia del método en matraz agitado que se utilizó en este trabajo, esta técnica no requiere centrifugación ni eliminación del medio antes de la adición de metanol, ya que se permite el agotamiento total del medio por consumo celular, seguido de la adición de medio que contiene metanol para inducir la expresión de proteínas. El proceso de inducción tiene lugar durante aproximadamente 3 días (incluidas varias adiciones de medio que contiene metanol), las células se sedimentan y la proteína recombinante secretada se cuantifica en el sobrenadante extracelular recolectado (Weis *et al.*, 2004; Weis 2019). Se sugiere probar esta técnica para realizar una selección más eficiente de transformantes y así poder expresar las proteínas 6816, 6962 y 8471 de A3.I.1.

Por otro lado, se ha reportado que la variación clonal en *P. pastoris* dificulta que se alcance la máxima eficiencia en la secreción de proteínas heterólogas (Ingram *et al.*, 2021). Como se mencionó en el apartado 7.2.3, en este trabajo con el objetivo de evitar la variación clonal se purificaron los plásmidos abiertos antes de llevar a cabo la transformación de *P. pastoris*. Esto en concordancia con el trabajo reportado por el Dr.

Aw y colaboradores (Aw *et al.*, 2017) que indica que la presencia de DNA contaminante de *E. coli* (de una miniprep) puede conducir a la integración de fragmentos genómicos bacterianos en *loci* aleatorios del genoma de *P. pastoris*, lo que podría contribuir a la variación clonal.

Como se mencionó en apartados anteriores, *P. pastoris* permite llevar a cabo modificaciones postraduccionales como los procesos de glicosilación. En la N-glicosilación, las proteínas nacientes se introducen en el *lumen* del RE mediante el uso de un péptido señal, donde un oligosacárido precursor (Glc3Man9GlcNAc2) se transfiere a un residuo de Asn siempre que esté presente una secuencia consenso de N-glicosilación Asn-Xaa-Ser/Thr en la secuencia de la proteína. La glicoproteína modificada luego se pliega con la ayuda de enzimas y chaperonas residentes en el RE y una vez correctamente modificadas y plegadas salen del RE y entran en el aparato de Golgi, donde continúa la glicosilación. Las proteínas correctamente modificadas y plegadas se secretan fuera de la célula, sin embargo, la presencia de glicoproteínas mal plegadas activa la “respuesta de proteína desplegada (UPR)” y son degradadas en el citoplasma (Wang *et al.*, 2020). La O-glicosilación consiste en la unión de oligosacáridos como la N-acetil glucosamina (GalNAc) o manosa al grupo hidroxilo de los aminoácidos serina (Ser) o treonina (Thr), aunque no existe una secuencia consenso conocida (Radoman *et al.*, 2021). Las secuencias de aminoácidos de las proteínas 6816, 6962, 7317 y 8471 se analizaron para encontrar posibles sitios de N- y O-glicosilación mediante los servidores NetNGlyc 1.0 y NetOGlyc 4.0 Server (Gupta R y Brunak S, 2002; Steentoft *et al.*, 2013) respectivamente. Los resultados obtenidos del servidor NetNGlyc 1.0 indican que las cutinasas 6962 y 7317 no presentan posibles sitios de N-glicosilaciones, mientras que para la AXE 6816 se encontraron dos posibles Asn susceptibles a la N-glicosilación y para la cutinasa 8471 se encontró un posible sitio de N-glicosilación (Anexo 6; Tablas A6.1-A6.4 y Figuras A6.1-A6.4). Por otro lado, los resultados obtenidos del servidor NetOGlyc 4.0 indican que las cuatro proteínas de interés presentan posibles sitios de O-glicosilación en aminoácidos Ser y Thr. La AXE 6816 presentó el mayor número de posibles sitios de O-glicosilación ya que se encontraron 81 sitios, mientras que las cutinasas 6962, 7317 y 8471 presentan 44, 8 y 42 posibles sitios de O-glicosilación respectivamente (Anexo 6; Tablas A6.5-A6.8). Se ha reportado que la glicosilación puede llegar a modificar la secreción y el transporte intracelular de la proteína de interés (Mendelzon, 1986). En ese sentido, al existir sitios susceptibles a glicosilación en las cuatro proteínas de interés, sobre todo de O-glicosilación, es posible que algunas bandas observadas en los perfiles proteicos en los geles SDS-PAGE sean referentes a las proteínas de interés glicosiladas y por ello no coincidan con los tamaños esperados, sin embargo en el Western Blot no se observaron señales de proteínas con etiqueta de histidinas en otros tamaños a los esperados. Se podrían realizar ensayos de actividad como zimogramas para analizar a profundidad la existencia de proteínas recombinantes glicosiladas. Por otra parte, cabe mencionar que se han reportado diferentes formas de abordar la interferencia de las glicosiltransferasas endógenas de *P. pastoris*, por ejemplo, mutar los residuos de aminoácidos que están glicosilados esperando que la mutación no

comprometa la función de la proteína. Otra alternativa es contrarrestar a estas enzimas endógenas con la sobreexpresión de glicosiltransferasas heterólogas con una especificidad de sustrato aceptor similar. Finalmente se propone también modificar las condiciones de fermentación para que se puedan obtener perfiles de glicosilación más homogéneos (Ingram *et al.*, 2021).

La proteína 7317 es la única que no tiene sección IDR en el extremo carboxilo y que su región desordenada (en el extremo amino) es la de menor longitud siendo menor al 20% de la secuencia total. En contraste, los extremos IDR de las enzimas 6816, 6962 y 8471 son del 48.4%, 30% y 46.8% de la secuencia total, respectivamente (ver tabla 11); por lo que se sugiere la posibilidad de que las IDRs presentes en las proteínas 6816, 6962 y 8471 podrían afectar de alguna manera la expresión, el plegamiento o su estabilidad durante la expresión recombinante, sin embargo, esta hipótesis debe ser probada en futuros trabajos que busquen la expresión recombinante de estas proteínas con y sin sus IDRs. Se ha reportado en la literatura que, en comparación con proteínas plegadas, las proteínas intrínsecamente desordenadas o con IDRs están significativamente empobrecidas en residuos hidrofóbicos y aromáticos que promueven el orden como F, Y, W, I, L, V y C. Por otro lado, están significativamente enriquecidas en residuos promotores de desorden, que típicamente son polares y con carga como Q, G, S, K, R, E y P (Nielsen y Mulder, 2019; Millard *et al.*, 2020). También, se conoce que, debido al bajo contenido de residuos aromáticos, el coeficiente de extinción molar a 280 nm de las proteínas intrínsecamente desordenadas suele ser bajo o incluso nulo. Esto puede dificultar la determinación de la concentración de proteínas, lo que a menudo puede provocar que la concentración de estas proteínas se subestime. Además, el sesgo debido a la composición de aminoácidos de las proteínas intrínsecamente desordenadas también afecta la unión de los colorantes utilizados para muchos ensayos colorimétricos; por ejemplo, los ensayos de Bradford subestiman las concentraciones de proteínas intrínsecamente desordenadas en un 63% en promedio (Contreras-Martos *et al.*, 2016). Teniendo en cuenta lo anterior, se sugiere que futuros trabajos utilicen un método de mayor sensibilidad para la cuantificación de cantidad de proteína. También es importante tomar en cuenta que las proteínas intrínsecamente desordenadas son altamente susceptibles a la degradación por proteasas debido a su naturaleza desordenada (Pedersen *et al.*, 2020). Además, es interesante resaltar que, de las cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos expresadas en sistemas heterólogos reportadas en la literatura, la mayoría carecen de regiones intrínsecamente desordenadas, y las que sí tienen IDRs se han expresado en *E. coli* mejor que en *P. pastoris*. Para ejemplificar este punto se presenta la Tabla 17, donde se observa que de 21 cutinasas degradadoras de poliésteres sintéticos que se han expresado en sistemas heterólogos únicamente cuatro tienen IDR, dos se sobreexpresaron en *E. coli*, una en *P. pastoris* y otra es endógena de *Cryptococcus flavus* GB-1.

Tabla 17. IDRs en cutinasas degradadoras de polímeros sintéticos expresadas en sistemas heterólogos. NA: no aplica.

Enzima (Accession)	Microorganismo	Vector/ Expresión	Hospedero	IDR	Sustratos	Referencia
Svir_Cut190 (BAO42836)	<i>Saccharomonospora viridis</i> AHK190	pQE80L/periplasma	<i>E. coli</i> (DE3)	Si	PET, PBSA, PCL	Kawai <i>et al.</i> , 2014
AnigCUT2 (AKE48475)	<i>Aspergillus niger</i>	pPICZαC/extracelular	<i>P. pastoris</i> X33	Si	PCL	Al-Tammar <i>et al.</i> , 2016
Talb_Est119 (6AID)	<i>T. alba</i> AHK119	pQE80L/periplasma	<i>E. coli</i> (DE3)	Si	PLA	Kitadokoro <i>et al.</i> , 2019
Cfla_CLE (BAT32793)	<i>Cryptococcus flavus</i> GB-1	NA (endógena)/extracelular	NA	Si	PBSA	Watanabe <i>et al.</i> , 2015
cutCsp (BAC67242)	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	pG-1/extracelular	<i>S. cerevisiae</i> YPH499	No	PLA, PBS	Masaki <i>et al.</i> , 2005
cutAory (P52956)	<i>Aspergillus oryzae</i>	pPICZαA/extracelular	<i>P. pastoris</i>	No	PCL	Liu <i>et al.</i> , 2009.
Tcel_Cut2 (ADV92527)	<i>Thermobifida cellulosilytica</i>	pET26b(+)/periplasma	<i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	No	PET	Herrero <i>et al.</i> , 2011
Tfus42_Cut1 (ADV92528)	<i>Thermobifida fusca</i>	pET26b(+)/periplasma	<i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	No	PET	Herrero <i>et al.</i> , 2011
Talb_Cut1 (ADV92525)	<i>Thermobifida alba</i> DSM43185	pET26b(+)/periplasma	<i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	No	PET	Ribitsch <i>et al.</i> , 2012
Abra_Cut (AAA03470)	<i>Alternaria brassicicola</i>	pPICZα/extracelular	<i>P. pastoris</i>	No	PCL	Baker <i>et al.</i> , 2012.
Afum_Cut (XP_755273)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	pPICZα/extracelular	<i>P. pastoris</i>	No	PCL	Baker <i>et al.</i> , 2012.
cutFoxy (EXK81749)	<i>Fusarium oxysporum</i>	pET22b(+)/ periplasma	<i>E. coli</i> BL21	No	PET, BHET	Dimarogona <i>et al.</i> , 2015
Fsol_Cut (AAA33334)	<i>Fusarium solani</i>	pPICZα/extracelular	<i>P. pastoris</i> X33	No	PLA, PBSA, PCL	Hu <i>et al.</i> , 2016.
Tcel_Cut1 (ADV92526)	<i>T. cellulosilytica</i>	pET26b(+)/periplasma	<i>E.coli</i> BL21-Gold(DE3)	No	PET, PBS, PHBV	Gamerith <i>et al.</i> , 2017
Fsol_synth (ASK40094)	<i>F. solani</i>	pPICZαA/extracelular	<i>P. pastoris</i> X33	No	PCL	Ping <i>et al.</i> , 2017
Afum_synth (ASK40095)	<i>A. fumigatus</i>	pPICZαA/extracelular	<i>P. pastoris</i> X33	No	PCL	Ping <i>et al.</i> , 2017
LC_Cutinase (CUM11140)	metagenoma	pET22b(+)/ periplasma	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	No	PS-PU Impranil	Schmidt <i>et al.</i> , 2017
Tfus_Cut2 (CDN67547)	<i>T. fusca</i> KW3	pET22b(+)/ periplasma	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	No	PS-PU Impranil	Schmidt <i>et al.</i> , 2017
Mthe_CUT (XP_003663956.1)	<i>Myceliophthora thermophila</i> 42464	pPICZαA/extracelular	<i>P. pastoris</i>	No	PCL	Yang <i>et al.</i> , 2018
Mror_CUT1 (ESK97883)	<i>Moniliophthora roreri</i>	pET22b(+)/periplasma	<i>E. coli</i> BL21	No	PES, PCL, PET	Vázquez-Alcántara <i>et al.</i> , 2021
HiC (ABC06408)	<i>H. insolens</i>	NA (comercial)	NA	No	PS-PU	Di Bisceglie <i>et al.</i> , 2022

Se ha reportado que la composición específica de aminoácidos de proteínas intrínsecamente desordenadas a menudo resulta en un alto grado de codones raros, lo que puede comprometer los rendimientos de expresión (Quax *et al.*, 2015). En este trabajo no se llevó a cabo una optimización de uso de codones para *P. pastoris* al momento de sintetizar los genes de interés, y esto podría haber afectado los niveles de expresión de las proteínas recombinantes, ya que en este trabajo se probaron diferentes condiciones de temperatura (28°C y 30°C) y de concentración de inductor (0.5%, 1%, 2% y 3% de MeOH) y en ningún caso se observó proteínas sobreexpresadas de forma heteróloga, siendo que estas concentraciones de MeOH están dentro del intervalo reportado como óptimo el cual varía en un rango de 0.1% a 3.0% (Serrano-Rivero *et al.*, 2016). Por otro lado, como sí se confirmó la presencia de los insertos integrados en el genoma de *P. pastoris*, el problema de la baja expresión podría estar en la traducción.

Con el objetivo de determinar si la no optimización de codones podría afectar la expresión de las proteínas de interés, se realizó un análisis de uso de codones de las secuencias de las enzimas de interés de A3.1.1 sin optimizar (como se sintetizaron) y las secuencias optimizadas para *P. pastoris* obtenidas del servidor web *Optimizer* (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>; Puigbo *et al.*, 2007). En este análisis se obtuvo el índice de adaptación de codones (CAI) cuyo valor de 1 se considera ideal, mientras que valores mayores a 0.8 se consideran como buenos para la expresión en el organismo de expresión deseado (Tabla 18). Cuanto menor sea el CAI, mayor será la posibilidad de que el gen de interés se exprese pobremente. Las secuencias sin optimizar tuvieron valores de CAI entre 0.629 y 0.679, mientras que todas las secuencias optimizadas para *Pichia* tuvieron valores de 1.000. Estos resultados indican que los valores de CAI de las secuencias no optimizadas están por debajo del valor óptimo (0.8-1). También se calculó el contenido de GC, cuyo valor ideal está entre 30% y 70%, cualquier valor fuera de este rango afectará adversamente la eficiencia transcripcional y la traduccional. El contenido de GC fue de entre 49.9% y 56.9% para las secuencias sin optimizar y de entre 39.2% y 41.2% para las secuencias optimizadas para *Pichia*, todas dentro del rango óptimo. Además, se obtuvo el índice ENc (número efectivo de codones), que es una medida del sesgo de uso de codones (Wright, 1990) y sus valores oscilan entre 20 (si se utiliza sólo un codón por aminoácido) y 61 (si se utilizan todos los codones sinónimos por igual). Para las secuencias sin optimizar los valores de ENc están entre 43 y 57, mientras que los de las secuencias optimizadas son más bajos, entre 21 y 22, lo cual se esperaba ya que los genes altamente expresados suelen utilizar el subconjunto mínimo de codones reconocidos por los ARNt más abundantes (Puigbo *et al.*, 2007). Los valores de ENc para las secuencias optimizadas reflejan un gran sesgo en el uso de codones mientras que los valores para las secuencias sin optimizar reflejan la ausencia de sesgo en el uso de codones. Los resultados de este análisis muestran que sí hay diferencias entre las secuencias sin optimizar y las optimizadas para *P. pastoris*, sobre todo en el índice CAI ya que sin optimizar las secuencias no llegan al intervalo de valores óptimos, siendo este índice el más eficaz de todas las medidas de sesgo de codones para predecir los niveles de expresión génica (Henry y Sharp, 2007; Goetz y Fuglsang, 2005). Debido a los

resultados anteriores, se infiere que existe una gran probabilidad de que la no optimización de las secuencias de los genes en este trabajo podría haber afectado el nivel de sobreexpresión de las proteínas recombinantes. Sin embargo, no es posible descartar que el problema de la baja expresión también pueda deberse a las condiciones del sistema de expresión o del cultivo de inducción.

Tabla 18. Análisis de uso de codones de las enzimas de A3.I.1 (para *Pichia pastoris*)

Enzima A3.I.1	CAI	Contenido GC	ENc
Secuencias sin optimizar			
6816	0.658	56.9	43
6962	0.654	53.3	48
7317	0.679	49.9	57
8471	0.629	55.2	51
Secuencias optimizadas para <i>Pichia pastoris</i>			
6816	1.000	39.9	22
6962	1.000	40.0	21
7317	1.000	39.2	21
8471	1.000	41.2	21

CAI: índice de adaptación de codones

ENc: número efectivo de codones

Con los resultados obtenidos en este proyecto, surgen varias alternativas para poder expresar las proteínas de interés con mejores rendimientos, ya sea en el sistema de *P. pastoris* o cambiando de sistema de expresión a *E. coli*. Estas alternativas se describen en el apartado de Perspectivas. Este proyecto se dividió en actividades a realizar en los cuatro semestres de duración del programa de maestría. La primera parte correspondiente a la revisión bibliográfica y el planteamiento del problema se llevó a cabo durante el primer y segundo semestre. Debido a la pandemia de COVID-19 se empezó el trabajo experimental en el tercer semestre y las actividades realizadas fueron la propagación de los plásmidos recombinantes y la transformación de células competentes de *P. pastoris*. Durante el cuarto semestre se trabajó con la inducción de la expresión de las enzimas recombinantes probando diferentes condiciones de temperatura y concentración de inductor. Debido a las dificultades en la determinación de las condiciones adecuadas de inducción enfrentadas, no se pudieron llevar a cabo los

ensayos enzimáticos con las proteínas recombinantes inicialmente previstos. Sin embargo, se espera que las proteínas recombinantes 6816, 6962 y 8471 se logren expresar y purificar en futuros proyectos, para que, en conjunto con la proteína 7317, se puedan caracterizar bioquímicamente con ensayos enzimáticos empleando los sustratos sugeridos en el presente trabajo, contribuyendo al estudio de enzimas con potencial capacidad de degradar PU y otros poliésteres sintéticos.

9. Conclusiones

Se logró establecer un sistema de expresión en *P. pastoris* X-33 para la cutinasa 7317, sin embargo, la metodología empleada no resultó de utilidad para la expresión de las enzimas recombinantes 6816, 6962 y 8471. Con relación a lo descrito en la literatura, se utilizaron las mismas condiciones de cultivo de inducción que fueron empleadas con éxito en trabajos publicados de producción de cutinasas recombinantes en *Pichia pastoris*, no obstante, el factor diferencial fue la no optimización de uso de codones ya que se pensó que al tratarse de proteínas de origen fúngico, ésta variable no sería limitante, sin embargo, los resultados obtenidos indican que la no expresión de estas enzimas recombinantes posiblemente se deba a la no optimización de uso de codones para *P. pastoris*. Sin dejar de mencionar que en este momento no es posible descartar totalmente que la no expresión de las proteínas 6816, 6962 y 8471 se deba a otros factores como las regiones desordenadas de las proteínas o las condiciones de cultivo.

10. Perspectivas

- Sintetizar los genes de interés con las secuencias optimizadas para *P. pastoris* y realizar experimentos de inducción bajo las condiciones probadas en este trabajo, debido a la alta posibilidad de que la no optimización de uso de codones para *P. pastoris* haya afectado los niveles de expresión de las proteínas recombinantes de interés.
- Detectar si hay expresión de las proteínas recombinantes bajo las condiciones utilizadas en este trabajo mediante la realización de zimografías de actividad esterasa y de aclaramiento del Impranil® (Álvarez-Barragán, 2016) para detectar las proteínas recombinantes por actividad enzimática ya que se esperaría que éstas, o al menos la 6962 identificada en nuestro laboratorio con la actividad esterasa y la capacidad de aclarar el Impranil®, tengan ambas actividades.
- Cambiar de sistema de expresión para producir las proteínas recombinantes de interés. Se podrían utilizar los plásmidos sin optimización de codones con cepas de *E. coli* con mayor expresión de tRNA raros, como las cepas BL21-CodonPlus o Rosetta(DE3). O bien, sintetizar nuevos plásmidos con optimización de codones para *E. coli*.
- Una vez producidas las proteínas recombinantes de interés, caracterizarlas bioquímicamente y comprobar su actividad enzimática sobre los sustratos tipo PU, carbamatos y poliésteres sintéticos seleccionados en este trabajo.

11. Referencias

- Ahmed Al-Tammar K, Omar O, Abdul Murad A, Abu Bakar F. 2016. Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*. *Open Life Scien.* 11:29-38.
- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:62–67.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70:422–429.
- Allen AB, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:37–41.
- Almagro Armenteros JJ, Tsirigos KD, Sønderby CK, Petersen TN, Winther O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2019. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat. Biotechnol.* 37:420–423.
- Al-Tammar KA, Omar O, Abdul-Murad AM, Abu Bakar FD. 2016. Expression and characterization of a cutinase (AnCUT2) from *Aspergillus niger*. *Open Life Sci.* 11:29.
- Álvarez-Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Álvarez-Barragán J. 2016. Caracterización de la biodegradación de poliuretano por hongos filamentosos e identificación de la enzima extracelular responsable. Tesis de MC. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H. 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Appl. Environ. Microbiol.* 82: 82:5225–5235.
- Aw R, Barton GR, Leak DJ. 2017. Insights into the prevalence and underlying causes of clonal variation through transcriptomic analysis in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101(12):5045–5058.
- Babu MM. 2016. The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease. *Biochem. Soc. Trans.* 44:1185-1200.
- Baker PJ, Poultney C, Liu Z, Gross R, Montclare JK. 2012. Identification and comparison of cutinases for synthetic polyester degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 93:229-240.
- Banani SF, Lee HO, Hyman AA, Rosen MK. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18:285–298.
- Barlow DE, Biffinger JC, Cockrell-Zugell AL, Lo M, Kjoller K, Cook D, Lee WK, Pehrsson PE, Crookes-Goodson WJ, Hung CS, Nadeau LJ, Russell JN. 2016. The importance of correcting for variable probe-sample interactions in AFM-IR spectroscopy: AFM-IR of dried bacteria on a polyurethane film. *Analyst.* 141:4848–4854.
- Barrero JJ, Casler JC, Valero F, Ferrer P, Glick BS. 2018. An improved secretion signal enhances the secretion of model proteins from *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.* 17(1):161.

