



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTA DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Degradación de polietileno tereftalato (PET) mediante el uso de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y a escala de biorreactor

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Diseño de enzimas PET hidrolasas mediante reconstrucción ancestral de secuencias” de la convocatoria CEDIA IDi XVIII - 2023, aprobado mediante Resolución 1210-CU-P-2023 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

Autor: Wilma Alexandra Caguana Tenelema

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Agosto - 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 19 de junio de 2024



Firmado electrónicamente por:
**MARIO DANIEL GARCIA
SOLIS**

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Wilma Alexandra Caguana Tenelema, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Wilma Alexandra Caguana Tenelema

1805650734

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos del autor.



Wilma Alexandra Caguana Tenelema

1805650734

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las diapositivas emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firma:



Firmado electrónicamente por:
**WILLIAM RICARDO
CALERO CACERES**

Presidente del Tribunal



Firmado electrónicamente por:
**MARIA DANIELA
GARCÉS MONCAYO**

Mg. María Daniela Garcés Moncayo

C.I. 1803571585



Firmado electrónicamente por:
**MANOELLA ALEJANDRA
SANCHEZ GARNICA**

Mg. Manoella Alejandra Sánchez Garnica

C.I. 0604079871

Ambato, 30 de julio de 2024

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen del Cisne

A mis padres Mario y Gladys

A mis hermanos Edison, Erika, Jefferson y Melanie

A mi abuelito que me cuida desde el cielo

A mi familia y amigos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por cada día permitir levantarme, por la salud y por la fuerza que me brindo en este camino, por ser mi guía espiritual porque sin el nada hubiera sido posible. Gracias también a la Virgen del Cisne por las bendiciones y por aclamar ante nuestro señor por mi bienestar. Infinitamente quiero dar gracias a mis padres Mario y Gladys por haberme dado la vida, regalarme su apoyo, comprensión y cariño que muchas veces lo necesite, y sobre todo por ser mi claro ejemplo de lucha constante. A mis hermanos, Edison, Erika y Melanie por acompañarme en este camino, especialmente agradezco a mi hermano Jefferson (tilín) por todas las risas, las tristezas y enojos, precipuamente por el apoyo moral y emocional recibido. Como no agradecer a mi familia (mamita, tíos y primos) por confiar en mí, por cada consejo y por cada una de las reuniones que han llenado mi alma de risa y energía.

Quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a la Dra. Liliana Cerda, y de manera muy especial a mi tutor Dr. Mario García por brindarme su poyo, ser una fuente de inspiración y por darme una acogida en sus proyectos. Gracias por cada clase dictada, por la paciencia y comprensión con la que enseñaba. A la Universidad Técnica de Ambato, por haberme abierto las puertas para esta mi formación académica.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio, especialmente a Vivian por la predisposición, la enseñanza brindada y la paciencia que me ha tenido. A mis amigos que han recorrido este camino académico conmigo Lenin y Mónica, gracias por las risas, los días de desesperación, las correcciones en cada trabajo entregado y los momentos tan gratos dentro y fuera de la universidad. A todos los amigos y personas que han formado parte de mi vida que de una u otra manera me motivaron a seguir luchando por conseguir mis objetivos.

Finalmente, y no menos importante quiero darme las gracias a mí mismo por no rendirme, incluso cuando las cosas se pusieron difíciles, por haber encontrado la fuerza e inspiración para seguir adelante cada día. Agradezco los días de cansancio e insomnio, porque ahí me di cuenta de que podía dar más de mí misma.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS	x
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
RESUMEN EJECUTIVO	xii
ABSTRACT.....	xiii
CAPITULO 1.- MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Producción mundial del plástico	2
1.1.2. Contaminación por el plástico.....	2
1.1.3. Polietileno Tereftalato (PET).....	3
1.1.4. Degradación del PET	4
1.1.4.1. Degradación convencional del PET	4
1.1.4.2. Biodegradación del PET	4
1.1.5. PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	5
1.1.5.1. Procesos de degradación del PET	6
1.1.5.2. Mutantes de la enzima PETasa	7
1.1.6. Degradación de PET comercial a escala de biorreactor	7
1.1.6.1. Procesos de escalado	7
1.1.6.2. Enzimas a escala industrial	8
1.1.6.3. Degradación del PET a escala de biorreactor por PET hidrolasa/depolimerasas	8

1.2. Objetivos	10
1.2.1. Objetivo General	10
1.2.2. Objetivos Específicos.....	10
CAPITULO II.- METODOLOGÍA	11
2.1. Materiales.....	11
2.2. Métodos.....	12
2.2.1. Diseño de un medio de autoinducción para la producción de la enzima PETasa N212A/S238Y.....	12
2.2.2. Producción de la enzima PETasa N212A/S238Y a escala de biorreactor	15
2.2.3. Determinación de la cinética y eficiencia de la degradación de PET comercial a escala de biorreactor	15
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
3.1. Análisis y discusión de los resultados	17
3.1.1 Autoinducción mediante lactosa en el operón lac.....	17
3.1.2 Producción de enzimas PETasa N212A/S238Y a escala de biorreactor	21
3.1.3 Análisis de la degradación del PETc a escala de biorreactor.....	23
3.1.3.1 Ensayos de la actividad enzimática a diferentes temperaturas.....	23
3.1.3.2 Ensayo de despolimerización del PETc en biorreactor Winpac	24
3.1.3.3 Cinética de despolimerización del PET	26
3.1.3.4 Cambios de la microestructura de las muestras de PET durante la degradación enzimática	28
CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	31
4.1 Conclusiones	31
4.2 Recomendaciones	32
MATERIALES DE REFERENCIA	33
Referencias Bibliográficas	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de reactivos, material fungible y equipos que se emplearon.	11
Tabla 2. Composición de los medios de cultivo Luria Bertani (LB) y Terrific Broth (TB).	13
Tabla 3. Buffer de lavado (Tampón A).	14
Tabla 4. Buffer de elución (Tampón B).	14
Tabla 5. Parámetros medidos en la degradación del PETc.	27

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de degradación del PET por IsPETasa.....	6
Figura 2. SDS-PAGE de la enzima PETasa N212A/S238Y inducción con IPTG y lactosa.	19
Figura 3. Purificación de la enzima PETasa N212A/S238Y por autoinducción producida en biorreactor.	22
Figura 4. Actividad de la enzima PETasa N212A/S338Y utilizando p(NP)A como sustrato. ..	24
Figura 5. SDS-PAGE del extracto celular E. coli.	25
Figura 6. Despolimerización del PETc en relación con el cambio del pH (consumo de protones).	27
Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (SEM) del PET.	29
Figura 8. Difracción de rayos X (XRD) del PET.....	30

RESUMEN EJECUTIVO

La producción de plástico en el 2022 alcanzó los 400.3 toneladas métricas, de los cuales solo el 8.9 por ciento fue reciclado, mientras que el restante terminó en el medio ambiente. El 6.2 por ciento de la producción total del plástico le pertenece al PET, el cual representa una fuente de contaminación preocupante debido al bajo nivel de degradación y una vida media superior a 2500 años. Los métodos de reciclajes convencionales (físicos y químicos) provocan una contaminación secundaria, por lo que se ha optado por el reciclaje biológico (biodegradación) a través de enzimas. En este estudio, se evaluó la degradación del polietileno tereftalato (PET) mediante el uso de la enzima IsPETasa N212A S238Y a escala de biorreactor. Tras la producción de la enzima PETasa a escala de biorreactor utilizando suero de leche como medio de autoinducción, se combinó 5 gramos PET comercial (PETc) micronizado con 0.67 micromol de PETasa preparada en 200 mililitros de buffer 100 milimolar KPO₄ pH 8 para el proceso de degradación. Después de 48 horas, se observó una cinética de degradación bifásica. Además, los análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) revelaron hendiduras y bordes agrietados en el polímero. La enzima PETasa N212A S238Y mostró un rendimiento del 2.8 por ciento en la degradación de PET comercial (PETc) a escala de biorreactor. Este estudio sugiere una nueva tecnología para el reciclaje del PET de forma sustentable.

