



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Análisis *in silico*, expresión y actividad de la enzima PHB depolimerasa de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en polietileno tereftalato (PET)

Tesis

Para obtener el grado de:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Graciela Jesed Reyes Trujillo

Director de tesis:

DC. Luis Javier Martínez Morales

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to DC. Luis Javier Martínez Morales, is written over the text of the director's name.

Puebla, Pue., Febrero 2026

La vida de una mujer en la ciencia es un testimonio de coraje, pasión y resiliencia. Durante siglos, muchas de ellas enfrentaron barreras invisibles, prejuicios y la falta de reconocimiento, pero nunca dejaron que eso apagara su curiosidad ni su deseo de descubrir. Ejemplos claros son: Marie Curie, quien trabajó en laboratorios improvisados, enfrentando el escepticismo y las dificultades, y aun así abrió caminos que transformaron la física y la medicina. Ella nos enseñó que “nada en la vida debe ser temido, solamente comprendido.” Rosalind Franklin perseveró en silencio, confiando en la evidencia científica, y su trabajo fue fundamental para descifrar el ADN, demostrando que la pasión y la precisión no necesitan aplausos inmediatos para cambiar el mundo. Barbara McClintock y Rita Levi-Montalcini nos muestran que incluso en la soledad y la adversidad, la dedicación y el amor por la ciencia pueden dar frutos extraordinarios.

Hoy, May-Britt Moser y tantas otras científicas contemporáneas continúan ese legado, recordándonos que cada desafío es una oportunidad y que cada esfuerzo deja una huella en la historia del conocimiento. Estas mujeres nos inspiran a creer que los obstáculos son escalones, que la perseverancia es fuerza y que el conocimiento no tiene género. Nos enseñan que, con pasión y constancia, una mente decidida puede iluminar el mundo entero.

“Ser mujer en la ciencia es transformar la duda en descubrimiento, el obstáculo en impulso y el esfuerzo en legado.”

Marie Curie (1867–1934), Rita Levi-Montalcini (1909–2012), Barbara McClintock (1902–1992), Rosalind Franklin (1920–1958), May-Britt Moser (2014).

Agradecimientos

A Dios, fuente de toda sabiduría y fortaleza, por guiar mis pasos en cada momento de este camino. Gracias por darme la luz para seguir adelante cuando las fuerzas parecían agotarse, por acompañarme en el silencio de mis dudas y regalarme la certeza de que todo esfuerzo tiene su propósito.

A mis padres, José Ángel Reyes, Graciela Trujillo y Carmina Reyes, y a mis hermanos Ikani, María, Ángel y Yefri, por su amor y apoyo incondicional, por enseñarme con el ejemplo el valor del trabajo, la honestidad y la perseverancia. Gracias por cada sacrificio, por cada palabra de aliento, por las risas compartidas y por creer en mí incluso cuando yo dudaba. Y, por supuesto, a mis perritas Lin, Adelita y Kiara, por su amor incondicional y lealtad infinita.

A mis amigos: Andy, por ser mi compañera, mi refugio y mi impulso, por compartir conmigo risas, desvelos y consejos sinceros; a Toni, por su apoyo incondicional; a Yovani, compañero de técnicas de laboratorio, con quien fue un verdadero placer compartir conocimientos y quien me alentó a seguir aprendiendo. Su presencia constante fue un pilar fundamental en los momentos más exigentes. A Pao, Luz, Leti, Liz, Yahev y Vale, quienes, con su apoyo constante, su paciencia y su alegría, me recordaron que el conocimiento también se nutre de la amistad. Gracias por acompañarme en los momentos difíciles, por celebrar cada pequeño logro y por estar presentes de corazón, aun en la distancia.

A mis maestros, por ser faros de conocimiento y ejemplo de vocación; a aquellos que no solo enseñaron teoría, sino también pasión, disciplina y amor por aprender. Gracias por inspirarme a creer que la educación transforma vidas y por sembrar en mí la certeza de que el conocimiento cobra sentido cuando se comparte con humildad y propósito.

A los chicos y chicas de servicio social, prácticas profesionales o de intercambio del Programa Delfín, con quienes compartí laboratorio y que contribuyeron a mi aprendizaje como instructora.

A todos ustedes, gracias por ser parte de esta historia. Cada palabra, gesto y enseñanza dejaron huellas que me acompañarán siempre. Este logro es tanto mío como de ustedes, porque cada uno, desde su lugar, fue una pieza esencial para alcanzar esta meta.

Con todo mi corazón, gracias.

Índice

Agradecimientos	3
Índice	6
Resumen	7
Abstract	8
1. Antecedentes	9
1.1 Contaminación por plásticos	10
1.2 Clasificación de los plásticos	12
1.2.1 Composición química	12
1.2.2 Comportamiento térmico	13
1.2.3 Ordenamiento de las cadenas de los polímeros	14
1.3 Bioplásticos y plásticos biodegradables	14
1.4 Tratamiento y eliminación de plásticos	15
1.5 Proceso de degradación del PET: biodegradación enzimática	16
2. Género Azospirillum	18
2.1 Vía metabólica involucrada en la producción de PHB	20
2.2 Características de las PHB depolimerasas (PhaZ/PhbZ)	21
2.3 Tipos de PHB depolimerasas	23
2.4 Antecedentes directos	23
3. Planteamiento del problema	24
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general	25
4.2 Objetivos específicos	25
5. Materiales y métodos	26
5.1 Diseño del estudio	26
5.2 Técnicas y procedimientos	27
5.2.1 Análisis bioinformáticos	27

– Obtención de secuencias y modelos tridimensionales	
– Análisis filogenético	
5.2.2 Análisis experimental	28
– Tratamiento de cepas bacterianas	
– Transformación de pMBA22 a <i>E. coli</i> S17.1	
– Condiciones de cultivo	
– Expresión, purificación y detección de PhaZ	
– Tratamiento del PET	
– Determinación de la actividad por peso constante	
– Detección de subproductos generados	
6. Resultados	29
6.1 Análisis del árbol filogenético	30
6.2 Visualización de estructuras tridimensionales de PHB y PET	31
6.3 Modelado 3D de PhaZ de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	32
6.4 Modelos de interacción PhaZ–PET	32
6.5 Modelos de interacción PETasa–PET	34
6.6 Producción, sobreexpresión y purificación de PhaZ	35
6.7 Ensayo comparativo de la actividad de PhaZ sobre PET	36
6.8 Observaciones microscópicas del PET	37
6.9 Microscopía de fluorescencia	39
6.10 Detección de subproductos generados	40
6.11 Determinación de la actividad por peso constante	41
7. Discusión	42
8. Conclusiones	43
9. Perspectivas	43
10. Bibliografía	48

11. Anexos	55
11.1 Anexo I. Técnicas de laboratorio	55
11.2 Anexo II. Generación de oligonucleótidos específicos y construcción del plásmido	59

Resumen

El polietileno tereftalato (PET) es uno de los plásticos más utilizados y menos degradables, lo que lo convierte en un problema ambiental significativo. Como alternativa, se han estudiado enzimas hidrolíticas capaces de romper sus enlaces éster, entre ellas la más estudiada es la PETasa de *Ideonella sakaiensis*. De manera paralela, las PHB depolimerasas (PhaZ) degradan polímeros como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) rompiendo el enlace éster del mismo, aunque su función se ha investigado menos que su producción, especialmente en *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

Los análisis *in silico* revelaron que ambas PhaZ se agrupan como especies parafiléticas respecto a hidrolasas de PET y que la PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 establece múltiples interacciones con los anillos aromáticos del PET, superando en afinidad a la PETasa. Experimentalmente, la evaluación con PhaZ purificada de *A. baldaniorum* Sp245, su mutante sin phaZ y PhaZ en *E. coli* s17.1 sobreexpresada evidenció: microfisuras, poros y fragmentación en la superficie del PET, además de fluorescencia asociada a oligómeros aromáticos. Los ensayos colorimétricos y de pH confirmaron la generación de grupos carboxílicos derivados de la hidrólisis. El análisis de peso constante mostró una reducción significativa de la masa del PET, destacando *A. baldaniorum* Sp245 como la cepa con mayor capacidad de degradación.

Estos resultados demuestran el potencial biotecnológico de las PhaZ como hidrolasas capaces de actuar sobre PET, posicionándose como candidatas relevantes para desarrollar procesos sostenibles de biorreciclaje de plásticos.

Abstract

Polyethylene terephthalate (PET) is one of the most widely used and least biodegradable plastics, making it a major environmental concern. As an alternative approach, hydrolytic enzymes capable of breaking its ester bonds have been studied, among which PETase from *Ideonella sakaiensis* is the most extensively characterized. In parallel, poly(β -hydroxybutyrate) (PHB) depolymerases (PhaZ) degrade polymers such as PHB by hydrolyzing ester bonds; however, their functional characterization has been less explored than their production, particularly in *Azospirillum brasilense* Sp7 and *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

In silico analyses revealed that both PhaZ enzymes cluster as paraphyletic species relative to PET hydrolases and that PhaZ from *A. baldaniorum* Sp245 establishes multiple interactions with the aromatic rings of PET, exhibiting higher predicted affinity than PETase. Experimentally, assays using purified PhaZ from *A. baldaniorum* Sp245, its *phaZ*-deficient mutant, and PhaZ overexpressed in *Escherichia coli* S17-1 revealed the formation of microcracks, pores, and surface fragmentation on PET, as well as fluorescence associated with aromatic oligomers. Colorimetric and pH-based assays confirmed the generation of carboxyl groups derived from ester hydrolysis. Constant-weight analyses showed a significant reduction in PET mass, with *A. baldaniorum* Sp245 exhibiting the highest degradation capacity among the tested strains.

Overall, these results demonstrate the biotechnological potential of PhaZ enzymes as hydrolases capable of acting on PET, positioning them as promising candidates for the development of sustainable plastic biorecycling processes.

Antecedentes

Los plásticos tienen cualidades versátiles entre las que destacan su durabilidad y resistencia a la degradación, por lo que tienen gran presencia a nivel industrial y en muchos casos han reemplazado el uso de cerámicos y metales, algunos de los plásticos han llegado a ser imprescindibles en la vida cotidiana. El poli(etilen tereftalato) (PET) es el polímero derivado del petróleo más utilizado en todo el mundo y ha llegado a formar parte de la sociedad humana moderna debido a sus propiedades deseables tales como: ligereza, durabilidad, bajo precio, maleabilidad, entre otras (1). Sin embargo, el uso indiscriminado de este material y su no degradabilidad ha sido considerada como una causa importante de problemas ambientales. El PET presenta un tiempo estimado de degradación de 2 500 años, debido a su alta resistencia y estabilidad estructural, tanto cuando es enterrado en suelos como cuando sufre procesos de fragmentación en microplásticos inducidos por radiación ultravioleta y temperatura en ecosistemas marinos (1, 2).

Existen distintas causas en las que se han incorporado los residuos plásticos en humanos, dentro de las cuales se encuentra la contaminación en productos del mar, la presencia residuos plásticos de en alimentos procesados y bebidas, así como la inhalación de partículas presentes en el aire, entre otros, se ve influenciado directamente por la creciente contaminación, el alto volumen de plásticos en conjunto con los microplásticos y nanoplásticos ambientales (MNP) han generado consecuencias para la salud. Investigaciones confirmaron la presencia de MNP en el hígado y el cerebro de humanos. Se han registrado concentraciones significativas de MNP de polietileno entre otros polímeros en estos órganos. Un estudio revela que las concentraciones de MNP en muestras de cerebro de difuntos fueron de 7 a 30 veces mayores que las concentraciones observadas en hígados o riñones, y las muestras de cerebro de casos de demencia mostraron una presencia de MNP incluso mayor (3). Se ha intentado abordar la problemática de contaminación por plásticos por diversos procesos como la incineración, reciclaje, fotodegradación y procesos químicos. Sin embargo, estas medidas presentan desventajas. Por ejemplo, durante el proceso de incineración se libera una variedad de gases (ácido cianhídrico y ácido clorhídrico) y partículas al aire altamente tóxicas, potencialmente dañinos para la salud. En el caso del reciclaje, este es complicado y consume mucho tiempo, además de que la presencia de muchos aditivos en los plásticos, como pigmentos y cubiertas, limita el proceso (2, 4). En vista de esta situación, se ha optado por otras alternativas que sean amigables con el ambiente tal es el caso de la biorremediación. En la búsqueda de remediar la problemática surgió el bioplástico poli-3-hidroxibutirato (PHB) como sustituto del plástico que comenzó a proponerse en la década de 1980 (5). Fue entonces cuando el interés en este biopolímero creció debido a su biodegradabilidad y su capacidad para ser producido a partir de recursos renovables. El desarrollo del PHB se vinculó con preocupaciones ambientales emergentes, lo que incentivó su estudio como un

material sostenible para aplicaciones que tradicionalmente usaban polímeros convencionales (6).

Contaminación por plásticos

Desde su descubrimiento en 1907, los plásticos han revolucionado la industria manufacturera, esto debido a sus cualidades versátiles entre las que destacan su durabilidad y resistencia a la degradación, en muchos casos han reemplazado el uso de vidrio y papel como materiales de empaque, logrando tener gran presencia en las industrias, estos productos han llegado a ser imprescindibles en la vida cotidiana (2). Sin embargo, estas mismas cualidades han convertido a los plásticos en una fuente de contaminación a nivel mundial. En 2021, la producción mundial aumentó un 4 %, hasta superar los 390 millones de toneladas, de las cuales se estima que el 79 % se convirtieron en residuos plásticos, terminan en vertederos o en el ambiente (7, 8). La contaminación por plásticos trae consigo acumulación en los océanos, en la figura 1 se muestra una representación de las manchas de basura concentradas en aguas tranquilas y estables de muchos de los giros oceánicos del mundo (9). Los plásticos se fragmentan en microplásticos (partículas de menos de 5 mm), que llegan a ser ingeridos por gran diversidad de especies marinas, causando obstrucciones digestivas y en algunos casos llegan a causar la muerte. Además, estas partículas pueden actuar como vectores de contaminantes químicos, afectando no solo a los organismos individuales, sino también a las redes tróficas. La contaminación por plásticos no solo afecta los océanos, sino también a los ecosistemas terrestres (10 –12). En el suelo, los plásticos pueden alterar la microbiota, teniendo efectos en la fertilidad y reduciendo la capacidad de retención de agua. Los fragmentos de plásticos, al degradarse, liberan aditivos tóxicos como ftalatos y bisfenol A (BPA), los cuales tienen efectos disruptores endocrinos en organismos vivos, también implican riesgos potenciales para la salud humana. Los microplásticos han sido hallados en alimentos y agua potable, lo que sugiere que pueden ingresar al organismo humano a través de la dieta (3, 13, 14). Aunque los efectos de la exposición prolongada a los microplásticos son aún inciertos, se conoce que estos pueden portar contaminantes químicos peligrosos (13).

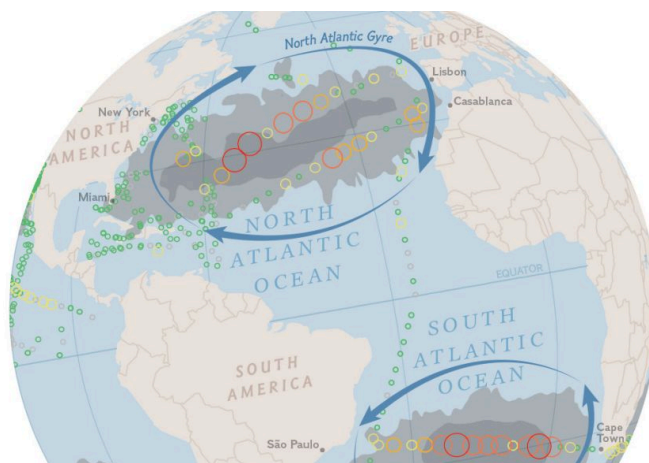


Figura 1. Representación de las manchas de basura (9).

El Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) muestra que el problema de la contaminación por plásticos no se produce de forma aislada. Los riesgos ambientales, sociales, económicos y sanitarios de los plásticos deben evaluarse junto con otros factores de estrés ambiental, como el cambio climático, la degradación de los ecosistemas y el uso de los recursos (15).

En el reporte de Pew Charitable Trusts y SYSTEMIQ, publicado en agosto de 2020, prevé que para el año 2040 se triplicará el flujo de materiales plásticos en el océano si no se empiezan a realizar importantes cambios políticos, de innovación y de comportamiento (Figura 2) (11).

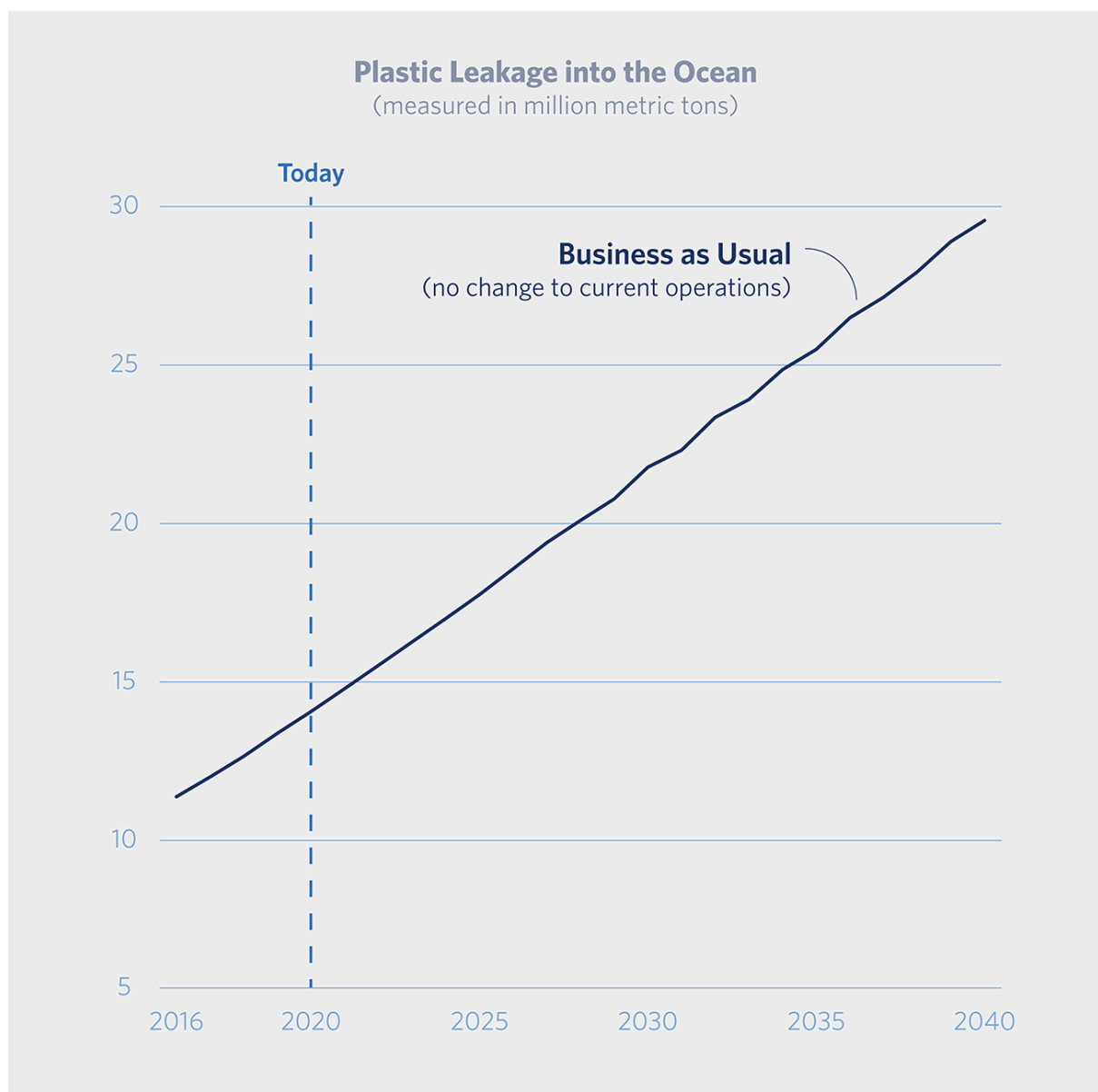


Figura 2. Estadísticas de contaminación por Simon Reddy y Winnie Lau, (2021).