- Bayan R, Karak N. 2017. Renewable resource modified polyol derived aliphatic hyperbranched polyurethane as a biodegradable and UV-resistant smart material. *Polym. Int.* 66:839–850.
- Biffinger JC, Barlow DE, Pirlo RK, Babson DM, Fitzgerald LA, Zingarelli S, Nadeau LJ, Crookes-Goodson WJ, Russell JN. 2014. A direct quantitative agar plate based assay for analysis of *Pseudomonas protegens* Pf-5 degradation of polyurethane films. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 95:311–319.
- Biffinger JC, Barlow DE, Cockrell AL, Cusick KD, Hervey WJ, Fitzgerald LA, Nadeau LJ, Hung CS, Crookes-Goodson WJ, Russell JN. 2015. The applicability of Impraniil®DLN for gauging the biodegradation of polyurethanes. *Polym. Degrad. Stab.* 120:178–185.
- Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.* 26(1):73-81.
- Brake AJ, Merryweather JP, Coit DG, Heberlein UA, Masiarz FR, Mullenbach GT, Urdea MS, Valenzuela P, Barr PJ. 1984. Alpha-factor-directed synthesis and secretion of mature foreign proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 81(15):4642–4646.
- Brodsky JL, Skach WR. 2011. Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum: Recent lessons from yeast and mammalian cell systems. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23(4):464–475.
- Brunner I, Fischer M, Ruthi J, Stierli B, Frey B. 2018. Ability of fungi isolated from plastic debris floating in the shoreline of a lake to degrade plastics. *PLoS ONE* 13(8): e0202047.
- Brzeska J, Heimowska A, Sikorska W, Jasińska-Walc L, Kowalczyk M, Rutkowska M. 2015. Chemical and enzymatic hydrolysis of polyurethane/polylactide blends. *Int. J. Polym. Sci.* 1–8.
- Campinez MD, Aguilar-de-Leyva A, Ferris C, de Paz MV, Galbis JA, Caraballo I. 2013. Study of the properties of the new biodegradable polyurethane PU (TEGHMDI) as matrix forming excipient for controlled drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39:1758–1764.
- Cangemi JM, Claro Neto S, Chierice GO, Santos AM. 2006. Study of the biodegradation of a polymer derived from castor oil by scanning electron microscopy, thermogravimetry and infrared spectroscopy. *Polymers.* 16:129–135.
- Cangemi J, Santos A, Neto S, Chierice G. 2008. Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. *Polímeros* 18:201–206.
- Castro-Rodríguez JA. 2017. Mejoramiento de la producción de la cutinasa Ancy1 utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Tesis de MC. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- Chang A, Jeske L, Ulbrich S, Hofmann J, Koblitz J, Schomburg I, Neumann-Schaal M, Jahn D, Schomburg D. 2021. BRENDA, the ELIXIR core data resource in 2021: new developments and updates. *Nucleic Acids Res.*, 49:D498-D508.
- Chavarría-Quintanilla I. 2021. Identificación de los genes que codifican la(s) cutinasa(s) con posible actividad degradativa sobre el poliuretano en el hongo *Cladosporium tenuissimum* cepa A3.I.1. Tesis de MC. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- Chen Y, Liu Z, Han S, Han J, Jiang D. 2016. Poly(propylene carbonate) polyurethane self-polishing coating for marine antifouling application. *J. Appl. Polym. Sci.* 133:43667.

- Chong S y Mir M. 2021. Towards Decoding the Sequence-Based Grammar Governing the Functions of Intrinsically Disordered Protein Regions. *J. Mol. Biol.* 433:166724.
- Christenson E M, Patel S, Anderson J M, Hiltner A. 2006. Enzymatic degradation of poly(ether urethane) and poly(carbonate urethane) by cholesterol esterase. *Biomaterials.* 27:3920–3926.
- Chu X, Sun T, Li Q, Xu Y, Zhang Z, Lai L, Pei J. 2022. Prediction of liquid–liquid phase separating proteins using machine learning. *BMC Bioinformatics.* 23:72.
- Ciardelli G, Rechichi A, Cerrai P, Tricoli M, Barbani N, Giusti P. 2004. Segmented polyurethanes for medical applications: synthesis, characterization and in vitro enzymatic degradation studies, *Macromolecular Symposia.* Wiley Online Library. 261–272.
- Clerc I, Sagar A, Barducci A, Sibille N, Bernadó P, Cortés J. 2021. The diversity of molecular interactions involving intrinsically disordered proteins: A molecular modeling perspective. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 19:3817–3828.
- Contreras-Martos S, Nguyen HH, Nguyen PN, Hristozova N, Macossay-Castillo M, Kovacs D, Bekesi A, Oemig JS, Maes D, Pauwels K, Tompa P, Lebrun P. 2016. Quantification of intrinsically disordered proteins: a problem not fully appreciated. *Front. Mol. Biosci.* 5:83
- Cooney J. 1969. Effects of polyurethane foams on microbial growth in fuel-water systems. *Appl. Microbiol.* 17:227–231.
- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 33:103–113.
- Cregut M, Bedas M, Durand MJ, Thouand G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol. Adv.* 31:1634–1647.
- Crookes-Goodson WJ, Bojanowski CL, Kay ML, Lloyd PF, Blankemeier A, Hurtubise JM, Singh KM, Barlow DE, Ladouceur HD, Matt Eby D, Johnson GR, Mirau PA, Pehrsson PE, Fraser HL, Russell JN. 2013. The impact of culture medium on the development and physiology of biofilms of *Pseudomonas fluorescens* formed on polyurethane paint. *Biofouling.* 29:601–615.
- Curia R, Milani M, Didenko L, Avtandilov G, Shevlyagina N, Smirnova T. 2014. Beyond the biodestruction of polyurethane: *S. aureus* uptake of nanoparticles is a challenge for toxicology. *Microscopy.* 1:16–23.
- Daemi H, Rajabi-Zeleti S, Sardon H, Barikani M, Khademhosseini A, Baharvand H. 2016. A robust super-tough biodegradable elastomer engineered by supramolecular ionic interactions. *Biomaterials.* 84:54–63.
- Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, Cregg JM, Old LJ, Batt CA. 2007. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74(2):381–389.
- de Castro AM, 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. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 44:835–844.

- Di Bisceglie F, Quartinello F, Vielnascher R, Guebitz G M, Pellis A. 2022. Cutinase-catalyzed polyester-polyurethane degradation: Elucidation of the hydrolysis mechanism. *Polymers*. 14:411.
- Dimarogona M, Nikolaivits E, Kanelli M, Christakopoulos P, Sandgren M, Topakas E. 2015. Structural and functional studies of a *Fusarium oxysporum* cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochim. Biophys. Acta*. 1850:2308-2317.
- Duarah R, Singh YP, Mandal BB, Karak N. 2016. Sustainable starch modified polyol based tough, biocompatible, hyperbranched polyurethane with a shape memory attribute. *New J. Chem*. 40:5152–5163.
- Edmonds P, Cooney J. 1968. Microbial growth in a fuel-water system containing polyesterurethane foam. *Appl. Microbiol*. 16:426-427.
- Egmond MR, de Vlieg J. 2000. *Fusarium solani pisi* cutinase. *Biochimie*, 82:1015-1021.
- Elliott S, Fromstein JP, Santerre J, Woodhouse K. 2002. Identification of biodegradation products formed by L-phenylalanine based segmented polyurethaneureas. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed*. 13:691–711.
- El-Sayed A, Mahmoud W, Davis E, Coughlin R. 1996. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 37:69–79.
- Emenecker RJ, Griffith D, Holehouse AS. 2021. Metapredict: a fast, accurate, and easy-to-use predictor of consensus disorder and structure. *Biophys. J*. 120:4312–9.
- Fang J, Ye SH, Shankarraman V, Huang Y, Mo X, Wagner WR. 2014. Biodegradable poly(ester urethane)urea elastomers with variable amino content for subsequent functionalization with phosphorylcholine. *Acta Biomater*. 10:4639–4649.
- Feng X, Wang G, Neumann K, Yao W, Ding L, Li S, Sheng Y, Jiang Y, Bradley M, Zhang R. 2017. Synthesis and characterization of biodegradable poly(etherester) urethane acrylates for controlled drug release. *Mater. Sci. Eng. C*. 74:270–278.
- Fernandes IP, Barbosa M, Amaral JS, Pinto V, Rodrigues JL, Ferreira MJ, Barreiro MF. 2016. Biobased additives as biodegradability enhancers with application in TPU-based footwear components. *J. Renew. Mater*. 4:47–56.
- Ferris C, Violante de Paz M, Zamora F, Galbis J.A. 2010. Dithiothreitol-based polyurethanes. Synthesis and degradation studies. *Polym. Degrad. Stab*. 95:1480–1487.
- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 7:277–280.
- Fitzgerald I, Glick BS. 2014. Secretion of a foreign protein from budding yeasts is enhanced by cotranslational translocation and by suppression of vacuolar targeting. *Microb. Cell Fact*. 13(1):125.
- Freudl R. 2018. Signal peptides for recombinant protein secretion in bacterial expression systems. *Microb. Cell Fact*. 17:52(1-10).
- Gamerith C, Herrero Acero E, Pellis A, Ortner A, Vielnascher R, Luschnig D, Zartl B, Haernvall K, Zitzenbacher S, Strohmeier G, Hoff O, Steinkellner G, Gruber K, Ribitsch D, Guebitz GM. 2016. Improving enzymatic polyurethane hydrolysis by tuning enzyme sorption. *Polym. Degrad. Stab*. 132:69–77.
- Gamerith C, Vastano M, Ghorbanpour SM, Zitzenbacher S, Ribitsch D, Zumstein MT, Sander M, Herrero Acero E, Pellis A, Guebitz GM. 2017. Enzymatic degradation of

- aromatic and aliphatic polyesters by *P. pastoris* expressed cutinase 1 from *Thermobifida cellulositytica*. *Front. Microbiol.* 8:938.
- García-Bernal. 2023. Análisis de la actividad biodegradativa de proteínas codificadas por genes sobre-expresados durante el crecimiento del hongo *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 en poliuretano. Tesis de MC. Posgrado en C. Bioquímicas, UNAM.
- Gautam BA, Yanful EK, Cullen E. 2007. Biodegradation of automotive waste polyester polyurethane foam using *Pseudomonas chlororaphis* ATCC55729. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 60:245–249.
- Gautam BA, Yanful EK. 2007b. *Candida rugosa* lipase-catalyzed polyurethane degradation in aqueous medium. *Biotechnol. Lett.* 29:1081–1086.
- Goetz RM, Fuglsang A. 2005. Correlation of codon bias measures with mRNA levels: analysis of transcriptome data from *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327:4–7.
- Gogoi G, Karak N. 2017. Waterborne hyperbranched poly(ester amide urethane) thermoset: mechanical, thermal and biodegradation behaviors. *Polym. Degrad. Stab.* 143:155–163.
- Gogoi S, Karak N. 2014. Biobased biodegradable waterborne hyperbranched polyurethane as an ecofriendly sustainable material. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2:2730–2738.
- Gogoi S, Karak N. 2015. Bio-based high-performance waterborne hyperbranched polyurethane thermoset. *Polym. Adv. Technol.* 26:589–596.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView Version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* 27:221–224.
- Gupta R, Brunak S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput.* 310-22.
- Han M, Yu X. 2015. Enhanced expression of heterologous proteins in yeast cells via the modification of N-glycosylation sites. *Bioengineered.* 6(2)115–118.
- Hashimoto M, Fukui M, Hayano K, Hayatsu M. 2002. Nucleotide sequence and genetic structure of a novel carbaryl hydrolase gene (*cehA*) from *Rhizobium* sp. strain AC100. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1220-1227.
- Henry I, Sharp PM. 2007. Predicting gene expression level from codon usage bias. *Mol. Biol. Evol.* 24:10–12.
- Herrero Acero E, Ribitsch D, Steinkellner G, Gruber K, Greimel K, Eiteljoerg I, Trotscha E, Wei R, Zimmermann W, Zinn M, Cavaco-Paulo A, Freddi G, Schwab H, Guebitz G. 2011. Enzymatic surface hydrolysis of PET: Effect of structural diversity on kinetic properties of cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules.* 44:4632–4640.
- Hong R, Su L, Wu J. 2019. Cutinases catalyze polyacrylate hydrolysis and prevent their aggregation. *Polym. Degrad. Stab.* 159:23–30.
- Howard G, Mackie R, Cann I, Ohene-Adjei S, Aboudehen K, Duos B, Childers G. 2007. Effect of insertional mutations in the *pueA* and *pueB* genes encoding two polyurethanases in *Pseudomonas chlororaphis* contained within a gene cluster. *J. Appl. Microbiol.* 103:2074–2083.

- Howard G, Norton W, Burks T. 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation* 23: 561–573.
- Howard G, Crother B, Vicknair J. 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (pueB) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 47:141–149.
- Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester–polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase–protease enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42:213–220.
- Hu X, Gao Z, Wang Z, Su T, Yang L, Li P. 2016. Enzymatic degradation of poly(butylene succinate) by cutinase cloned from *Fusarium solani*. *Polym. Degrad. and Stab.* 134:211–219.
- Hung CS, Zingarelli S, Nadeau LJ, Biffinger JC, Drake CA, Crouch AL, Barlow DE, Russell JN, Crookes-Goodson WJ. 2016. Carbon catabolite repression and impranil polyurethane degradation in *Pseudomonas protegens* strain Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 82:6080–6090.
- Ibrahim N, Ibrahim AM, Hameed KM, Saadoun IM, Maswadeh HM, Nakajima-Kambe T. 2009. Polyester-polyurethane biodegradation by *Alternaria solani*, isolated from Northern Jordan. *Adv. Environ. Biol.* 3:162–170.
- Ingram Z, Patkar A, Oh D, Zhang KK, Chung C, Lin-Cereghino J, Lin-Cereghino GP. 2021. Overcoming Obstacles in Protein Expression in the Yeast *Pichia pastoris*: Interviews of Leaders in the Pichia Field. *Pac. J. Health*: 4:1, Article 2.
- Invitrogen. 2010. pPICZ α A, B, and C User Manual. Carlsbad, CA.
- li R, Norton W, Howard G. 1998. Adherence and growth of a *Bacillus* species on an insoluble polyester polyurethane. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42:63–73.
- Ionescu M. 2005. Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes. iSmithers Rapra Publishing.
- Islam S, Apitius L, Jakob F, Schwaneberg U. 2019. Targeting microplastic particles in the void of diluted suspensions. *Environm. Int.* 123:428–435.
- Jansen B, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Pulverer G. 1991. Evidence for degradation of synthetic polyurethanes by *Staphylococcus epidermidis*. *Zentralblatt für Bakteriologie.* 276:36–45.
- Jiakang R, Yixin H, Yu Y. 2020. Microbial degradation and valorization of plastic wastes. *Front. Microb.* 11:442.
- Jiang X, Li J, Ding M, Tan H, Ling Q, Zhong Y, Fu Q. 2007. Synthesis and degradation of nontoxic biodegradable waterborne polyurethanes elastomer with poly(ϵ -caprolactone) and poly (ethylene glycol) as soft segment. *Eur. Polym. J.* 43:1838–1846.
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SAA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D. 2021. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 596:583–589.

- Kai Zhang, Jiege Hu, Shuai Yang, Wei Xu, Zhichao Wang, Peiwen Zhuang, Hans-Peter Grossart, Zhuhua Luo. 2022. Biodegradation of polyester polyurethane by the marine fungus *Cladosporium halotolerans* 6UPA1. *J. Hazard. Mater.* 437: 129406
- Kamini, Shetty D, Trivedi VD, Varunjikar M, Phale PS. 2018. Compartmentalization of the carbaryl degradation pathway: molecular characterization of inducible periplasmic carbaryl hydrolase from *Pseudomonas* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 84:2115-17.
- Kanavel G, Koons P, Lauer R. 1966. Fungus resistance of millable urethans. *Rubber Chem. Technol.* 39:1338–1346.
- Kang CH, Oh KH, Lee MH, Oh TK, Kim BH, Yoon J. 2011. A novel family VII esterase with industrial potential from compost metagenomic library. *Microb. Cell Factories.* 10:41(1-8).
- Kawai F, Oda M, Tamashiro T, Waku T, Tanaka N, Yamamoto M, Mizushima H, Miyakawa T, Tanokura M. 2014. A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:10053-64.
- Kay M, McCabe R, Morton L. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 31:209–225.
- Kay M, Morton L, Prince E. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int. Biodeterior.* 27:205–222.
- Kemona, Piotrowska. 2020. PU recycling and disposal: methods and prospects. *Polymers.* 12:1752.
- Khan S, Nadir S, Shah ZU, Shah AA, Karunarathna SC, Xu J, Khan A, Munir S, Hasan F. 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environ. Pollut.* 225:469–480.
- Khruengsai S, Sripahco T, Pripdeevech P. 2022. Biodegradation of polyester polyurethane by *Embarria clematidis*. *Front. Microbiol.* 13:874842.
- Kim YD, Kim SC. 1998. Effect of chemical structure on the biodegradation of polyurethanes under composting conditions. *Polym. Degrad. Stab.* 62:343–352.
- Kim YH, Ahn JY, Moon SH, Lee J. 2005. Biodegradation and detoxification of organophosphate insecticide, malathion by *Fusarium oxysporum* f. sp. Pisi cutinase. *Chemosphere.* 60:1349-55.
- Kitadokoro K, Kakara M, Matsui S, Osokoshi R, Thumarat U, Kawai F, Kamitan S. 2019. Structural insights into the unique polylactate-degrading mechanism of *Thermobifida alba* cutinase. *FEBS J.* 286:2087–2098.
- Kodama Y, Masaki K, Kondo H, Suzuki M, Tsuda S, Nagura T, Shimba N, Suzuki E, Iefuji H. 2009. Crystal structure and enhanced activity of a cutinase-like enzyme from *Cryptococcus* sp. Strain S-2. *Proteins.* 77:710-717.
- Kwon MA, Kim HS, Yang TH, Song BK, Song JK. 2009. Protein Expr. Purif. 68:104-9.
- Langlois P, Howard G T. 2002. A single glycine-rich repeat of *Pseudomonas chlororaphis* Polyurethanase A mediates secretion of a GST fusion protein in *Escherichia coli*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50:121–126.
- Li BH, Yang MC. 2006. Improvement of thermal and mechanical properties of poly(L-lactic acid) with 4, 4-methylene diphenyl diisocyanate. *Polym. Adv. Technol.* 17:439–443.

- Li S, Wu F, Wang Y, Zeng J. 2015. Biobased thermoplastic poly(ester urethane) elastomers consisting of poly(butylene succinate) and poly(propylene succinate). *Ind. Eng. Chem. Res.* 54:6258–6268.
- Liu Z, Gosser Y, Baker PJ, Ravee Y, Lu Z, Alemu G, Li H, Butterfoss G, Kong X, Gross R, Montclare K. 2009. Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *J. Am. Chem. Soc.* 131:15711–15716.
- Liu J, He J, Xue R, Xu B, Qian X, Xin F, Blank LM, Zhou J, Wei R, Dong W, Jiang M. 2021. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: Progress, challenges, and prospects. *Biotech. Advan.* 48:107730.
- Liu K, Su Z, Miao S, Ma G, Zhang S. 2016. Enzymatic waterborne polyurethane towards a robust and environmentally friendly anti-biofouling coating. *RSC Adv.* 6:31698–31704.
- Magnin A, Hoornaert L, Pollet E, Laurichesse S, Phalip V, Avérous L. 2018. Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microb. Biotechnol.* 12:544–555.
- Magnin A, Pollet E, Perrin R, Ullmann C, Persillon C, Phalip V, Avérous L. 2019. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste. Manag.* 85:141–150.
- Magnin A, Pollet E, Phalip V, Avérous L. 2020. Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotech. Advan.* 39:107457.
- Mahajan N, Gupta P. 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *RSC Adv.* 5:41839–41854.
- Malagrino F, Pennacchietti V, Santorelli D, Pagano L, Nardella C, Diop A, Toto A, Gianni S. 2022. On the effects of disordered tails, supertertiary structure and quinary interactions on the folding and function of protein domains. *Biomolecules.* 12:209.
- Marchant R, Zhao Q, Anderson J, Hiltner A. 1987. Degradation of a poly (ether urethane urea) elastomer: infra-red and XPS studies. *Polymer.* 28:2032–2039.
- Martinez C, Nicolas A, van Tilbeurgh H, Egloff MP, Cudrey C, Verger R, Cambillau C. 1994. Cutinase, a lipolytic enzyme with a preformed oxyanion hole. *Biochemistry.* 33(1):83-9.
- Masaki K, Kamini NR, Ikeda H, Iefuji H. 2005. Cutinase-like enzyme from the yeast *Cryptococcus* sp. strain S-2 hydrolyzes polylactic acid and other biodegradable plastics. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:7548-50.
- Masaki K, Fujihara K, Kakizono D, Mizukure T, Okuda M, Mukai N. 2020. *Aspergillus oryzae* acetamidase catalyzes degradation of ethyl carbamate. *J. Biosci. Bioeng.* 130:577–581.
- Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 167:1595–1602.
- Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethanedegrading microorganism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *J. Appl. Microbiol.* 108:1946–1953.
- Mendelzon D. 1986. Mecanismo de glicosilación de proteínas en organismos de las proteínas en organismos de la familia *Trypanosomatidae*. Facultad de ciencias exactas y naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp 10-27.