Palabras clave: Biodegradación, enzima PETasa, *Ideonella sakaiensis*, PETc, SEM, autoinducción, degradación bifásica

ABSTRACT

Plastic production in 2022 reached 400.3 metric tons, of which only 8.9 percent was recycled, while the remainder ended up in the environment. PET accounts for 6.2 percent of total plastic production, which represents a source of pollution of concern due to its low level of degradation and a half-life of more than 2 500 years. Conventional recycling methods (physical and chemical) cause secondary contamination, so biological recycling (biodegradation) through enzymes has been chosen. In this study, the degradation of polyethylene terephthalate (PET) using the enzyme IsPETase N212A S238Y was evaluated at bioreactor scale. After production of PETase enzyme at bioreactor scale using whey as autoinduction medium, 5 grams micronized commercial PET (PETc) was combined with 0.67 micromol of PETase prepared in 200 milliliters of 100 millimolar KPO₄ buffer pH 8 for the degradation process. After 48 hours, biphasic degradation kinetics was observed. In addition, scanning electron microscopy (SEM) analyses revealed cleavages and cracked edges in the polymer. The N212A S238Y PETase enzyme PETase showed a 2.8 percent yield in the degradation of commercial PET (PETc) at bioreactor scale. This study suggests a new technology for sustainable PET recycling.

Keywords: Biodegradation, PETase enzyme, *Ideonella sakaiensis*, PETc, SEM, autoinduction, biphasic degradation.

CAPITULO 1.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

Los polímeros sintéticos, conocidos comúnmente como plásticos, son materiales ampliamente utilizados por la sociedad moderna, debido a su elevada durabilidad, maleabilidad e impermeabilidad a líquidos y gases (**UN Environment Programme [UNEP], 2023**). En 2022, la producción mundial de plástico alcanzó los 400.3 Mt, de las cuales se recicló tan solo el 8.9 % (**PlasticsEurope, 2023**). Las proyecciones indican que la fabricación de plásticos podría alcanzar las 30 000 Mt para fines del 2050 (**Aer et al., 2022; Li et al., 2022**), lo que plantea desafíos importantes con miras a reducir su acumulación en el ambiente mediante un reciclaje eficiente. Con el 6.2 % de la producción mundial de plástico, el polietileno tereftalato (PET) es uno de los plásticos más importantes en la industria alimentaria (**PlasticsEurope, 2023**) y uno de los principales contaminantes ambientales debido a su elevada resistencia a la biodegradación (**Kushwaha et al., 2023**). Se estima que aproximadamente 100 000 animales marinos mueren anualmente por ingestión o estrangulamiento causados por residuos del PET (**Greenpeace Internacional, 2020**), y que, incluso, estos residuos podrían afectar a la salud de los seres humanos tras la ingestión de microplásticos impregnados en diferentes productos alimenticios (**UNEP, 2021**).

Actualmente, el PET se recicla principalmente por métodos físicos y químicos; sin embargo, hoy se conoce que los productos de degradación obtenidos mediante estos métodos son contaminantes secundarios (**Kushwaha et al., 2023**). Como resultado, varios estudios sugieren que la degradación biológica, mediada por microorganismos o sus enzimas, es la estrategia más apropiada para reciclar el PET. Recientemente, se identificó que la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* (IsPETasa) posee una elevada capacidad para degradar el PET a temperatura ambiente (**Yoshida et al., 2016**). Se han realizado varios intentos de mejorar la actividad y termoestabilidad de la enzima mediante la introducción de mutaciones dirigidas a lo largo de su secuencia de aminoácidos, incluyendo su sitio activo (**Austin et al., 2018; Han et al., 2017; Joo et al., 2018; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019; Ma et al., 2018**). Particularmente, la variante mutante N212A/S238Y de IsPETasa presenta una mayor capacidad degradadora de PET altamente cristalino, en comparación con la enzima silvestre, incluso a una temperatura de 45 °C (**Gavilanes & García, 2023**). Por lo tanto, esta variante mutante es una excelente candidata para desarrollar estudios de degradación a mayor escala, con miras a predecir su desempeño en sistemas industriales de reciclaje del PET.

Considerando los antecedentes expuestos, en el presente proyecto de investigación se pretende evaluar la eficiencia de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y en la degradación de PET altamente cristalino en un sistema de biorreacción de 500 mL. De esta manera, se intenta contribuir al desarrollo de nuevas tecnologías para el reciclaje del PET de forma sustentable.

1.1.1. Producción mundial del plástico

En 1907, se marca el inicio de la era de los plásticos con la síntesis del primer del polímero sintético. Sin embargo, no fue hasta después de la Segunda Guerra Mundial, en 1950, que se observó un rápido crecimiento de la producción del plástico producto de su industrialización, y desde ese momento, cada año ha aumentado radicalmente su producción (**Yang et al., 2023**). De 1950 al 2022 la producción aumentó de 2 a 400.3 Mt de plástico (**PlasticsEurope, 2023**), y se estima que para el año 2050 la fabricación del plástico alcanzaría los 30 000 Mt. Del total de la producción del plástico el 6.2 % pertenece al polietileno tereftalato (PET) (**PlasticsEurope, 2022, 2023**), un poliéster fabricado por primera vez en 1941.

1.1.2. Contaminación por el plástico

Gran parte de los plásticos están diseñados para un solo uso y una reciclabilidad limitada, lo que ha aumentado la producción y el consumo global, llevando a la generación de plásticos descontrolada y una contaminación plástica invasiva (**Walker & Fequet, 2023**). La mala gestión del plástico no biodegradable ha hecho que sea ubicuo en el medio ambiente, por lo que se considera que se ha entrado a una etapa de la historia llamada plastileno, dentro del Antropoceno (**Rangel-Buitrago & Neal, 2023**). Se conoce que el 79 % de los desechos plásticos terminan en vertederos o en el medio ambiente, el 12 % se incinera y tan solo el 9 % del total de plástico producido y consumido se recicla (**Greenpeace Internacional, 2020**).

La acumulación del plástico en el medio ambiente ha llegado a niveles alarmantes, contaminando cuerpos de agua dulce y salada. En 2016, alrededor de 19 y 23 Mt de desechos plástico fueron depositados en sistemas acuáticos a nivel global, y se proyecta que esta cifra aumente hasta 53 Mt anuales para el 2030 (**Walker & Fequet, 2023**). Esta acumulación ha ocasionado la creación de islas flotantes de plásticos debido a la acción sinérgica de la contaminación antropogénica, las corrientes marinas y los fragmentos o desechos plásticos (**Nisticò, 2020**). Al fraccionarse, del plástico se forman

partículas de microplásticos (<5 mm) y macroplásticos (>5 mm), los cuales representan riesgos potenciales debido a que pueden acumularse en animales marinos, seres humanos y plantas, afectando a la salud humana, ecológica y amenaza la sostenibilidad global.

1.1.3. Polietileno Tereftalato (PET)

El polietileno tereftalato (PET), es un poliéster a base de petróleo producido a partir de la esterificación y policondensación de etilenglicol (EG), ácido tereftálico (TPA), con fórmula química $C_{10}H_8O_4$ (**Kim et al., 2022**). Según el grado de cristalinidad, el PET puede ser amorfo (transparente) o semicristalino (opaco). En su estructura presenta un anillo aromático y moléculas alifáticas cortas que lo convierte en una molécula rígida y con gran estabilidad. El PET cristalino presenta un punto de fusión (T_m) de 255 a 265 °C y una temperatura transición vitrea (T_g) de 67 °C. Por otra parte, la T_g del PET amorfo es ligeramente superior a la del PET cristalino, con un valor de 80 °C. Por lo tanto, la T_g del PET es muy importante para comprender el envejecimiento y la degradación del PET (**Dhaka et al., 2022**), procesos en los que puede ocurrir un incremento en la rigidez y fragmentación en microplásticos y nanoplasticos.