Clasificación de los plásticos

Los plásticos convencionales son polímeros sintéticos, que se fabrican a partir de recursos no renovables, como el petróleo crudo o el gas natural. Son ampliamente utilizados en diversas aplicaciones debido a su versatilidad, bajo costo y propiedades específicas. Su estructura química está diseñada para resistir la degradación. Se clasifican principalmente según su composición química, comportamiento térmico y ordenamiento de las cadenas del polímero (1).

Composición química

Los plásticos se pueden clasificar de diferentes maneras, entre ellas por su composición química; esta define su estructura molecular, propiedades físicas, comportamiento térmico y su degradabilidad. Esta clasificación se basa en los monómeros que los componen y el tipo de enlace repetitivo que forman la cadena principal del polímero. Las reacciones de polimerización suelen dividirse en dos grupos mediante reacciones de adición que dan lugar a los polímeros de adición y reacciones de condensación que dan lugar a los polímeros de condensación. En las siguientes tablas se muestran ejemplos de ambos grupos (16).

Tabla 1. Polímeros de adición de uso frecuente (16),

Polímero	Abreviatura	Unidad repetitiva
polietileno	PE	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$
polipropileno	PP	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
poliestireno	PS	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array}$
poli(cloruro de vinilo)	PVC	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{Cl} \end{array}$
poliacrilonitrilo	PAN	$\begin{array}{c} -\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{C}\equiv\text{N} \end{array}$

poli(metacrilato de metilo)	PMMA	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{CH}_2-\text{CH}- \\ \\ \text{COOCH}_3 \end{array}$
polibutadieno (1,4-cis)	PB	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$

Tabla 2. Polímeros de condensación de uso frecuente (16),

Polímero	Abreviatura	Unidad de repetición
Poliéster		$-\text{R}-\text{OCO}-\text{R}'-\text{COO}-$
Poliamida	PA	$-\text{NH}-\text{R}-\text{NHCO}-\text{R}'-\text{CO}-$
Policarbonato	PC	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ -\text{O}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CO}- \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Poli(etilen tereftalato)	PET	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COO}-$
Poliuretano	PU	$-\text{NH}-\text{COO}-\text{R}-\text{OCO}-\text{NH}-\text{R}'-$
Resina de fenol-formaldehido		$\begin{array}{cc} \text{OH} & \text{OH} \\ & \\ -\text{C}_6\text{H}_3- & \text{CH}_2- & -\text{C}_6\text{H}_3- \\ & & \\ \text{CH}_2 & & \text{CH}_2 \end{array}$

Comportamiento térmico

Termoplásticos: Son plásticos que se ablandan al calentarse y se pueden moldear repetidamente sin sufrir cambios químicos, algunos ejemplos y usos del polietileno (PE) son: bolsas, envases, tuberías, juguetes; del polipropileno (PP): contenedores de alimentos, tapones, jeringas; del poliestireno (PS): vasos desechables, envases de alimentos, aislamiento térmico; del policloruro de vinilo (PVC): tuberías,

ventanas, mangueras, cables; del policarbonato (PC): Lentes, discos compactos, cascos protectores (1, 16, 17).

Termoestables: Una vez moldeados, no pueden volver a ablandarse con calor debido a su estructura reticulada, algunos ejemplos y usos de la baquelita son: Interruptores, enchufes eléctricos; de resinas epóxicas: Adhesivos, recubrimientos protectores; del poliuretano (PU): Espumas para muebles, recubrimientos, adhesivos (16, 17).

Elastómeros: Materiales con alta elasticidad que pueden volver a su forma original tras ser deformados como el caucho natural y sintético, así como las siliconas (18).

Ordenamiento de las cadenas de los polímeros

Cristalinos: Poseen una estructura molecular ordenada que proporciona resistencia mecánica y térmica; algunos ejemplos son: el polietileno de alta densidad (HDPE), y el nylon. Amorfo: No tienen un orden molecular definido, lo que les da transparencia y flexibilidad, ejemplos son el poliestireno y el policarbonato. Semi-cristalinos: estos combinan propiedades cristalinas y amorfas, un claro ejemplo es el polietileno de baja densidad (LDPE) y el polipropileno (1, 18).

También se clasifican según su uso, y en donde se encuentran los plásticos de uso general: Usados en aplicaciones comunes debido a su bajo costo y facilidad de producción (PE, PP, PS); los plásticos de ingeniería: Tienen mejor rendimiento mecánico y térmico, usados en aplicaciones específicas (Acrilonitrilo Butadieno Estireno (ABS), policarbonato, nylon), y los plásticos especiales diseñados para aplicaciones técnicas o industriales específicas (Politetrafluoroetileno (PTFE, teflón), poliéter éter cetona (PEEK) (17, 18).

Otra clasificación es por su uso según el sector, debido a que cada tipo tiene propiedades específicas que lo hacen adecuado para distintas aplicaciones. Por ejemplo, el PET es común en botellas debido a su transparencia y resistencia, mientras que el PVC se usa en aplicaciones industriales por su estabilidad y resistencia química: Embalaje: Bolsas, botellas, envolturas (PE, PP, PET); Construcción: Tuberías, ventanas, revestimientos (PVC, poliuretano); Automotriz: Tableros, parachoques, aislamiento (ABS, PC); Electrónica: Carcasas, circuitos (ABS, epoxi); Médico: Jeringas, prótesis, bolsas de sangre (PP, silicona) (1, 17, 18).

Bioplásticos y plásticos biodegradables

Plásticos Biodegradables: Estos materiales son biopolímeros producidos a partir de recursos renovables, como el almidón de maíz o los aceites vegetales, y tienen la capacidad de biodegradarse en condiciones de compostaje o bajo ciertos factores ambientales como la temperatura, la presencia de microorganismos específicos y la disponibilidad de oxígeno (1, 19). Bioplásticos, como el PHA y el PLA, son considerados alternativas sostenibles a los plásticos convencionales. Sin embargo,

su producción a escala comercial es aún costosa, y su degradación efectiva depende de la disposición adecuada en instalaciones de compostaje industrial (20).

Tratamiento y eliminación de plásticos

El reciclaje prolonga la vida útil de los plásticos, consiste en recolectar, procesar y reutilizar plásticos para fabricar nuevos productos (17). Principalmente hay 3 métodos que son: a) el reciclaje mecánico, método más común en donde los plásticos se limpian, trituran y funden para fabricar nuevos productos, b) es el caso de las botellas de PET convertidas en fibras textiles. En tanto que, el reciclaje químico consiste en descomponer los plásticos en monómeros para sintetizar nuevos polímeros, es el caso de la despolimerización del PET para fabricar nuevos materiales. Finalmente, el reciclaje energético, en el cual los plásticos se queman para generar energía, aunque emiten gases contaminantes, por ejemplo, la incineración con recuperación energética (21).

La incineración es una técnica ampliamente utilizada para los plásticos no reciclables, transformándolos en energía mediante su combustión. Este método presenta una sola cualidad que se podría llegar a considerar como ventaja, la cual es la reducción del volumen de residuos y su gran desventaja es la emisión de gases y generación de subproductos tóxicos. Otra técnica común de eliminación aparente son los vertederos, en esta técnica los plásticos se depositan en rellenos sanitarios. Sin embargo, la degradación puede tomar siglos y la contaminación de suelos y aguas subterráneas es su mayor desventaja (22).

A raíz de las desventajas antes mencionadas se han implementado nuevas alternativas tecnológicas como la pirólisis, la cual consiste en la descomposición térmica de plásticos a altas temperaturas en ausencia de oxígeno, convirtiéndolos en combustibles líquidos o gaseosos. Ejemplo: Conversión de PE en petróleo crudo sintético (23, 24). Otra alternativa es la gasificación, en este proceso los plásticos se convierten en gas de síntesis (syngas) mediante altas temperaturas y oxígeno controlado. Este gas puede usarse como fuente de energía (1, 22, 25).

Por último, se tiene la técnica de degradación enzimática, que consiste en el uso de microorganismos o enzimas que escinden los enlaces de los polímeros generando oligómeros y/o monómeros, el resultado de la catálisis enzimática da lugar a una economía circular en la que estos subproductos se convierten en materia prima (25, 26). Al respecto, las hidrolasas más estudiadas son: la PETasa de *Idonella sakaiensis*, la Cutinasa de PET de *Thermobifida fusca*, la METasa de *Idonella sakaiensis*. La figura 3 muestra un esquema general de la degradación del PET. PETasa/cutinasa escinden el enlace éster del PET para producir tereftalato de bis(2-hidroxietilo) (BHET), tereftalato de mono(2-hidroxietilo) (MHET), ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG). El MHET es hidrolizado nuevamente por la segunda enzima, MHETasa, para producir ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) (27, 28).

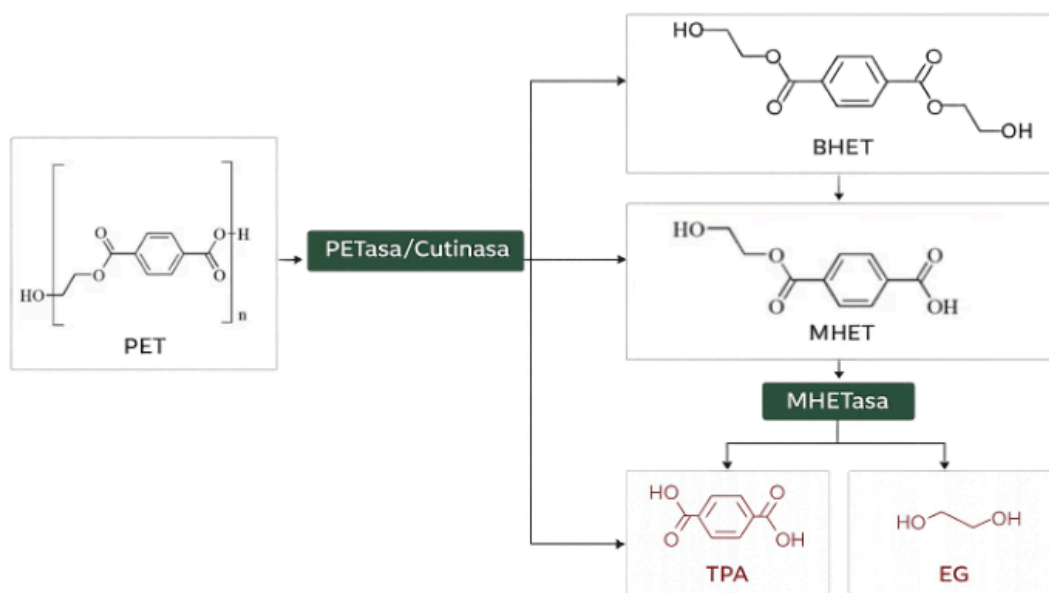


Figura 3. Representación esquemática de la degradación enzimática del PET catalizada por PETasa/ Cutinasa y MHETasa.

Proceso de degradación del PET; biodegradación enzimática

El proceso de biodegradación enzimática se presenta en tres etapas principales:

- 1) Adsorción de la Enzima: La enzima se adhiere a la superficie del polímero PET.
- 2) Hidrólisis de los enlaces Éster: Una vez adherida, la enzima cataliza la hidrólisis de los enlaces éster en las cadenas poliméricas del PET (26). Esto convierte los polímeros en monómeros.
- 3) Liberación de Productos de Degradación: A medida que los enlaces se rompen, se liberan productos como ácido tereftálico (un compuesto aromático) y etilenglicol (un alcohol) (26, 27).

Se ha descrito que, durante la degradación, el PET sufre una pérdida de integridad estructural, volviéndose más frágil y menos translúcido. Las áreas expuestas a la enzima pueden volverse más opacas o mostrar signos de erosión superficial a medida que las cadenas poliméricas se rompen. En casos avanzados, el material puede fragmentarse en partículas más pequeñas, resultando en una textura rugosa y quebradiza (25,28).

Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* son bacterias Gram negativas con forma en espiral o bacilar, con tamaños de 1-2 μm de longitud y cuentan con flagelos polares o peritricos que le confieren movilidad. Comúnmente se encuentran en suelos, rizosferas de plantas y ambientes acuáticos (29). Se caracterizan por promover el crecimiento vegetal (PGPR - Plant Growth-Promoting Rhizobacteria), debido a su capacidad de fijar nitrógeno, producción de fitohormonas como el ácido indolacético (AIA) y el ácido indol butírico (IBA) que promueve el desarrollo de raíces, giberelinas y citocininas que regulan el crecimiento y desarrollo vegetal, solubilización de fosfatos que

mejoran la disponibilidad de fósforo en el suelo y producción de sideróforos que secuestran hierro en el ambiente, haciéndolo más accesible para las plantas (29–31).

Estas son bacterias que presentan la capacidad de producir poli- β -hidroxibutirato (PHB), bajo ciertas condiciones como la limitación de nutrientes, la luz ultravioleta y el choque osmótico (29, 32). El PHB es utilizado como fuente de almacenamiento de carbono y energía. La producción de PHB varía dependiendo de las condiciones de cultivo, como la fuente de carbono, la limitación de nutrientes (nitrógeno o fósforo), y las características específicas de cada cepa (29, 30).

En la Tabla 3 se muestran los factores críticos en la producción de PHB y porcentajes del peso seco de PHB de algunas especies de *Azospirillum* bajo ciertas condiciones de cultivo (29, 32–35). El carbono es esencial para la acumulación de PHB y cada especie tiene mayor preferencia o producción de PHB dependiendo del carbohidrato utilizado para su cultivo. La limitación de nutrientes es otro factor importante, el reducir nitrógeno o fósforo en el medio favorece la acumulación de PHB como reserva de energía y carbono (32, 34, 35). Las condiciones de oxígeno contribuyen a mejorar la producción de PHB, ya que evita la competencia metabólica con la respiración aeróbica. Temperatura y pH: Óptimos generalmente entre 28-30°C y pH neutro (6.8-7.5)

Tabla 3. Factores críticos en la producción de PHB en las especies del género *Azospirillum* (29, 32–35).

Especie	% PHB (peso seco)	Fuente de carbono	Limitación	Temperatura óptima	Concentración de O ₂
<i>Azospirillum brasilense</i>	50-60%	Glucosa o sacarosa.	nitrógeno	30°C.	Microaerofilia (2-10% de oxígeno)
<i>Azospirillum baldaniorum</i>	45-55%	Glucosa o lactosa.	Fósforo	30°C.	(2-10% de oxígeno)
<i>Azospirillum melinis</i>	40-55%	Sacarosa.	nitrógeno	30°C.	microaerofilia No especificado
<i>Azospirillum lipoferum</i>	40-50%	Manitol.	nitrógeno	28°C	microaerofilia No especificado
<i>Azospirillum rugosum</i>	35-50%	Manitol o lactosa.	nitrógeno y fósforo.	No especificado	microaerofilia No especificado
<i>Azospirillum thiophilum</i>	30-45%	Glicerol.	sulfato.	28-30°C.	microaerofilia No especificado
<i>Azospirillum</i>	30-40%	Sacarosa o	nitrógeno y	30°C.	Bajo estrés

<i>amazonense</i>		fructosa.	fósforo.		osmótico
<i>Azospirillum irakense</i>	25-35%	Glucosa o galactosa.	nitrógeno y fósforo.	No especificado	Presencia de bajo oxígeno (3-5%).
<i>Azospirillum halopraefere ns</i>	25-35%	Glucosa. Presencia de 1-3% de NaCl.	fósforo	30°C	microaerofilia No especificado
<i>Azospirillum oryzae</i>	20-30%	Lactosa.	oxígeno y nitrógeno.	25-30°C. Alta humedad relativa.	No especificado

Dentro de las especies anteriormente registradas en la Tabla 3 destacan con mayor porcentaje de producción de PHB, las correspondientes a *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum baldaniorum* llegando a acumular hasta el 60% del peso total de la biomasa bacteriana en forma de PHB bajo condiciones limitantes específicas. En virtud de esto se han considerado bacterias con un gran potencial en la producción de bioplásticos biodegradables, ofreciendo una alternativa sostenible frente a los plásticos derivados del petróleo (31, 34, 35).

Azospirillum brasilense Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 son bacilos Gram negativos que presentan la capacidad de producir PHB, polímero biodegradable que es sintetizado principalmente en condiciones favorables, abundancia de fuentes de carbono y una limitación de otros nutrientes esenciales, como nitrógeno o fósforo que sirve como reserva de carbono y energía para su metabolismo (31, 34, 35).

Vía metabólica involucrada en la producción de PHB

El PHB fue descubierto en 1925 por el bacteriólogo francés Maurice Lemoigne, quien trabajaba en el Instituto Pasteur en Francia, observó que ciertas bacterias podían sintetizar este polímero. El PHB es un polímero lineal de (*R*)-3-hidroxiácidos con grupo carboxilo de un monómero, forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente. Su síntesis ocurre en tres pasos principales y utiliza como precursor el acetil-CoA, un metabolito común en muchos organismos (28, 35).

Las condiciones para que se lleve a cabo la síntesis de PHB son la presencia de fuentes de carbono fácilmente asimilables, como glucosa o lactosa, lo que es esencial para la acumulación de PHB. La restricción de nitrógeno o fósforo en el medio de cultivo estimula la síntesis de PHB, ya que la célula redirige el exceso de carbono hacia la formación de este polímero. Por otro lado, la restricción de Oxígeno: Ambientes microaerofílicos (bajas concentraciones de oxígeno) favorecen la acumulación de PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7 (34, 35).

La síntesis de PHB inicia con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotiolasa (producto del gen *phbA*) para formar acetoacetil-CoA. El acetoacetil-CoA es reducido por la enzima Acetoacetil-CoA reductasa (producto del gen *phbB*) a 3-hidroxi-butiril-CoA utilizando NADPH como cofactor. Las unidades de 3-hidroxi-butiril-CoA son polimerizadas por la enzima PHB sintasa (producto del gen *phbC*) para formar PHB, que se almacena en forma de gránulos intracelulares (34, 35).

Cuando las condiciones ambientales son desfavorables la degradación de PHB le permite a la célula utilizar este polímero. La movilización del polímero ocurre cuando hay escasez de carbono en el medio y la bacteria necesita fuentes de energía para su metabolismo. La degradación se activa bajo estrés ambiental o cuando la célula entra en fase estacionaria (32, 35). En 2003 investigadores realizaron la mutante para *phaZ* que codifica para PhaZ (PHB depolimerasa), en donde observaron que la ausencia de PhaZ afectaba la capacidad de la bacteria para degradar el PHB acumulado (Figura 4) (32).