- Millard PS, Bugge K, Marabini R, Boomsma W, Burow M, Kragelund BB. 2020. IDDomainSpotter: compositional bias reveals domains in long disordered protein regions -insights from transcription factors. *Protein Sci.* 29(1):169–183.
- Mukherjee K, Tribedi P, Chowdhury A, Ray T, Joardar A, Giri S, Sil A.K. 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation.* 22:377–388.
- Murphy CA, Cameron JA, Huang SJ, Vinopal RT. 1996. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:456-460.
- Nair S, Kumar P. 2007. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23:1441–1449.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:39-42.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Akutsu Y, Nakahara T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J. Ferment. Bioeng.* 83:456–460.
- Nielsen JT, Mulder FAA. 2019. Quality and bias of protein disorder predictors. *Sci. Rep.* 9:1–11.
- Ng WS, Lee CS, Chuah CH, Cheng S. 2017. Preparation and modification of water-blown porous biodegradable polyurethane foams with palm oil-based polyester polyol. *Ind. Crop. Prod.* 97:65–78.
- Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J. Ferment. Bioeng.* 86:339–345.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-Garcia A, Lopez N, Bolanos-Nunez S, Cruz-Gomez MJ, Wacher C, Loza-Tavera H, 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6214–6223.
- Oprea S, Potolinca VO, Gradinariu P, Joga A, Oprea V. 2016. Synthesis, properties, and fungal degradation of castor-oil-based polyurethane composites with different cellulose contents. *Cellulose.* 23:2515–2526.
- Oprea S, Potolinca VO, Gradinariu P, Oprea V. 2018. Biodegradation of pyridinebased polyether polyurethanes by the *Alternaria tenuissima* fungus. *J. Appl. Polym. Sci.* 135:46096.
- Oprea S, Doroftei F. 2011. Biodegradation of polyurethane acrylate with acrylate depoxidized soybean oil blend elastomers by *Chaetomium globosum*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 65:533–538.
- Osman M, Satti M, Luqman A, Hasan F, Shah Z, Shah A. 2018. Degradation of polyester polyurethane by *Aspergillus* sp. strain S45 isolated from soil. *J. Polym. Environ.* 26:301–310.
- Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. 1996. The biodegradation of low-molecularweight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:244–248.

- Owji H, Nezafat N, Negahdaripour M, Hajiebrahimi A, Ghasemi Y. 2018. A comprehensive review of signal peptides: Structure, roles, and applications. *Eur. J. Cell Biol.* 97:422–441.
- Ozaki S. 1972. Recent advances in isocyanate chemistry. *Chem. Rev.* 72:457–496.
- Pantaleón Legorreta JR. 2022. Efecto del tiempo de expresión y la concentración del metanol en la producción recombinante de la proteína M271 en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura en Biología, UNAM.
- Pedersen CP, Seiffert P, Brakti I, Bugge K. 2020. Production of intrinsically disordered proteins for biophysical studies: Tips and tricks. *Methods Mol. Biol.* 2141:195-209.
- Peng C, Guo Y, Ren S, Li C, Liu F, Lu F. 2022. SPSED: A signal peptide secretion efficiency database. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9:819789.
- Peng YH, Shih YH, Lai YC, Liu YZ, Liu YT, Lin NC. 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21: 9529-9537.
- Peña-Montes C, Bermúdez-García E, Morales-García S, Farrés A. 2018. Las cutinasas como una herramienta valiosa para la descontaminación de residuos plásticos. *Mens. Bioquim.* 42:24-35.
- Pérez-Lara LF, Vargas-Suárez M, López-Castillo NN., Cruz-Gómez MJ, Loza-Tavera H. 2016. Preliminary study on the biodegradation of adipate/phthalate polyester polyurethanes of commercial-type by *Alicyclophilus* sp. BQ8. *J. Appl. Polym. Sci.* 133:42992.
- Perz V, Bleymaier K, Sinkel C, Kueper U, Bonnekessel M, Ribitsch D, Guebitz G M. 2016. Substrate specificities of cutinases on aliphatic–aromatic polyesters and on their model substrates. *New Biotech.* 33:295-304.
- Phua S, Castillo E, Anderson J, Hiltner A. 1987. Biodegradation of a polyurethane in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 21:231–246.
- Ping LF, Chen XY, Yuan XL, Zhang M, Chai YJ, Shan SD. 2017. Application and comparison in biosynthesis and biodegradation by *Fusarium solani* and *Aspergillus fumigatus* cutinases. *Int. J. Biol. Macromol.* 104:1238–1245.
- Plastics Europe. 2020. <https://www.plasticseurope.org/es/resources/market-data>. Consultado el 30/08/2021.
- Plastics Europe. 2021. <https://www.plasticseurope.org/es/resources/market-data>. Consultado el 20/05/2022.
- Plastics Europe. 2022. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>. Consultado el 21/11/2022.
- Plastics Europe. 2023. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>. Consultado el 25/02/2024.
- Puigbo P, Guzmán E, Romeu A, Garcia-Vallvé S. 2007. OPTIMIZER: A web server for optimizing the codon usage of DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 35:W126-W131.
- Quax TEF, Claassens NJ, Sołł D, van der Oost J. 2015. Codon bias as a means to fine-tune gene expression. *Mol. Cell.* 59:149–161.
- Radoman B, Grünwald-Gruber C, Schmelzer B, Zavec D, Gasser B, Altmann F, Mattanovich D. 2021. The Degree and Length of O-Glycosylation of Recombinant Proteins Produced in *Pichia pastoris* Depends on the Nature of the Protein and the Process Type. *Biotechnol J.* 16(3):e2000266.

- Rafiemanzelat F, Fathollahi Zonouz A, Emtiazi G. 2013. Synthesis of new poly(etherurethane-urea)s based on amino acid cyclopeptide and PEG: study of their environmental degradation. *Amino Acids*. 44:449–459.
- Rafiemanzelat F, Jafari M, Emtiazi G. 2015. Study of biological degradation of new poly(ether-urethane-urea)s containing cyclopeptide moiety and PEG by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from soil. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177:842–860.
- Ratner B, Gladhill K, Horbett T. 1988. Analysis of in vitro enzymatic and oxidative degradation of polyurethanes. *J. Biomed. Mater. Res.* 22:509–527.
- Ribitsch D, Herrero Acero E, Greimel KJ, Eiteljörg I, Trotscha E, Freddi G, Schwab H, Gübitz G. 2012. Characterization of a new cutinase from *Thermobifida alba* regarding PET-surface hydrolysis. *Biocatal. Biotransformation.* 30:2-9.
- Roussel A, Amara S, Nyssölä A, Mateos-Diaz E, Blangy S, Kontkanen H, Westerholm-Parvinen A, Carrière F, Cambillau C. 2014. A cutinase from *Trichoderma reesei* with a lid-covered active site and kinetic properties of true lipases. *J. Mol. Biol.* 426:3757–3772.
- Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50:33–40.
- Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:43–47.
- Ruiz C, Howard GT. 1999. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (pula) from *Pseudomonas fluorescens*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 44:127–131.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Nunez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Vargas MP, Boulanger LA, Bascom-Slack C, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:6076–6084.
- Santerre J, Labow R, Adams G. 1993. Enzyme–biomaterial interactions: effect of biosystems on degradation of polyurethanes. *J. Biomed. Mater. Res. A* 27:97–109.
- Santerre J, Labow R, Duguay D, Erfle D, Adams G. 1994. Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *J. Biomed. Mater. Res. A* 28:1187–1199.
- Schmidt C, Krauth T, Wagner S. 2017a. Export of plastic debris by rivers into the sea. *Environ. Sci. Technol.* 51:12246–12253.
- Schmidt J, Wei R, Oeser T, Dedavid E Silva LA, Breite D, Schulze A, Zimmermann W. 2017b. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. *Polymers.* 9:65.
- Schöne AC, Kratz K, Schulz B, Lendlein A. 2016. Polymer architecture versus chemical structure as adjusting tools for the enzymatic degradation of oligo(ϵ -caprolactone) based films at the air-water interface. *Polym. Degrad. Stab.* 131:114–121.
- Seman WM, Bakar SA, Bukhari NA, Gaspar SM, Othman R, Nathan S, Mahadi NM, Jahim J, Murad AM, Bakar FD. 2004. *J. Biotechnol.* 184:219-228.
- Shah A., Hasan F, Akhter J, Hameed A, Ahmed S. 2008a. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Ann. Microbiol.* 58:381.

- Shah Z, Krumholz L, Aktas D, Hasan F, Khattak M, Shah A. 2013b. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*. 24:865.
- Shah Z, Shah A, Hasan F, Gulzar M. 2016. Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil. *Polym. Degrad. Stab.* 134:349–356.
- Shah, Z, Hasan F, Krumholz L, Aktas D, Shah A. 2013a. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GCMS. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 77:114–122.
- Shi K, Jing J, Song L, Su T, Wang Z. 2020. Enzymatic hydrolysis of polyester: Degradation of poly(ϵ -caprolactone) by *Candida antarctica* lipase and *Fusarium solani* cutinase. *Int. J. Biol. Macromol.* 144:183–189.
- Shuttleworth WA, Seal KJ. 1986. A rapid technique for evaluating the biodeterioration potential of polyurethane elastomers. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23:407–409.
- Skleničková K, Abbrent S, Halecký M, Kočí V, Beneš H. 2020. Biodegradability and ecotoxicity of polyurethane foams: A review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–46.
- Smith R, Williams D, Oliver C. 1987. The biodegradation of poly (ether urethanes). *J. Biomed. Mater. Res. A* 21:1149–1165.
- Spontón M, Casis N, Mazo P, Raud B, Simonetta A, Ríos L, Estenoz D. 2013. Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 85:85–94.
- Steenoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong Y, Vester-Christensen MB, Schjoldager KT, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Levery SB, Clausen H. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J*, 32(10):1478-88.
- Stern RV, Howard GT. 2000. The polyester polyurethanase gene (pueA) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol. Lett.* 185:163–168.
- Sun L, Gao X, Chen W, Huang K, Bai N, Lyu W, Liu H. 2019. Characterization of the prophan biodegradation pathway in *Starkeya* sp. strain YW6 and cloning of a novel amidase gene *mmH*. *J. Agric. Food Chem.* 67:4193–4199.
- Tagle Gil M. 2020. Evaluación de diferentes cepas de *Pichia pastoris* para la producción de cutinasas. Tesis de Licenciatura en Química de Alimentos, UNAM.
- Takamoto T, Shirasaka H, Uyama H, Kobayashi S. 2001. Lipase-catalyzed hydrolytic degradation of polyurethane in organic solvent. *Chem. Lett.* 30:492–493.
- Tang Y, Labow R, Santerre J. 2001a. Enzyme-induced biodegradation of polycarbonate-polyurethanes: dependence on hard-segment chemistry. *J. Biomed. Mater. Res. A* 57:597–611.
- Tang Y, Labow R, Santerre J. 2001b. Enzyme-induced biodegradation of polycarbonate polyurethanes: dependence on hard-segment concentration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 56:516–528.
- Tang Y, Labow R, Santerre J. 2003. Isolation of methylene dianiline and aqueous-soluble biodegradation products from polycarbonate-polyurethanes. *Biomaterials.* 24:2805–2819.
- Thirunavukarasu K, Purushothaman S, Gowthaman M K, Nakajima-Kambe T, Rose C, Kamini N R. 2015. Utilization of fish meal and fish oil for production of *Cryptococcus*

- sp. MTCC 5455 lipase and hydrolysis of polyurethane thereof. *J. Food Sci. Technol.* 52:5772–5780.
- Tokiwa Y, Suzuki T, Takeda K. 1988. Two types of lipases in hydrolysis of polyester. *Agric. Biol. Chem.* 52:1937–1943.
- Vázquez-Alcántara L, Oliart-Ros RM, García-Bórquez A, Peña-Montes C. 2021. Expression of a cutinase of *Moniliophthora roreri* with polyester and PET-plastic residues degradation activity. *Microbiol. Spectr.* 9:e00976-21.
- Vega RE, Main T, Howard GT. 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:49–55.
- von Heijne G. 1990. The signal peptide. *J. Membr. Biol.* 115:195–201.
- von Heijne G. 1998. Life and death of a signal peptide. *Nature.* 396:111–113.
- Wang G, Labow R, Santerre J. 1997a. Biodegradation of a poly (ester) urea-urethane by cholesterol esterase: isolation and identification of principal biodegradation products. *J. Biomed. Mater. Res.* 36:407–417.
- Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee YM, Bostock RM. 2002. *Fungal Genet. Biol.* 35:261-76.
- Wang N, Wang KY, Xu F, Li G, Liu D. 2020. The effect of N-glycosylation on the expression of the tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif.* 166:105503.
- Watanabe T, Suzuki K, Shinozaki Y, Yarimizu T, Yoshida S, Sameshima-Yamashita Y, Koitabashi M, Kitamoto H K. 2015. A UV-induced mutant of *Cryptococcus flavus* GB-1 with increased production of a biodegradable plastic-degrading enzyme. *Process Biochem.* 50:1718-1724.
- Wei R, Oeser T, Schmidt J, Meier R, Barth M, Then J, Zimmermann W. 2016. Engineered bacterial polyester hydrolases efficiently degrade polyethylene terephthalate due to relieved product inhibition. *Biotechnol. Bioeng.* 113:1658–1665.
- Weis R, Luiten R, Skranc W, Schwab H, Wubbolts M, Glieder A. 2004. Reliable high-throughput screening with *Pichia pastoris* by limiting yeast cell death phenomena. *FEMS Yeast Res.* 2:179–189.
- Weis R. 2019. High-Throughput Screening and Selection of *Pichia pastoris* Strains. *Methods Mol. Biol.* 1923:169–185.
- Woo G, Mittelman M, Santerre J. 2000. Synthesis and characterization of a novel biodegradable antimicrobial polymer. *Biomaterials.* 21:1235–1246.
- Wright F. 1990. The 'effective number of codons' used in a gene. *Gene* 87:23–29.
- Wu Y, Wang L, Guo B, Shao Y, Ma X. 2016. Electroactive biodegradable polyurethane significantly enhanced Schwann cells myelin gene expression and neurotrophin secretion for peripheral nerve tissue engineering. *Biomaterials.* 87:18–31.
- Xu W, Ma C, Ma J, Gan T, Zhang G. 2014. Marine biofouling resistance of polyurethane with biodegradation and hydrolyzation. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 6:4017–4024.
- Yamamoto N, Nakayama A, Oshima M, Kawasaki N, Aiba S. 2007. Enzymatic hydrolysis of lysine diisocyanate based polyurethanes and segmented polyurethane ureas by various proteases. *React. Funct. Polym.* 67:1338–1345.
- Yang S, Xu H, Yan Q, Liu Y, Zhou P, Jiang Z. 2013. A low molecular mass cutinase of *Thielavia terrestris* efficiently hydrolyzes poly(esters). *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:217–226.

- Yang S, Liu M, Long L, Zhang R, Ding S. 2018. Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. *Process Biochem.* 66:106–112.
- Zhang L, Hang P, Zhou X, Dai C, He Z, Jiang J. 2020. Mineralization of the herbicide swep by a two-strain consortium and characterization of a new amidase for hydrolyzing swep. *Microb. Cell Fact.* 19:4.
- Zhao Q, Marchant R, Anderson J, Hiltner A. 1987. Long term biodegradation in vitro of poly(ether urethane urea): a mechanical property study. *Polymer.* 28:2040–2046.
- Zhou L, Liang D, He X, Li J, Tan H, Li J, Fu Q, Gu Q. 2012. The degradation and biocompatibility of pH-sensitive biodegradable polyurethanes for intracellular multifunctional antitumor drug delivery. *Biomaterials.* 33:2734–2745.
- Zhou X, Xie W. 2017. Synthesis and characterization of poly(ester ether urethane)s block copolymers based on biodegradable poly(butylene succinate) and poly(ethylene glycol). *Polym. Degrad. Stab.* 140:147–155.
- Zicht T.J. 2017. Detection and analysis of polyurethane biodegradation due to *Cryptococcus laurentii*. Wright State University. Master's Thesis.

Anexo 1

Diseños de las construcciones de los genes de las proteínas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 a ser sintetizados y clonados en el vector de expresión pPICZαA

```

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA
TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG
GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT
GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT
ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA
GAG GCT GAA GCT GAA TTC CAG AGC GTT GGA ACT GGC TCA TGT ACC GAT GTC
CAC ATC TTC ATC GCT CGC GGA TGG AAC GAG AAC TAC CCC GGC CGC CAG GGT
GAC CTC ACC TCC GCT GTC TGT GCC AAC CTC TCT GGC ATG AGC TGT GAC TAC
GAG GAC ATC GCC TAC GAC GCT TAT TCC ACC GAC TAC TGC CCA TCT GTC GCA
GAC GGC GAG CTC CTC GCA TTG AAG CAG ATC AAT GCA TAC TAC GCC AAG TGC
CCC GAC ACT GCC ATC GTC TTG AGC GGT TAC TCC GAG GGT GCC ACC GTC CTC
GGA AAT GTT CTT GCT GGC GAC AGT GGC GAT GTC AAG TGC CCT ACC AGG GGA
CAC GCT GGC TTG ACT GAG ACC AAG TCT GGC GTC AGC TGC AAC ATC GCT GCC
GTC ACT TTG TTC GGC AAC CCC AGG CAC ACT GCC GAC CAG CCC TAC AAC GCT
CTG AAC GGA GGC GCT GGC CAG GCC AAC AGC CAC CGC GAT GCC GGT GGC CTT
GCT CGC CTT GCT GCC TAC ACC CCG AGA CTC CAG GAC TAC TGC AAC ATC GAC
GAC CTG GTC TGC GCT CCT GGC CTC GGT GCC GAT ACT GTC GAG GCT CAC ACC
AAC TAC TTC CAG CTG TAC AAC GCC CAG GCT GCC AAG TAC ATT GCC GAC ACC
GTC AAG GGA TAC TCC AAG GAC AAG TAC TGC TCC GTC GCC ACC AGC TCT TCC
TCC AGC AGT GCC TCT GCC TCT TCC ACC GCT TCT GCC AGC GGT TCT GTT ACC
TCT TCG GCC AGC GCC CAC GAG ACT GAG ATG TCC AGC GCC ACC GAC AAG TCC
AGC GCC CCT GCT ACT TAC TCT GCT CCC GAA TCC GTA CCT TAC ATC ACC GCC
ACC GAG GTG ACC AGC ATC TAC ACC ACC GTC TGC CCC CAG AGC AGC ATC TAC
AAC CAC GGC AAC GTG ACC CGC ACC TCC ACC TGG ACC GGC CCC TCC ACC GTG
ACC ACC TCG CTC CGC TCC ACC ACC ACC ATG ACC GTT CCT GCC ACC TAC ATT
CCC TCT CCC AAG CCC ATT AAG GAG ACT TCC ATC ACC ACC CTT TCC GGC ACC
CCC GCT GTC GTT CAG TAC ACC TCG ACC ATC ACC GTC ACC AAG TAT GCT AAC
TTC CCT ACG CTC ACG ATC ACT CTG GCC GTA CCC ACT GCC ACC TAC GTT ATC
GAC AAC AAC GGC AAG CCC AAG GGC CCC ATG GTG ACC GGC GTT GCC CCC AGC
GGA ACC GGT GCT GGC GCT GCC CAC CCC ACT GGC AGC TCT CCC CCA ATC ACT
CCT TAC ACC GGC GCT GCT AGC TCT TCC AGC GTT GCT GCC AAG TGG CTG GTC
ATT GCT GCT GCT GTT GCC GGC TTC ATG ATG ATC GAT GAC GAT GAC AAG AGT
CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT
CAT CAT CAT CAT CAT TGA
  
```

Fig. A1.1. Diseño de la secuencia de la enzima 6816 de A3.I.1 en fase con factor α , enzimas de restricción, sitio de reconocimiento a enterocinasa, c-myc y his-tag. Naranja: factor α ; Morado: *EcoRI* y *XbaI*; Azul: 6816; Rosa: sitio reconocimiento enterocinasa; Gris: c-myc; Verde: his-tag; Rojo: codón de paro.

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA
 TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG
 GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT
 GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT
 ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA
 GAG GCT GAA GCT GAA TTC GTT CCT ACT GGC ATT GAG CGC AGA CAG TTT GGC ATG ACC
 GAG AAC GAC TTG AAA TCC GGC AGC TGC AAA AAG ATC ACA CTC GTC TAC GCT CGT GGT TCC ACC
 GAA ATG GGC AAC ATG GGC TCT TCT CTT GGT CCC CCT ACT TGC AGT GGT CTT AAA AAG AAA TTC
 CCA GGT CAA GTA GCC TGC CAG GGT GTC GGA AGC CCC TAC AAT GCC GGC CTT GGT ACT AAT GCT
 CTT CCC GGA GAC GGG ACC AGC GCC GCT GCC TAC GGT GAG GCC GAG AAA ATG TTC AAC CTA GCC
 GCC TCT AAA TGT CCC GAC ACC ATC ATT GTT GGT GGC GGC TAC TCT CAA GGT GCA GCC GTC ATG
 GTC GCT TCC GTC AGA CGC CTG CCA GAA GCA ACC AAG GCC AAG ATG GCT GGC GTT GTG CTT TAC
 GGA AAC ACT CGC AAC CGT CAG GAG CAC GGC AAG ATT CCT AAC TTC CCT GAG GAC AAG GCC CTC
 ACT ATC TGC AAC GCC TCT GAT GGC GTT TGT GGT GGC GCC CTT CTG GTT ACT CCT GGT CAC CTC
 ACT TAC CAA ACC AAA GTC CCC AAG GCT GTC GAC TGG CTT GCG GAG CGC ATC CGC GCT CAA GAA
 AGC TCT GGC GGC AGC TCC TCC AGC AGT TCC GCG TCC TCG ACT GAC AGC AGC GCT TCT GAT GAT
 TCA AGC AGC TCT GGT AGC TCT ACC GGT TCT GGT GGT CTC TTT GGT GGC CTG CGT CGC CTG CGC
 GGT GCC AGC TCG GCT GCT GCA GAC ACC TCT GCT GAC ACC TCC ACC GCT TCT GAT AGC TCC TCC
 GAC TCT GGC GCC AGC ACT GGA TCT ACT GGT GGA AGC CGC TTC AGC AGC TTC CTC AGC AGA ATG
 CGT GGC ATG CGC GGT GGC AAG GAT GAC GAT GAC AAG AGT CTA GAA CAA AAA CTC
 ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT
TGA

Fig. A1.2. Diseño de la secuencia de la enzima 6962 de A3.I.1 en fase con factor α , enzimas de restricción, sitio de reconocimiento a enterocinasa, c-myc y his-tag. Naranja: factor α ; Morado: *EcoRI* y *XbaI*; Azul: 6962; Rosa: sitio reconocimiento enterocinasa; Gris: c-myc; Verde: his-tag; Rojo: codón de paro.