Las excelentes propiedades físicas y mecánicas del PET, como su flexibilidad durante el procesamiento, durabilidad, ligereza, impermeabilidad a líquidos y gases y termoestabilidad lo han posicionado como el cuarto polímero más producido y consumido a nivel mundial (**Han et al., 2024; Oreski et al., 2023**). El PET se ha convertido en parte fundamental de nuestra vida diaria, ya que es empleado en la fabricación del 47 % de las botellas plásticas, 20 % de los envases (bandejas flexibles-fijas) y 33 % del volumen total de fibras textiles (**Eunomia & Zero Waste Europe, 2022**). Su principal consumo es en botellas plásticas, y se conoce que el 42 % del PET producido se recicla, el 38 % va al vertedero y el 20 % se quema (**Dhaka et al., 2022**). La mayoría de sus aplicaciones como material de empaque de alimentos y bebidas hacen que sea un polímero de un solo uso, lo cual aumenta su volumen producción y contribuye a la contaminación ambiental. Se conoce que el PET puede llegar a alcanzar una vida media de más de 500 años en el medio ambiente debido a su elevada resistencia al efecto de agentes bióticos y abióticos (**Kushwaha et al., 2023**). Esto plantea un reto importante que demanda acciones urgentes para encontrar soluciones a la contaminación plástica.

1.1.4. Degradación del PET

1.1.4.1. Degradación convencional del PET

Existen diversos métodos para la despolimerización del PET con el fin de reducir gradualmente su impacto en el medio ambiente. Los enfoques tradicionales o convencionales se basan en el reciclaje mecánico, químico y de recuperación de energía (**Chan & Zinchenko, 2023**), los cuales presentan ciertas limitaciones, como altos costos de procesamiento y contaminación secundaria del suelo y aire (**Aer et al., 2022**).

El reciclaje mecánico involucra el reciclaje primario y secundario, según el tipo de material tratado (**Bhanderi et al., 2023**). El reciclaje primario es un método de reextrusión o reciclaje de circuito cerrado, que utiliza el polímero no contaminado para su reintroducción en productos de similar composición (**Cao et al., 2022**). Por otro lado, el reciclaje secundario tiene como fin recuperar desechos no modificados para la fabricación de nuevos materiales a través de procesos de clasificación, trituración y fusión. Sin embargo, las características físicas y mecánicas del PET se deterioran después de su uso, afectando su calidad (**Chan & Zinchenko, 2023; Cusano et al., 2023**). El reciclado químico o terciario, se basa en la despolimeración o transformación del PET mediante hidrólisis, lo cual produce resinas que sirven como materia prima para sintetizar nuevamente el polímero, logrando alcanzar la calidad del PET virgen (**Bhanderi et al., 2023**). EL reciclaje cuaternario corresponde a la recuperación de energía por combustión de los productos de degradación del PET obtenidos mediante pirólisis o gasificación, debido a que el PET proviene de materias primas derivadas del petróleo (**Cao et al., 2022**). Los procesos antes mencionados generan subproductos peligrosos que deterioran tanto el medio ambiente como la salud de los seres humanos, plantas y animales.

1.1.4.2. Biodegradación del PET

En vista de que los métodos de reciclaje convencionales (mecánicos y químicos) generan subproductos contaminantes, se ha planteado la necesidad de generar métodos para degradar el PET de forma amigable con el medio ambiente. Uno de los enfoques más importantes involucra la utilización de arqueas, bacterias, algas y hongos capaces de producir enzimas que degraden el PET, debido a su eficiencia, bajo consumo de energía, cero emisiones y formación de subproductos no tóxicos (**Kushwaha et al., 2023**). Hasta la fecha existen más de 50 microorganismos plastívoros que han desarrollado enzimas dentro de su estructura para digerir plásticos y utilizarlos como fuente principal

de carbono para su supervivencia. Sin embargo, la biodegradación es un procedimiento multifacético que depende tanto de los factores bióticos (microorganismos) y abióticos (temperatura, pH, nutrientes, etc.), por lo que solo algunas especies han logrado una degradación *in situ*, mientras que otras solo tienen capacidad de degradación en condiciones de laboratorio (Das et al., 2021; Maity et al., 2021).

Se han identificado alrededor de 89 enzimas diferentes capaces de degradar el PET, entre las más destacadas están las lipasas, carboxilesterasas, cutinasas, y PET hidrolasas, aisladas de microorganismos como *Fusarium*, *Saccharomonospora*, *Streptomyces*, *Thermobifida fusca*, *Ideonella sakaiensis*, entre otros organismos (Kushwaha et al., 2023). Estas enzimas pueden dividirse de acuerdo con sus funciones como: i) enzimas modificadoras de superficie: estas se utilizan para mejorar la hidrofiliidad del PET y ii) PET hidrolasas: ayudarán a la hidrólisis de la cadena polimérica de la superficie y el bloque interno del PET (Sui et al., 2023).

1.1.5. PETasa de *Ideonella sakaiensis*

En el 2016, Yoshida y colaboradores aislaron una cepa bacteriana a partir de residuos de una planta de tratamiento de plástico en Japón, la cual fue taxonómicamente clasificada como *Ideonella sakaiensis*. Tras su caracterización, se concluyó que el microorganismo es capaz de utilizar el PET como fuente de carbono principal para su supervivencia. El análisis de su genoma reveló que dos enzimas, PETasa y MEHTasa, son esenciales para la degradación y metabolismo del PET. La PETasa de *Ideonella sakaiensis* (IsPETasa) es una enzima con actividad hidrolítica, con una estructura tridimensional similar a aquella de las cutinasas. IsPETasa muestra una actividad enzimática sobre el PET que es hasta 120 veces mayor en comparación a otras enzimas reportadas, y que opera a temperaturas de entre 30 y 40 °C (Koshti et al., 2018; Shi et al., 2021).

Estudios estructurales han demostrado que IsPETasa posee un pliegue α/β hidrolasa (una lámina β retorcida rodeada por seis α – hélices y nueve cadenas β), con aminoácidos en posiciones estratégicas, como el W156, que se encuentra encima del dominio de unión al sustrato, lo que proporciona flexibilidad y aumenta la eficiencia catalítica en el sitio activo (Graf et al., 2021; Maity et al., 2021). En el sitio activo también se encuentran presentes tres residuos S160-H237-D206 que forman una triada catalítica nucleófilo–His–ácida (Carr et al., 2020). Además, se ha comprobado la presencia de una “caja de lipasa” G-X1-S-X2-G dentro de su dominio catalítico. Este dominio catalítico es visto como un surco largo en forma de L, con aminoácidos que crean un ambiente hidrofóbico, lo que ayuda a estabilizar la interacción enzima – sustrato. IsPETasa tiene un enlace disulfuro adicional, en

comparación a otras cutinasas, que conecta el extremo C-terminal manteniendo unidos ha aminoácidos catalíticos (Ejm. N177 e H242) para estabilizarla. Se cree que este puente de disulfuro es la razón por la que existe alta actividad degradadora del PET y alta flexibilidad del sitio activo de *IsPETasa* a temperatura ambiente (Buhari et al., 2024; Joo et al., 2018).

1.1.5.1. Procesos de degradación del PET

El mecanismo de degradación de PET mediado por *IsPETasa* empieza con la unión de la superficie del PET en el surco ancho y poco profundo de la enzima que consta de dos subsitios (I y II). Cuatro restos de tereftalato de monohidroxietilo (MHET) se unen a los subsitios (1 anillo de tereftalato al subsitio I y 3 al subsitio II) (Figura 1a). Esta unión esta mediada y estabilizada por las interacciones hidrofóbicas, aunque ciertos residuos producen interacciones polares $\pi - \pi$ (Carr et al., 2020). Tras la unión, el residuo S160 provoca una incisión en el enlace éster formando una mella en el PET, liberando así dos cadenas con distintos terminales (TPA e hidroxietilo (HE)) (Figura 1a). Los productos resultantes se digieren en monómeros MHET dependiendo de los terminales de cada molécula. La molécula con terminal TPA, da la formación TPA y $^{\text{He}}\text{PET}_{n-1}$ tras la unión de los restos a los diferentes subsitios, y la molécula con terminal HE se van a unir de la misma manera dando como resultado MHET y $^{\text{He}}\text{PET}_{n-1}$ (Figura 1b). Las posteriores reacciones se dan de manera similar a los procesos anteriormente descritos, generando una acumulación de monómeros y dímeros del PET, obteniéndose eventualmente MHET, TPA, EG y ácido bis (2-hidroxietil) tereftálico (BHET), este último pudiendo degradarse en MHET y EG (Joo et al., 2018; Magalhães et al., 2021).