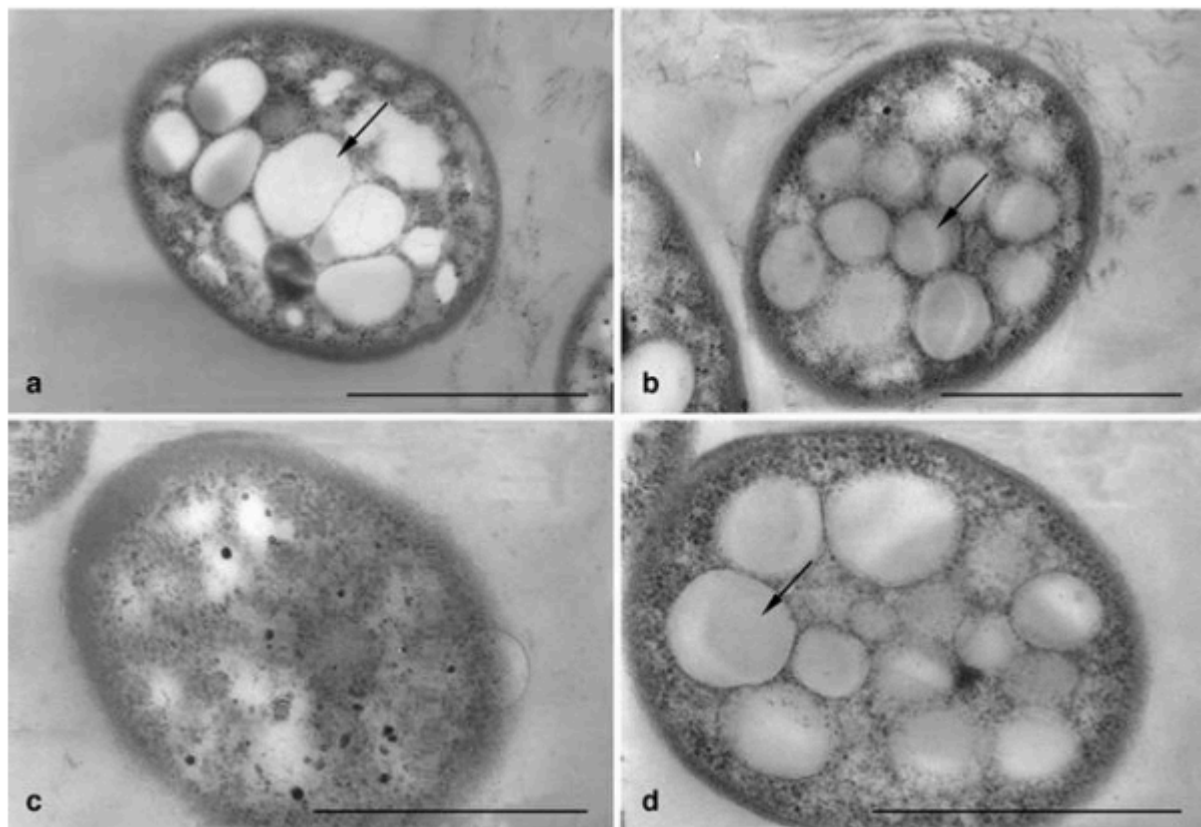


Figura 4. Caracterización de la mutante *phaZ*: Micrografías electrónicas de *A. brasilense* 7030 (a) y la mutante *phaZ* (b), cultivados durante 48 h en medio alto C:N, y de *A. brasilense* 7030 (c) y la mutante *phaZ* (d) después de un período de inanición de 72 h en tampón de fosfato. La flecha indica gránulos de PHB. Tomado de Kadouri, *et al.* 2003 (32).

El PHB es hidrolizado por la enzima PHB depolimerasa (PhbZ/PhaZ) escinde los enlaces entre los monómeros de 3-hidroxi-butirato (3-HB) en la cadena de PHB liberando monómeros de 3-hidroxi-butirato en el citoplasma. Al haber un aumento de 3-HB en la célula, este es oxidado por la enzima 3-Hidroxi-butirato deshidrogenasa

en acetoacetato, un intermediario energético (esta acción requiere NAD^+ como cofactor). Cuando la célula requiere acetil-CoA para el metabolismo energético se activa la enzima β -Cetoacil-CoA transferasa (también conocida como acetoacetato-CoA transferasa) y transfiere una molécula de CoA al acetoacetato para formar acetoacetyl-CoA. La enzima β -Cetotiolasa (Thiolasa) cataliza la escisión de acetoacetyl-CoA en dos moléculas de acetil-CoA en respuesta a la necesidad de generar ATP o precursores metabólicos, para que finalmente el Acetil-CoA ingrese al Ciclo de Krebs o bien puede ser redirigido hacia la síntesis de ácidos grasos u otros compuestos (32, 35, 36).

La degradación del PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 sigue una ruta bien regulada, que convierte el polímero en energía cuando la célula lo necesita (Figura 5). Este mecanismo es crucial para la supervivencia bacteriana en ambientes con fluctuaciones en la disponibilidad de carbono (34–36). Es importante destacar que, aunque las rutas metabólicas y las condiciones generales para la síntesis y degradación de PHB son similares en *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245, pueden existir diferencias en la eficiencia de acumulación y movilización de PHB entre ambas cepas, dependiendo de factores específicos como la regulación genética y las condiciones ambientales (32, 35, 36).

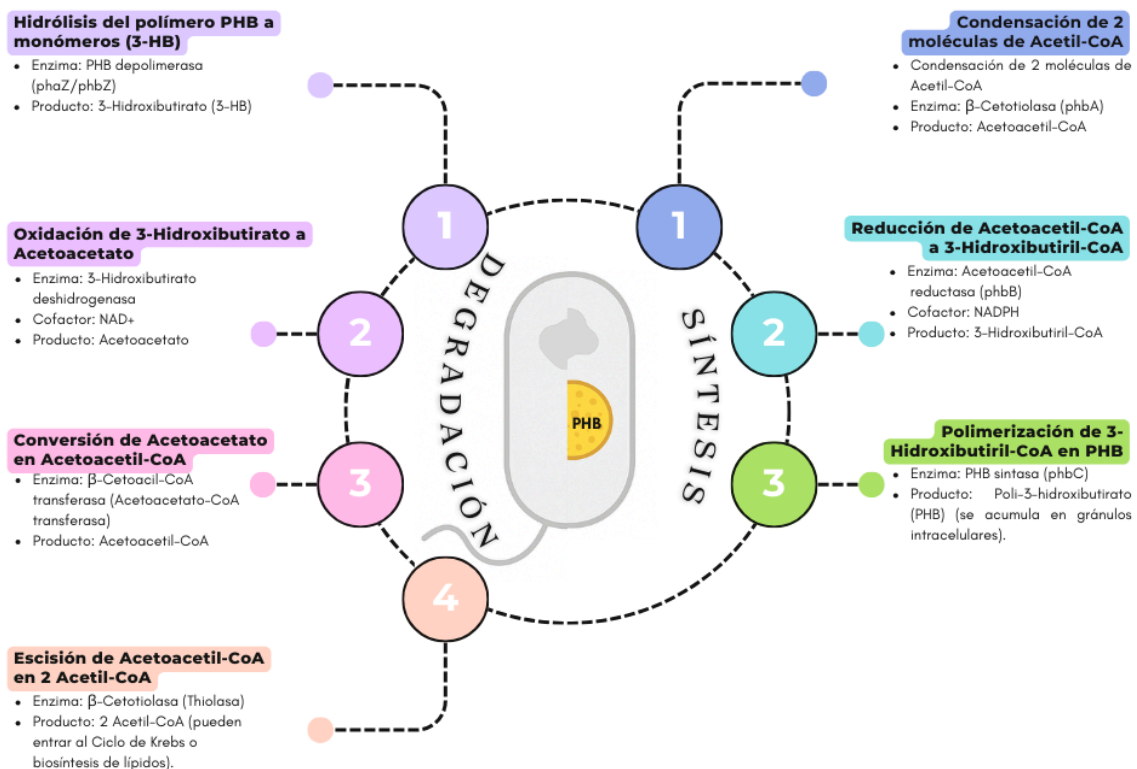


Figura 5. Esquema representativo del ciclo del PHB de *Azospirillum* realizado en Biorend (35)

Características de las PHB depolimerasas (PhaZ/PhbZ)

Se ha descrito que a temperaturas de 20 a 40°C se lleva a cabo la degradación del PHB, sin embargo, a temperaturas elevadas se mejora la biodisponibilidad y solubilidad de compuestos poliméricos orgánicos permitiendo mayor eficiencia de biorremediación. Esto ocurre debido a que, a altas temperaturas, el PHB es amorfo y más sensible al ataque enzimático facilitando su degradación. La velocidad de biodegradación del polímero depende de varios factores, incluyendo el área superficial del polímero, actividad microbiana, pH, temperatura, humedad y la presencia de otros nutrientes. Los parámetros del polímero que afectan tal velocidad incluyen la composición monomérica del polímero, el nivel de cristalinidad o de regiones amorfas y el peso molecular (35, 36).

La hidrólisis enzimática se lleva a cabo en la región amorfa y subsecuentemente en la cristalina del polímero, PhaZ hidroliza los enlaces éster del polímero generando oligómeros, dímeros que son llevados a sus formas monoméricas por hidrolasas de oligómeros (35, 38). Estos monómeros son suficientemente pequeños para pasar a través de la membrana celular microbiana semipermeable para ser metabolizados por β -oxidación y el ciclo de los ácidos tricarboxílicos en dióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, mientras que en condiciones anaerobias también es producido metano. Se han reportado algunas PhbZ capaces de hidrolizar otros biopolímeros como el PHB/HV, así mismo han presentado actividad en algunos poliésteres sintéticos como la poli(propiolactona) (PPL) y el poli(adipato de etileno) (PEA) (35).

Tipos de PHB depolimerasas

Las Depolimerasas extracelulares, son enzimas hidrolíticas secretadas al medio extracelular, actúan directamente sobre los polímeros presentes en el entorno. Estas tienen dos tipos de catálisis para llevar a cabo la degradación de las cadenas del PHB. El ataque exógeno que ocurre estrictamente en la parte terminal del polímero, produciendo exclusivamente pequeños oligómeros metabolizables. En el caso del ataque endógeno, éste ocurre en cualquier región a lo largo de la cadena del polímero, generando una mezcla de oligómeros y una reducción rápida del peso molecular. Las depolimerasas también pueden combinar sinérgicamente los dos tipos de actividad, la Tabla 4 muestra un listado de las clases de PhaZ extracelulares. Estas proteínas tienen un amplio dominio catalítico en el extremo N-terminal, un dominio de enlace al sustrato en el extremo C-terminal y un dominio de unión conectando los dominios. El sitio activo está conformado por el dominio catalítico constituido por tres aminoácidos altamente conservados semejante al de las lipasas: serina, aspartato e histidina conocido como caja lipasa (lipase box) y un grupo de aminoácidos que estabilizan el oxianión. La serina que ataca nucleofílicamente el enlace éster es parte del pentapéptido (Gly-X-Ser-X-Gly) que forma la caja lipasa, la cual ha sido encontrada en todas las hidrolasas conocidas tales como lipasas, esterasas y proteasas séricas (32, 36). Las depolimerasas

intracelulares catalizan la degradación de los gránulos de PHB almacenados al interior de la célula, liberando monómeros que pueden ser utilizados como fuente de carbono y energía. Estas enzimas suelen tener dominios catalíticos similares a las depolimerasas extracelulares, incluyendo la presencia de una "caja de lipasa" con una tríada catalítica formada por serina, ácido aspártico e histidina. En la Tabla 5 se presentan las principales diferencias entre las depolimerasas intracelulares y extracelulares (32, 36, 37).

Tabla 4. Clases de PhaZ extracelulares (36)

Clase de PhaZ	Subunidades o aminoácidos	Cepa	Especificidad por sustrato	Otras características
Tipo I	Dominio catalítico con caja lipasa en posición central; dominio de enlace al sustrato tipo fibronectina III (Fn3)	<i>Pseudomonas lemoignei</i> (PhaZ4), <i>Alcaligenes faecalis</i> T1 (<i>Ralstonia pickettii</i> T1)	Poli-3-hidroxibutirato (P3HB) y otros PHB de cadena corta	La caja lipasa contiene la secuencia Ser-His-Asp-His; el dominio Fn3 facilita la unión al sustrato
Tipo II	Dominio catalítico con caja lipasa cerca del extremo N-terminal; dominio de enlace al sustrato tipo fibronectina III (Fn3)	<i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Streptomyces exfoliatus</i> , <i>Comamonas acidovorans</i> YM1609	PHB de cadena media y larga	La caja lipasa presenta la secuencia Ser-Asp-His-His; el dominio Fn3 está presente en el extremo C-terminal
Tipo III	Dominio catalítico con caja lipasa en posición central; dominio de enlace al sustrato rico en treonina	<i>Pseudomonas lemoignei</i> (PhaZ5 - Isoenzima A)	PHB con diferentes composiciones de monómeros	El dominio rico en treonina facilita la interacción con el sustrato; la caja lipasa contiene la secuencia Ser-His-Asp-His

Tabla 5. Diferencias entre las depolimerasas intracelulares y extracelulares (31, 35–37).

Característica	Depolimerasas intracelulares	Depolimerasas extracelulares
Ubicación	Dentro del citoplasma bacteriano	Secretadas al exterior de la célula
Sustrato	Gránulos de PHB intracelulares	Polímeros presentes en el medio ambiente como PHAs, celulosa (polisacárido estructural en plantas) y quitina (Polisacárido estructural en exoesqueletos de insectos y

		hongos).
Tipo de ataque	Endógeno y exógeno PhaZ1 de <i>Ralstonia eutropha</i> , se une a los gránulos de PHB intracelulares y los degrada en 3-hidroxibutirato. Actúa mediante un mecanismo de hidrólisis de enlaces éster internos y terminales. Requiere contacto con los gránulos de PHB para su activación.	Endógeno y exógeno <i>Comamonas testosteroni</i> , puede romper enlaces en el interior de la cadena (endo) y luego procesar los fragmentos resultantes (exo). Se une a las regiones amorfas del PHB antes de degradarlo.
Regulación	Se activan cuando la célula necesita movilizar reservas de PHB	Se expresan en presencia de PHB en el ambiente
Especificidad	Generalmente degradan solo el PHB que el microorganismo almacena	Mayor diversidad, pueden actuar en varios tipos de PHB y otros polímeros como el PE (en condiciones específicas).

Antecedentes directos

En 2019 Martínez generó la construcción pMBA22 de *phaZ* de *Azospirillum brasilense* Sp7.

El gen *phaZ* de *A. brasilense* Sp7 fue amplificado mediante PCR utilizando los pares de oligonucleótidos, posteriormente el amplicón fue separado mediante electroforesis en gel de agarosa, el fragmento correspondiente al gen *phbZ* fue ligado al vector pMBArA para expresión y obtención del gen *phbZ*. El plásmido resultante se le denominó pMBA22 (39).

En 2015 Rosales generó la mutante *phaZ* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Clonación del gen *phaZ* en el vector de clonación pCR 2.1 TOPO. Se transformaron a células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes y posteriormente, se subclonó al vector suicida pSUP 202 interrumpiendo al gen de resistencia a Tetraciclina (Tc). Finalmente, se transfirió la mutante *phbZ* en *A. brasilense* Sp245 por el método de conjugación (40).

Planteamiento del problema

La producción y utilización de plásticos de un solo uso da lugar a la creciente contaminación en las últimas décadas, lo que ha generado preocupaciones a nivel mundial debido al impacto ambiental y en la salud humana. Se estima que 11 millones de toneladas de plásticos llegan a los océanos cada año. El PET representa el 80 % del uso total de plásticos a nivel mundial. En México 100.000 tortugas y mamíferos marinos, 1.000.000 de aves marinas mueren anualmente por la contaminación del plástico de los mares. El 40 % del plástico que se fabrica es para envases que se desechan tras un solo uso. La mayoría de los residuos de PET se eliminan mediante tratamientos físicos y químicos que liberan contaminantes nocivos, subproductos tóxicos y microplásticos, contaminantes que se han encontrado en diversas fuentes de agua y alimentos, representando una amenaza potencial para la salud humana. Investigaciones recientes reportan la presencia de microplásticos y nanoplásticos en riñón, hígado y cerebro de seres humanos. Por ello, se ha intentado abordar la problemática mediante alternativas que sean amigables con el ambiente. Tal es el caso de: la biorremediación para acelerar la degradación de plásticos, la generación de polímeros biodegradables y/o el uso de enzimas degradadoras de plástico. La estrategia prometedora que ofrece solución es la remediación enzimática, especialmente con el uso de enzimas hidrolasas capaces de escindir los enlaces éster del polímero PET generando subproductos que son de importancia a nivel industrial llegando a incorporarse a la economía circular mejorando los procesos de reciclaje, a su vez mitigando la contaminación por plásticos.

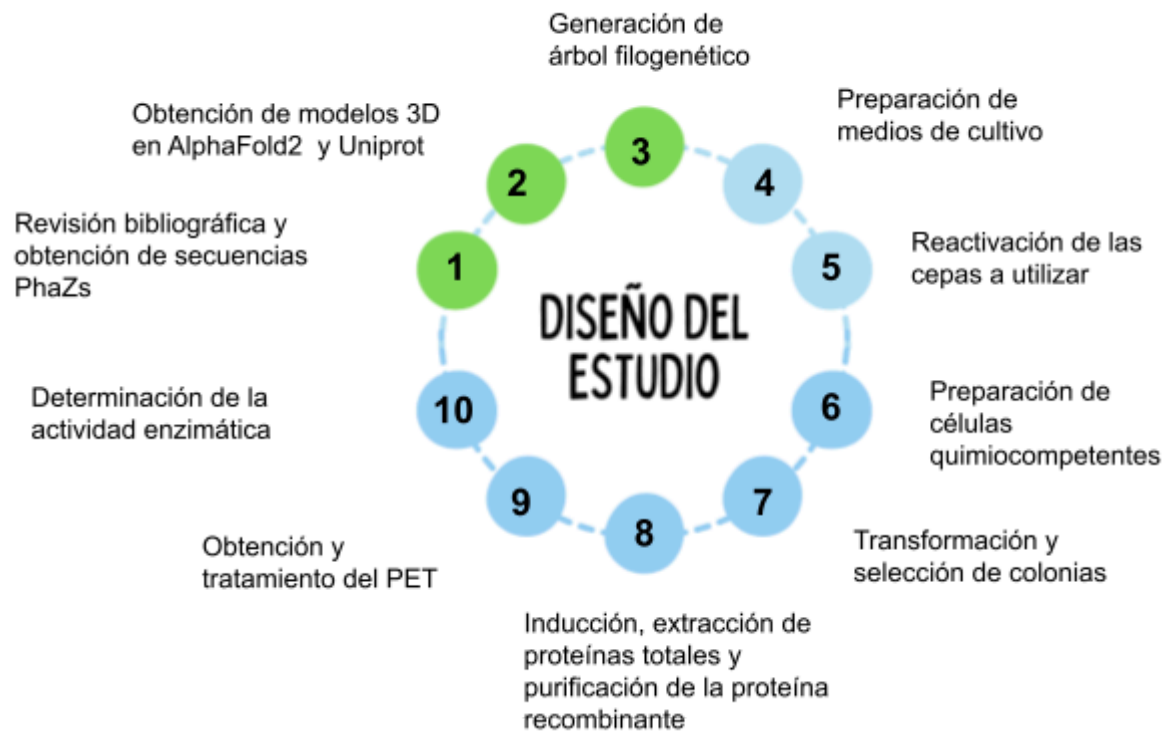
Objetivo general

Analizar la actividad enzimática de las PhbZs de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en PET.

Objetivos específicos

- ❖ Analizar la filogenia de hidrolasas y PHB depolimerasas de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y *Azospirillum brasilense* Sp7.
- ❖ Modelar PhaZ de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y *Azospirillum brasilense* Sp7.
- ❖ Determinar las condiciones de tiempo y temperatura de mayor producción de PhbZs y realizar extracción de proteínas totales de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 con phaZ mutado.
- ❖ Generar la proteína recombinante de PhbZ en *Azospirillum baldaniorum* Sp7 en la cepa de *E. coli* S17.1 con el plásmido pBluescript SK (+).
- ❖ Inducción de proteína recombinante
- ❖ Purificar la enzima PHB depolimerasa
- ❖ Determinar actividad enzimática de las PhbZs de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y comparar su actividad sobre PET virgen y el PET reciclado.

Diseño del estudio



Técnicas y procedimientos

Análisis bioinformáticos

Obtención de secuencias y modelos tridimensionales de PhaZ de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245.

La predicción de la estructura tridimensional de las proteínas PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 y *A. brasilense* Sp7, se realizó mediante los servidores EMBL-EBI, NCBI, AlphaFold2 y pymol, la secuencias y estructuras tridimensionales de las hidrolasas de PET se obtuvieron mediante EMBL-EBI, NCBI, Uniprot, PDB, y pymol, y posteriormente, se realizaron acoplamiento moleculares. Cutinasa (PDB ID:4CG3), PETasa (PDB ID: 5XJH), MHETasa (PDB ID: 6QGA), Lipasa (PDB ID: 4K6G), P. Carboxilesterasa (PDB ID: 6SBN), Esterasa (GenBank: AFA45122.1) (41–45).