ATG AGA TTT CCT TCA ATT TTT ACT GCT GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA
 TTA GCT GCT CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG
 GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC GAT GTT GCT
 GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG TTA TTG TTT ATA AAT ACT
 ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA
 GAG GCT GAA GCT GAA TTC GCC CCG GCT ACA ATT GAG AGA CGC ACC TCT TAC
 AGT GGT GGC ACA ACT GCA AAC GAT GTC GCC AAC AAG GCA CCC TGT ACA CCT
 CTG ACA TTC ATC TTT GCG CGT GGA TCC ACC GAG CGT GGT ACC ATG GGA AGC
 AGC GTC GGA CCA GCC CTG GCC AAG CAG CTC ATT GCA TCT TTG GGT GCT TCC
 AAG GTC TCA GTT CAA GGT GTC GAT TAT ACC GCC ACG ATC CAA TCG AAT GTA
 CTG CGT GGG TGC GAA GGC GGT AAG GTC ATG GCT AAA CTG GCC AAG GAT CAG
 CTC GCG AGA TGC GGA AAC ACC AAG ATC GCC ATT GCC GGG TAT TCT CAA GGA
 GCC ATG GTG GTT CAC TAT GCG GTG AAG TCT GGC GGG CTG AGT CCA GAT GTT
 GTT TCT TCT GCC GTT GTC TAC GGT GAC CCG CAG AAC CGC GAA AGC GTT GGC
 AGT CTT CCC GCG CCA AAG ACC AAG AAA TTC TGC GCC AGG GGC GAT GGT GTT
 TGT GAG ACA GGA GGC TTT GCT ATC ACA GCC GCA CAC CTT GCC TAC ACT AAC
 AAT GGT GAC ATT GCT GAA GGA GCG AAG TTC ATC ATT CAA CAA GCA GGT CTC
 GAT GAC GAT GAC AAG AGT CTA GAA CAA AAA CTC ATC TCA GAA GAG GAT CTG
 AAT AGC GCC GTC GAC CAT CAT CAT CAT CAT CAT **TGA**

Fig. A1.3. Diseño de la secuencia de la enzima 7317 de A3.I.1 en fase con factor α , enzimas de restricción, sitio de reconocimiento a enterocinasa, c-myc y his-tag. Naranja: factor α ; Morado: *EcoRI* y *XbaI*; Azul: 7317; Rosa: sitio reconocimiento enterocinasa; Gris: c-myc; Verde: his-tag; Rojo: codón de paro.

ATG	AGA	TTT	CCT	TCA	ATT	TTT	ACT	GCT	GTT	TTA	TTC	GCA	GCA	TCC	TCC	GCA
TTA	GCT	GCT	CCA	GTC	AAC	ACT	ACA	ACA	GAA	GAT	GAA	ACG	GCA	CAA	ATT	CCG
GCT	GAA	GCT	GTC	ATC	GGT	TAC	TCA	GAT	TTA	GAA	GGG	GAT	TTC	GAT	GTT	GCT
GTT	TTG	CCA	TTT	TCC	AAC	AGC	ACA	AAT	AAC	GGG	TTA	TTG	TTT	ATA	AAT	ACT
ACT	ATT	GCC	AGC	ATT	GCT	GCT	AAA	GAA	GAA	GGG	GTA	TCT	CTC	GAG	AAA	AGA
GAG	GCT	GAA	GCT	GAA	TTC	GCT	GGC	GGT	TGC	TCA	TCC	TAT	GTC	ATC	ATC	AAC
ACT	CGC	GGT	ACT	GGA	GAA	ATG	CAA	GGC	CAG	TCT	TCG	GGC	TTC	CGC	ACC	ATG
AAC	AGG	AAA	GTC	ATG	GGC	CAG	AAG	TCA	GGT	GGA	AGC	ATC	TAC	AAC	ACA	GTC
TAC	TCT	GCC	GGC	GTC	ACG	CAA	ATG	TCG	GGC	AGG	GGC	ACT	GCC	GAC	ATT	GTC
CGA	AAG	GTC	TCC	TCA	ACA	CTG	TCA	TCG	AAC	CCA	AAC	ACC	TGC	TTT	ATC	CTC
GAG	GGC	TAC	TCG	CAA	GGT	GCC	GCG	GCC	ACT	ACC	AAT	GCC	TTG	CCT	AAG	CTG
ACC	GGC	AAA	AAC	TTC	GAT	GCT	GTG	AAG	GGC	GTC	TTC	CTC	ATC	GGT	AAC	CCC
ATG	CAC	CAC	AAG	GGC	AAG	GCT	TGT	AAC	GTC	GAC	ACG	AAA	GGC	GGC	AAG	AGT
ACT	ATG	GAC	GTC	AAC	GGC	ATG	TCG	GCT	GCT	CTT	GGT	GGC	ATC	CCC	GAC	AAC
TGG	GTC	TCG	AAG	ACC	ATG	GAC	GTC	TGC	AAC	TAT	GGC	GAT	GGT	GTC	TGT	GAC
ACT	AGG	CAC	GGC	TTC	GGT	ATC	AAC	ATG	CAG	CAT	CTG	GCG	TAT	CCC	GCC	TCC
AGC	AGC	ACT	CAA	TCC	ATG	GGT	GCC	AAA	TTC	ATA	CTC	AAG	CAG	CTC	AAT	GGC
GCC	AGC	TCT	TCC	AGC	GGC	GGT	GGT	GCT	GAA	GCC	GCC	TGC	ACT	GAT	TCC	GCC
CCT	GCT	GCC	GAT	TCG	TCT	GCC	TCT	AGC	AAG	TCT	AAG	CGC	CAA	TTT	GGT	GGC
CTC	AGC	CGT	TTG	GGC	GGC	GGC	GGC	GGC	GGA	GGC	GGT	TCC	TCA	AGA	CTC	GAC
AAG	CTC	AAA	AGC	ATG	TTC	GGA	GGC	GGT	GCC	AGC	TCT	GAG	GCC	AGT	GGA	TCT
ACC	GAA	GCC	AGT	GGC	AGC	ACC	GAG	GGT	AGT	GCC	GCT	TCC	TGC	AGC	ACA	CCG
GCC	AGC	GGC	GGT	GCA	TCC	AGC	GAC	ACC	GGA	AGC	AAC	GGC	ACC	ACG	ACC	GCG
AGC	GCC	GAA	GAT	AGC	GGT	AGT	GCT	TCC	ACA	GGC	GCC	GAT	GCT	AGT	GCT	GAT
TCA	GGC	GCA	GAC	ACA	GGT	TCT	GAT	TCT	GGT	GCT	GAT	GCT	GGA	GGT	GGC	TCC
AGG	CTT	GAC	AAG	CTC	AAG	AGC	ATG	TTC	GGC	GGT	GGT	GCT	GGT	GGT	TCT	TCT
GGC	GGA	TTG	GGT	CGT	CTC	AGT	GCT	CTC	CGT	GGA	GGT	GGT	TCA	GGT	GGT	GGC
ATG	AGC	CGT	CTG	AGT	AAG	CTC	CGC	GGT	ATG	GGT	GGC	ATG	GGC	GCT	CTC	AGC
AAA	CTC	CGC	GGT	GGC	TCA	GAT	GAC	GAT	GAC	AAG	AGT	CTA	GAA	CAA	AAA	CTC
ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	AAT	AGC	GCC	GTC	GAC	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT
TGA																

Fig. A1.4. Diseño de la secuencia de la enzima 8471 de A3.1.1 en fase con factor α , enzimas de restricción, sitio de reconocimiento a enterocinas, c-myc y his-tag. Naranja: factor α ; Morado: *EcoRI* y *XbaI*; Azul: 8471; Rosa: sitio reconocimiento enterocinas; Gris: c-myc; Verde: his-tag; Rojo: codón de paro.

Anexo 2

Preparación de medios de cultivo y soluciones stock

- 10X YNB (13.4% base nitrogenada de levadura con sulfato de amonio)
 1. Disolver 134 g de base nitrogenada de levadura (YNB) con sulfato de amonio y sin aminoácidos en 1 L de agua y esterilizar por filtración
*Nota: calentar la solución para disolver la YNB completamente en agua
 2. Conservar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente 1 año

- 500X Biotina (0.02% biotina)
 1. Disolver 20 mg de biotina en 100 mL de agua y esterilizar por filtración
 2. Conservar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente 1 año

- 10X Dextrosa (20% dextrosa)
 1. Disolver 200 g de D-glucosa en 1 L de agua.
 2. Esterilizar en autoclave durante 15 min o esterilizar por filtración. La vida útil de esta solución es de aproximadamente 1 año

- 10X Metanol (5% metanol)
 1. Mezclar 5 mL de metanol con 95 mL de agua.
 2. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C. La vida útil de esta solución es de aproximadamente 2 meses

- 10X Glicerol (10% glicerol)
 1. Mezclar 100 mL de glicerol con 900 mL de agua
 2. Esterilizar por filtración o en autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es superior a 1 año

- Buffer de fosfato de potasio 1 M, pH 6.0
 1. Combinar 132 mL de K_2HPO_4 1M y 868 mL de KH_2PO_4 1M y confirmar el pH = 6.0 ± 0.1 (si es necesario ajustar el pH con ácido fosfórico o hidróxido de potasio)
 2. Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente. La vida útil de esta solución es superior a 1 año

- Medio Luria-Bertani bajo en sales (LB-LS) para 1 L
 - Triptona 1%
 - Extracto de Levadura 0.5%
 - NaCl 0.5%
 - pH 7.5
 1. Disolver en 950 mL de agua desionizada 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl

2. Ajustar el pH de la solución a 7.5 con NaOH 1 N y llevar el volumen hasta 1 L
 3. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 15 lb/sq. in. y 121°C
 4. Dejar enfriar a ~55°C y agregar Zeocina™ a una concentración final de 25 µg/mL
 5. Conservar a 4°C en oscuridad
- *Nota: si se requieren hacer placas con agar, agregar 15 g/L de agar antes de esterilizar en autoclave

➤ Medio extracto de levadura de peptona y dextrosa (YPD) para 1 L

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Dextrosa 2%

1. Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 900 mL de agua desionizada
 2. Esterilizar en autoclave durante 20 min en ciclo líquido
 3. Añadir 100 mL de 10X dextrosa estéril
 4. Si se requiere agregar antibiótico, dejar enfriar a ~55°C y agregar Zeocina™ a una concentración final de 100 µg/mL y almacenar a 4°C en oscuridad
- *Nota: si se requieren hacer placas con agar, agregar a medio Luria-Bertani bajo en sales 15 g/L de agar antes de esterilizar en autoclave

➤ Medio extracto de levadura de peptona y dextrosa con sorbitol (YPDS) para 1 L

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Dextrosa 2%

1M sorbitol

2% agar

1. Disolver 10 g de extracto de levadura, 182.2 g de sorbitol y 20 g de peptona en 900 mL de agua desionizada
2. Añadir 20 g de agar
3. Esterilizar en autoclave durante 20 min en ciclo líquido
4. Añadir 100 mL de 10X dextrosa estéril
5. Enfriar la solución a ~60°C y agregar Zeocina a una concentración final de 100 µg/mL y almacenar a 4°C en oscuridad

➤ Medio complejo amortiguado con glicerol (BMGY) para 1 L

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Buffer de fosfato de potasio pH 6 100 mM

YNB 1.34%

Biotina 4x10⁻⁵%

Glicerol 1%

1. Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 mL de agua
2. Esterilizar en autoclave 20 min en ciclo líquido
3. Enfriar a temperatura ambiente, luego agregar lo siguiente y mezclar bien:

100 mL buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0

100 mL 10X YNB

2 mL 500X biotina

100 mL 10X glicerol

4. Almacenar a 4°C. La vida útil es de aproximadamente 2 meses

➤ Medio complejo amortiguado con metanol (BMMY) para 1 L

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Buffer de fosfato de potasio pH 6 100 mM

YNB 1.34%

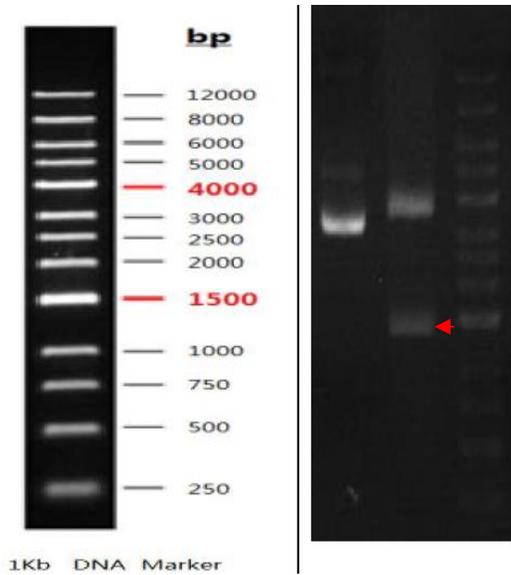
Biotina 4×10^{-5} %

Metanol 0.5%

1. Disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 mL de agua
2. Esterilizar en autoclave 20 min en ciclo líquido
3. Enfriar a temperatura ambiente, luego agregar lo siguiente y mezclar bien:
100 mL buffer de fosfato de potasio 1M pH 6.0
100 mL 10X YNB
2 mL 500X biotina
100 mL 10X metanol
4. Almacenar a 4°C. La vida útil es de aproximadamente 2 meses

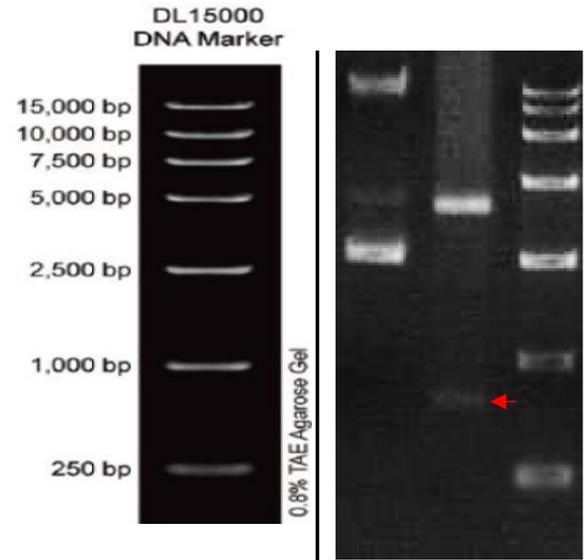
Anexo 3

Control de calidad síntesis de genes cutinasas de *C. tenuissimum* cepa A3.I.1 por Gene Universal



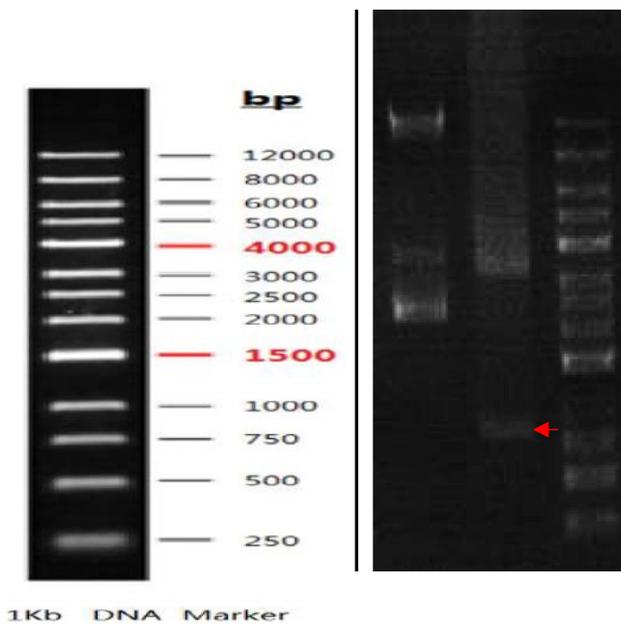
Gene name: 6816; Length (bp): 1370; RES: *EcoRI-XbaI*

Electroforesis doble digestión plásmido pPICZαA-6816



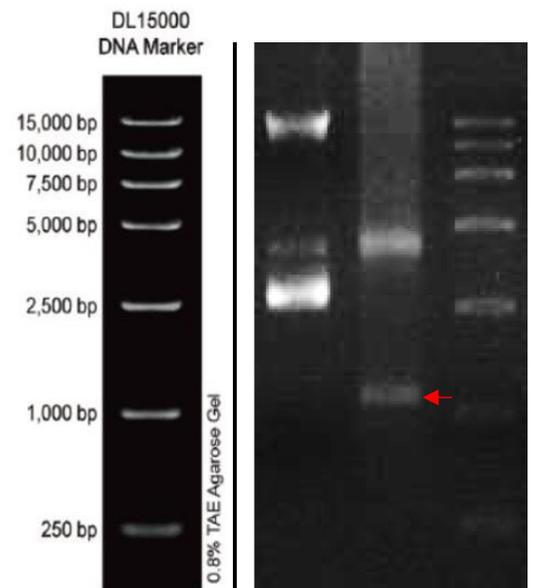
Gene name: 7317; Length (bp): 623; RES: *EcoRI-XbaI*

Electroforesis doble digestión plásmido pPICZαA-7317



Gene name: 6962; Length (bp): 908; RES: *EcoRI-XbaI*

Electroforesis doble digestión plásmido pPICZαA-6962



Gene name: 8471; Length (bp): 1202; RES: *EcoRI-XbaI*

Electroforesis doble digestión plásmido pPICZαA-8471

Anexo 4

Curvas de concentración de proteína total y SDS-PAGEs de los concentrados proteicos obtenidos de los cultivos de inducción de colonias de *P. pastoris* X-33 Zeo^R seleccionadas a partir de la primera transformación con los plásmidos recombinantes.

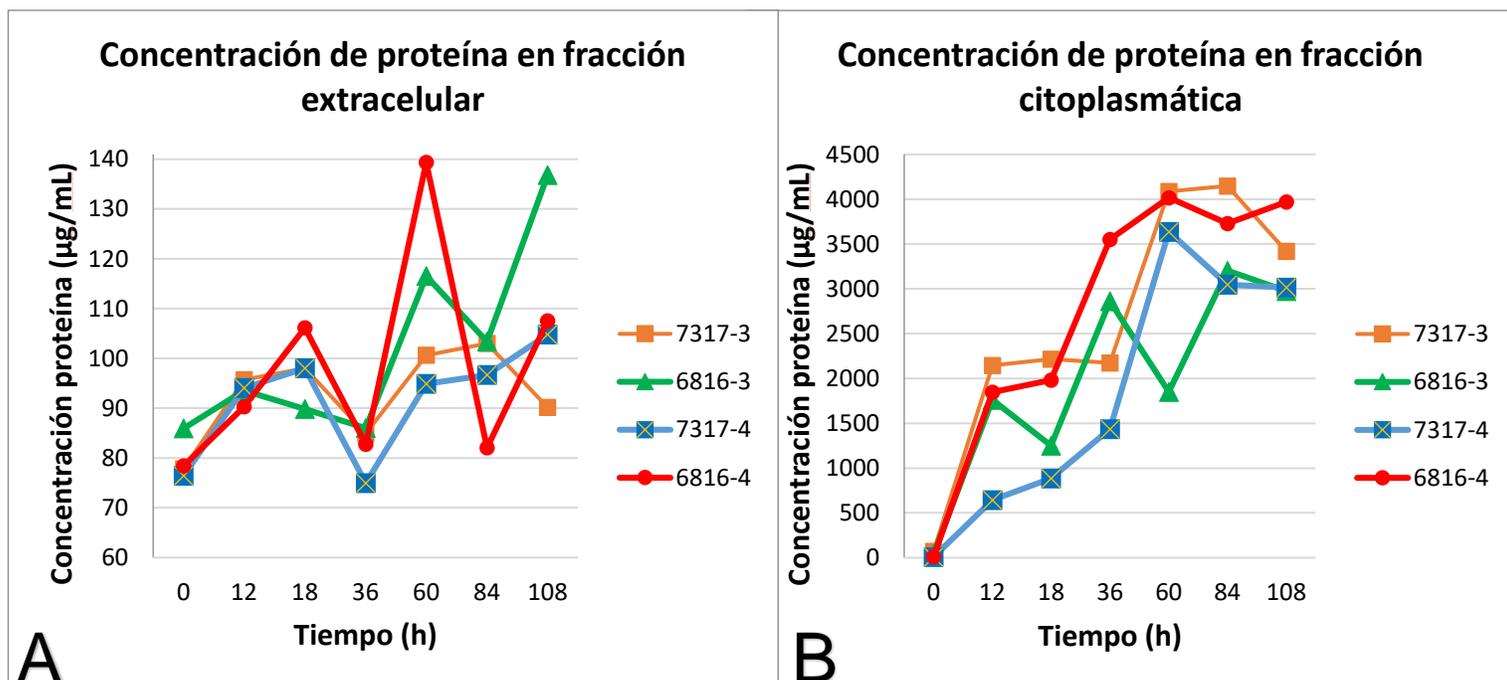


Fig. A4.1. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5%. A) proteínas extracelulares de la inducción de las proteínas 7317 y 6816 clonas 3 y 4; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de las proteínas 7317 y 6816 clonas 3 y 4.