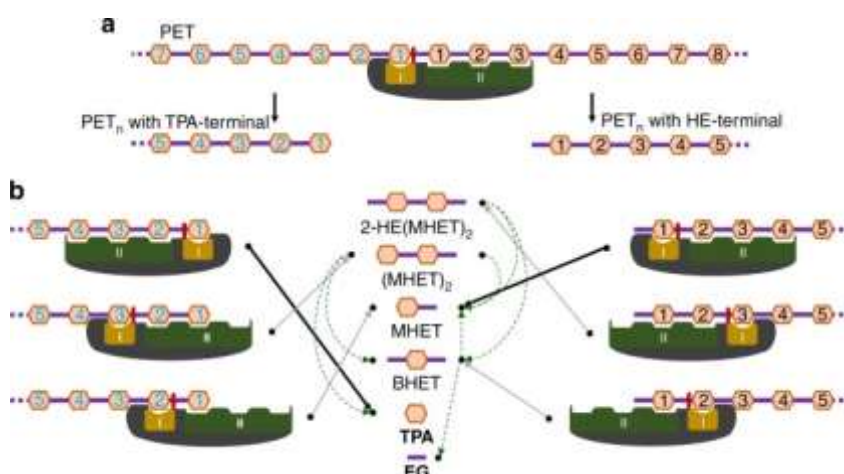


Figura 1. Proceso de degradación del PET por *IsPETasa*.

Nota: a. Formación de mella. La representación de TPA y EG del polímero se encuentra mediante polígonos de color naranja y líneas púrpuras, respectivamente. La enzima PETasa se visualiza a través del diagrama gris oscuro.

Los subsitios I y II de IsPETasa se encuentran correctamente etiquetados color naranja y verde, proporcionalmente. El residuo catalítico S160 se muestra mediante un rectángulo rojo. **b.** Digestión terminal. Cada paso se visualiza como un diagrama. Los productos escindidos de las reacciones enzimáticas se indican con flechas negras. Las líneas de puntos de color verde claro indican el camino que siguen los polímeros del PET para posteriores reacciones. Los productos finales de la degradación se encuentran etiquetados en negrita (MHET, TPA, EG). Adaptado de **Joo et al. (2018)**.

1.1.5.2. Mutantes de la enzima PETasa

La temperatura de transición vitria (T_g) del PET comercial (PET_c) se ubica alrededor de los 60 a 65 °C, temperatura a la que las cadenas del polímero son más flexibles, lo que facilita la interacción enzima-sustrato. Sin embargo, la forma silvestre de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* (IsPETasa^{WT}) es termolábil y sufre un decremento en su actividad a temperaturas superiores a los 37 °C (**Alvina et al., 2022**). Por ello, se han introducido múltiples mutaciones dentro de su cadena de aminoácidos con el fin de mejorar su termoestabilidad. Por ejemplo, con la mutación S238F/W159H se consiguió un aumento en su actividad de 4.13 % en comparación con la variante silvestre (**Austin et al., 2018**), otras mutaciones dirigidas como W159A, W159H, S214H, R61A, L88F, I158F, Y87A, M161A, W185A, I208A, W159A, N241A/R280A y W159H también presentaron resultados similares, aumentando su actividad enzimática (**Han et al., 2017; Joo et al., 2018; Liu et al., 2018; Liu et al., 2019; Ma et al., 2018**). Se conoce que la variante mutante N212A/S238Y de IsPETasa, diseñada y construida por (**Gavilanes & García, 2023**), mostro una mayor degradación del PET altamente cristalino a temperaturas de hasta 45 °C, por lo que es un excelente candidato para el desarrollo de nuevos métodos de degradación del PET a escala piloto.

1.1.6. Degradación de PET comercial a escala de biorreactor

1.1.6.1. Procesos de escalado

Un proceso biotecnológico toma forma dentro de un laboratorio, en donde se pueden producir pequeñas cantidades de un producto, gracias a que en este entorno es factible realizar ensayos miniaturizados de caracterización estructural y funcional. Sin embargo, a esta escala no es posible satisfacer las necesidades locales o globales de la población. Por lo tanto, es necesario evaluar el proceso en sistemas de biorreacción de mayor capacidad. Por ejemplo, a escala de biorreactor, el cual permite determinar las condiciones iniciales de operación y rendimiento que podrían extrapolarse a aplicaciones industriales (**Panda, 2011**). Dentro de las condiciones iniciales de operación del bioproceso a escala de biorreactor, es necesario determinar la velocidad de mezcla, pH del medio, temperatura del reactor, los

cambios en la reología del fluido, entre otros factores. Los cuales permitirán optimizar los costos y el rendimiento de obtención del producto deseado (**Ponnusami & Singh, 2022; Scott & Gazaille, 2019**). Los resultados obtenidos a escala de laboratorio y planta piloto ayudan el escalado de la producción a nivel industrial, adoptando el principio de similitud (**Van Heugten & Vromans, 2018**).

1.1.6.2. Enzimas a escala industrial

I. sakaiensis secreta naturalmente la enzima PETasa para la degradación del PET en su espacio extracelular, debido a que el PET no puede cruzar la bicapa lipídica de los microorganismos gramnegativos. Para la expresión de esta enzima, se han utilizado sistemas recombinantes. Sin embargo, el alto costo de purificación, baja estabilidad, solubilidad y rendimiento representan una gran desventaja para llevar el proceso a una escala mayor a la del laboratorio. Por ello, con el uso del péptido señal N-terminal se han planteado varios enfoques prometedores para llevar la producción de estas enzimas a una escala industrial (**Seo et al., 2019; Zhang et al., 2018**).

Una de ellas se basa en el uso de microorganismos, como *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, o *Yarrowia lipolytica*, como plataformas para la expresión y presentación de las enzimas PETasa al sustrato, mediante sistemas de secreción enzimática al ambiente extracelular (**Chen et al., 2022; Seo et al., 2019; Wei & Weber, 2022**). Por ejemplo, la expresión extracelular de la enzima IsPETasa en *E. coli* ha permitido la secreción constitutiva de la enzima y la continua degradación de PET. Al acoplar este sistema con coexpresión de chaperonas y de fusión de etiquetas N-terminales se ha conseguido aumentar la sobreexpresión de la enzima hasta en 12,5 y 4,6 veces (**Aer et al., 2022**). Por otra parte, la fijación de la enzima IsPETasa en la membrana celular de *P. pastoris* ha permitido incrementar la eficiencia de biodegradación de PET altamente cristalino en 328 veces con respecto a la actividad que muestra la enzima por si sola (**Deng et al., 2023**).

1.1.6.3. Degradación del PET a escala de biorreactor por PET hidrolasa/depolimerasas

Se pueden diferenciar 3 fases importantes en el escalado del proceso de degradación del PET mediante enzimas a escala de biorreactor: pretratamiento de materia prima, despolimerización del PET mediada por enzimas y recuperación de productos y coproductos (**Tournier et al., 2023**). Dentro de ello, la cristalinidad del PET y pretratamiento asociado, son factores decisivos, ya que muchas hidrolasas no actúan de manera eficiente en PET altamente cristalino, que habitualmente es empleado en el material

de empaque. Por lo que es necesario realizar un pretratamiento que cambie la macroestructura del PET y lo lleve a su estado amorfo. Otros parámetros, como la superficie de intercambio (entre menos diámetro tengan las partículas del PET más rápida será la despolimerización), temperatura de despolimerización del PET, temperatura de transición vítrea, de cristalización inducida, termoestabilidad (entre más cerca este de la Tg aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas), ley de Arrhenius, eficiencia catalítica enzimática (para competir con la cinética de cristalización del PET), concentración de sustrato, rendimiento de la despolimerización del PET basado en enzimas, composición de productos finales y expresabilidad enzimática, son factores importantes con el fin de tener un alto rendimiento enzimática y despolimerización del PET (**Arnal et al., 2023; Wei et al., 2022**).