Análisis filogenético

Para la construcción del árbol filogenético de máxima verosimilitud se utilizaron secuencias de las PHB depolimerasas y las hidrolasas con actividad hidrolítica en PET, utilizando el software MEGA, con la finalidad de encontrar secuencias monofiléticas, parafiléticas y polifiléticas correspondientes a hidrolasas hidrolíticas de PET(46) .

Análisis experimental

Tratamiento de las cepas bacterianas

Las cepas de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 fueron reactivadas de crioviales a -70° C en glicerol (50% v/v). Se recuperaron 50 µL del cultivo, se inocularon tubos que contenían 5 mL de Medio Mínimo K-Malato (MMKM). Los tubos se incubaron a 32 °C y 150 rpm durante 24 h. Posteriormente, se analizaron muestras de 10 µL de cultivo y se observaron bajo el microscopio óptico. Después se sembraron 10 µL de los cultivos en placas Petri conteniendo MMKM. Las cepas de *E. coli* S17.1 se recuperaron a partir de cultivos en glicerol (50% v/v) a -70 °C a partir de 50 µL del cultivo para inocular en tubos que contienen 5 mL de medio líquido Luria Bertani (LB). Los tubos se incubaron a 24 h a 37 °C y 150 rpm.

Transformación de pMBA22 a la cepa *E. coli* S17.1

Las células quimiocompetentes de la cepa *E. coli* S17.1 que contiene phaZ y seguidamente se transformaron con el plásmido de selección pBluescript SK(+), se incubaron, luego seleccionaron colonias aisladas, se sembraron, e incubaron y posteriormente se realizó la extracción de DNA plasmídico y la visualización fue mediante una electroforesis en gel de agarosa para su verificación.

Condiciones de cultivo para la extracción de proteínas totales de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y *E. coli* S17.1

Las cepas fueron incubadas a 32 °C por 36h, sometándose a estrés por inanición de nutrientes asegurando la presencia de PhaZ. Para la cepa *E. coli* que porta el plásmido pBluescript SK (+) se cultivó en medio LB. Se incubó a 37 °C por 4h hasta con una DO₆₀₀ de 0.5, se agregó el inductor e incubó por tres horas.

Expresión, purificación y detección de la PhaZ

La proteína PhaZ fue inducida con arabinosa al 2 %, utilizando el método de lisis por sonicación, obteniendo las proteínas totales de *Azospirillum brasilense* Sp7, *Azospirillum baldaniorum* Sp245 y *E. coli* S17.1. Se cuantificó por el método de Bradford acompañado de un gel SDS-PAGE con marcador de peso molecular para observar la proteína esperada y posteriormente se purificó por electroelución.

Tratamiento del PET

El PET reciclado proveniente de una botella se lavó, secó y trituró manualmente.. Una vez teniendo las presentaciones del PET se colocaron en tubos eppendorf y posteriormente fueron almacenados hasta su uso.

Determinación de la actividad por peso constante

El ensayo consta de dos secciones: Una vez obtenida la proteína en condiciones nativas se realizó ensayo de actividad con el biopolímero PHB; en un tubo eppendorf que contenga PHB se agregó PhaZ e incubó, y se dio el debido seguimiento de los pesos antes y después de cada procedimiento. Una vez que se comprobó la actividad proteica con PHB, se realizaron ensayos de peso constante con el sustrato PET, en donde se agregaron 500 µg de proteínas por cada 0.5g de PET; se pesó antes y después de agregar la enzima, y posterior al periodo de incubación.

Detección de subproductos generados

Los ensayos colorimétricos permitieron identificar de manera cualitativa la generación de subproductos, resultado de la degradación. La fenoltaleína, en una solución básica es rosa, e incolora en una solución ácida. Si los medios de reacción demuestran un comportamiento ácido, significa una gran presencia de grupos carboxílicos que, particularmente en la degradación del PET, indican la despolimerización de las cadenas del polímero en monómeros, como el ácido tereftálico y el ácido benzoico, así como en etilenglicol (47).

Resultados

Análisis del árbol filogenético

Considerando la actividad de las PHB depolimerasas en comparación con otras enzimas degradantes de polímeros se analizaron comparativamente 11 enzimas con actividad en PET y 26 depolimerasas de organismos filogenéticamente diversos. El árbol filogenético de neighbor-joining y máxima verosimilitud. Las PHB depolimerasas más cercanas (monofiléticas) a las hidrolasas de PET fueron las pertenecientes a: *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomonospora viridis*, *Uncultured bacterium*, *Saccharomonospora*, dentro de las PHB depolimerasas que se pueden considerar medianamente cercanas (parafileticas) son de género *Azospirillum*, *Pseudomonas alcaligenes*, *mine drenaje metagenoma*, *Pseudomonas alcaligenes*, *alphaproteobacteria*, entre otros. Las PHB depolimerasas que se pueden considerar más lejanas (polifiléticas) son: *Rhodospirillales bacterium*, *Methylibium Sp* y *Bradyrhizobium diazoefficiens*, *Variovorax*.

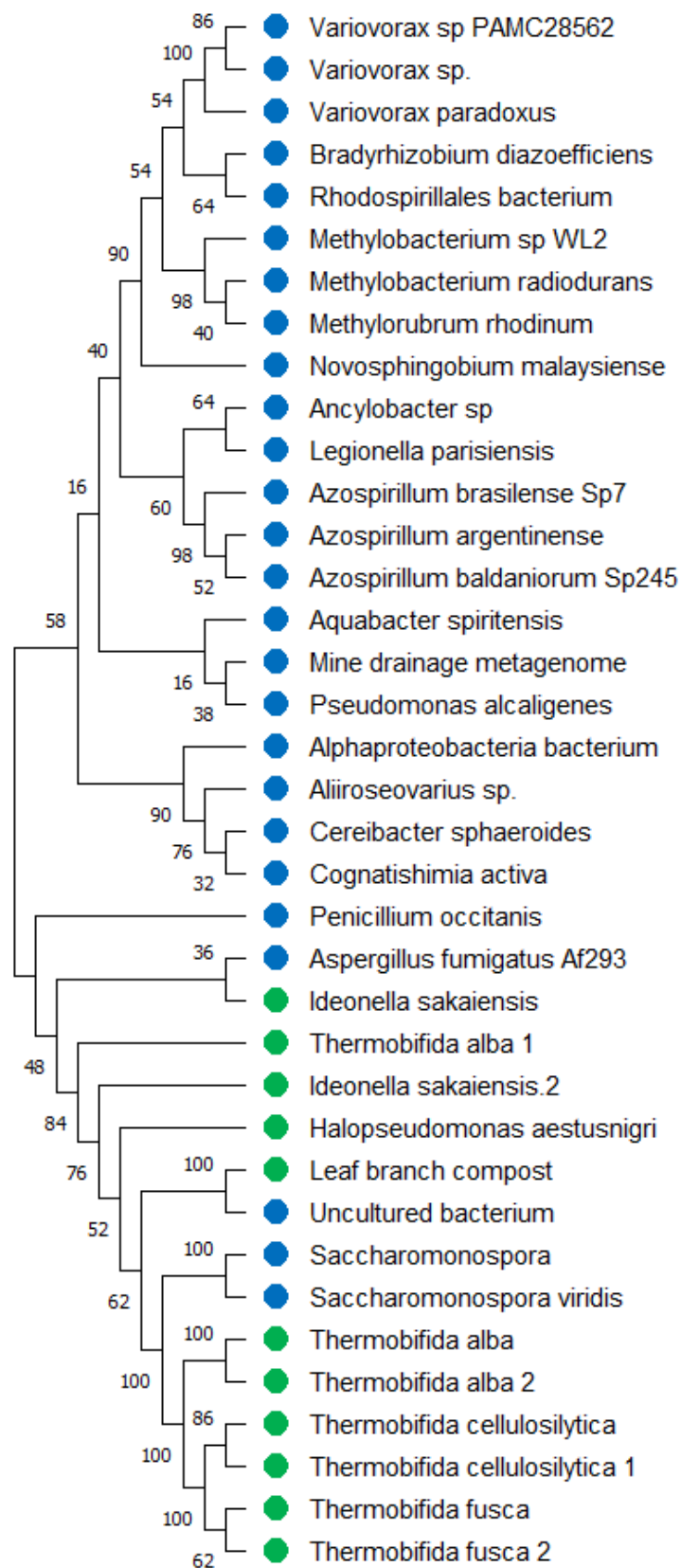


Figura 6. Árbol filogenético de máxima verosimilitud generado mediante el software MEGA 11, correspondiente a las 26 PHB depolimerasas registradas en las bases de datos y 11 enzimas con capacidad hidrolítica en plásticos.

Visualización de estructuras 3D de PHB y PET

Conocer la estructura tridimensional (3D) es fundamental para la determinación de sus propiedades físicas, químicas y mecánicas que a su vez define sus múltiples aplicaciones y la capacidad de degradación. La Figura 7 muestra la representación 3D de cuatro unidades repetitivas de los polímeros PHB y PET; El polímero PHB exhibe una estructura lineal alifática, conformada por unidades repetidas de 3-hidroxibutirato, unidas mediante enlaces éster. La cadena presenta una conformación relativamente flexible, con enlaces accesibles y sin la presencia de estructuras aromáticas. Esta disposición genera una arquitectura abierta, en la que los enlaces éster se encuentran expuestos a lo largo de la cadena polimérica. Por otro lado, el PET muestra una estructura lineal aromático-alifática, compuesta por la alternancia de etilenglicol y ácido tereftálico. En la visualización se distinguen claramente los anillos aromáticos del tereftalato, los cuales confieren una conformación más rígida y compacta a la cadena polimérica. Los enlaces éster están presentes entre los monómeros, aunque se observan asociados a un entorno estructural más restringido debido a la proximidad de los anillos aromáticos.

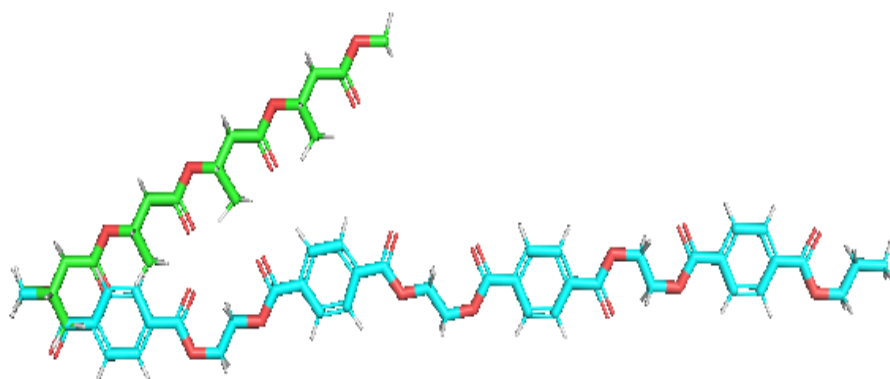


Figura 7. La estructura superior en color verde corresponde al polímero PHB, la estructura inferior de color azul aqua corresponde al polímero PET, ambos polímeros constan de 4 unidades.

Modelado 3D de PhaZ de *A. baldaniorum* Sp 245

La Figura 8 incluye una gráfica de pLDDT (predicted Local Distance Difference Test), en la cual se representa el nivel de confianza del modelo estructural de la enzima PhaZ a lo largo de su secuencia aminoacídica. En el eje horizontal se muestran los residuos de la proteína, mientras que en el eje vertical se indica el valor de pLDDT, con un rango de 0 a 100.

En la gráfica se observan picos pronunciados con valores superiores a 80, los cuales corresponden a regiones del modelo con alta confiabilidad estructural.

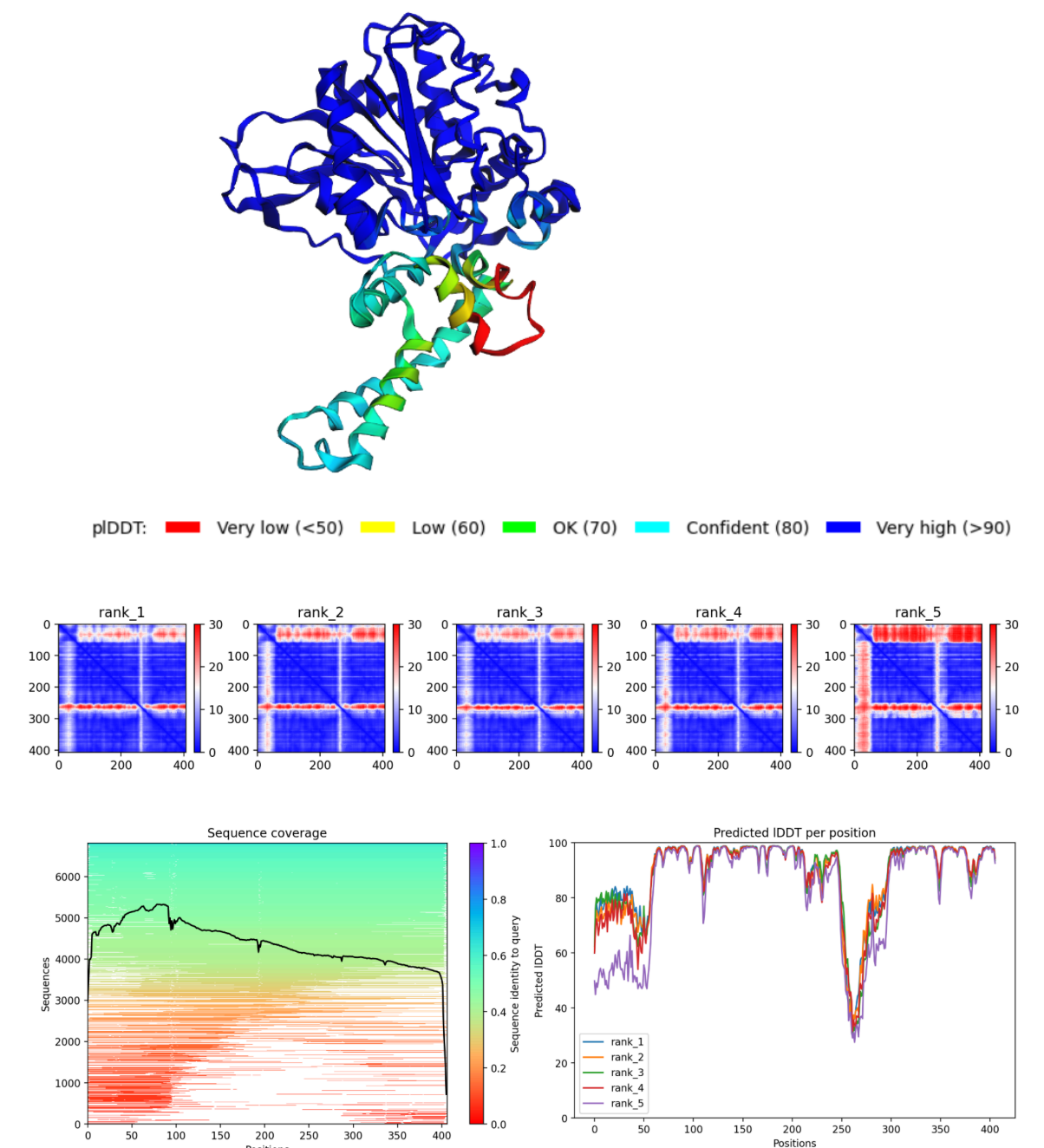


Figura 8. Modelado 3D de PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 y PET (generado mediante el servidor Alpha Fold 2)

Modelos de interacción entre PhaZ y PET

En las representaciones tridimensionales, el PET se observa dispuesto sobre una región superficial definida de PhaZ, formando una orientación alargada y paralela a la superficie de la proteína. El polímero se extiende a lo largo de un surco accesible, permitiendo el contacto simultáneo con varios residuos de la enzima. La posición del PET se mantiene consistente entre las poses del clúster principal, lo que indica una estabilidad espacial de la interacción. Los mapas de interacción permiten identificar

regiones de la proteína involucradas en la interacción, principalmente en áreas superficiales con accesibilidad estructural.

- Las interacciones observadas corresponden mayoritariamente a:
- Contactos hidrofóbicos con el esqueleto del polímero
- Aproximación del enlace éster del PET a regiones cercanas al dominio catalítico

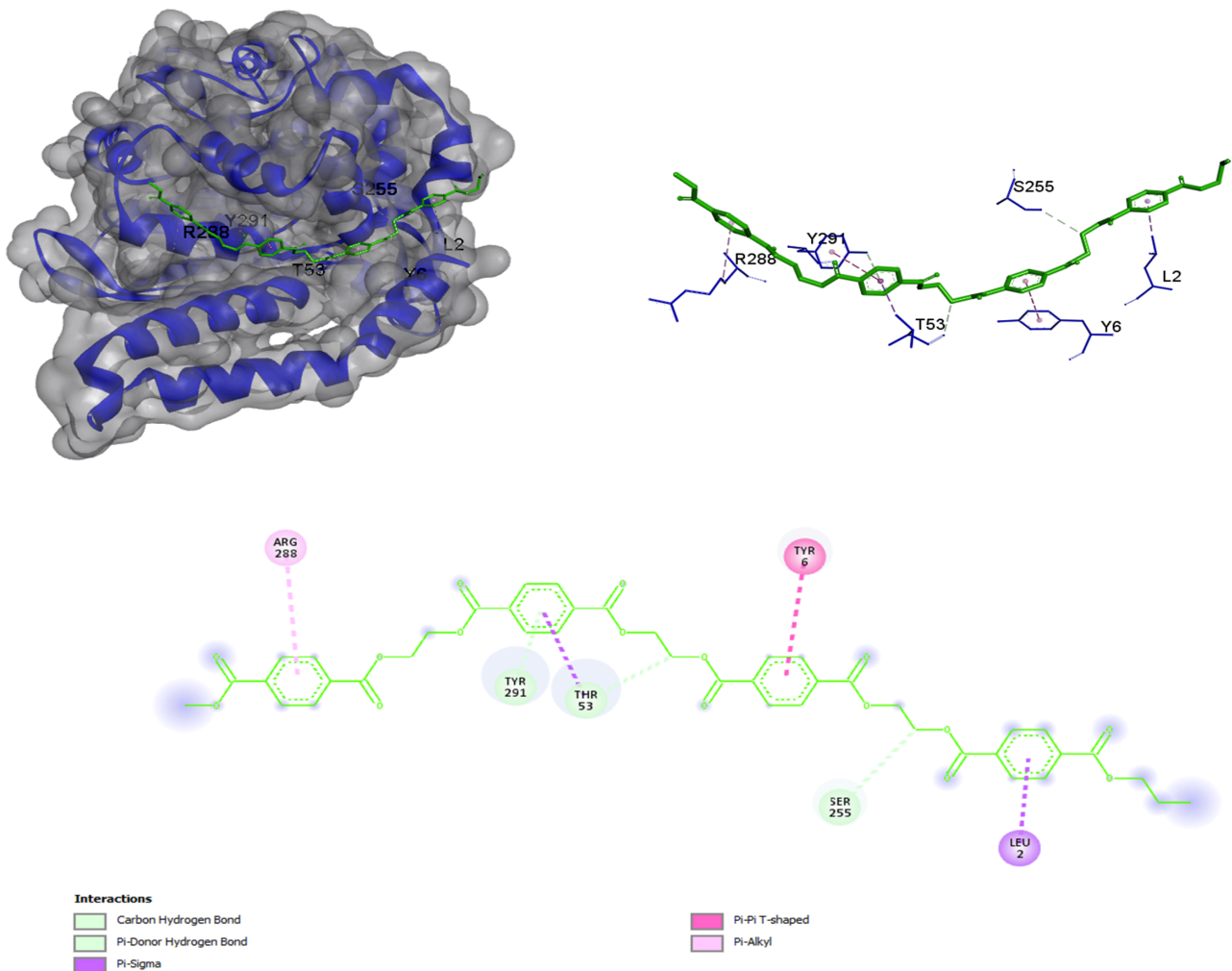


Figura 9. Acoplamiento molecular de PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 y PET (generado mediante el servidor SWISS-MODEL).