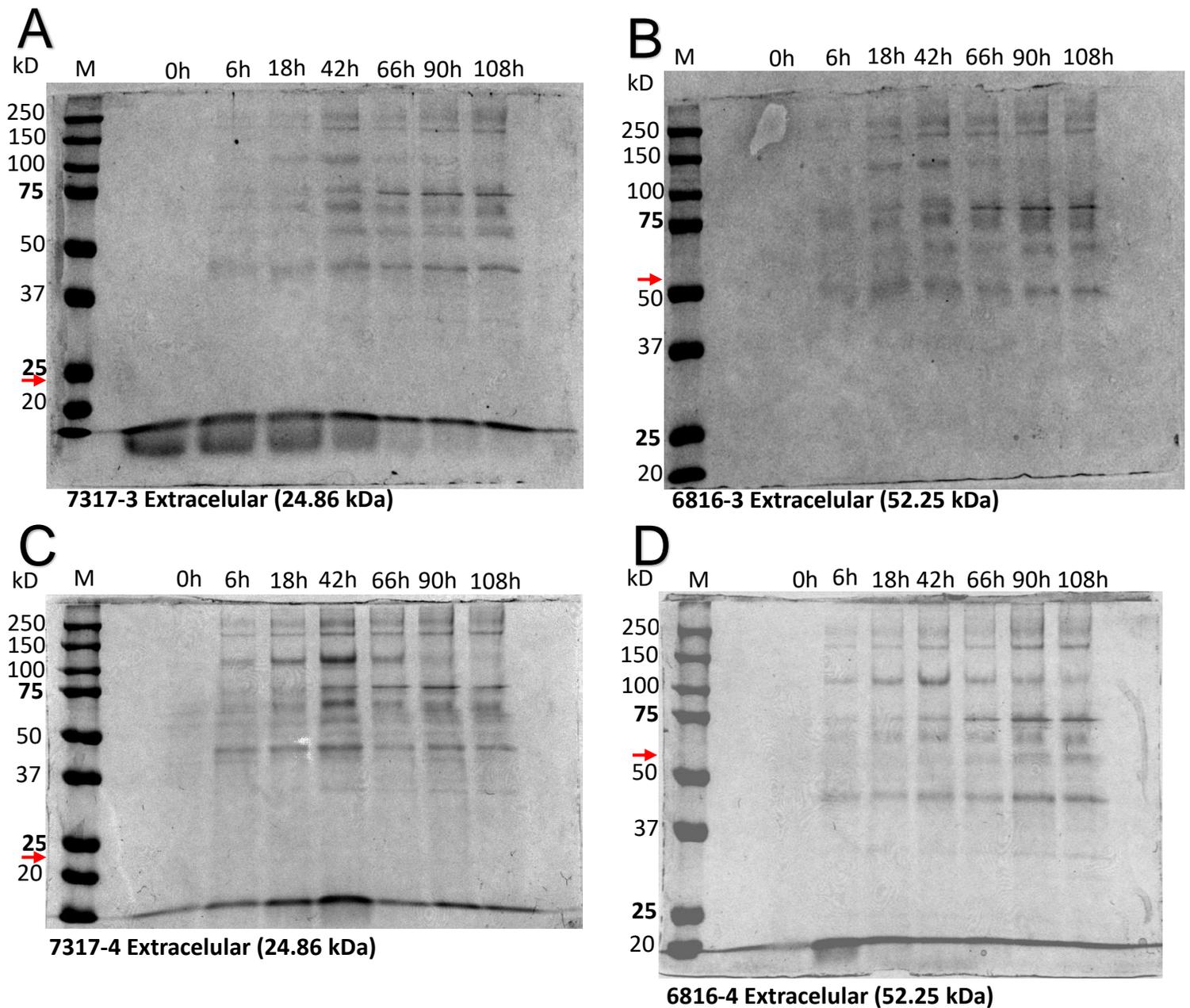


Fig. A4.2. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos recombinantes pPICZαA-7317 y pPICZαA-6816, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces no baffeados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-3; B) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-3; C) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-4 y D) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-4.

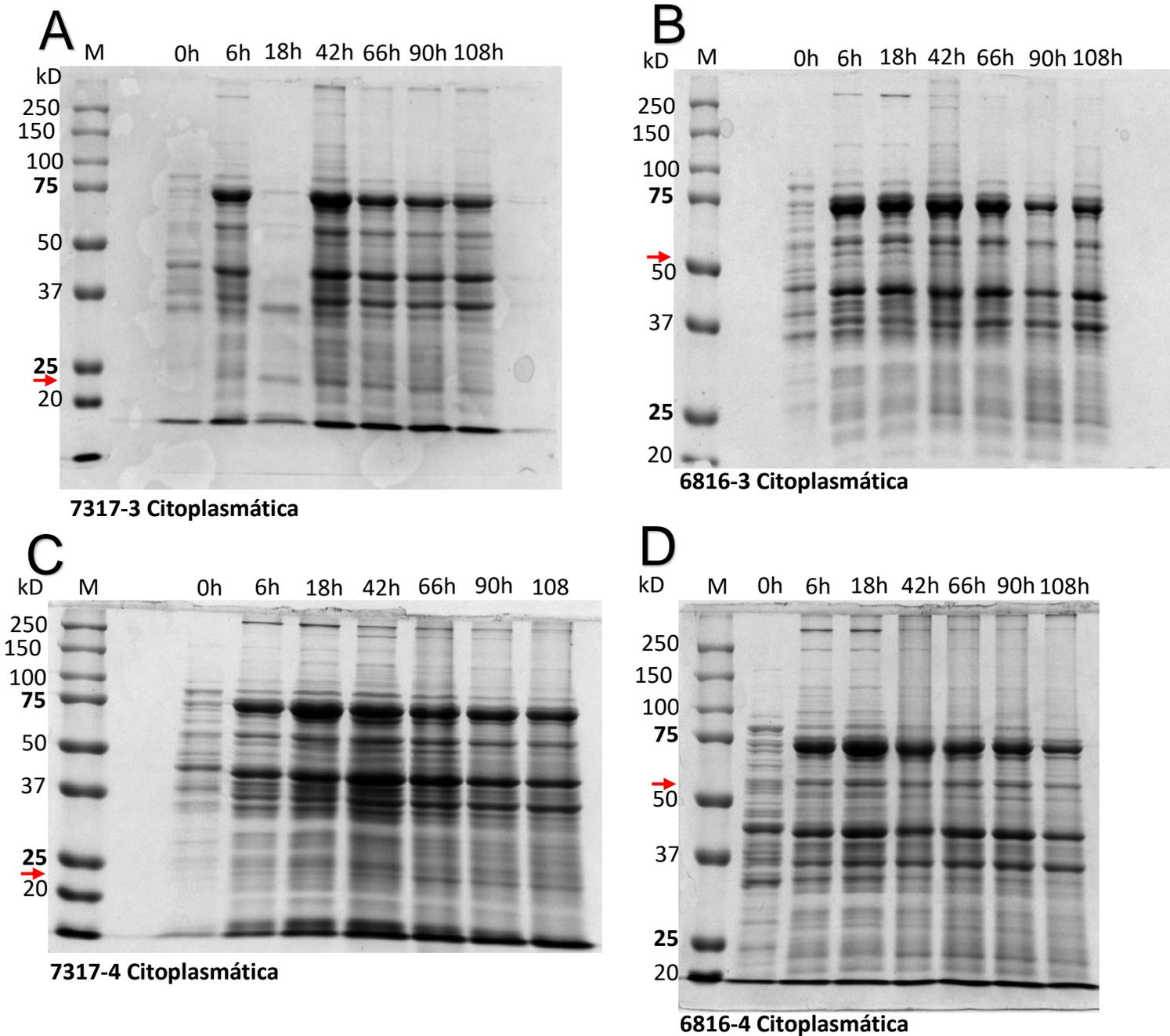


Fig. A4.3. SDS-PAGEs de proteínas citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos recombinantes pPICZ α A-7317 y pPICZ α A-6816, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces no baffeados. Se corrieron 30 μ g de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-3; B) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-3; C) concentrado proteico de la inducción de la proteína 7317-4 y D) concentrado proteico de la inducción de la proteína 6816-4.

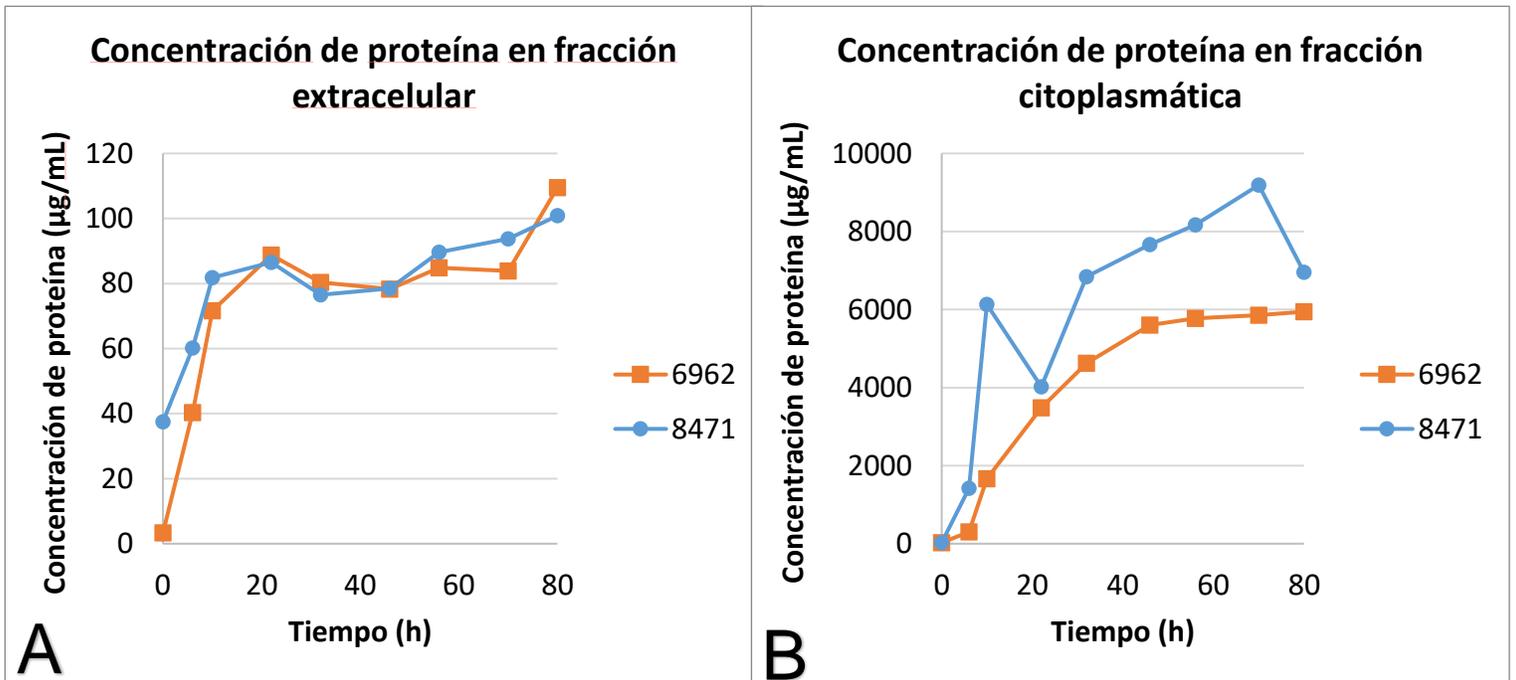


Fig. A4.4. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5%. A) proteínas extracelulares de la inducción de las proteínas 8471 y 6962; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de las proteínas 8471 y 6962.

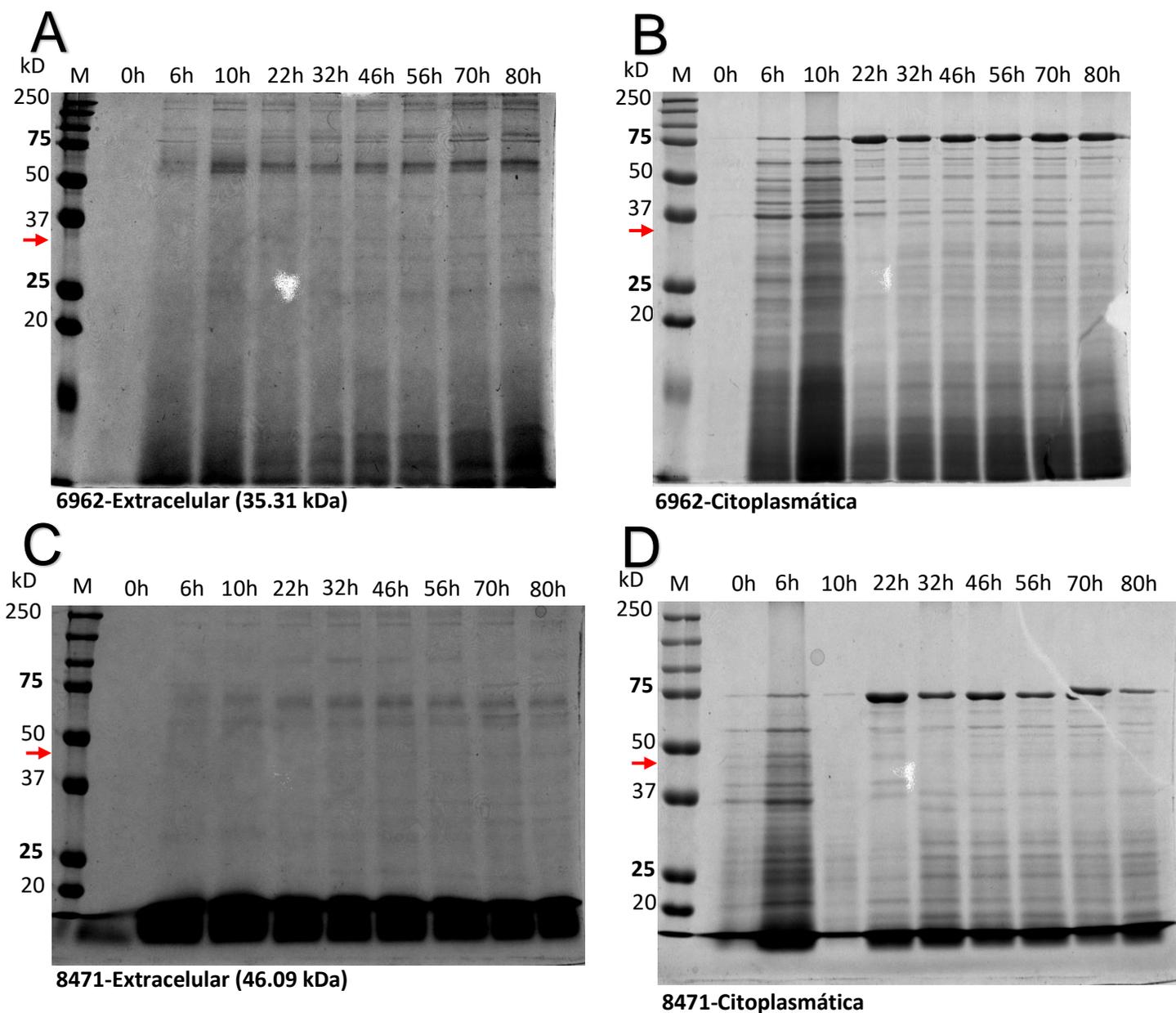


Fig. A4.5. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares y citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos recombinantes pPICZαA-8471 y pPICZαA-6962, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962; B) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6962; C) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 y D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 8471.

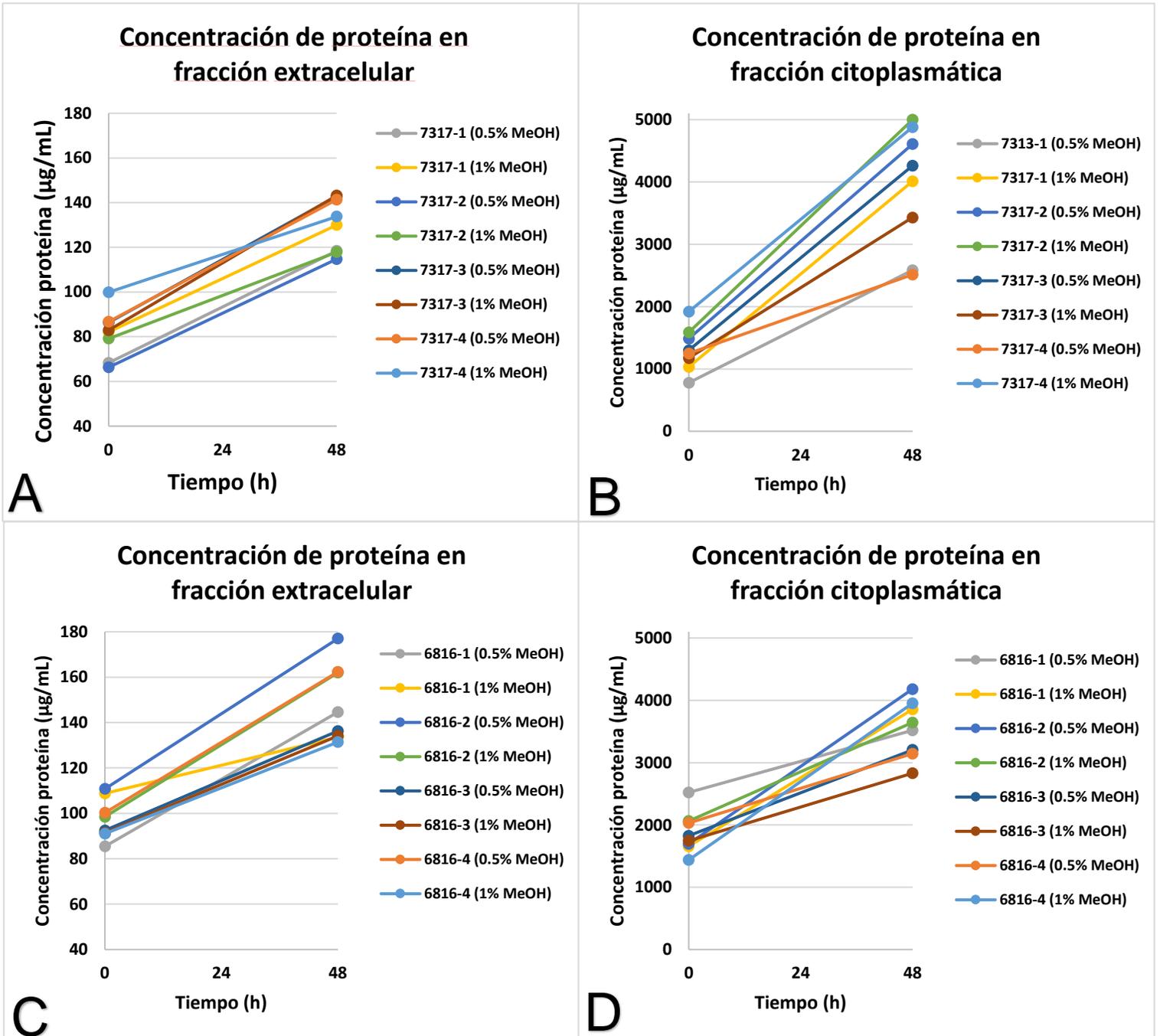


Fig. A4.6. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1%. A) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 7317 clonas 1, 2, 3 y 4; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 7317 clonas 1, 2, 3 y 4; C) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 6816 clonas 1, 2, 3 y 4; D) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 6816 clonas 1, 2, 3 y 4.

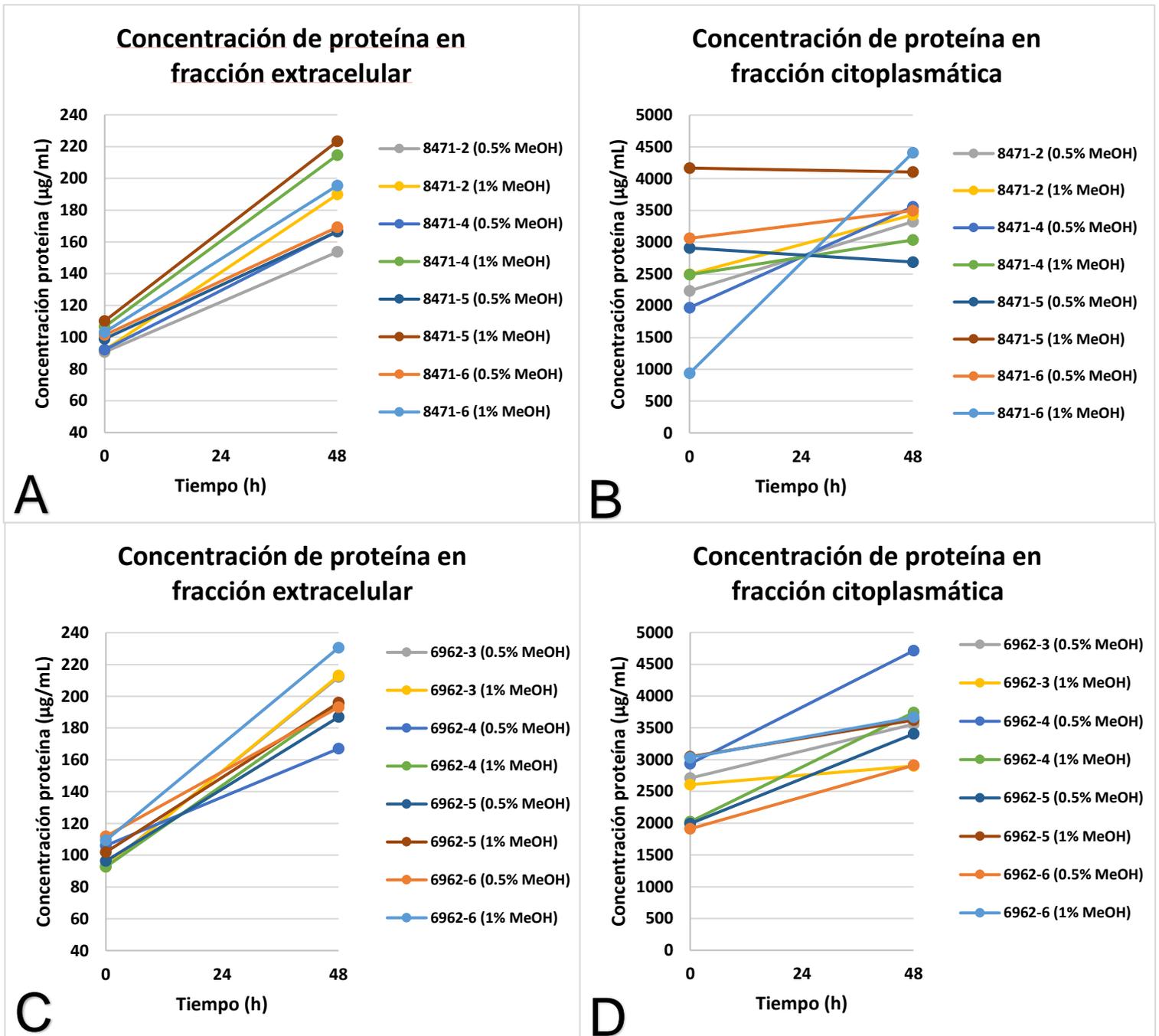


Fig. A4.7. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1%. A) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 8471 clonas 2, 4, 5 y 6; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 8471 clonas 2, 4, 5 y 6; C) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 6962 clonas 3, 4, 5 y 6; D) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 6962 clonas 3, 4, 5 y 6.