Considerando los factores anteriormente mencionados, **Tournier et al., (2020)** han demostraron que la variante mutante de LCC PETasa expresada en *E. coli* a escala piloto es capaz de despolimerizar el 90 % de PET altamente cristalino en 10 horas. Además, otro estudio muestra una conversión del 98 % del PET después de 24 horas aplicando $1 \text{ mg}_{\text{enzima}} \text{ g}_{\text{PET}}^{-1}$ utilizando la mutación LCC^{ICCG} PETasa a 68 °C (**Arnal et al., 2023**).

Recientemente, se construyó la variante mutante N212A/S238Y de la enzima IsPETasa, la cual muestra una excelente actividad a escala de laboratorio (**Gavilanes & García, 2023**). En este sentido, los autores han resaltado la necesidad de explorar la cinética de degradación del PET a escala de biorreactor con el fin de determinar la factibilidad de emplear la enzima en procesos industriales. Por lo tanto, es necesario investigar la actividad de esta variante mutante en diferentes escalas de tiempo/longitud para una mejor visión del proceso de hidrólisis del PET, para que las enzimas PET hidrolasas puedan lograr sostenibilidad y eficiencia en la despolimerización del PET (**Jayasekara et al., 2023; Wei & Weber, 2022**).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

Evaluar la degradación de polietileno tereftalato (PET) mediante el uso de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y a escala de biorreactor.

1.2.2. Objetivos Específicos

- Diseñar un medio de autoinducción para la producción de la enzima PETasa N212A/S238Y.
- Producir la enzima PETasa N212A/S238Y a escala de biorreactor.
- Determinar la cinética y eficiencia de degradación de polietileno tereftalato (PET) comercial a escala de biorreactor.

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El presente trabajo de titulación fue tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios de investigación UODIDE-ICIA de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. En la **Tabla 1**, se enlistan los reactivos, material fungible y equipos que se utilizaron en la presenta investigación.

Tabla 1. Lista de reactivos, material fungible y equipos que se emplearon.

Reactivos	
- Agua destilada	- Agar – Agar
- Agua desionizada	- Alcohol etílico
- Extracto de levadura	- Glucosa
- Cloruro de sodio (NaCl)	- Tris HCl
- Triptona	- EDTA
- Hidróxido de sodio (NaOH)	- SDS
- Cloranfenicol	- Glicerol
- Imidazol	- Acrilamida
- PET comercial	- Paranitrofenil acetato (p(NP)A)
- Ampicilina	- Agua tipo II
- Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	- Fosfato disódico (Na ₂ HPO ₄)
- Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	- Sulfato de amonio ((NH ₄) ₂ SO ₄)
- Lactosa	- isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido
- Fosfato dipotásico (KPO ₄)	(IPTG)
- Tritón X100	
Líneas celulares	
- <i>E. coli</i> Rosetta (DE3)	
Material fungible	
- Guantes de nitrilo	- Gradillas
- Malla metálica	- Frascos de tapa azul
- Matraz Erlenmeyer	- Probetas
- Micropipetas	- Balones de aforo
- Papel absorbente	- Puntas de micropipetas

Material fungible	
- Papel filtro	- Papel aluminio
- Papel film	- Tubos falcon
- Pipetas	- Hisopos
- Cajas Petri de vidrio	- Mechero
- Espátulas estériles	- Columna Ni – NTA

Equipos	
- Estufa	- Micropipetas (2-20 μ L, 20-200 μ L, 10-100 μ L)
- Centrífuga	- Incubadora
- Refrigerador	- Ultra congelador
- Cámara de flujo laminar	- Autoclave
- Agitador incubador orbital	- FPLC
- Balanza analítica	- Cámara de electroforesis
- Plancha de agitación	- Plancha de calentamiento
- pH metro	- Vortex
- Baño termostático con agitación	- Nanodrop
- Biorreactor Winpac	

2.2. Métodos

2.2.1. Diseño de un medio de autoinducción para la producción de la enzima PETasa N212A/S238Y

2.2.1.1. Formulación de medios

Para el diseño del medio de autoinducción se empleó como referencia el método de **Tournier et al. (2020)**. Para ello, el medio YT se modificó con la adición de distintas concentraciones de lactosa (1 y 2 g/L) y la expresión se evaluó en un volumen de 100 – 500 mL. Según el tratamiento, se obtuvieron diferentes niveles de inducción de la expresión de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y mediante el vector pET21b (+) *IsPETasa_N212A/S238Y* preparado previamente por **Gavilanes & García (2023)**. Se estableció un control positivo que consistió en la expresión de la enzima en ausencia de lactosa y con la adición de IPTG (0.1 mM) (**Gavilanes & García, 2023**).

2.2.1.2. Expresión de la proteína IsPETasa

La expresión de la proteína se desarrolló en base a la metodología propuesta por **Sevilla & Cerda-Mejía (2022)** con modificaciones. Primero, se incubó la variante mutante N212A/S238Y en *E. coli* Rosetta (DE3) en medio agar LB (**Tabla 2**) por 24 h a 37 °C con el fin de obtener colonias aisladas. Después, una colonia se transfirió a 10 mL de caldo LB suplementado con antibióticos (cloranfenicol (34 µg/mL) y ampicilina (100 µg/mL)) y se incubó por 24 h a 37 °C con agitación constante de 200 rpm. Posteriormente, el cultivo se traspasó a un matraz con 50 mL de caldo LB nuevamente suplementado con antibióticos y se incubó en idénticas condiciones por 24 h adicionales. Luego, el medio de cultivo se transfirió a 500 mL de medio YT modificado, suplementado con antibióticos, y se incubó por 24 h con agitación constante de 200 rpm a temperatura ambiente. Se estableció un control positivo que consistió en la expresión de la enzima IsPETasa N212A/S238Y en medio Terrific Broth (TB) (**Tabla 2**) mediante la adición de 0.1 mM IPTG, de acuerdo al protocolo establecido previamente (**Gavilanes & García, 2023**). Pasado el tipo requerido, se centrifugó el cultivo por 10 minutos a 5000 rpm a 4 °C para recuperar las células de *E. coli*. Finalmente, se almacenó la biomasa a -80 °C.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo Luria Bertani (LB) y Terrific Broth (TB).

Reactivo	LB (g/L)	TB (g/L)
Extracto de levadura	5	24
Cloruro de sodio (NaCl)	10	-
Triptona	10	12
Glicerol	-	5.04
KH ₂ PO ₄	-	0.23
K ₂ HPO ₄	-	1.26

Nota: Para preparar medio sólido se agregó 1.5 % de bacto agar. El pH a de los medios LB y TB se ajustó a 7.0 y 7.2, respectivamente, con NaOH 1M. Los componentes del medio se diluyeron en un volumen total de 1 L de agua destilada. Información obtenida de **Sigma-Aldrich (2013)**.

2.2.1.3. Purificación de la enzima PETasa

La purificación de la enzima se realizó mediante el protocolo descrito por **Gavilanes & García, (2023)**. Se agregó 6 mL de buffer de lavado (Tampón A) (**Tabla 3**) por cada gramo de biomasa obtenida y se agitó la mezcla hasta conseguir la completa suspensión de las células. Seguido, se agregó 0.3 % de

tritón X100 y se realizó la lisis celular por sonicación empleando 10 ciclos de 10 s de sonicación constante (frecuencia 40 %) con pausas de 10 s, a 4 °C. Rápidamente, el extracto celular se centrifugó por 10 minutos a 400 rpm y el sobrenadante se clarificó por centrifugación a 21 300 x g por 1 h y a 4 °C.