Modelos de interacción entre PETasa y PET

En la Figura 10 se observa el acoplamiento del PET dentro del sitio activo de la PETasa, donde los enlaces éster del polímero quedan orientados favorablemente para su hidrólisis. Las interacciones están dominadas por contactos hidrofóbicos y apilamiento aromático entre los anillos bencénicos del PET y residuos aromáticos presentes en la región catalítica de la enzima, lo que contribuye a la estabilización del complejo enzima-sustrato. Adicionalmente, se identifican enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo del PET y residuos polares cercanos al sitio activo, facilitando la correcta orientación del sustrato para el ataque nucleofílico. El modelo sugiere que la tríada catalítica característica de las hidrolasas tipo cutinasa participa activamente en la ruptura del enlace éster del PET, permitiendo la formación de productos de menor peso molecular.

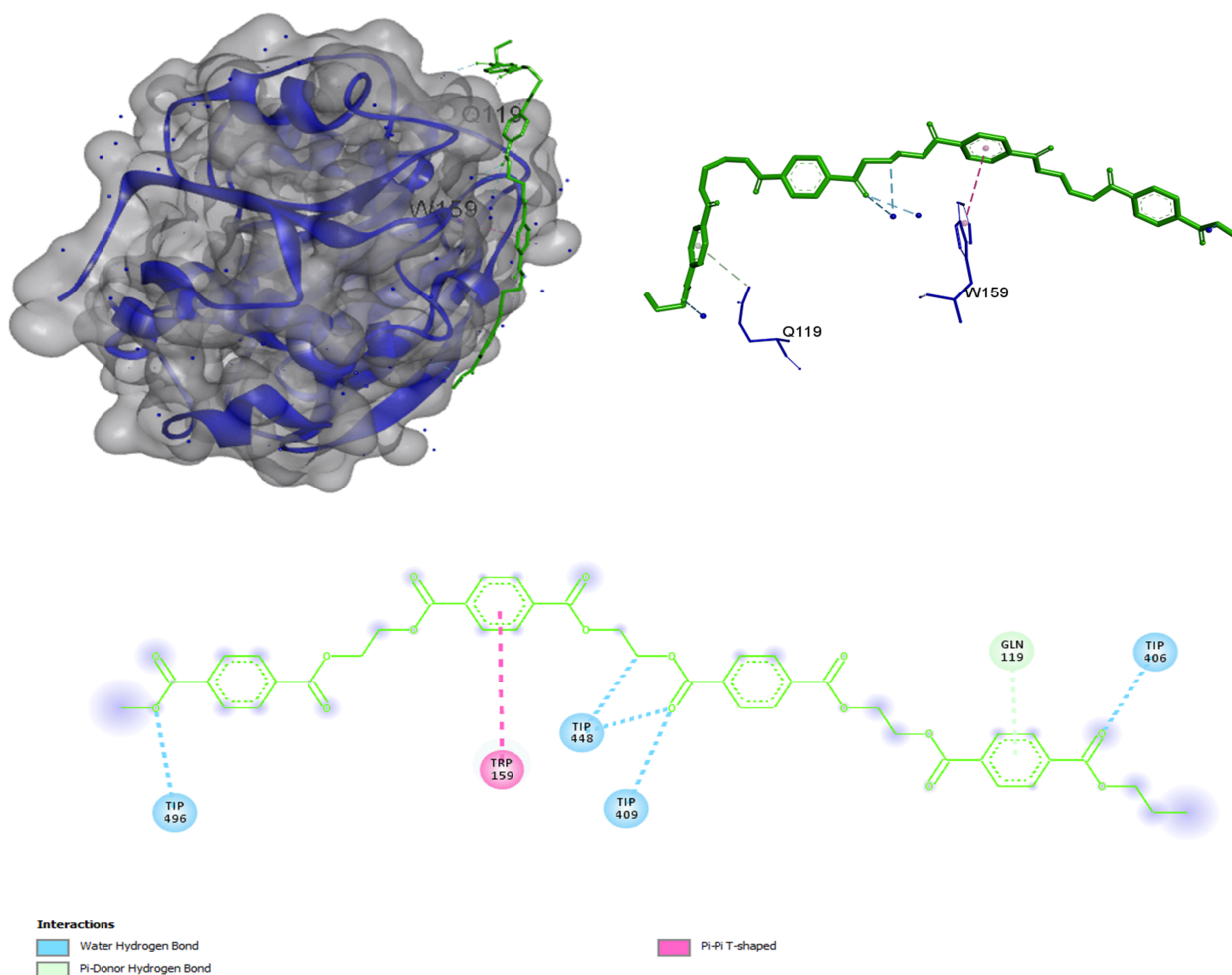


Figura 10. Acoplamiento molecular de PETasa y PET (generado mediante el servidor SWISS-MODEL)

Determinación las condiciones de tiempo y temperatura de mayor producción de PhbZs y sobreexpresión y purificación PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245

Las condiciones óptimas de inducción y tiempo de incubación para la mayor producción de la enzima PhaZ, se evaluaron diferentes concentraciones de inductor y tiempos de extracción proteica en los sistemas de expresión empleados.

En el caso de la expresión heteróloga, se probó la inducción con arabinosa a concentraciones de 1 %, 2 % y 3 % (p/v). La producción de PhaZ se evaluó mediante el análisis de proteínas totales por SDS-PAGE, comparando la intensidad de la banda correspondiente al peso molecular esperado de la enzima. Los resultados mostraron que la concentración de inductor al 2 % produjo la mayor intensidad de la banda correspondiente a PhaZ, en comparación con las concentraciones de 1 % y 3 %. De manera adicional, se evaluó el efecto del tiempo de incubación sobre la producción de la proteína. Para ello, se realizaron extracciones de proteínas totales a las 6, 9, 12, 24 y 36 h a 32 y 37 °C, posteriores al inicio del cultivo/inducción. El análisis por SDS-PAGE evidenció un incremento progresivo en la intensidad de la banda correspondiente a PhaZ conforme aumentó el tiempo de incubación, observándose la mayor producción de la proteína a las 36 h a 32 °C. Con base en estos resultados, se estableció que las condiciones óptimas para la producción de PhaZ corresponden a una inducción con arabinosa al 2 % con temperatura de 32 y un tiempo de incubación de 36 h, las cuales fueron utilizadas en los experimentos subsecuentes de purificación y evaluación de actividad enzimática.

La Figura 11 muestra el análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) correspondiente a las diferentes etapas del proceso de purificación de PhaZ. Tras el proceso de purificación, en las fracciones de elución se identifica una banda predominante con un peso molecular aparente consistente con el valor teórico esperado para PhaZ, lo que indica la retención y posterior elución específica de la proteína de interés. En comparación con el extracto crudo, se observa una reducción significativa de bandas inespecíficas, evidenciando un incremento en el grado de pureza de la muestra. Las fracciones de lavado muestran una disminución progresiva de proteínas no específicas, lo que confirma la eliminación efectiva de contaminantes durante el proceso cromatográfico. Las fracciones que presentan una mayor intensidad de la banda correspondiente a PhaZ y menor presencia de proteínas adicionales fueron seleccionadas para su posterior concentración y uso en los ensayos funcionales.

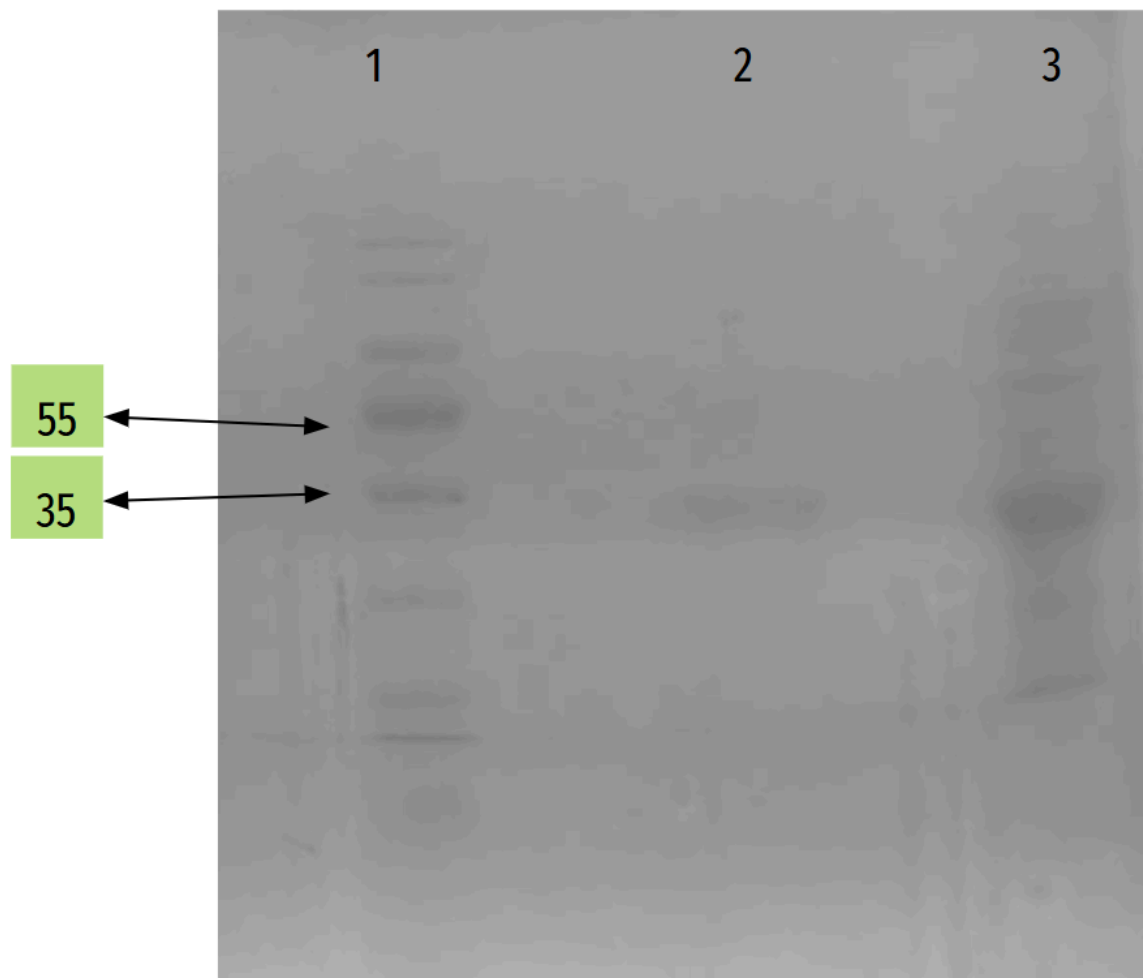
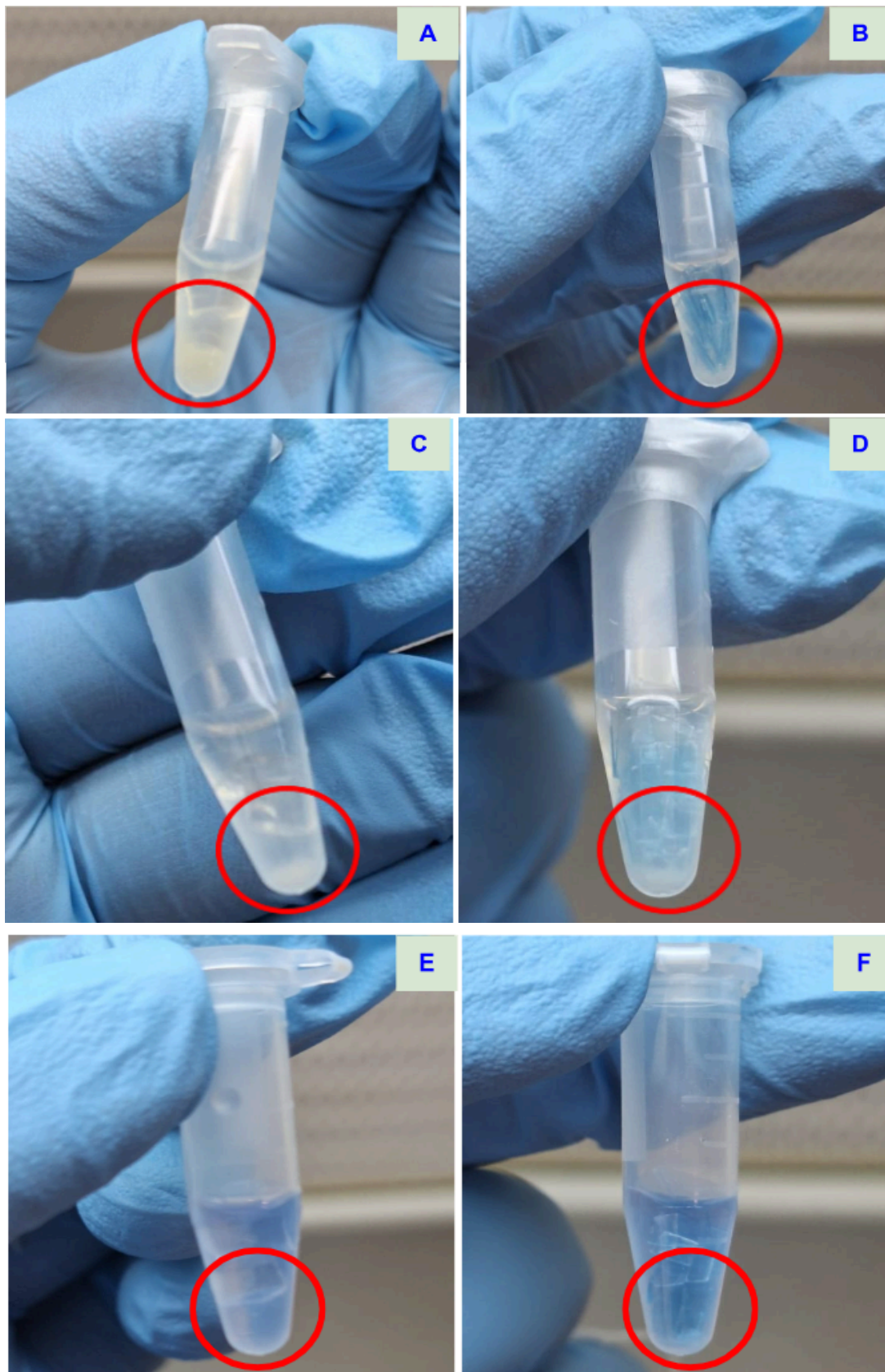


Figura 11. Gel de poliacrilamida 12% SDS-PAGE: En el carril 2 se aprecia una banda con 3.96 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína con un peso de 45.303 kDa que corresponde al peso de PhaZ, el carril 3 contiene 7.53 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de extracto crudo inducido con arabinosa al 2 %.

Ensayo comparativo de la actividad de PhaZ en *A. baldaniorum* Sp 245, *A. baldaniorum* Sp 245 mutada, *A. brasilense* Sp7 y PhaZ en *E. coli* s17.1 con el plásmido pBSK y PhaZ purificada en presencia de PET.

La Figura 12 presenta un ensayo cualitativo de la actividad de PhaZ en presencia de polietileno tereftalato (PET), evaluado tras un periodo de incubación de 40 días. En todos los tubos eppendorf se observa sedimento en la base, el cual podría corresponder a subproductos generados durante la degradación del PET. Asimismo, se aprecian diferencias en la proporción y apariencia del sedimento entre los tratamientos con extractos crudos y con enzima purificada, lo que refleja variaciones en la interacción del polímero con PhaZs. A y B corresponden a tubos con *A. baldaniorum* Sp245, incubados con PET virgen (A) y PET reciclado (B). Las imágenes C y D muestran el mismo arreglo experimental utilizando la cepa mutada de *A. baldaniorum* Sp245 (ΔphaZ), con PET virgen (C) y PET reciclado (D). E y F corresponden a tubos con PhaZ purificada de *A. baldaniorum* Sp245, obtenida por electroelución, incubada con PET virgen (E) y PET reciclado (F). Por su parte, las imágenes G y H muestran tubos con *A. brasilense* Sp7 incubados con PET virgen

(G) y PET reciclado (H). Finalmente, I y J corresponden a tubos con *E. coli* S17.1 portadora del plásmido pBSK⁺, incubados con PET virgen (I) y PET reciclado (J).



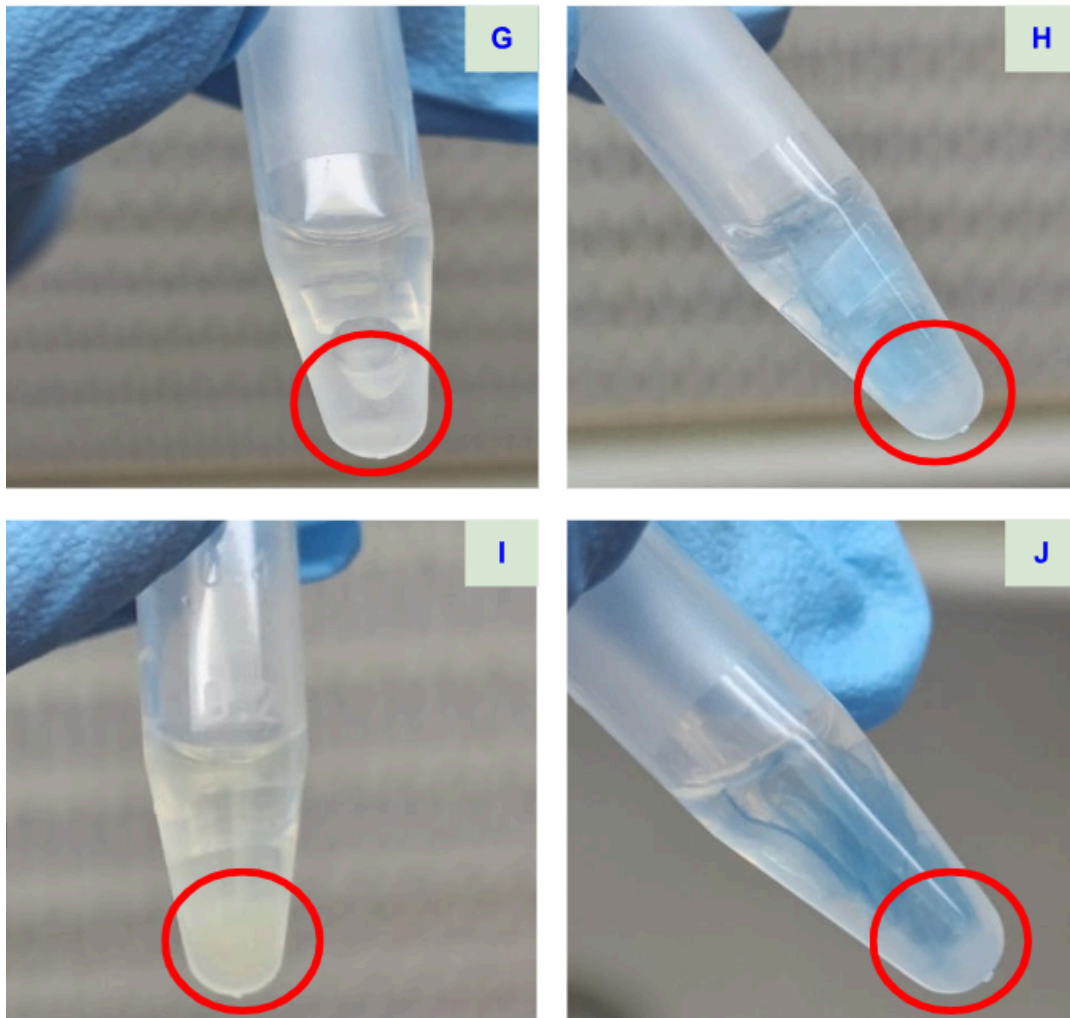


Figura 12: Tubos eppendorf con PET luego de un periodo de incubación de 40 días.