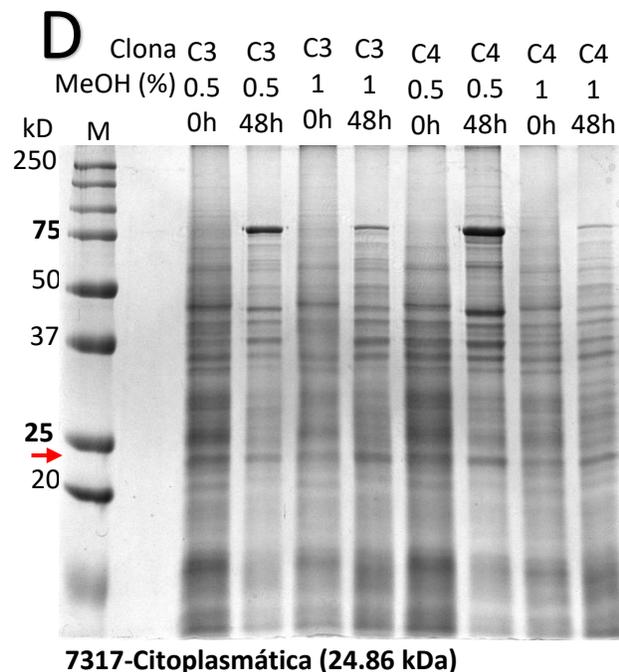
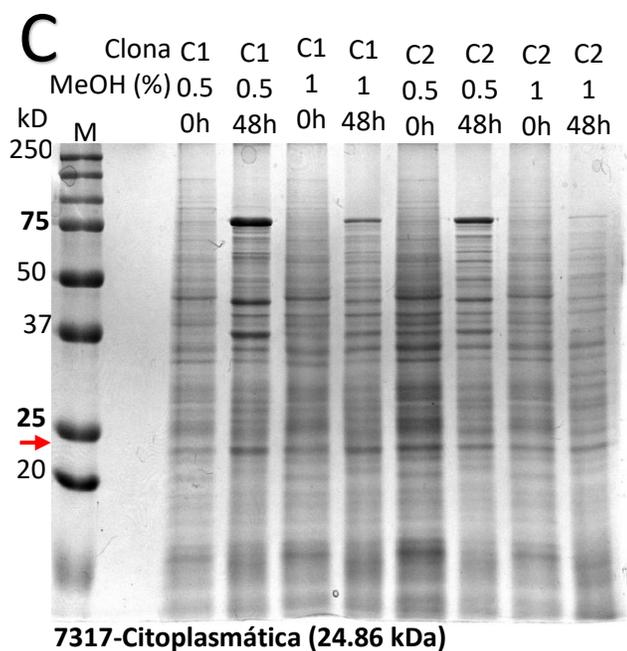
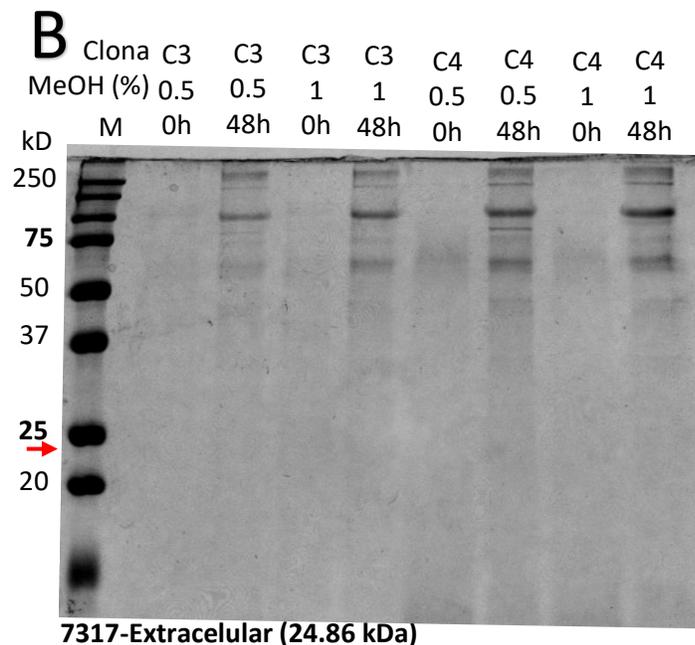
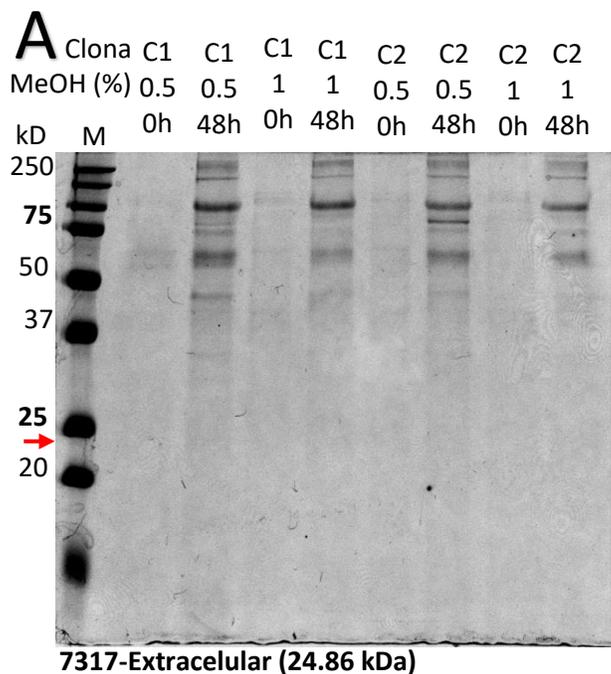


Fig. A4.8. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares y citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pPICZαA-7317, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 clonas 1 y 2; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 clonas 3 y 4; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 7317 clonas 1 y 2; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 7317 clonas 3 y 4.

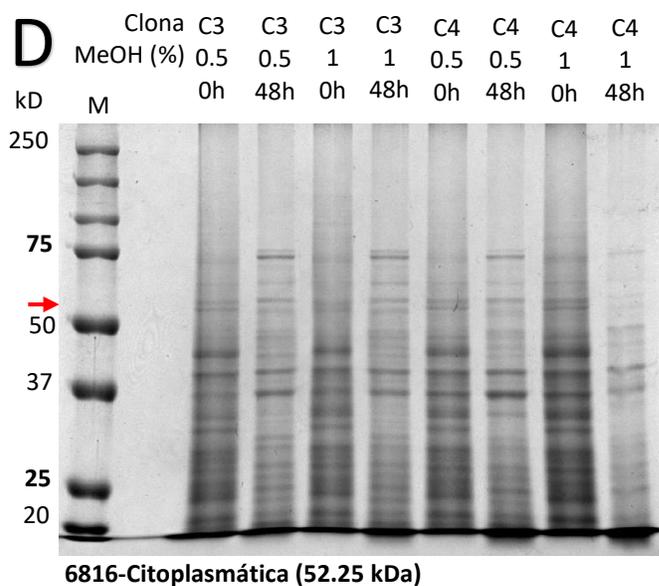
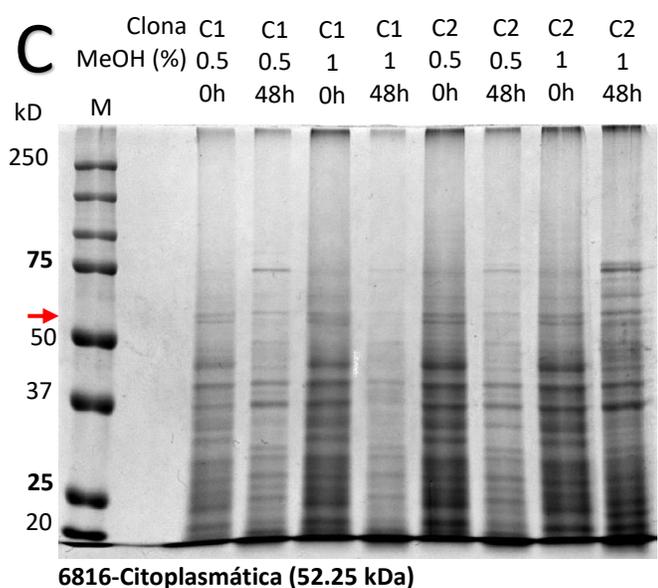
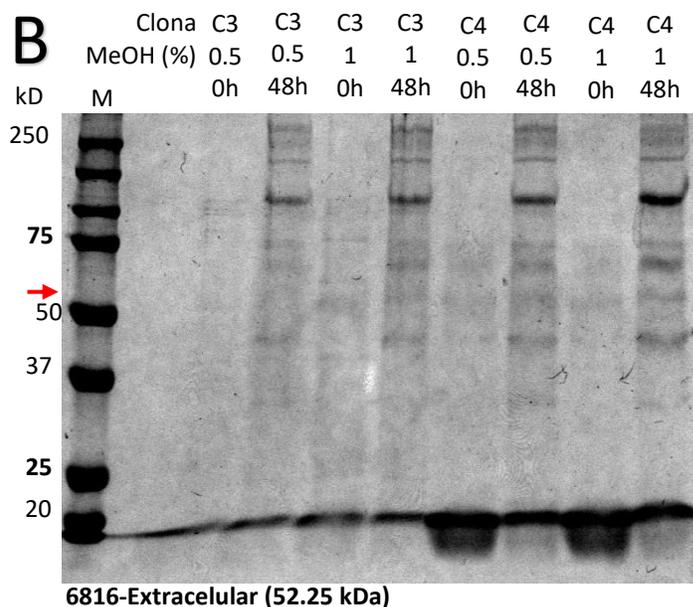
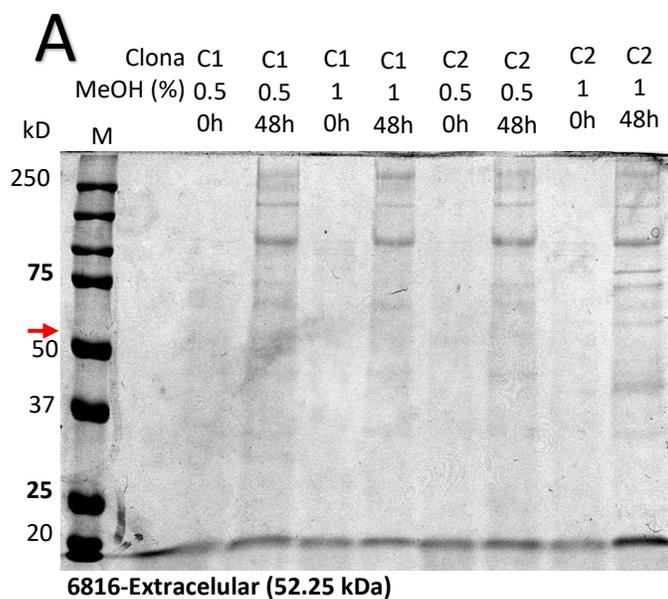


Fig. A4.9. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares y citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pPICZ α A-6816, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces baffleados. Se corrieron 30 μ g de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6816 clonas 1 y 2; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6816 clonas 3 y 4; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6816 clonas 1 y 2; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6816 clonas 3 y 4.

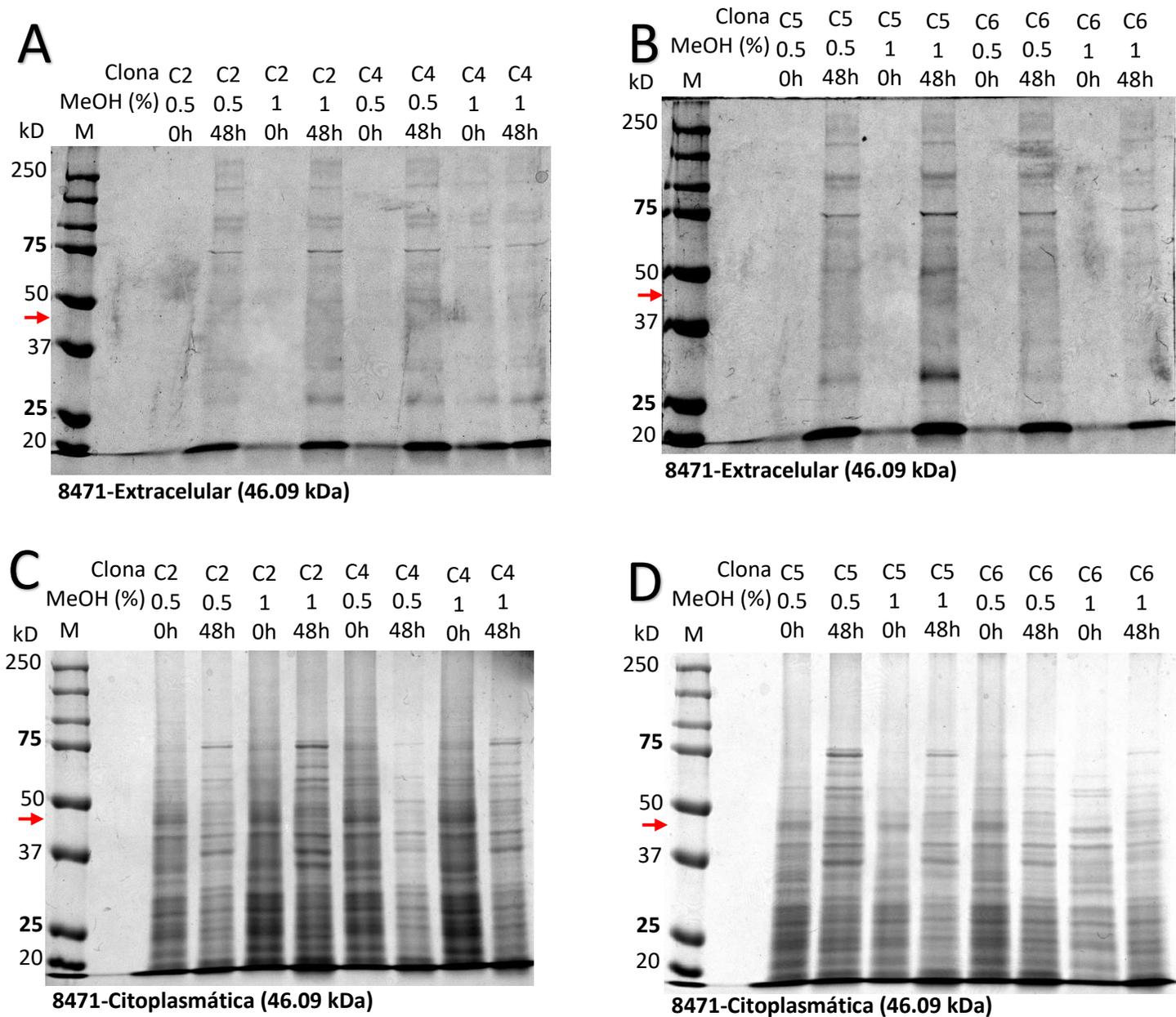


Fig. A4.10. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares y citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pPICZ α A-8471, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces baffeados. Se corrieron 30 μ g de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 clonas 2 y 4; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 clonas 5 y 6; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 8471 clonas 2 y 4; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 8471 clonas 5 y 6.

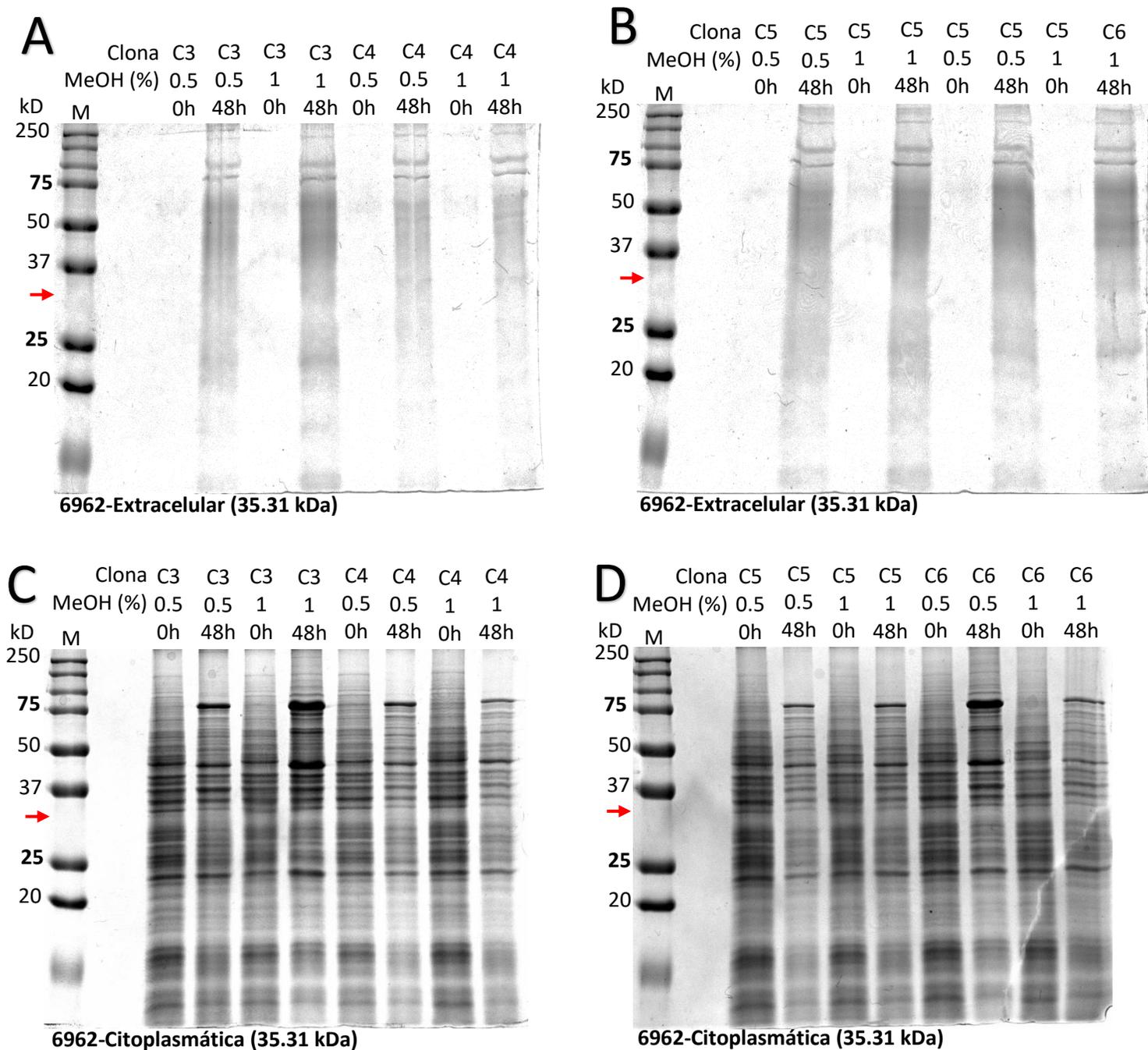


Fig. A4.11. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares y citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pPICZαA-6962, cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962 clonas 3 y 4; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962 clonas 5 y 6; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6962 clonas 3 y 4; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6962 clonas 5 y 6.

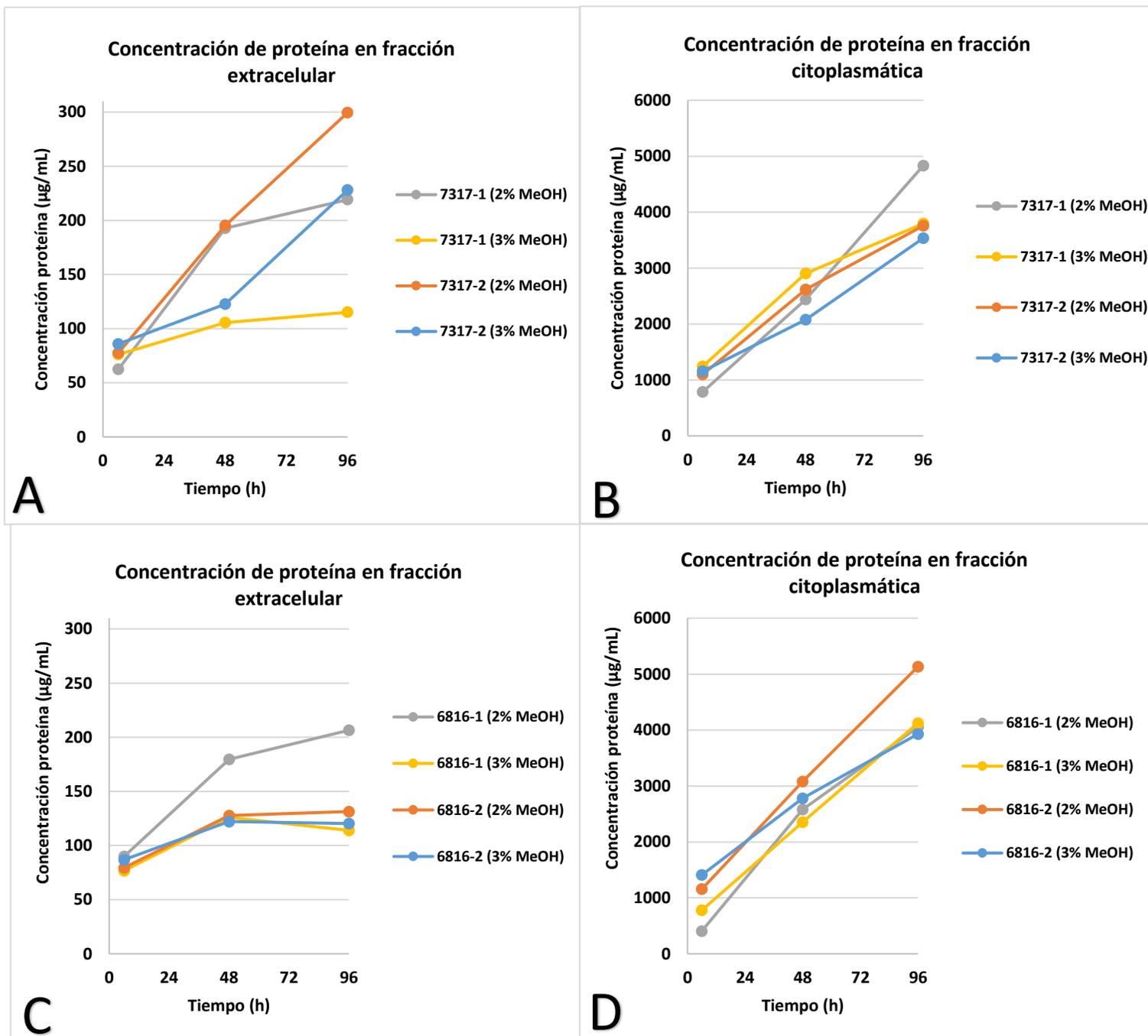


Fig. A4.12. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 2% y 3%. A) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 7317 clonas 1 y 2; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 7317 clonas 1 y 2; C) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 6816 clonas 1 y 2; D) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 6816 clonas 1 y 2.