Tabla 3. *Buffer de lavado (Tampón A).*

Reactivo	Concentración (mM)
Tris base	25
NaCl	150
Imidazol	20

Nota: El pH de la solución se ajustó a $7.5 \pm$ con ácido clorhídrico (HCl) 1 M. Información obtenida de **Sevilla & Cerda-Mejía (2022)**.

Luego, la fracción soluble se cargó a una columna cromatográfica pre-empacada de Ni – NTA (GE, HHealth Care), previamente equilibrada con tampón A, mediante un equipo FPLC ÄKTA Start. Después, las proteínas no unidas a la columna se removieron con 10 volúmenes de columna de solución tampón A. La enzima se liberó de la columna mediante buffer de elución (Tampón B) (**Tabla 4**). La enzima IsPETasa se recolectó en fracciones de 1 mL en tubos eppendorf estériles. Posteriormente, se removió el imidazol mediante cromatografía de filtración en gel empleando una columna PD-10 equilibrada con tampón de almacenamiento (20 M Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl). Para analizar la pureza de las fracciones que contienen la enzima se realizó por SDS-PAGE (**Dermitt & Mardakheh, 2021**).

Tabla 4. *Buffer de elución (Tampón B).*

Reactivo	Concentración (mM)
Tris base	25
NaCl	150
Imidazol	500

Nota: El pH debe permanecer en 7.5 ± 0.2 que puede ser ajustado con ácido clorhídrico (HCl) 1 M. Información obtenida de **Sevilla & Cerda-Mejía (2022)**.

2.2.1. 4. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la prueba de Biuret descrito por **Janairo et al. (2011)**. Para el control, se añadió 40 µL de agua tipo II y 160 µL de reactivo Biuret en un posillo de una placa de Elisa, seguidamente, en otro posillo se agregó 40 µL de la muestra de proteína a 160 µL de reactivo Biuret. Después, se incubaron las soluciones por 10 minutos y se determinó las absorbancias de las muestras a 540 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis. Finalmente, la concentración de proteína se determinó por comparación con una curva estándar empleando distintas concentraciones de albúmina de suero bovino (BSA) obtenida por el método antes descrito.

2.2.2. Producción de la enzima PETasa N212A/S238Y a escala de biorreactor

La metodología del escalado de la producción y purificación de la enzima PETasa N212A/S238Y es la misma que la sección 2.2.1. pero en esta etapa se empleó el medio YT suplementado con la cantidad óptima de lactosa para la expresión de la enzima en *E. coli* Rosetta a un volumen de 5 L empleando un vaso de borosilicato acoplado con 3 impulsores Rushton, sensores de oxígeno, pH y temperatura, y operado por una unidad de control Winpac, modelo FS-02.

2.2.3. Determinación de la cinética y eficiencia de la degradación de PET comercial a escala de biorreactor

2.2.3.1. Evaluación de la actividad enzimática a diferentes temperaturas.

La actividad de IsPETasa N212A/S238Y se determinó a partir de la metodología propuesta por **Yoshida et al. (2021)**. Se utilizó paranitrofenil acetato (p(NP)A) como sustrato modelo y buffer KPO₄ pH 8. Para la preparación del sustrato, se diluyó acetonitrilo (ACN) y p(NP)A hasta alcanzar una concentración de 100 mM. De igual manera, la enzima se diluyó en buffer KPO₄ pH 8 hasta alcanzar una concentración de 250 nM. Se ensayó la actividad de la enzima a temperaturas de 25 a 50 °C, con intervalos de 5 °C. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos, que contuvieron 100 mM de buffer KPO₄ pH 8, 250 nM IsPETasa y 100 mM p(NP)A en un volumen reacción de 250 µL. La hidrólisis del sustrato se determinó mediante espectrofotometría a 540 nm, durante 5 minutos.

2.2.3.2. Ensayo de degradación del PETc

La evaluación de la degradación de PET comercial (PETc) se realizó mediante el método descrito por **Tournier et al. (2020)** con modificaciones. Se combinó 0.67 μmol de proteína purificada preparada en 200 ml de buffer 100 mM KPO_4 pH 8 con 5 g de PETc (pulverizado) en un vaso de borosilicato de 500 mL acoplado a una unidad de control Winpac, modelo FS-02. La temperatura de reacción se reguló mediante un baño termostatzado y una manta de calentamiento. La solución se agitó constantemente a 250 rpm. El pH de la solución se equilibró a 8.0 mediante la adición de una solución de NaOH 6N utilizando el sistema biocontrolador.

2.2.3.3. Cinética de despolimerización

Para seguir la cinética de la despolimerización del PETc se evaluó el cambio de pH con respecto al tiempo correlacionándola con la concentración de protones mediante la ecuación 1 (**Arnal et al., 2023**). El rendimiento final de la despolimerización del PETc se determinó mediante el peso del PETc residual. Posteriormente, se calculó la velocidad de la despolimerización del PETc a partir de la sección lineal del cambio de pH. Seguidamente, se filtró el PETc residual a través de un filtro de 12 μm , y se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó un análisis de la morfología del PET por microscopía electrónica de barrido (SEM) y cristalinidad mediante difracción de rayos X (XRD) (**Sevilla et al., 2023**). El índice de cristalinidad se determinó por el método de **Segal et al. (1959)**, mediante la ecuación 2.

$$[H^+] = 1 \times 10^{-pH} M \quad (1)$$

$$IC\% = \frac{I_{002} - I_{AM}}{I_{AM}} * 100 \quad (2)$$

Donde:

IC %= porcentaje del grado de cristalinidad.

I_{002} = intensidad máxima (en unidades arbitrarias) de la difracción reticular 002.

I_{AM} = intensidad de difracción en las mismas unidades a $2\theta = 18^\circ$.

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Autoinducción mediante lactosa en el operón lac

El promotor lac forma parte de un sistema regulatorio (operón lac) que codifica la maquinaria celular para transportar y metabolizar lactosa mediada por el represor lac (*LacI*). En bacterias como *E. coli*, el operón se expresa en presencia de lactosa y bajos niveles de glucosa (**Pinto et al., 2021**). Este operón posee tres genes estructurales, *LacY* que importa lactosa a la célula, donde *LacZ* quien codifica para una β -galactosidasa que degrada lactosa en glucosa y galactosa. Finalmente, el gen *LacA*, que produce una tiogalactósido transacetilasa de lactosa que facilita el proceso de degradación de la lactosa para utilizarla como fuente de carbono y energía. El mecanismo de regulación del operón lac permite la represión o activación de la transcripción mediante la asociación del represor *LacI* al operador, ubicado aguas abajo con respecto al promotor lac, en ausencia o presencia de lactosa o inductores artificiales, como el IPTG. La lactosa induce la liberación de *LacI* del ADN permitiendo la transcripción (retroalimentación positiva) (**Aggarwal & Narang, 2022; Gatti-Lafranconi et al., 2013; Phillips et al., 2019**). De esta forma, este mecanismo ofrece un sistema de inducción controlada de la transcripción, por lo cual ha sido empleado en la construcción de varios vectores para la expresión de proteínas recombinantes.