Comparación de las características físicas del PET antes y después de la incubación con PhaZ

Los cambios químicos de un material normalmente conllevan cambios físicos. Por ello se realizaron observaciones al microscopio a 40X con la finalidad de apreciar los cambios físicos antes y después del contacto con la enzima. Se aprecia una diferencia significativa en la apariencia del PET, después de la incubación, en la superficie del plástico se observan una apariencia esmerilada con pequeñas hendiduras en el PET virgen, mientras que en el PET reciclado se observó la superficie con hendiduras prolongadas.

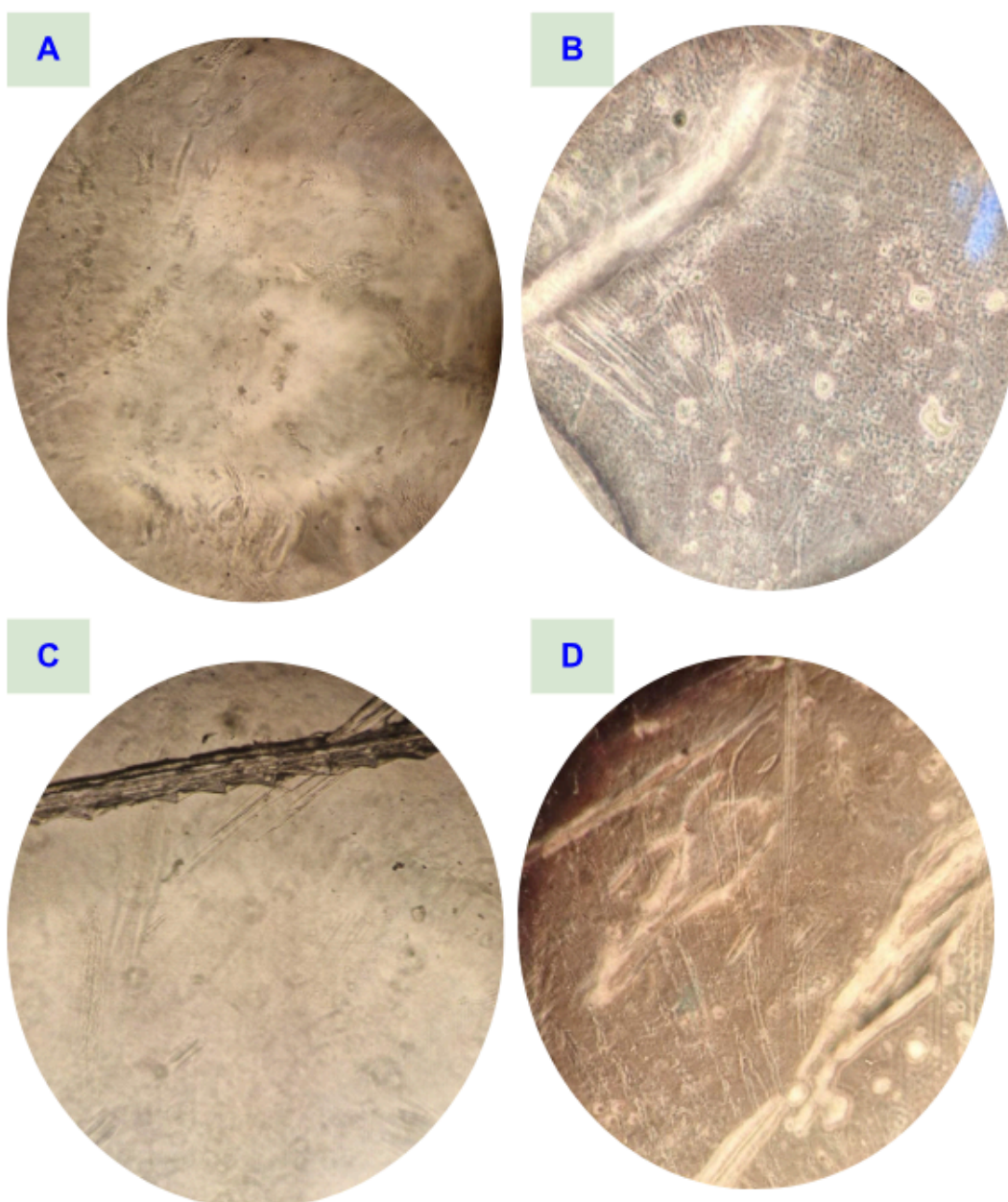
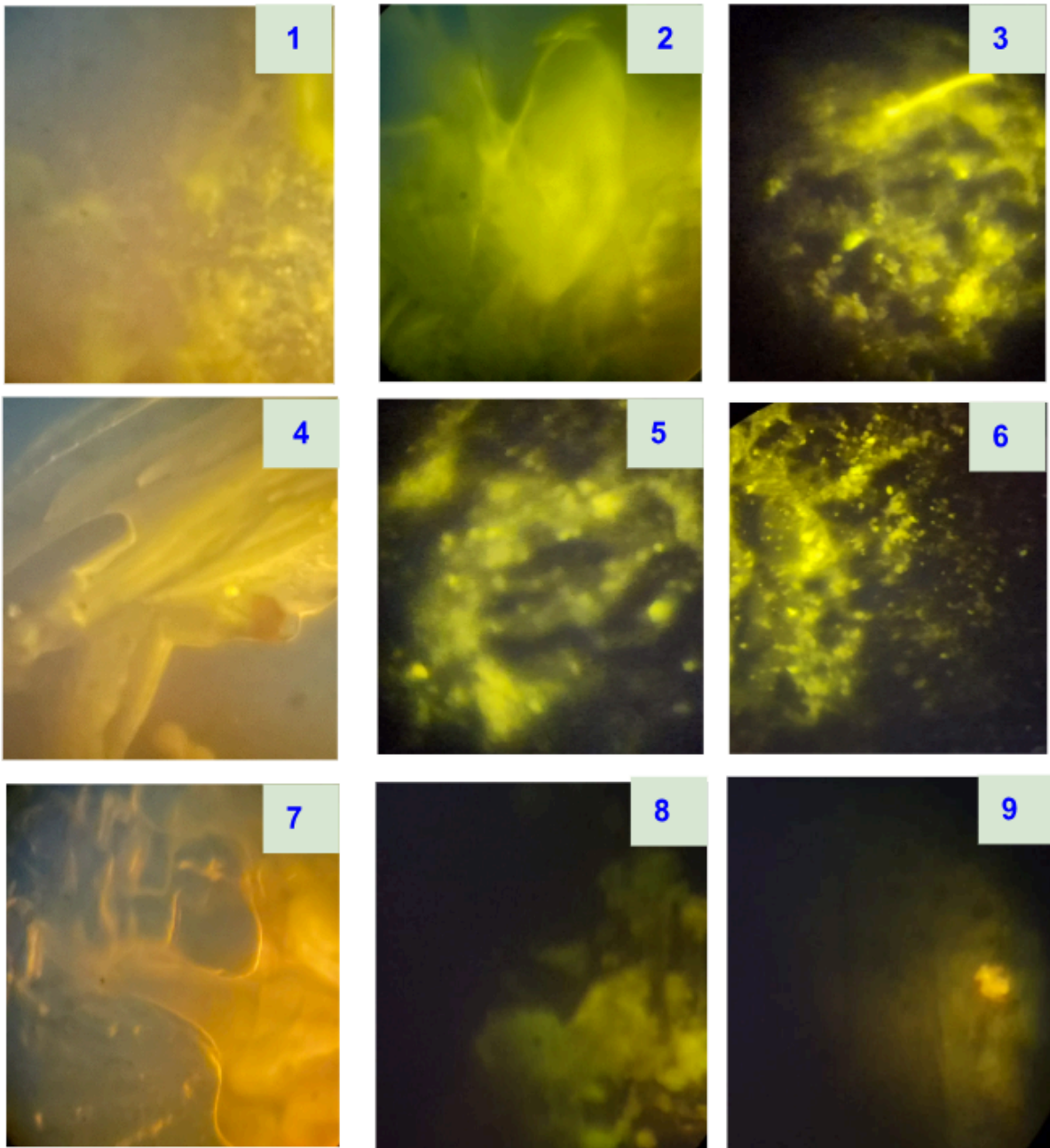


Figura 13. Comparación de las características físicas del PET antes y después de la incubación con PhaZ : La imagen A corresponde al PET virgen antes de la incubación, mientras que la B corresponden al PET después de la incubación con la enzima. La imagen C corresponde a un trozo de PET reciclado previo a la incubación con PhaZ. La imagen D corresponde al PET posterior a la incubación.

Microscopía de fluorescencia para el estudio de la degradación del PET por enzimas.

La microscopía de fluorescencia dispone de las propiedades del PET y sus productos de degradación para su estudio. Los grupos aromáticos (tereftalato), pueden exhibir autofluorescencia bajo ciertas condiciones de excitación, facilitando su visualización. Durante la degradación enzimática, el PET se rompe en productos más pequeños, como tereftalato de bis(2-hidroxietilo) (BHET), mono(2-hidroxietil)tereftalato (MHET) y ácido tereftálico (TPA). La Figura 14 muestra microscopía de fluorescencia a 40X de los sedimentos generados pos incubación: panel 1 corresponde al sedimento de PET virgen con *A. baldaniorum* Sp 245. Los

paneles 2 y 3 corresponden a tubos eppendorf con PET reciclado con *A. baldaniorum* Sp 245. Panel 4 corresponden al sedimento de PET virgen con *A. baldaniorum* Sp 245 mutada. Panel 5 y 6 corresponden a sedimentos de PET reciclado con *A. baldaniorum* Sp 245 mutada. Panel 7 corresponden a sedimentos de PET virgen con *A. baldaniorum* Sp 245 purificada. Panel 8 y 9 corresponden a sedimentos de PET reciclado con *A. baldaniorum* Sp 245 purificada. Panel 10 corresponden a sedimento de PET virgen con *A. brasilense* Sp7. Los paneles 11 y 12 corresponden a sedimentos de PET reciclado con *A. brasilense* Sp7. Panel 13 corresponden a sedimentos de PET virgen con *E. coli* S17.1 con el plásmido pBSK+. Panel 14 y 15 corresponden a sedimentos de PET reciclado con *E. coli* s17.1 con el plásmido pBSK+.



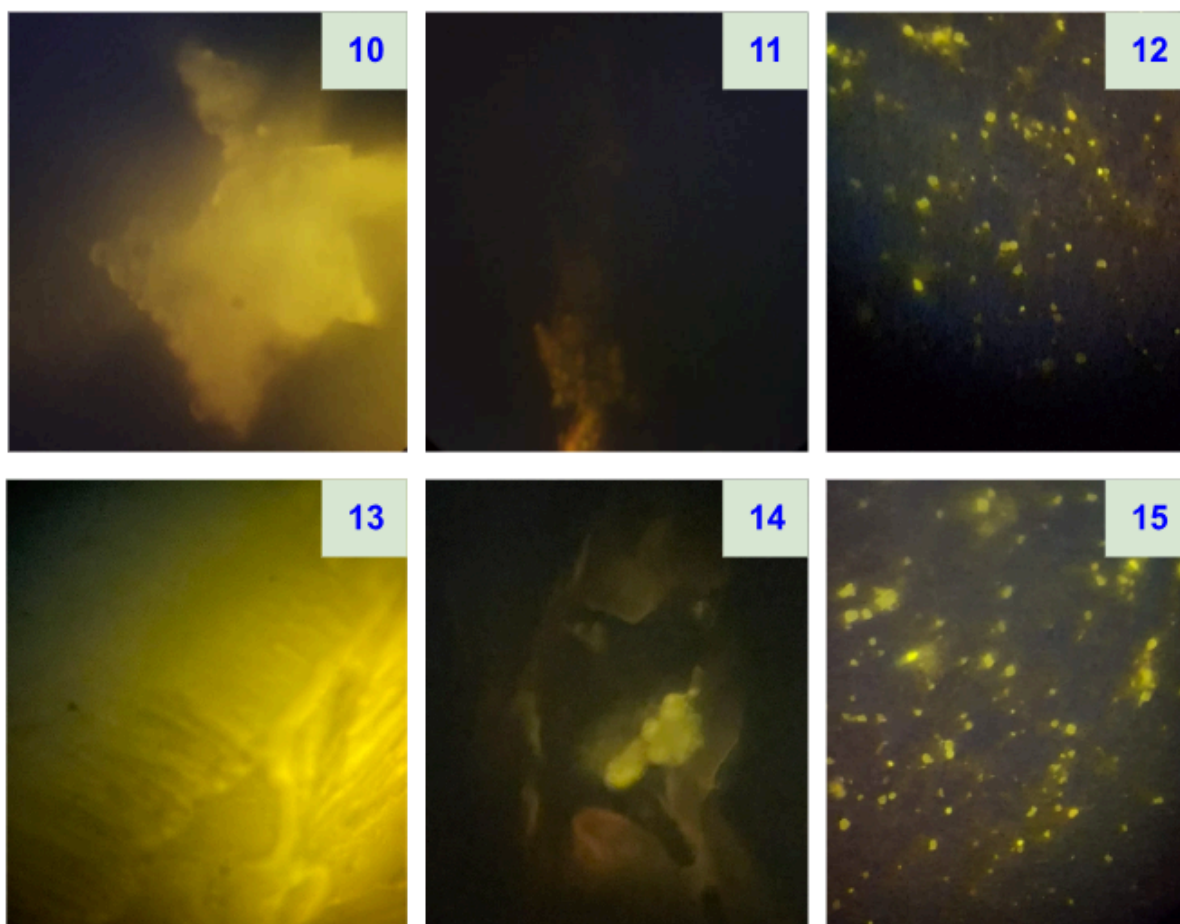


Figura 14. Microscopía de fluorescencia a 40X de los sedimentos generados luego de 40 días de incubación.

Detección de subproductos generados.

Se realizó un ensayo ácido-base de los sobrenadantes obtenidos, utilizando la fenolftaleína como indicador colorimétrico del punto de viraje (indica neutralización de la reacción entre los dos compuestos). La fenolftaleína, en una solución básica es ligeramente rosa, e incolora en una solución ácida. Los sobrenadantes no presentaron la coloración rojiza o rosa al contacto con la fenolftaleína, lo que sugiere un comportamiento ácido, por tanto, significa una gran presencia de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) que, particularmente en la degradación del PET, indican la despolimerización de las largas cadenas del PET (polímero) en monómeros (unidades de un solo compuesto), tales como el ácido tereftálico y el ácido benzoico, así como en etilenglicol.

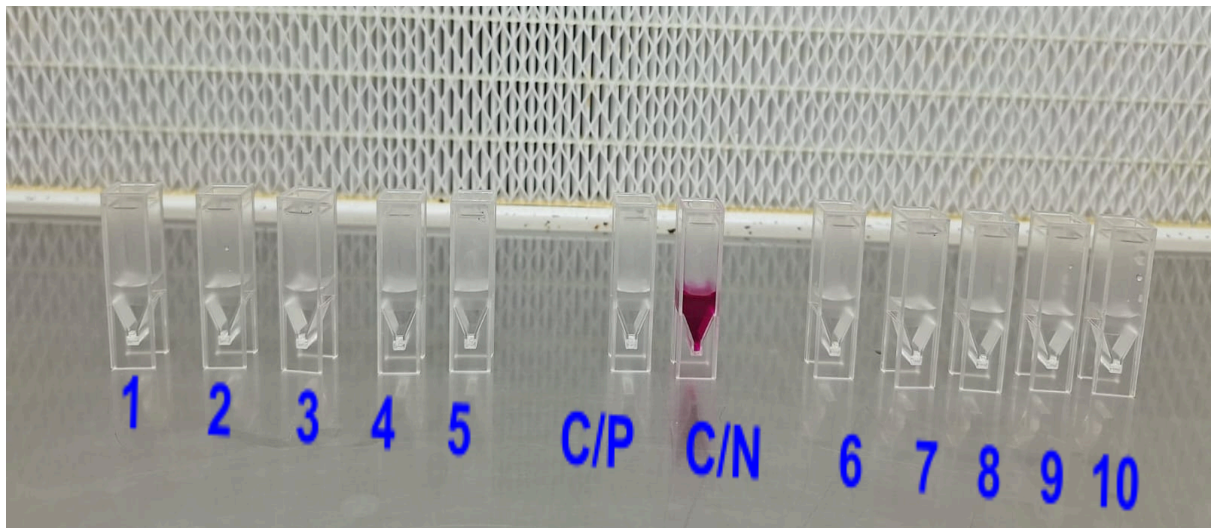


Figura 15. Ensayo colorimétrico. Los ensayos colorimétricos se realizaron tomando el sobrenadante de los tubos con PET incubados con la enzima y el colorante fenolftaleína: Los sobrenadantes no presentaron coloración al contacto con la fenolftaleína, lo que sugiere un comportamiento ácido, lo que se podría deber a la presencia de grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) que, particularmente en la degradación del PET, indican la despolimerización de las largas cadenas del PET en monómeros.

Estos resultados se corroboraron con tiras de pH, que indicaron pH de entre 6 y 4

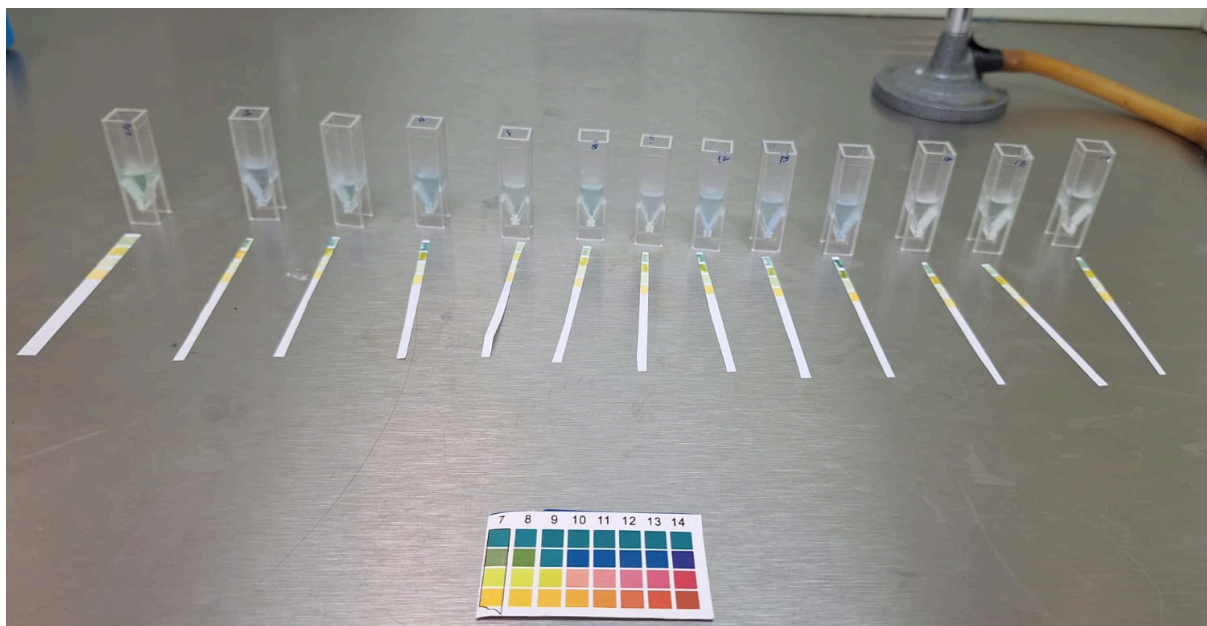


Figura 16. Cambios en el pH: Se midió pH, indicaron pH de entre 3 y 6.