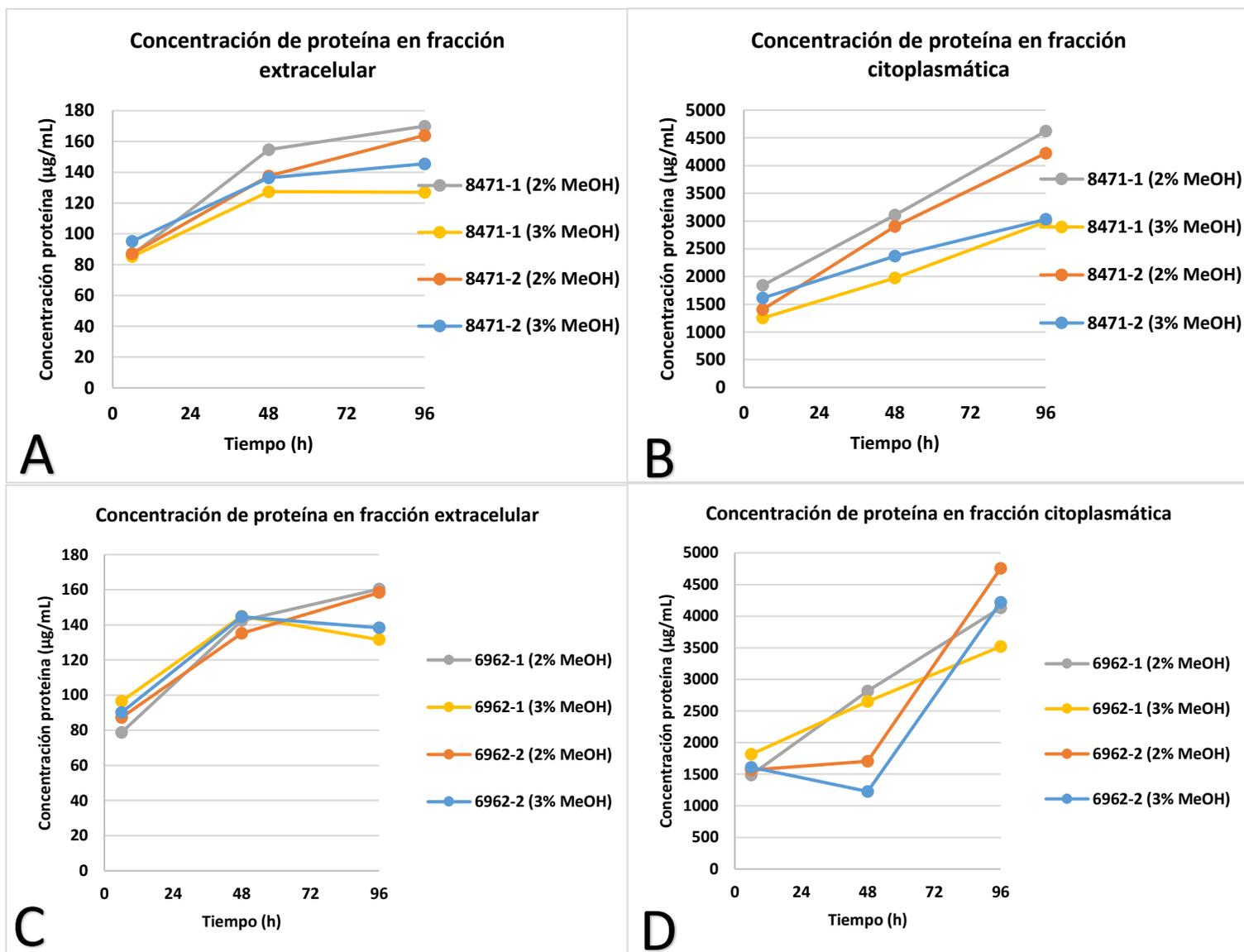


Fig. A4.13. Curvas de concentración de proteína. Inducción en medio BMMY con una concentración final de MeOH del 2% y 3%. A) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 8471 clonas 1 y 2; B) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 8471 clonas 1 y 2; C) proteínas extracelulares de la inducción de la proteína 6962 clonas 1 y 2; D) proteínas citoplasmáticas de la inducción de la proteína 6962 clonas 1 y 2.

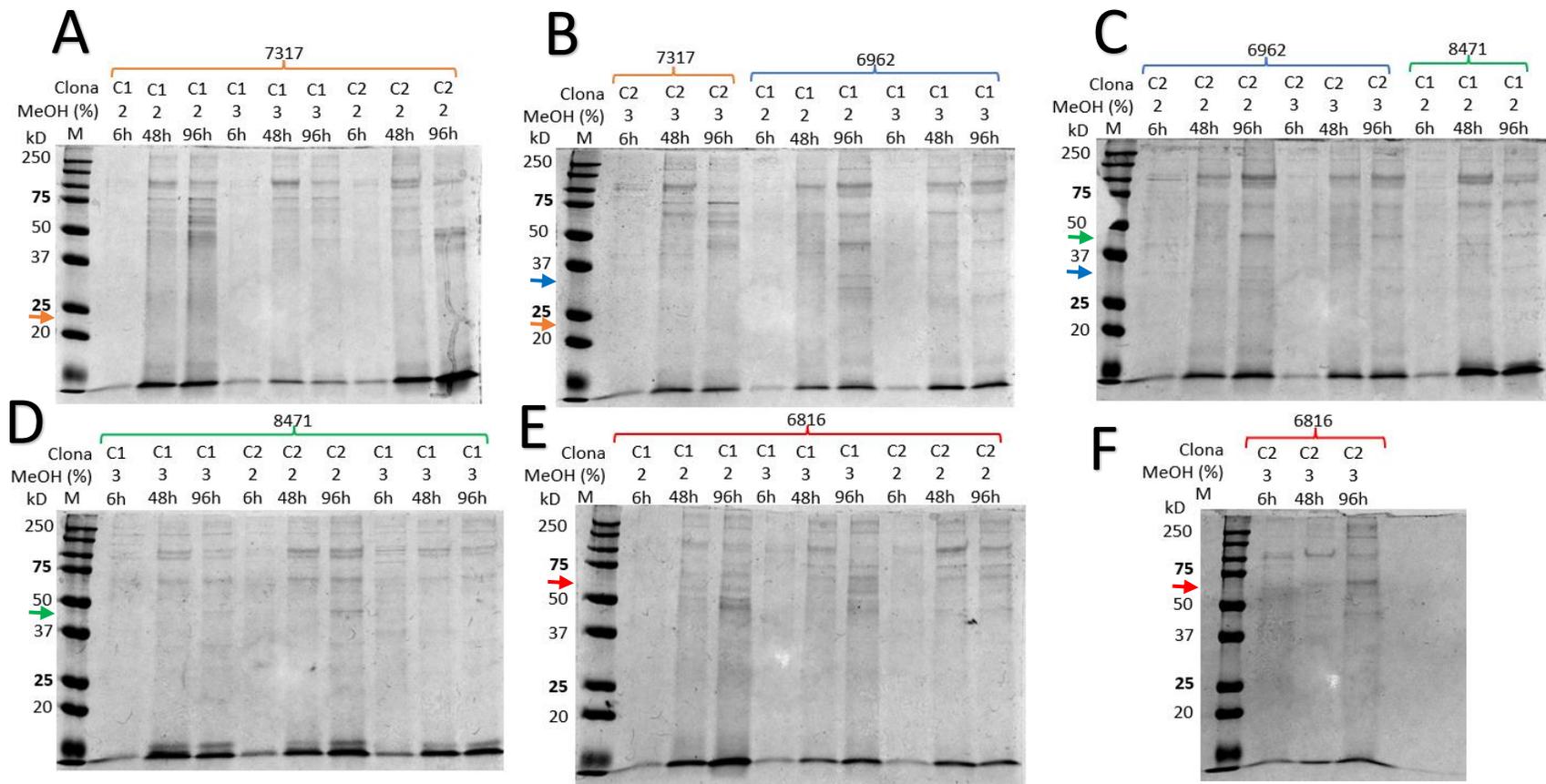


Fig. A4.14. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares de *P. pastoris* X-33 transformadas con el plásmido pPICZαA-7317, pPICZαA-6962, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6816 cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 2% y 3% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clonas 1 y 2; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clona 2 y 6962 (35.31 kDa) clona 1; C) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962 (35.31 kDa) clona 2 y 8471 (46.09 kDa) clona 1; D) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 (46.09 kDa) clonas 1 y 2; E) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6816 (52.25 kDa) clona 1; F) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 (52.25 kDa) clona 2.

Anexo 5

SDS-PAGEs de los concentrados proteicos obtenidos de los cultivos de inducción de colonias de *P. pastoris* X-33 Zeo^R seleccionadas a partir de la segunda transformación (confirmadas con los genes de interés integrados por PCR).

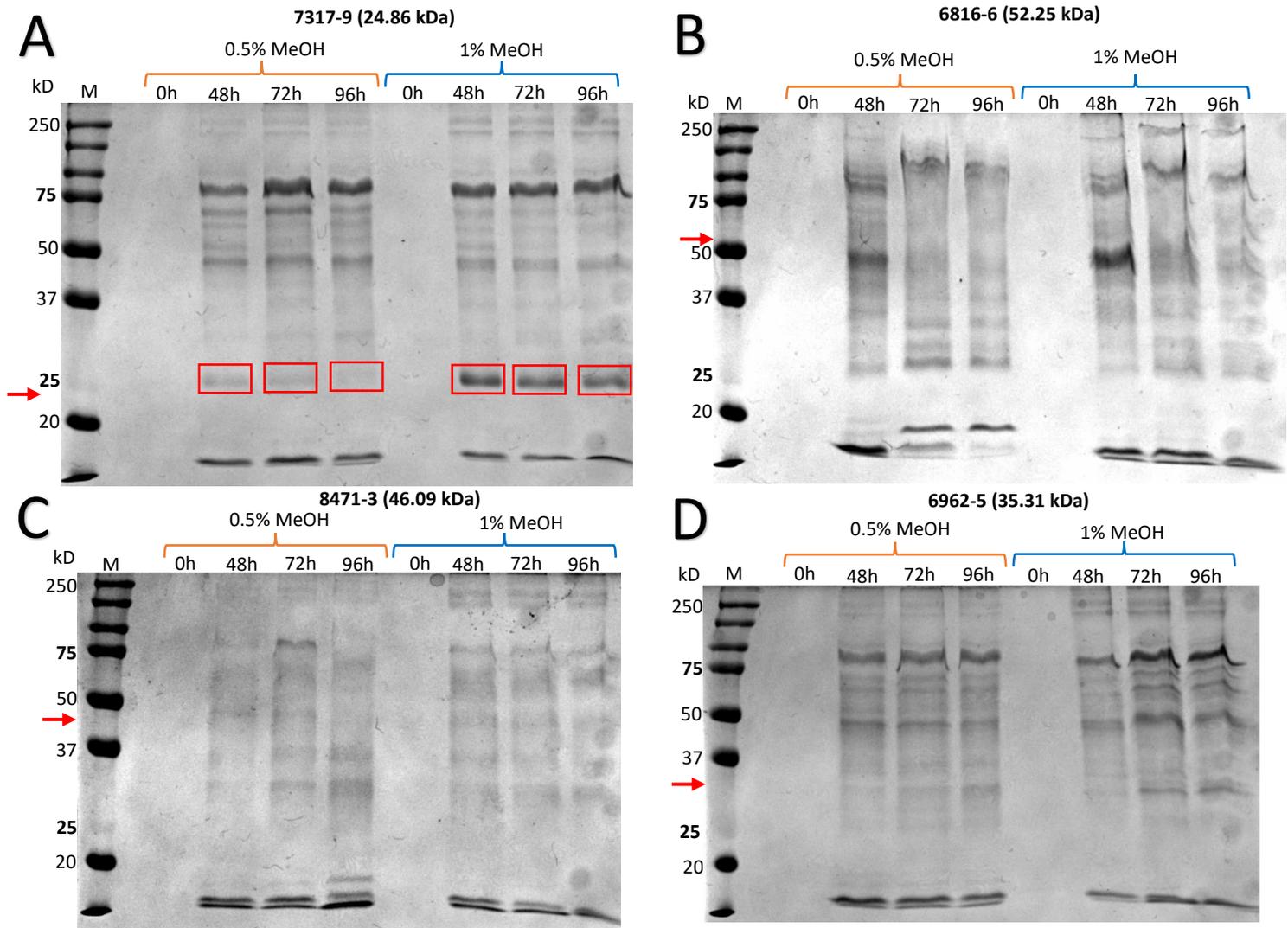


Fig. A5.1. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos pPICZαA-7317, pPICZαA-6962, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6816 cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clona 9; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6816 (52.25 kDa) clona 6; C) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 (46.09 kDa) clona 3; D) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962 (35.31 kDa) clona 5. **Enmarcado en rojo:** bandas candidatas de proteínas de interés recombinantes.

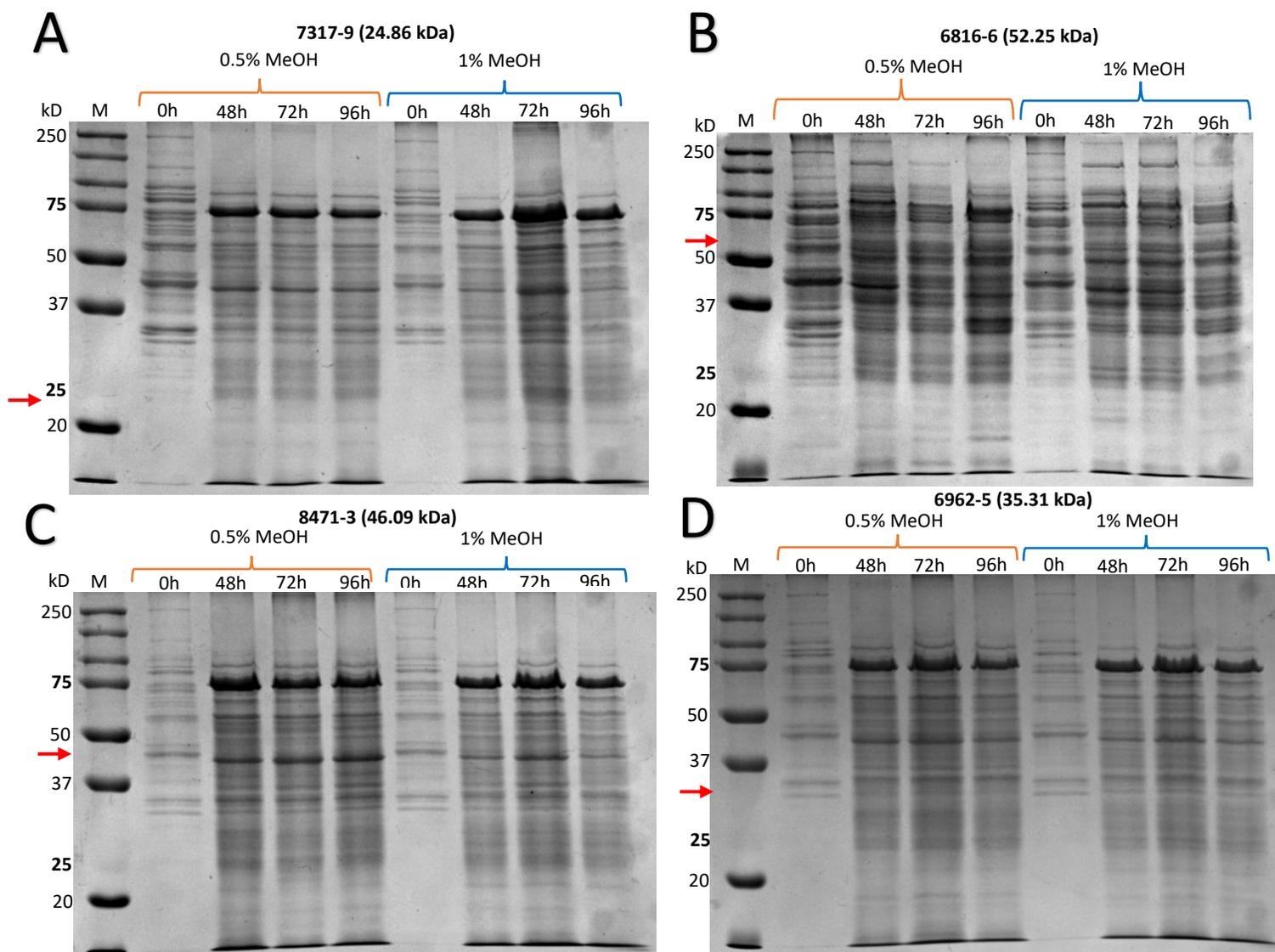


Fig. A5.2. SDS-PAGEs de proteínas citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos pPICZαA-7317, pPICZαA-6962, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6816 cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clona 9; B) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6816 (52.25 kDa) clona 6; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 8471 (46.09 kDa) clona 3; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6962 (35.31 kDa) clona 5.

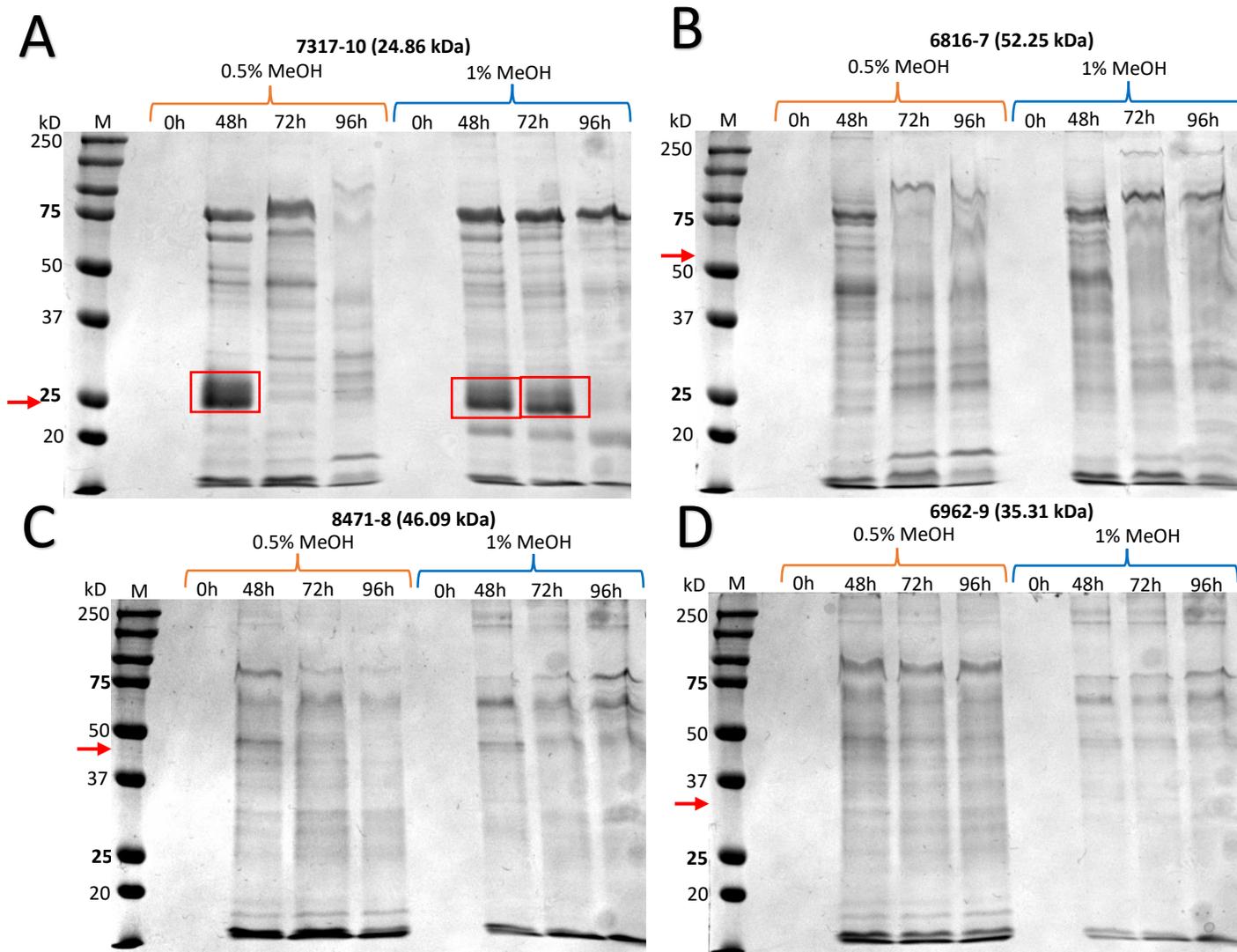


Fig. A5.3. SDS-PAGEs de proteínas extracelulares de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos pPICZαA-7317, pPICZαA-6962, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6816 cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción extracelular de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clona 10; B) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6816 (52.25 kDa) clona 7; C) fracción extracelular de la inducción de la proteína 8471 (46.09 kDa) clona 8; D) fracción extracelular de la inducción de la proteína 6962 (35.31 kDa) clona 9. **Enmarcado en rojo: bandas candidatas de proteínas de interés recombinantes.**

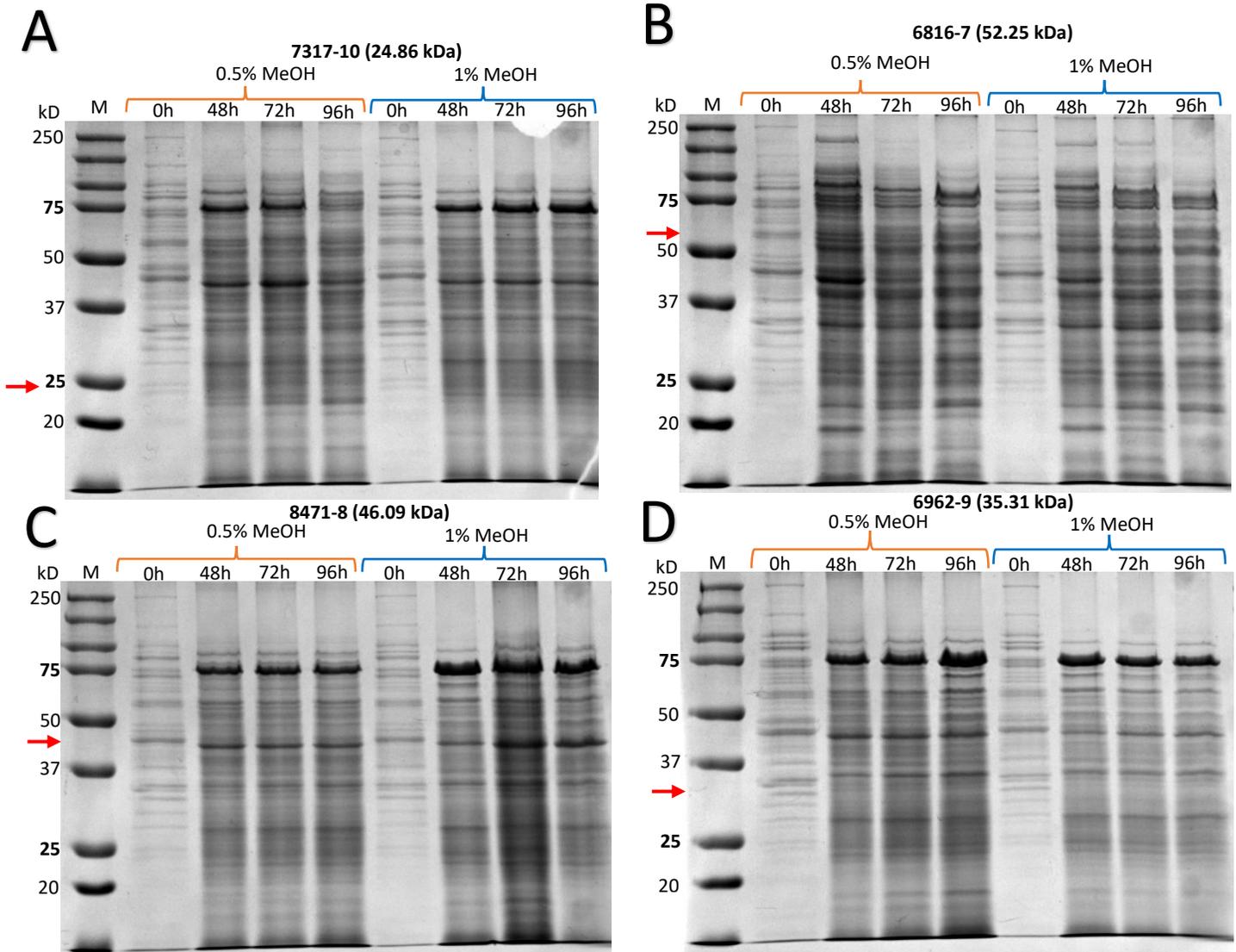


Fig. A5.4. SDS-PAGEs de proteínas citoplasmáticas de *P. pastoris* X-33 transformadas con los plásmidos pPICZαA-7317, pPICZαA-6962, pPICZαA-8471 y pPICZαA-6816 cultivadas en BMMY con una concentración final de MeOH del 0.5% y 1% en matraces baffleados. Se corrieron 30 µg de proteína de los concentrados proteicos en gel SDS-PAGE al 12%. Marcador molecular (M): *Precision Plus Protein Standards™ Dual Color* (BIO-RAD). A) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 7317 (24.86 kDa) clona 10; B) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6816 (52.25 kDa) clona 7; C) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 8471 (46.09 kDa) clona 8; D) fracción citoplasmática de la inducción de la proteína 6962 (35.31 kDa) clona 9.