El IPTG, al ser un análogo de la lactosa, es el inductor artificial más utilizado para la expresión genética en huésped microbianos. De acuerdo con diferentes estudios el IPTG es transportado hacia el interior de la célula mediante la permeasa de lactosa por difusión pasiva (en pequeñas concentraciones) y entrada independiente sin ayuda del transportador de lactosa (a concentraciones altas) (**Marbach & Bettenbrock, 2012**). Se conoce que el IPTG también puede ingresar por la influencia del transportador de lactosa (**Fernández-Castané et al., 2012**), lo que hace que este compuesto sea menos susceptible a la exclusión por la glucosa y otros azúcares. Este al poseer en su estructura un átomo de azufre, crea un enlace no hidrolizable impidiendo ser metabolizado por la célula lo que asegura que la inducción permanezca constante (**Donovan et al., 1996**). Tras el ingreso al citoplasma, el IPTG se une al dominio aloestérico del represor *LacI*, lo que provoca un cambio conformacional significativo en la estructura de *LacI*. Este cambio reduce la afinidad del represor *LacI* por el operador, facilitando su disociación y permitiendo así que la ARN polimerasa se una al promotor lac iniciando la transcripción de los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*. A partir de ello se produce ARNm que codifica para las enzimas β -galactosidasa, permeasa de lactosa y transacetilasa, codificadas por los genes *lacZ*, *lacY* y *lacA*, respectivamente, y en

caso de establecer un gen de interés clonado bajo el control del operón lac su transcripción también va a iniciar (Simas et al., 2023; Wong et al., 1997).

Su aplicación a escala industrial es limitada debido a los altos costos y la alta concentración necesaria para la expresión. Además, altas concentraciones de IPTG pueden ser tóxicas para el huésped y generar un elevado estrés metabólico, junto a elevadas tasas de traducción que podrían generar agregados proteicos de proteína mal plegada. Por otra parte, una concentración baja puede ser insuficiente para inducir la liberación de LacI, lo cual se traduce en bajos rendimientos de proteína (Mobayed et al., 2021; Zhao et al., 2018).

Desde el estudio presentado por Studier (2005), la autoinducción de proteínas en *E. coli* por lactosa ha ofrecido varias ventajas por sobre el IPTG, debido a que este es un método más eficiente y una forma menos costosa para expresiones de alto rendimiento debido a las desventajas que presenta el IPTG. A diferencia del IPTG la lactosa no puede penetrar en la pared celular por lo que necesita la ayuda de un transporte activo codificada por el gen LacY (Khlebnikov & Keasling, 2002). Una vez dentro es convertida en alolactosa mediante β -galactosidasa (codificada por el gen lacZ), la cual, como se mencionó anteriormente, se une a LacI y activa la transcripción de genes de interés alojados en plásmidos de expresión (Laksmi et al., 2023; Wong et al., 1997). La lactosa es un inductor natural, por lo que puede ser metabolizado por la célula descomponiéndola en glucosa y galactosa para poder ser utilizadas como fuentes de carbono y energía. De esta forma, la expresión de la proteína de interés ocurre a una menor velocidad, disminuyendo la posibilidad de causar estrés metabólico y la formación de agregados proteicos.

Después de los procesos de pre-inóculos e inóculos en medios YT modificados con lactosa, y utilizando la inducción con IPTG como control positivo, se analizó la presencia y concentración de la enzima IsPETasa mediante SDS-PAGE al 10 % (Figura 2). La pureza, calidad y concentración de la proteína se evaluó mediante la intensidad y presencia de bandas en el gel. Se compararon los precipitados (P) y sobrenadantes (S) obtenidos tras la lisis celular, así como las fracciones 4, 5 y 6 resultantes de la purificación de la enzima mediante cromatografía de afinidad (IMAC).

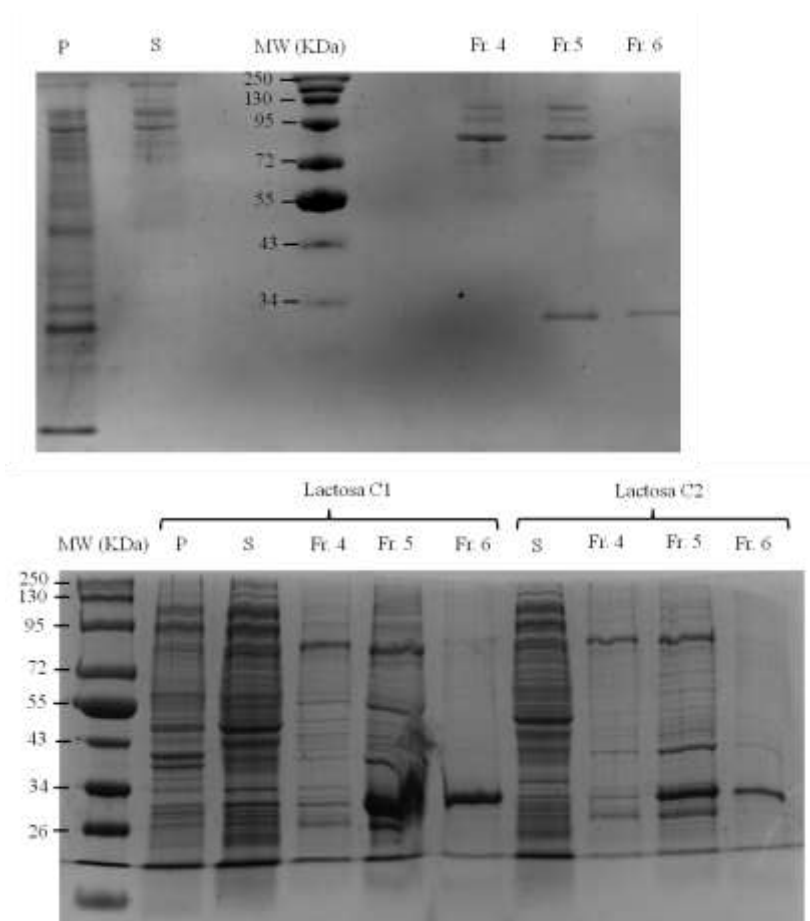


Figura 2. SDS-PAGE de la enzima PETasa N212A/S238Y inducción con IPTG y lactosa.

Nota: (A) Inducción con IPTG 0.1 mM. (B) Inducción con lactosa en medio YT. Análisis SDS-PAGE donde MW representa el marcador de peso molecular, P el precipitado, S el sobrenadante y Fr. 4, 5, y 6 representan las fracciones recolectadas en la purificación de la enzima. Cada muestra (20 μ L) se diluyó en 10 μ L de buffer de caraga 3X, a excepción del marcador de peso molecular y se cargó directamente en cada pocillo. Seguidamente, se visualizó las proteínas tras tinción con azul de Coomassie.

En el precipitado obtenido con IPTG como inductor (**Figura 2A**), se observó una mayor cantidad y diversidad de enzimas en comparación con las obtenidas mediante la inducción con lactosa. Esto se atribuye a que los cultivos inducidos con lactosa pueden producir mayor cantidad de proteína soluble, la cual se encuentran en el sobrenadante (carril S, **Figura 2B**). Además, las proteínas observadas en el precipitado tras la lisis celular podrían provenir de la membrana celular, componentes intracelulares grandes, ribosomas, etc., y la mayoría se encuentran en forma de cuerpos de inclusión y no son activas (**Cho, 2016**). En las fracciones 4 de la inducción con lactosa, se observaron otros tipos de enzimas, pero no la PETasa, al igual que la inducción con IPTG, dado que esta debe tener un peso molecular de 31.31 kDa (**Gavilanes & García, 2023**). Sin embargo, en los carriles de la elución 5 y 6 se observó la presencia de PETasa al comparar la banda de 34 kDa del marcador de peso molecular (carril MW). **De Souza et al. (2021)** investigaron la inducción con lactosa comercial, lactosa suero de leche

desproteínizado e IPTG para la expresión de la enzima α -AI recombinante de *Enterococcus faecium*. Sus resultados revelaron que la expresión enzimática fue dos veces mayor cuando se utilizó suero de leche y lactosa comercial en comparación con el uso de IPTG. Sin embargo, las células mostraron una reacción más lenta a la inducción con lactosa residual de suero de leche. Esto se atribuye a que el suero de leche contiene impurezas y otros nutrientes, lo que impide alcanzar una pureza total de lactosa y afecta a la eficiencia de la inducción.