Determinación de la actividad por peso constante

La Figura 17 muestra el decremento PET en gramos después de su incubación: Los valores representados en la gráfica corresponden a la media aritmética del decremento. El control negativo; PET incubado únicamente con agua PISA estéril (no presentó degradación detectable), el control positivo, correspondiente a PHB, mostró un decremento promedio de 0.307 g, confirmando la funcionalidad del sistema experimental. En presencia de *A. baldaniorum* Sp245, se observó un decremento promedio de 0.179 g en PET virgen y 0.102 g en PET reciclado. Para la cepa mutada de *A. baldaniorum* Sp245, los valores promedio de degradación fueron de 0.143 g y 0.084 g en PET virgen y reciclado, respectivamente. La PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 presentó decrementos promedio de 0.122 g en PET virgen y 0.097 g en PET reciclado. Así mismo, *A. brasilense* Sp7 mostró valores promedio de 0.128 g y 0.101 g en PET virgen y reciclado, respectivamente, mientras que la PhaZ expresada en *E.coli* S17.1 con el plásmido pBSK⁺ presentó decrementos promedio de 0.158 g en PET virgen y 0.104 g en PET reciclado. En conjunto, los resultados evidencian una mayor degradación del PET virgen en comparación con el PET reciclado en todas las condiciones evaluadas.

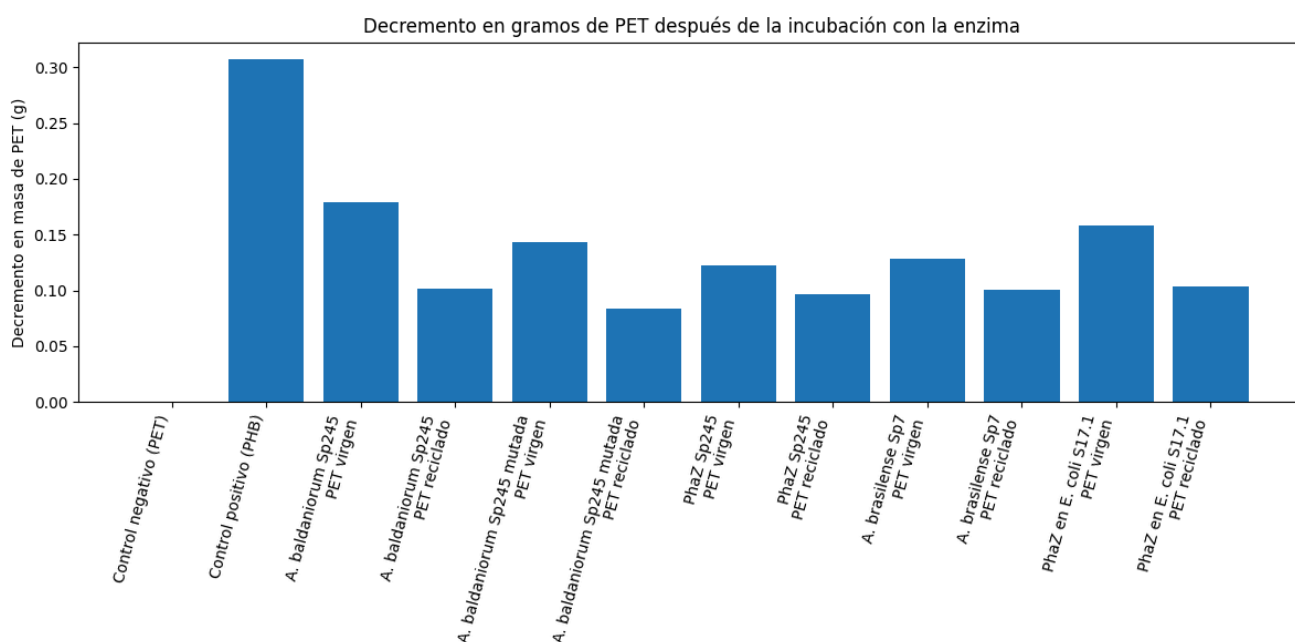


Figura 17. Gráfica de barras correspondiente al ensayo de peso constante, en donde por cada 0.5 g de PET se agregaron 500 µg de proteína; se pesó antes y después de agregar la enzima, y posterior a los 40 días de incubación.

Discusión

Las PHB depolimerasas se caracterizan por utilizar el polímero de PHB como fuente de carbono y energía para la bacteria, la PHB depolimerasa incide en el enlace éster que une a los monómeros que conforman el PHB. Por otra parte, el PET es un polímero orgánico sintetizado mediante una reacción de policondensación entre el ácido tereftálico y el etilenglicol. Durante esta reacción, se forman enlaces éster que dan lugar a una cadena polimérica lineal.

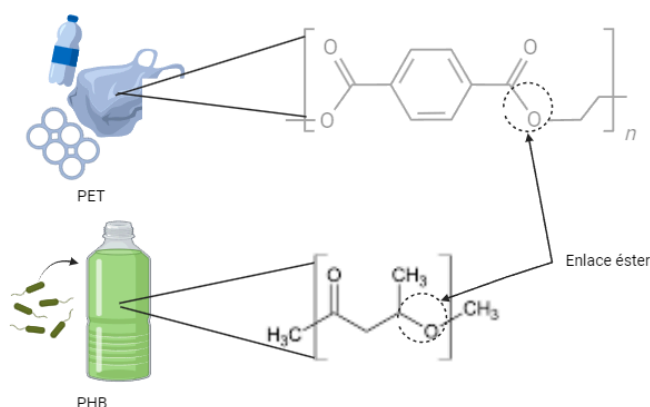


Figura 18. Esquema representativo y comparativo del PHB y PET

Actualmente se conocen diversas hidrolasas capaces de hidrolizar el enlace éster del PET, dentro de estas la enzima PETasa es una de las más estudiadas, cuenta con el proceso de degradación con patrones y/o características específicas, las cuales coinciden con los resultados obtenidos del periodo de incubación con *A. baldaniorum* Sp 245, *A. baldaniorum* Sp 245 mutada, PhaZ purificada, *A. brasilense* Sp7 Y PhaZ en *E. coli* s17.1. El Árbol filogenético sugiere la localización de *A. baldaniorum* Sp 245 y *A. brasilense* Sp7 como especies pariféticas a las hidrolasas de PET, el acoplamiento de *A. baldaniorum* Sp 245 con PET nos sugiere que PhaZ presenta 6 aminoácidos que interactúan con el PET, de los cuales 5 interactúan con los anillos aromáticos, mientras que en la PETasa sólo un aminoácido interactúa con el anillo aromático del PET (26-28).

El sedimento acumulado en la base de los tubos se observa en la Figura 12 sugieren cambios y modificaciones al interior de los tubos, la microscopía óptica (Figura 13) se observaron microfisuras y poros generados luego del proceso de incubación que coinciden con la descripción de Yoshida en 2016: mencionan cambios fisicoquímicos generados posterior a la incubación de 70 y 120 de la enzima PETasa con PET, estos cambios se mencionan como el resultado del proceso de degradación (25-28).

En el proceso de degradación del PET se generan fragmentación del PET (estructura quebrada, puntos reflectivos) y oligómeros o compuestos aromáticos que emiten fluorescencia, esto se aprecia en la Figura 14. Se complementó con un ensayo colorimétrico y pruebas de pH, las cuales muestran un comportamiento ácido lo que sugieren una gran presencia de grupos carboxílicos (-COOH) que,

particularmente en la degradación del PET, indican la despolimerización de las largas cadenas del PET (polímero) en monómeros (unidades de un solo compuesto), tales como el ácido tereftálico y el ácido benzoico, así como en etilenglicol (47). Los paneles 1, 4, 7, 10 y 13 de la Figura 14 corresponden a sedimentos de PET virgen se observan estructuras irregulares con diferente tonalidad e intensidad de fluorescencia en comparación con las otras correspondientes al sedimento del PET reciclado, lo que podría indicar que los aditivos y/o colorantes añadidos al PET virgen (proceso de personalización dependiendo de la industria) ralentiza el periodo de degradación del PET.

Finalmente, el ensayo de peso constante evidenció un decremento en la masa del PET después del periodo de incubación, lo que indica la ocurrencia de procesos de hidrólisis del polímero. En la Figura 17 se observa que *A. baldaniorum* Sp245 presentó el mayor decremento en gramos de PET, posicionándose como el sistema con mayor efecto sobre el sustrato, lo que sugiere una elevada capacidad degradativa bajo las condiciones evaluadas.

De manera interesante, la cepa *A. baldaniorum* Sp245 mutada en el gen phaZ mostró también un decremento apreciable en el peso del PET, aunque inferior al de la cepa silvestre. Este resultado sugiere que, además de PhaZ, podrían estar involucradas otras enzimas hidrolíticas o esterasas con capacidad de interactuar y actuar sobre el PET, contribuyendo parcialmente a su degradación. Por otro lado, aunque los ensayos in silico sugieren que la PhaZ presenta una alta afinidad por el PET, esto podría atribuirse a limitaciones asociadas al método de purificación, tales como pérdida de actividad o desnaturalización parcial que desfavorecen la hidrólisis del polímero. En conjunto, estos resultados indican que la actividad degradativa del PET es un fenómeno multifactorial, en el que la presencia de la célula completa, la diversidad enzimática y el microambiente generado durante la incubación juegan un papel determinante. La Figura 17 integra y respalda los análisis cualitativos y microscópicos presentados previamente, confirmando el potencial de PhaZ para la degradación del PET.

Conclusión

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que las PHB depolimerasas (PhaZ/PhbZ) de *Azospirillum brasilense* Sp7 y *Azospirillum baldaniorum* Sp245 poseen un potencial funcional relevante más allá de su sustrato natural. El análisis filogenético mostró que ambas enzimas se agrupan como parafiléticas respecto a la PETasa, lo que sugiere una relación evolutiva cercana con hidrolasas capaces de actuar sobre polímeros sintéticos como el PET.

El modelado estructural tridimensional de la PhaZ de *A. baldaniorum* Sp245 permitió realizar estudios de docking molecular, identificándose que cinco de los seis residuos catalíticos predichos interactúan directamente con el anillo aromático del

PET, lo que respalda la afinidad estructural de esta enzima por dicho polímero. Estos resultados *in silico* se correlacionaron con los ensayos experimentales.

Las condiciones óptimas de expresión de PhbZ se establecieron a las 36 h de cultivo y a 32 °C, permitiendo la obtención eficiente de proteínas totales y la purificación de PhaZ mediante electroelución. Asimismo, se logró la generación y expresión de la proteína recombinante PhbZ en *E. coli* S17.1 utilizando el plásmido pBluescript SK (+), con inducción efectiva del gen phaZ mediante arabinosa al 2 %.

La evaluación de la actividad enzimática mediante microscopía óptica, microscopía de fluorescencia, ensayos colorimétricos, pruebas de pH y determinación de peso constante evidenció diferencias significativas en la hidrólisis del PET virgen y reciclado. En particular, las PhbZs de *A. brasilense* Sp7 y *A. baldaniorum* Sp245 mostraron capacidad para inducir alteraciones estructurales en el PET, confirmando su actividad hidrolítica.

En conjunto, estos hallazgos confirman que las PHB depolimerasas estudiadas, especialmente la de *A. baldaniorum* Sp245, representan candidatas prometedoras para el desarrollo de estrategias biotecnológicas orientadas a la degradación enzimática del PET y al fortalecimiento de procesos sostenibles de biorreciclaje de plásticos.

Perspectiva

Como continuación de este trabajo, se propone evaluar métodos alternativos de purificación de PhaZ, tales como cromatografía de afinidad o de intercambio iónico, con el fin de conservar la conformación nativa de la enzima y mejorar su afinidad y actividad catalítica sobre el PET. De manera complementaria, se plantea incorporar cofactores o aditivos y evaluar su efecto sobre la velocidad de hidrólisis mediante ensayos en tiempos de incubación más cortos. Asimismo, se sugiere implementar técnicas analíticas adicionales para la detección de la degradación del PET, incluyendo FTIR, RMN y HPLC, que permitan correlacionar la pérdida de masa con cambios estructurales del polímero y la liberación de productos de hidrólisis. Finalmente, considerando la actividad observada en la cepa *A. baldaniorum* Sp245 mutada en el gen phaZ, se propone realizar un análisis proteómico comparativo para identificar y caracterizar otras enzimas con potencial hidrolítico involucradas en la degradación del PET.

Bibliografía.

1. Geyer R, Jambeck JR, Law KL. 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci Adv* 3:e1700782.
2. Thompson RC, Moore CJ, Vom Saal FS, Swan SH. 2009. Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 364:2153–2166.
3. Nihart AJ, Garcia MA, El Hayek E, Liu R, Olewine M, Kingston JD, Castillo EF, Gullapalli RR, Howard T, Bleske B, Scott J, Gonzalez-Estrella J, Gross JM, Spilde M, Adolphi NL, Gallego DF, Jarrell HS, Dvorscak G, Zuluaga-Ruiz ME, West AB, Campen MJ. 2025. Bioaccumulation of microplastics in decedent human brains. *Nat Med* <https://doi.org/10.1038/s41591-024-03453-1>.
4. Prata JC, Da Costa JP, Lopes I, Duarte AC, Rocha-Santos T. 2020. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Sci Total Environ* 702:134455.
5. Suzuki M, Tachibana Y, Kasuya K. 2021. Biodegradability of poly(3-hydroxyalkanoate) and poly(ϵ -caprolactone) via biological carbon cycles in marine environments. *Polym J* 53:47–66.
6. Reddy CSK, Ghai R, Rashmi, Kalia VC. 2003. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresour Technol* 87:137–146.
7. Jambeck JR, Geyer R, Wilcox C, Siegler TR, Perryman M, Andrady A, Narayan R, Law KL. 2015. Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science* 347:768–771.
8. Organización Panamericana de la Salud. 2024 Apr 16. Salud y contaminación por plásticos: la OPS considera clave fortalecer la investigación sobre los impactos en la salud y los sistemas de información y vigilancia. OPS. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/16-4-2024-salud-contaminacion-por-plasticos-ops-considera-clave-fortalecer-investigacion>
9. National Geographic. La Gran mancha de basura del Pacífico. *Natl Geogr*. <https://education.nationalgeographic.org/resource/la-gran-mancha-de-basura-d-el-pacifico/>.
10. Gobierno de México. Contaminación por plástico. Gob México. <https://www.gob.mx/profeco/es/articulos/contaminacion-por-plastico?idiom=es>.

11. The Pew Charitable Trusts, SYSTEMIQ. Breaking the Plastic Wave: A Comprehensive Assessment of Pathways Towards Stopping Ocean Plastic Pollution. 2020. Disponible en: https://www.pew.org/-/media/assets/2020/10/breakingtheplasticwave_mainreport.pdf
12. Hale RC, Seeley ME, La Guardia MJ, Mai L, Zeng EY. 2020. A Global Perspective on Microplastics. *J Geophys Res Oceans* 125:e2018JC014719.
13. Cox KD, Covernton GA, Davies HL, Dower JF, Juanes F, Dudas SE. 2019. Human Consumption of Microplastics. *Environ Sci Technol* 53:7068–7074.
14. Gobierno de México. Con-su-mismo plástico. 2018 Nov 23. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Disponible en: <https://www.gob.mx/conanp/articulos/con-su-mismo-plastico?idiom=es>
15. UNEP. 2021. From pollution to solution: a global assessment of marine litter and plastic pollution. United Nations Environment Programme. Available from: <https://www.unep.org/resources/report>
16. Beltrán M, Marcilla A. Tema 1. Estructura y propiedades de los polímeros. Universidad Politécnica del Altiplano (UnPA). Disponible en: <https://unpa.edu.mx/~aramirez/Tema1.pdf>
17. Berry KLE, Hall N, Critchell K, Chan K, Bennett B, Mortimer M, Lewis PJ. 2023. Plastics, p. 207–228. *In* Reichelt-Brushett, A (ed.), *Marine Pollution – Monitoring, Management and Mitigation*. Springer Nature Switzerland, Cham.
18. Gomis A. 2012. Tecnología de polímeros. Procesado y propiedades. Universidad de Alicante. https://books.google.com.mx/books?id=jxilUUn4_QAC.
19. Dilshad E, Waheed H, Ali U, Amin A, Ahmed I. 2021. General Structure and Classification of Bioplastics and Biodegradable Plastics, p. 61–82. *In* Kuddus, M, Roohi (eds.), *Bioplastics for Sustainable Development*. Springer Singapore, Singapore.
20. Fonseca-Florido HA, Peña-Castillo JU. 2022. Una revisión a la clasificación de los bioplásticos y sus regulaciones actuales. Disponible en: https://iqa.mx/documentos/mp_115_noviembre_diciembre_2022-14-17.pdf
21. Naderi Kalali E, Lotfian S, Entezar Shabestari M, Khayatzadeh S, Zhao C, Yazdani Nezhad H. 2023. A critical review of the current progress of plastic waste recycling technology in structural materials. *Curr Opin Green Sustain Chem* 40:100763.

22. Nayanathara Thathsarani Pilapitiya PGC, Ratnayake AS. 2024. The world of plastic waste: A review. *Clean Mater* 11:100220.
23. Al-Malaika S. 2000. Polyester Degradation and Recycling. En: Hamid SH, editor. *Handbook of Polymer Degradation*. 2^a ed. Nueva York: Marcel Dekker.
https://books.google.com.mx/books/about/Handbook_of_Polymer_Degradation.html?id=xzJRAAAAMAAJ&redir_esc=y.
24. Ruiz MTZ AR, Neira Velázquez G. Basura plástica. Centro de Investigación en Química Aplicada (CICQA). Basura plástica. Disponible en: <https://www.ciqqa.mx/BasuraPlastica.aspx>
25. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, Toyohara K, Miyamoto K, Kimura Y, Oda K. 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* 351:1196–1199.
26. Tournier V, Topham CM, Gilles A, David B, Folgoas C, Moya-Leclair E, Kamionka E, Desrousseaux M-L, Texier H, Gavalda S, Cot M, Guémard E, Dalibey M, Nomme J, Cioci G, Barbe S, Chateau M, André I, Duquesne S, Marty A. 2020. An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature* 580:216–219.
27. Khairul Anuar NFS, Huyop F, Ur-Rehman G, Abdullah F, Normi YM, Sabullah MK, Abdul Wahab R. 2022. An Overview into Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases and Efforts in Tailoring Enzymes for Improved Plastic Degradation. *Int J Mol Sci* 23:12644.
28. Amanna R, Rakshit SK. 2024. Review of nomenclature and methods of analysis of polyethylene terephthalic acid hydrolyzing enzymes activity. *Biodegradation* 35:341–360.
29. Fernandes Domingues Duarte C, Cecato U, Biserra TT, Mamédio D, Galbeiro S. 2020. *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. *Rev Mex Cienc Pecu* 11:223–240.
30. Kadouri D, Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y. 2002. Identification and Isolation of Genes Involved in Poly(β -Hydroxybutyrate) Biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and Characterization of a *phbC* Mutant. *Appl Environ Microbiol* 68:2943–2949.
31. Martínez-Morales LJ, Soto-Urtecho L, Baca BE, Sánchez-Ahúja JA. 2003. Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 228:167–173.

32. Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y. 2003. Poly γ -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a phaZ mutant. *Arch Microbiol* 180:309–318.
33. Baca K, Sánchez M, Carreño C, Mendoza G. 2010. Polihidroxicanoatos de cepas de *Azospirillum* spp. aisladas de raíces de *Lycopersicon esculentum* Mill. “tomate” y *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque. *Scientia Agropecuaria* 1:213–224.
34. Garcia F, Muñoz H, Carreño C, Mendoza G. 2010. Caracterización de cepas nativas de *Azospirillum* spp. y su efecto en el desarrollo de *Oryza sativa* L. “arroz” en Lambayeque 1:107–116.
35. Martínez MDLÁM, Urzúa LS, Carrillo YA, Ramírez MB, Morales LJM. 2023. Polyhydroxybutyrate Metabolism in *Azospirillum brasilense* and Its Applications, a Review. *Polymers* 15:3027.
36. Gonzalez Y, Meza JC, Gonzalez O, Cordoca JA. 2013. Synthesis and biodegradation of polyhydroxialkanoates: Bacterially produced plastics. *Rev Int Contam Ambient* 29.
37. Knoll M, Hamm TM, Wagner F, Martinez V, Pleiss J. 2009. The PHA Depolymerase Engineering Database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* 10:89.
38. Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y. 2003. Poly γ -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch Microbiol* 180:309–318.
39. Martínez MDLÁM. 2019. Caracterización genética y funcional de proteínas fasin probables de *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de Doctorado. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
40. Rosales A. 2015. Mutación del gen *phbZ* de *Azospirillum brasilense* Sp245. Tesis de Licenciatura. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla.
41. European Nucleotide Archive (ENA). FASTA sequence. Hinxton, UK: European Bioinformatics Institute (EBI). Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/ena/>
42. Geer LY, Marchler-Bauer A, Geer RC, Han L, He J, He S, Liu C, Shi W, Bryant SH. 2010. The NCBI BioSystems database. *Nucleic Acids Res* 38:D492–D496.

43. Finn RD, Coghill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar GA, Tate J, Bateman A. 2016. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* 44:D279–D285.
44. Berman HM. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
45. Sokrypton. AlphaFold2 using MMseqs2 (ColabFold). GitHub. Disponible en: <https://github.com/sokrypton/ColabFold>
46. Koichiro Tamura, Glen Stecher y Sudhir Kumar. 2021 MEGA11: Análisis de genética evolutiva molecular, versión 11. *Biología molecular y evolución* 38:3022-3027
47. Smith M, March J. 2007. March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure Sixth edition. http://books.google.com.mx/books?id=by05kNkm_xYC&printsec=frontcover&source=gbs_atb#v=onepage&q&f=false.

Anexo I

Técnicas de laboratorio

Preparación de medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

Reactivos para 1 L de medio LB

- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Peptona de caseína 10 g
- Agua, aforar a 1 L

Ajustar pH 7.0 con NaOH. Si se requiere medio sólido agregar 15 g de Agar. Esterilizar a 15 Lb durante 20 min.

Medio Mínimo K-Malato (MMKM)

Preparar soluciones stock de sales y oligoelementos

Sales para MMKM

- CaCl_2 0.7%
- FeCl_3 1%
- NaMoO_4 0.5%
- NH_4Cl 20%

Oligoelementos

- MnSO_4 2.5 g
- ZnSO_4 0.7 g
- CoSO_4 0.14 g
- CuSO_4 0.125 g
- H_3BO_3 0.03 g
- Agua aforar a 100 mL

Preparar la base K- Malato Base K – Malato

- KH_2PO_4 0.87 g
- K_2HPO_4 1.67 g
- MgSO_4 0.29 g
- NaCl 0.48 g
- Ácido Málico 4.5326 g
- Agua Aforar a 950 mL
- Ajustar pH 6.9 con KOH.

Si se requiere medio sólido agregar 15 g de agar. Esterilizar sales, oligoelementos y base K-Malato por separado 5 lb durante 30 min. Una vez esterilizadas las sales, los oligoelementos y la base K-Malato agregar 10 mL de cada una de las sales (CaCl_2 , FeCl_3 , NaMoO_4 y NH_4Cl) y de la solución stock de oligoelementos a la Base K-Malato.

Protocolo de elaboración de células quimiocompetentes (Ramírez, 2013)

Estriar una colonia de la cepa de interés en una placa de medio LB con agar. Incubar 24 h a 37 °C.

- Inocular una colonia de la cepa de interés en un tubo conteniendo 5 mL de medio LB. Incubar de 12 a 24 h a 37° C y 200 rpm.
- A partir del precultivo anterior, inocular, a una $\text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$ de 0.1, un matraz conteniendo 100 mL de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una $\text{D.O.}_{600 \text{ nm}}$ (aproximadamente de 5 – 7 h).
- Mantener el cultivo en hielo 20 min.
- Obtener el paquete celular de 10 ml de cultivo centrifugando a 4 °C durante 1 min a 8000 rpm muestras de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL. Descartar el sobrenadante.
- Lavar el paquete celular en 1 mL de buffer TE centrifugando los tubos eppendorf a 4°C durante 1 min a 12000 rpm.
- Resuspender el paquete celular en 1 mL de una solución fría de CaCl_2 0.1 M y mantener a 4 °C durante 15 min.
- Centrifugar a 4 °C durante 1 min a 10000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Repetir los dos pasos anteriores de 4 – 5 veces.
- Resuspender el paquete celular en 100 μL de una solución fría de CaCl_2 0.1 M con glicerol 15%.
- Almacenar a -70 °C

Protocolo de transformación bacteriana (Sambrook et al.,1989).

- Agregar 1 μL de la construcción plasmídica en 100 μL de células quimiocompetentes cuidadosamente descongeladas.
- Resuspender e incubar las células en hielo durante 30 min.
- Aplicar choque térmico a 42 °C durante 45 - 90 s.
- Mantener en hielo durante 2 min

- Agregar 250 µl de medio líquido LB precalentado a 42 °C.
- Incubar las células a 37 °C y 200 rpm durante 1:30 - 2:00 h para favorecer la recuperación de las células.
- Extender el contenido en 2 placas Petri de medio sólido LB suplementado con los antibióticos de selección.
- Incubar 24 h a 37 °C.
- Analizar las clonas obtenidas

Extracción y purificación de DNA plasmídico (Sambrock, 1998)

Inocular 10 µl de cultivo de la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido de interés en una placa Petri de medio sólido LB suplementado con él (los) antibiótico (s) apropiado (s). Incubar 24 h a 37 °C.

- Inocular una colonia en un tubo de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar toda la noche a 37 °C y 200 rpm.
- Obtener el paquete celular contenido en 5 – 10 mL de cultivo mediante centrifugación a 12000 rpm durante 2 min en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Lavar el paquete celular con buffer TE dos veces.
- Resuspender el paquete celular en 250 µl de la solución I agregar 500 µl de la solución II y mezclar por inversión hasta obtener una solución viscosa y transparente.
- Añadir 375 µl de la solución III, mezclar por inversión hasta observar la formación de agregados blancos.
- Incubar la muestra 10 min en hielo.
- Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf.
- Adicionar 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Agitar vigorosamente en vórtex durante 60 s.
- Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.
- Agregar 400 µl de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Agitar vigorosamente en vortex.
- Centrifugar a 4 °C durante 5 min a 12000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.

- Repetir el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) hasta no observar la interfase blanca (2 – 4 lavados).
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.
- Agregar 800 µL de alcohol isopropílico, mezclar por inversión y almacenar durante 10 – 30 min a -20 °C. Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.
- Decantar el sobrenadante.
- Lavar el paquete dos veces con 1mL de etanol 70% centrifugando a 12000 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante.
- Permitir que el etanol restante se evapore.
- Hidratar el paquete en 50 µL de una solución de RNasa H (40 µg/mL).
- Incubar a 37 °C durante 30 min
- Analizar pureza y rendimiento.

Soluciones para Miniprep

Solución I

- Glucosa 50 mM
- Tris-HCl 25 mM
- EDTA 10 mM

Solución II

- SDS 1%
- NaOH 0.2 N

Solución III

- Ác. Acético 11.5 mL
- Acetato de Potasio 5M 60 mL
- Agua 28.5 mL

Electroforesis en gel de agarosa tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Pesar la agarosa y disolver en el volumen correspondiente de buffer TAE 1X calentando por lapsos en horno de microondas (aproximadamente 1 min).

- Una vez fundida la agarosa, esperar a que enfríe en temperatura ambiente.
- Colocar el peine en la cámara electroforética y vierta la agarosa fundida.
- Permitir que gelifique la agarosa (aproximadamente 20 min).
- Agregar el buffer TAE 1X a la cámara electroforética hasta cubrir el gel de electroforesis y retirar el peine del gel de agarosa.
- Cargar, en los pocillos del gel de agarosa, la muestra de ADN de interés (5 – 10 µl) mezclada con 1 µl de buffer de carga 1X y 1 µl de marcador 1 Kb.
- Tapar la cámara electroforética y conectar los electrodos a la fuente de alimentación.
- Encender la fuente de alimentación y programar a 60 V durante 10 min y posteriormente a 70 – 80 V durante 90 min (dependiendo del porcentaje de agarosa).
- Una vez finalizada la electroforesis, visualizar los fragmentos de ADN mediante luz UV previa tinción del gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio.

Expresión de proteínas (Sambrock, 1998)

- Inocular 10 µl de cultivo de la cepa conteniendo el plásmido de interés en una placa Petri de medio sólido LB suplementado con el (los) antibiótico (s) apropiado(s).
- Incubar 24 h a 37 °C.
- Inocular una colonia en un tubo con 5 mL de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar toda la noche a 37 °C y 150 rpm.
- Con el precultivo anterior, inocular un matraz conteniendo 200 mL de medio de cultivo líquido LB suplementado con él (los) antibióticos de selección, a una $DO_{600\text{ nm}} = 0.1$.
- Incubar a 37 °C a 150 rpm hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}}$ entre 0.5 y 0.8.
- Posteriormente, añadir el inductor
- Incubar nuevamente los matraces a 37 °C y 150 rpm durante 3h.
- Centrifugar la muestra a 10000 rpm por 10 min.
- Agregar 5 mL de buffer PBS y resuspender
- Almacenar la pastilla a -20 °C

Protocolo de determinación de proteínas (BioRad).

- Agregar 500 µl de buffer PBS y resuspender en la pastilla que se almacenó anteriormente en la inducción.
- Diluir de 5 µl del extracto proteico en 795 µL de agua PISA estéril.
- Agregar 200 µl del reactivo de Bradford (BioRad).

- Mezclar en vórtex e incubar la muestra durante 5 min a temperatura ambiente.
- Medir la $DO_{595\text{ nm}}$, utilizar agua PISA estéril como blanco.
- Determinar la concentración de proteína utilizando una curva de calibración de BSA

Protocolo de elaboración del gel de electroforesis SDS-PAGE (Sambrock, 1998)

De acuerdo con el peso molecular de la proteína de interés buscar la concentración del gel de poliacrilamida a preparar para una eficiente resolución. Limpiar los cristales y espaciadores con SDS al 1%. Ensamblar los cristales con los espaciadores para la carga del gel. Colocar cuidadosamente la solución del gel en los cristales dejando de 2- 3 cm libres de solución. Agregar agua hasta llenar los vidrios (eliminará las burbujas que se puedan formar). Permitir la polimerización del gel (aproximadamente 30 min). Colocar el peine luego de verter el gel concentrador, posteriormente llenar con buffer de corrimiento la cámara y cargar las muestras preparadas.

Gel separador

- Agua destilada: 3.8ml
- acrilamida: 3.4 ml
- Tris HCL pH de 8.8: 2.6ml
- SDS 10%: 100µl
- APS: 100µl
- TEMED: 10µl

Gel concentrador

- Agua destilada: 2.93 ml
- acrilamida: 670µl
- Tris HCL pH de 6.8: 1.3 ml
- SDS 10%: 50µl
- APS: 50µl
- TEMED: 5µl

Purificación por el método de electroelución (Bio-Rad)

- Preparar por lo menos cuatro geles de poliacrilamida.
- Cámaras electroforéticas y posteriormente llenar con buffer de corrimiento la cámara y cargar las muestras preparadas.
- Encender la fuente de alimentación y programar a 70 V durante 25-30 min y posteriormente a 80 - 100 V durante 70 min
- Teñir la primera y última columna de cada gel (controles).
- Cortar la banda correspondiente al peso molecular de la proteína de interés utilizando una cuchilla desechable afilada y colocarlo en un tubo eppendorf.
- Electroeluir utilizando el electroelution (Modelo 422; Bio-Rad) durante 3 h a temperatura ambiente utilizando un tampón de elución (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, glicina 192 mM, que contiene 0,1% (p/v) de SDS), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Recuperar la proteína en una cantidad mínima del mismo tampón y colocarlo en un tubo eppendorf. La pureza de la proteína se verifica mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Protocolo de amplificación mediante PCR (Thermo Scientific) Modificado para *phaZ*

Mezcla de reacción para 30 µL:

- | | |
|---------------------------------|--------|
| • Agua pisa: | 5 µL |
| • Buffer: | 5 µL |
| • DNTPs: | 2.5 µL |
| • Oligo delantero: | 2.5 µL |
| • Oligo reverso: | 2.5 µL |
| • Preparado de paquete celular: | 8.5µL |
| • DMSO: | 1.5 µL |
| • Taq polimerasa | 2.5 µL |

Mezclar suavemente y centrifugar 5 seg. colocar los tubos en el termociclador y ajustar los parámetros.

Condiciones para 30 ciclos

- 95°C 5 minutos. Fase 1
- 95°C 1.5 minutos. Desnaturalización.
- 57°C 1.5 minutos. Alineamiento.
- 72°C 10 minutos. Extensión.

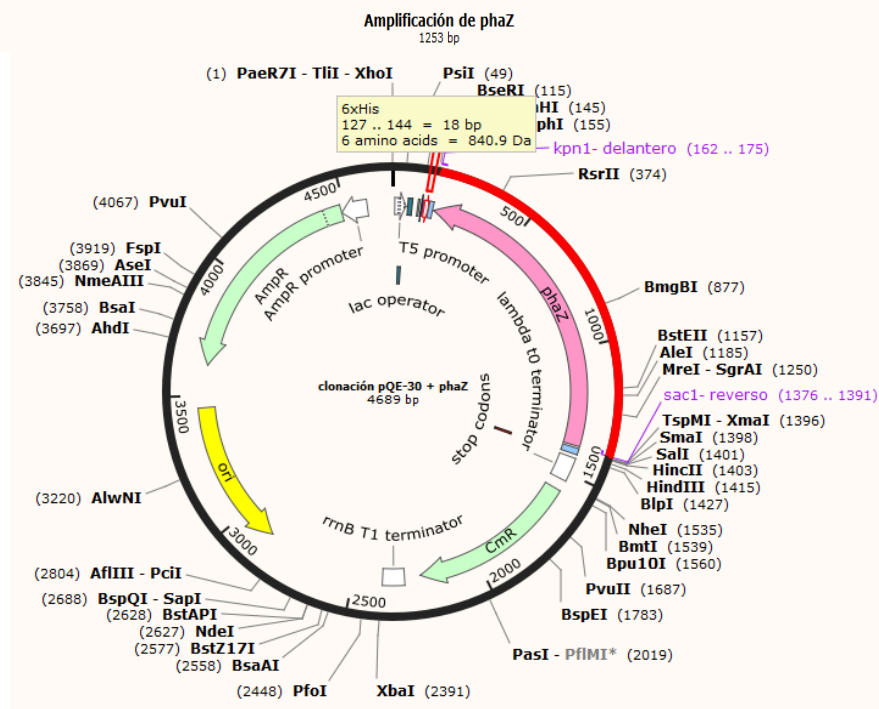
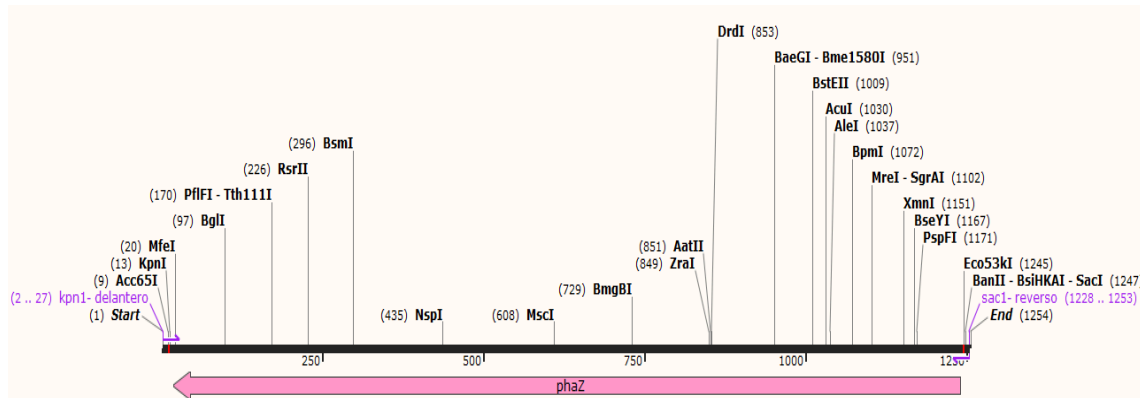
Una vez finalizado el proceso, se correrá la muestra en una electroforesis en gel de agarosa al 1%. Visualizar con la luz UV después de haber teñido el gel con bromuro de etidio.

Anexo II

Generación de oligonucleótidos específicos para *phaZ* *A. baldaniorum* Sp 245 y construcción del plásmido para la proteína recombinante

Delantero: AGG GAA CGG TAC CAA CCT CAA TTG TG

Reverso: GAA GCG AGC TCC TGT TGC TCT ACC AT



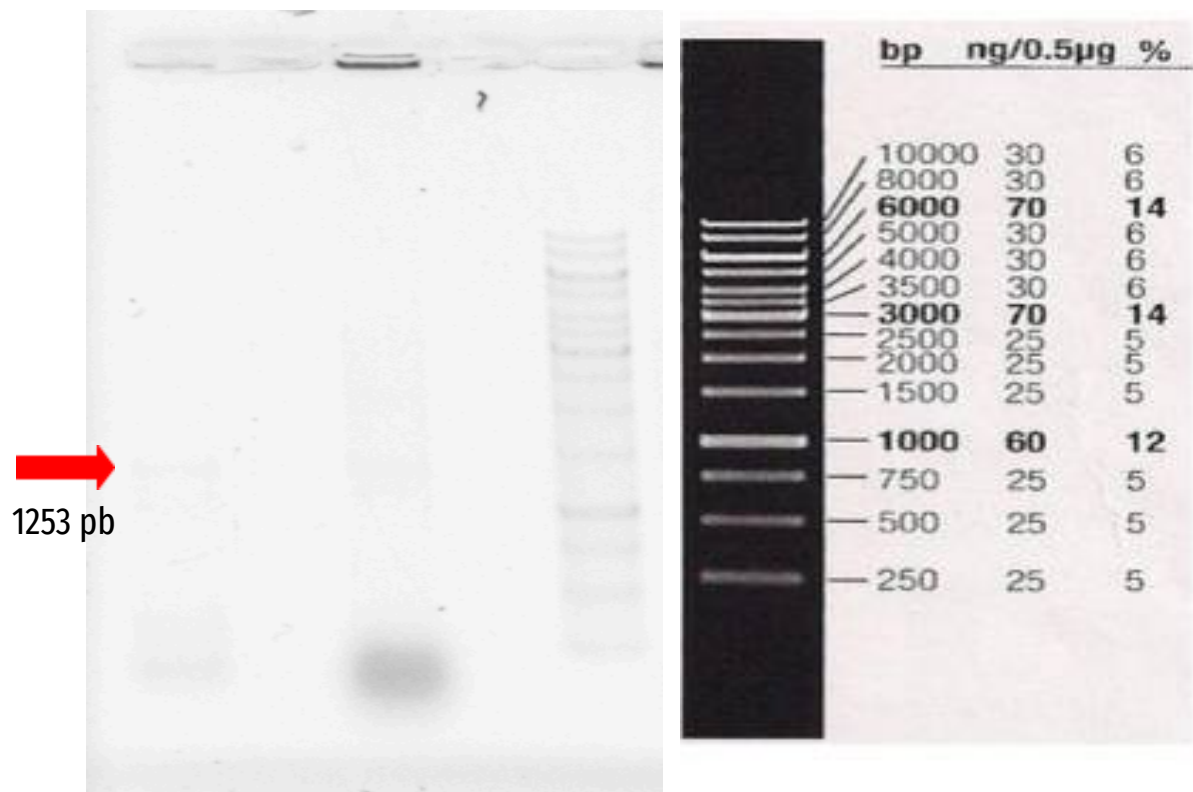


Figura 19. Diseño de primers y PCR