Anexo 6

Resultados obtenidos para la determinación de sitios potenciales de N-glicosilación (considerando el sequón Asn-Xaa-Ser/Thr) por medio del servidor NetNGlyc 1.0 (Gupta R y Brunak S, 2002)

Tabla A6.1. Determinación de sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína 6816

<p align="center">Secuencia aa proteína 6816</p> <p align="center">Las asparaginas que se prevé que estén N-glicosiladas resaltadas en rojo</p> <p align="center"><i>Sequon</i> Asn-Xaa*-Ser/Thr resaltadas en azul</p>		
<p>MPSKITISSLVMAAAPAILAQSVGTGSCTDVHIFIARGWNENYPGRQGDLTSAVCANLSGMSCDYEDIAY DAYSTDYCPSVADGELLALKQINAYYAKCPDTAIVLSGYSEGATVLGNVLAGDSGDVKCPTRGHAGLTETK SGVSCNIAAVTLFGNPRHTADQPYNALNGGAGQANSHRDAGGLARLAAYTPRLQDYCNIDDLVCAPGL GADTVEAHTNYFQLYNAQAAKYIADTVKGYSKDKYCSVATSSSSSSASASSTASASGSVTSSASAHETEMS SATDKSSAPATYSAPESVPYITATEVTSIYTTVCPQSSIYNHGNVTRTSTWTGPSTVTTSLRSTTTMTVPAT YIPSPKPIKETSITTLSGTPAVVQYTSTITVTKYANFPTLTITLAVPTATYVIDNNGKPKGPMVTVGVAPSGTG AGAAHPTGSSPITPYTGAASSSSVAAKWLVIAAAVAGFMMI</p>		
Sitio potencial de N-glicosilación	<i>Sequon</i>	Potencial
57	NLSG	0.5738
324	NVTR	0.7478
*Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina		

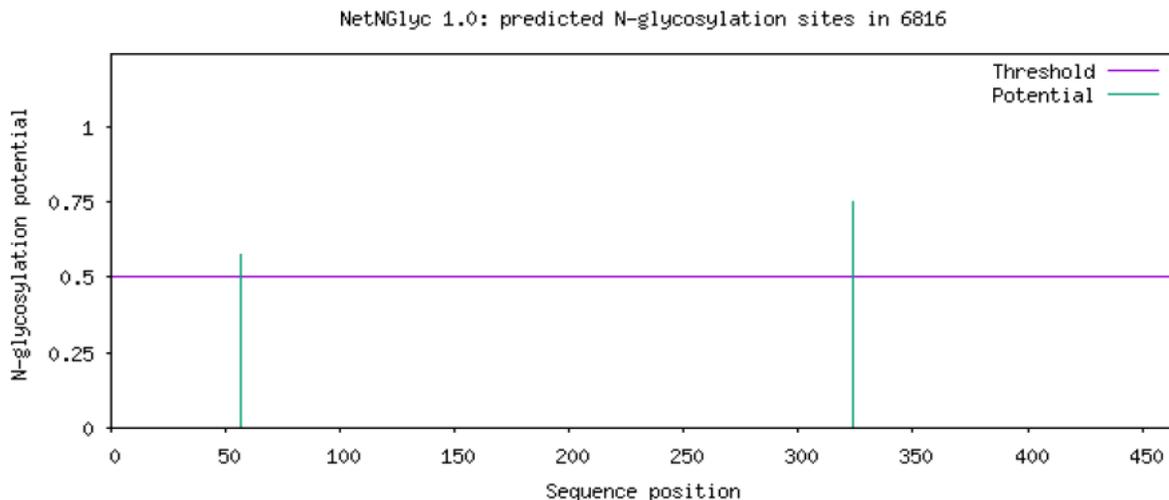


Fig. A6.1. Posibles N-glicosilaciones para la AXE 6816.

Tabla A6.2. Determinación de sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína 6962

<p align="center">Secuencia aa proteína 6962</p> <p align="center">Las asparaginas que se prevé que estén N-glicosiladas resaltadas en rojo</p> <p align="center"><i>Sequon</i> Asn-Xaa*-Ser/Thr resaltadas en azul</p>		
<p>MKLTAITALLVAAAAVPTGIERRQFGMTENDLKSGSCKKITLVYARGSTEMGNMGSSLGPPTCSGLKKK FPGQVACQGVGSPYNAGLGTNALPGDGTSAAAYGEAEKMFNLAASKCPDTIIVGGGYSQGAAVMVAS VRRLEATKAKMAGVVLYGNTRNRQEHGKIPNFPEDKALTICNASDGVCGGALLVTPGHLTYQTKVPA VDWLAERIRAQESSGGSSSSSSASSTDSSASDDSSSSGSSTGSGGLFGGLRRLRGASSAAADTSADTSTAS DSSSDSGASTGSTGGSRFSSFLSRMRGMRGGK</p>		
Sitio potencial de N-glicosilación	<i>Sequon</i>	Potencial
<p align="center">No se encontraron sitios de posible glicosilación en esta secuencia</p>		
<p>*Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina</p>		

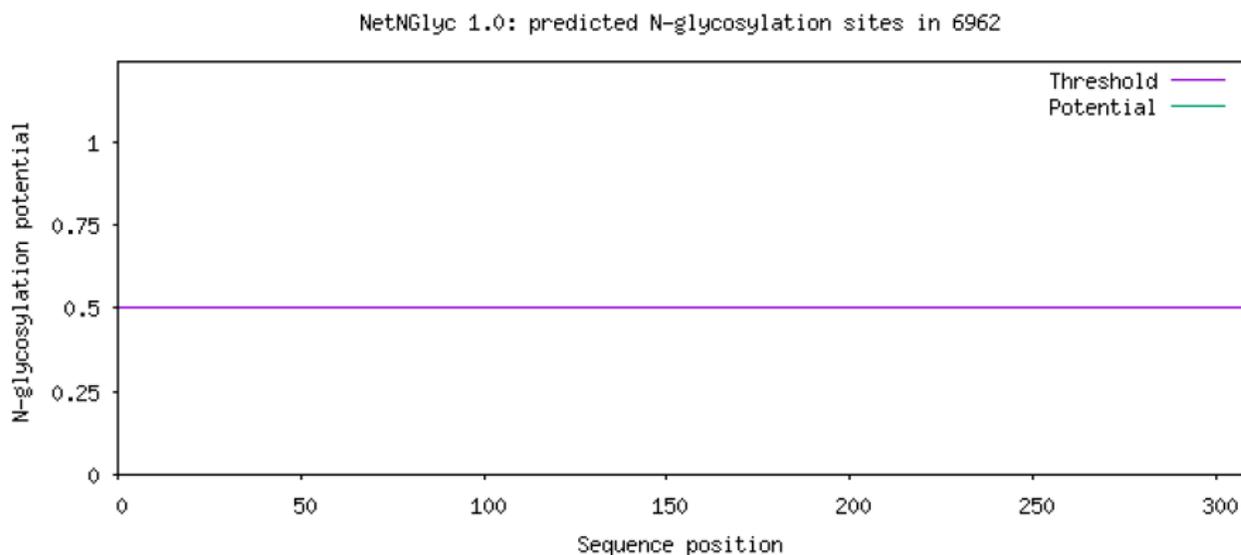


Fig. A6.2. Posibles N-glicosilaciones para la cutinasa 6962.

Tabla A6.3. Determinación de sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína 7317

<p align="center">Secuencia aa proteína 7317</p> <p align="center">Las asparaginas que se prevé que estén N-glicosiladas resaltadas en rojo</p> <p align="center"><i>Sequon</i> Asn-Xaa*-Ser/Thr resaltadas en azul</p>		
<p>MKLTTILSCMLYAATAVVVAAPATIERRTSYSGGTTANDVANKAPCTPLTFIFARGSTERGTMGSSVGPALA KQLIASLGASKVSVQGVDTATIQSNVLRGCEGGKVMAKLAKDQLARCGNTKIAIAGYSQGAMVVHYA VKSGGLSPDVVSSAVVYGDPQNRRESVGSPLPAPKTKKFCARGDGCETGGFAITAAHLAYTNNGDIAEGA KFIIQQAGL</p>		
Sitio potencial de N-glicosilación	<i>Sequon</i>	Potencial
<p align="center">No se encontraron sitios de posible glicosilación en esta secuencia</p>		
<p>*Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina</p>		

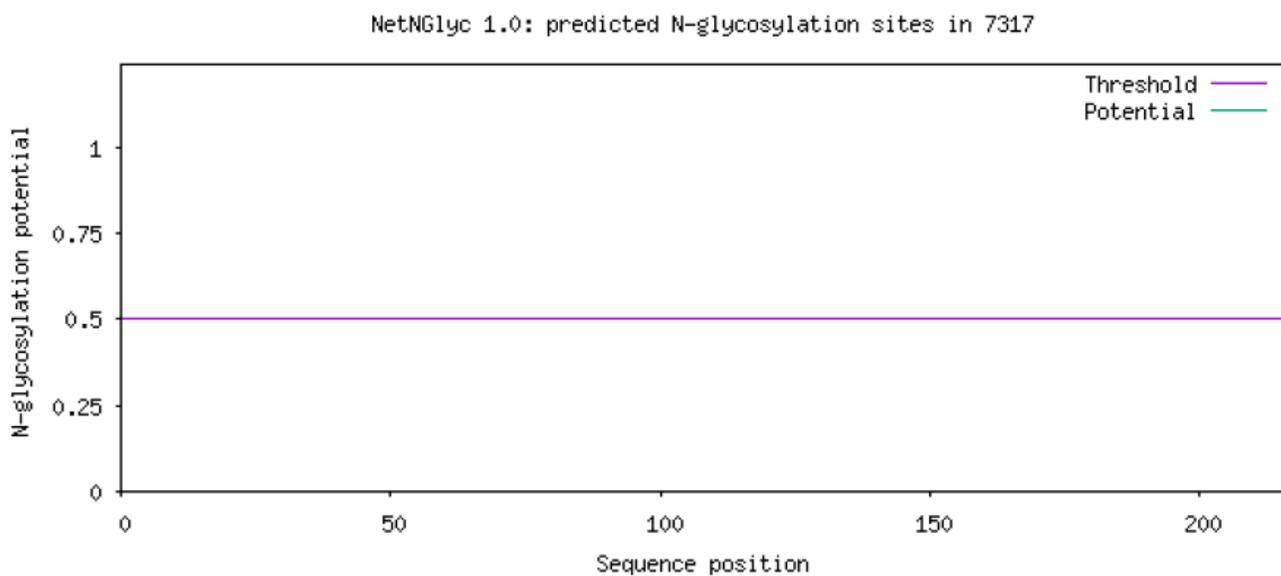


Fig. A6.3. Posibles N-glicosilaciones para la cutinasa 7317.

Tabla A6.4. Determinación de sitios potenciales de N-glicosilación para la proteína 8471

<p align="center">Secuencia aa proteína 8471</p> <p align="center">Las asparaginas que se prevé que estén N-glicosiladas resaltadas en rojo</p> <p align="center"><i>Sequon</i> Asn-Xaa*-Ser/Thr resaltadas en azul</p>		
<p>MVAFFNLVIALVATAIAVEAAPIDNTIEKRAGGCSSYVIINTRGTGEMQQQSSGFRTMNRKVMGQKSGG SIYNTVYSAGVTQMSGRGTADIVRKVSSTLSSNPNTCFILEGYSQGAAATTNALPKLTGKNFDAVKGVFLI GNPMMHKGKACNVDTKGGKSTMDVNGMSAALGGIPDNWVSKTMDVCNYGDGVCDRHGFGINMQ HLAYPASSSTQSMGAKFILKQLNGASSSSGGGAEAACTDSAPAADSSASSKSKRQFGGLSRLGGGGGGG GSSRLDKLKSMTFGGGASSEASGSTEASGSTEAGSAASCSTPASGGASSDTGSNGTTASAEDSGSASTGAD ASADSGADTGSDSGADAGGGSRDLKLSMFGGGAGGSSGGLGRLSALRGGGSGGGMSRLSKLRGMGG MGALSKLRGGS</p>		
Sitio potencial de N-glicosilación	<i>Sequon</i>	Potencial
325	NGTT	0.5221
*Xaa es cualquier aminoácido excepto prolina		

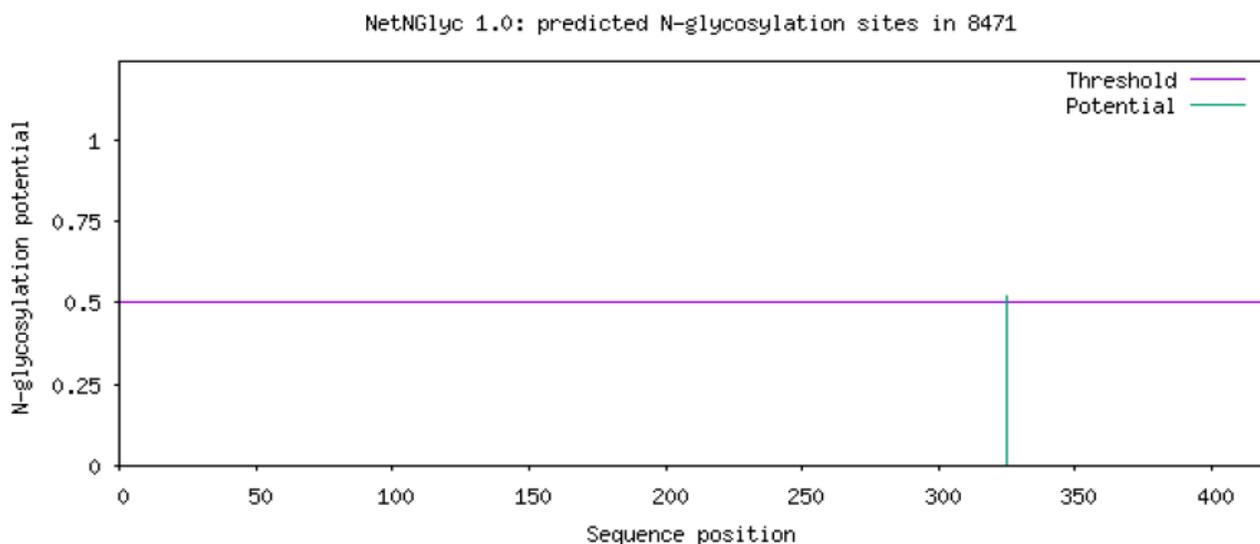


Fig. A6.4. Posibles N-glicosilaciones para la cutinasa 8471.

Resultados obtenidos para determinar sitios potenciales de O-glicosilación por medio del servidor NetOGlyc 4.0 Server (Steentoft *et al.*, 2013)

Tabla A6.5. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 6816

Proteína 6816		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
131	T	0.7812
160	T	0.5437
177	S	0.7467
246	S	0.7950
249	T	0.7352
250	S	0.9374
251	S	0.8779
252	S	0.9566
253	S	0.9444
254	S	0.8986
255	S	0.9614
257	S	0.9788
259	S	0.9698
260	S	0.9635
261	T	0.9336
263	S	0.9707
265	S	0.9598
267	S	0.9411
269	T	0.9764
270	S	0.9333
271	S	0.9760
273	S	0.9340
277	T	0.8605
280	S	0.8719
281	S	0.9303
283	T	0.9390
286	S	0.8478
287	S	0.9453

Tabla A6.5. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 6816 (cont.)

Proteína 6816		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
291	T	0.8487
293	S	0.7661
297	S	0.7773
304	T	0.7904
307	T	0.5316
308	S	0.7237
312	T	0.7051
317	S	0.5111
318	S	0.5403
326	T	0.6939
328	T	0.8806
329	S	0.9512
330	T	0.8486
332	T	0.9257
335	S	0.9737
336	T	0.8970
338	T	0.9469
339	T	0.8638
340	S	0.9464
343	S	0.9117
344	T	0.9552
345	T	0.9257
346	T	0.9507
348	T	0.9387
352	T	0.9186
356	S	0.8953
363	T	0.8104
364	S	0.6723

Tabla A6.5. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 6816 (cont.)

Proteína 6816		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
366	T	0.6646
367	T	0.8186
369	S	0.7860
371	T	0.8666
378	T	0.6068
379	S	0.8217
380	T	0.6113
382	T	0.6291
384	T	0.8474
391	T	0.8402
395	T	0.8313
400	T	0.7601
402	T	0.8521
417	T	0.8811
422	S	0.9671
424	T	0.9427
432	T	0.9675
434	S	0.9770
435	S	0.9804
439	T	0.9290
442	T	0.7808
446	S	0.8697
447	S	0.6858
448	S	0.5380
449	S	0.6157

Tabla A6.6. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 6962

Proteína 6962		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
29	T	0.5626
193	T	0.5482
201	T	0.6384
219	S	0.5569
220	S	0.6125
223	S	0.8765
224	S	0.8169
225	S	0.8790
226	S	0.8736
227	S	0.9091
228	S	0.8828
230	S	0.8704
231	S	0.9426
232	T	0.8666
234	S	0.8831
235	S	0.9051
237	S	0.8951
240	S	0.6380
241	S	0.8467
242	S	0.6239
243	S	0.8674
245	S	0.5460
246	S	0.8851
247	T	0.7244
249	S	0.5779
263	S	0.9304
264	S	0.9493
269	T	0.8579
270	S	0.8777
273	T	0.8271

Tabla A6.6. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 6962 (cont.)

Proteína 6962		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
274	S	0.9328
275	T	0.9068
277	S	0.9110
279	S	0.8907
280	S	0.9169
281	S	0.9125
274	S	0.9328
275	T	0.9068
277	S	0.9110
279	S	0.8907
280	S	0.9169
281	S	0.9125
283	S	0.9075
286	S	0.8716
287	T	0.7066
289	S	0.7295
290	T	0.6168
293	S	0.6190
296	S	0.5155
297	S	0.6337

Tabla A6.7. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 7317

Proteína 7317		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
15	T	0.5
28	T	0.8762
29	S	0.9250
31	S	0.9149
34	T	0.6375
35	T	0.8003
65	S	0.5456
192	T	0.6075

Tabla A6.8. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 8471

Proteína 8471		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
230	S	0.6234
233	S	0.8436
242	T	0.9385
244	S	0.7932
250	S	0.8738
251	S	0.8839
253	S	0.8663
254	S	0.8881
256	S	0.6987
283	S	0.6884
290	S	0.5148
291	S	0.6075
294	S	0.8970
296	S	0.7258
297	T	0.6881
300	S	0.8676
302	S	0.7916

Tabla A6.8. Determinación de sitios potenciales de O-glicosilación para la proteína 8471 (cont.)

Proteína 8471		
Sitio potencial de O-glicosilación	Aminoácido	Potencial
303	T	0.8409
306	S	0.7170
309	S	0.9128
311	S	0.7534
312	T	0.8619
315	S	0.8438
319	S	0.8958
320	S	0.8166
322	T	0.7757
324	S	0.8673
327	T	0.8256
328	T	0.9503
329	T	0.8625
331	S	0.9263
335	S	0.7918
337	S	0.8888
339	S	0.8796
340	T	0.9062
345	S	0.8378
348	S	0.9060
352	T	0.7434
354	S	0.8074
356	S	0.6997
371	S	0.5359
395	S	0.5