El análisis de pureza y calidad de la proteína IsPETasa observada mediante SDS-PAGE con IPTG (**Figura 2A**) indicaron un nivel de pureza más bajo en comparación con el análisis SDS-PAGE con lactosa (**Figura 2B**). Esto se debe a que la inducción natural con lactosa permite controlar mejor la expresión de proteínas, a diferencia del IPTG, que, al no ser metabolizable, lleva a una sobreexpresión de la proteína. Esta sobreexpresión promueve la formación de cuerpos de inclusión y evita el plegamiento adecuado de la enzima IsPETasa, reduciendo así el nivel de pureza (**Yuan et al., 2010**). Se ha documentado que los sustratos derivados de la leche contienen micronutrientes, vitaminas, cofactores y osmolitos (betaína y colina) que favorecen la aptitud celular. No obstante, estos osmolitos contrarrestan la formación de cuerpos de inclusión durante la producción recombinante de proteínas (**Zhao et al., 2021**). Por lo tanto, el uso de permeado de suero de queso, suero de leche, permeado de leche, etc., que contienen altos contenidos de lactosa previene la formación de cuerpo de inclusión, lo cual se refleja en la menor cantidad de bandas observadas en el análisis SDS-PAGE.

Los tratamientos de la expresión enzimática a concentraciones distintas de lactosa muestran que con C1 de lactosa se obtuvo una mayor expresión de la proteína en comparación con C2 de acuerdo con el grosor de la banda y al nivel de pureza observados. Esto podría deberse a que a concentraciones mayores de lactosa se produjo una muerte celular y, además, muchas células perdieron el plásmido de expresión (**Studier, 2005**). Resultados similares se observaron en el estudio de **Mobayed et al. (2021)**, quienes utilizaron permeado de suero de queso y obtuvieron una mayor expresión a concentraciones más bajas de sustrato. Ellos sugirieron que una mayor concentración de macrocompuestos de suero de queso, como proteínas y lípidos, podría afectar el metabolismo celular, provocando cambios en la producción de proteínas recombinantes.

3.1.2 Producción de enzimas PETasa N212A/S238Y a escala de biorreactor

La producción de enzimas solubles a escala de biorreactor es un proceso complejo que requiere la optimización de varios factores. Uno de estos factores clave es la composición del medio para la autoinducción, desarrollada previamente en el inicio de este estudio. Basándose en ensayos de expresión realizados en matraces de agitación, se decidió utilizar lactosa a una concentración de C1 para la expresión de la proteína, dado el alto rendimiento observado. La inducción del cultivo se llevó a cabo tras preparar los preinóculos necesarios para el crecimiento bacteriano. Como resultado, la biomasa obtenida en el biorreactor fue diez veces mayor en comparación a la obtenida en los ensayos en matraces de agitación.

La enzima PETasa tiene su extremo C-terminal una cola de histidina, lo que confiere afinidad por los iones metálicos divalentes. Por esta razón, durante su purificación mediante una columna de Ni-NTA, la enzima se une a los iones Ni^{2+} que se encuentran inmovilizados en la matriz por el ligando quelante ácido nitrotriácético (NTA). Este sitio de quelación previene la lixiviación de los iones de níquel, proporcionando así una mejor capacidad de unión y rendimiento (IBA Solutions For Life Sciences, 2021). Es importante destacar que esta fuerte interacción entre la proteína y el ión Ni^{2+} se debe a que el residuo de histidina contiene un anillo de imidazol, el cual actúa como un grupo donante de electrones y facilita la formación de enlaces coordinados con los iones de metales de transición. Durante la elución de la proteína diana, esta interacción se revierte ajustando la concentración de imidazol en el buffer de elución o modificando el pH del mismo (Dutta & Bose, 2022).

En la **Figura 3** se muestra el cromatograma y el análisis SDS-PAGE la proteína purificada del cultivo de biorreactor, realizado 24 horas después de la inducción. El cromatograma (**Figura 4A**) presenta un pico de elución (fecha roja), cuyo tamaño, altura y área bajo la curva están relacionados con la concentración de la proteína presente en la muestra (Roe, 2001). La concentración de la proteína se determinó mediante el método de Biuret, obteniéndose concentración de 2.08, 40.86 y 5.70 mg/mL de las fracciones 4, 5 y 6 respectivamente, siendo la fracción 5 la que presentó la mayor concentración.

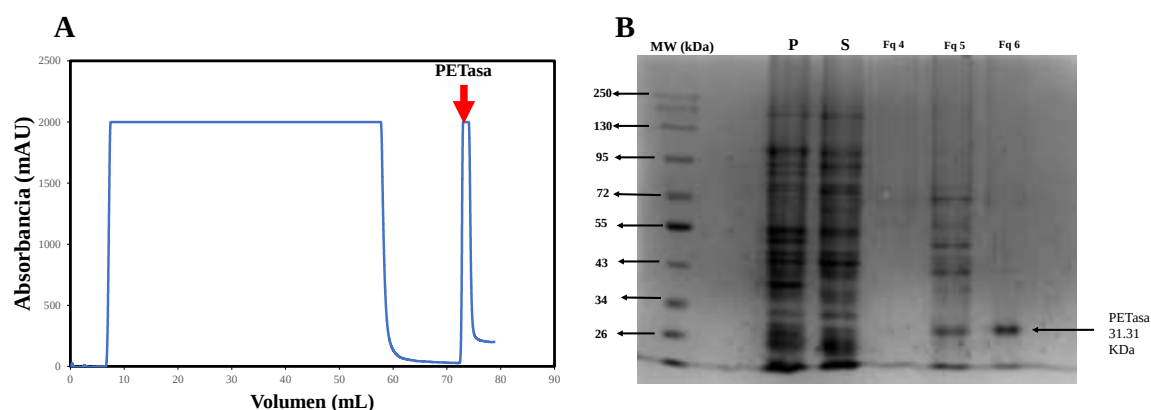


Figura 3. Purificación de la enzima PETasa N212A/S238Y por autoinducción producida en biorreactor.

Nota: (A) Cromatograma de purificación de la enzima PETasa N212A/S238Y, en donde el pico de elución de la PETasa se encuentra marcado con una flecha roja. (B) Análisis SDS-PAGE de purificación de la enzima PETasa producida a escala de biorreactor, donde MW representa el marcador de peso molecular, P el precipitado, S el sobrenadante y Fr 4, 5, y 6 representan las fracciones recolectadas en la purificación de la enzima. Cada muestra (20 μ L) se diluyó en 10 μ L de buffer de caraga 3X, a excepción del marcador de peso molecular y se cargó en cada posillo 15 μ L de muestra en el gel 10 % SDS-PAGE. Seguidamente, se visualizó las proteínas tras el tratamiento con azul de Coomassie.

Tras el análisis visual SDS-PAGE (**Figura 3B**) de la purificación de la proteína IsPETasa, se observa que existen concentraciones similares de enzimas tanto en el precipitado (P) como en el sobrenadante (S). Se obtuvo una menor cantidad de proteínas solubles en comparación con los matraces de agitación, a pesar de haber utilizado un medio de inducción con la misma composición en ambos cultivos. Esta diferencia de producción podría estar relacionada con los cambios en el grado de aireación, que pueden influenciar en la producción de proteínas a escala de biorreactor (**Tahara et al., 2021**).

Además, **de Andrade et al. (2019)** señalaron que la temperatura también podría ser un factor determinante, ya que a temperaturas inferiores a 37 °C se puede reducir la absorción de nutrientes y la tasa de crecimiento, disminuyendo la formación de subproductos tóxicos y la generación de calor metálico. También, **Krause et al. (2010)** informaron previamente sobre la producción de proteínas solubles utilizando un sistema de cultivo en lotes alimentados, logrando una producción de 6,7 mg de proteína pura por litro. En su estudio, la temperatura fue un factor crítico: aunque obtuvieron proteínas de alto rendimiento a 37 °C, optaron por una temperatura de 30 °C para mejorar la solubilidad de oxígeno y reducir la evaporización.

A pesar de estos factores, se obtuvo una alta concentración de proteína soluble en las fracciones recolectadas, posiblemente debido al prolongado período de síntesis de proteínas (24 h) en condiciones favorables.

3.1.3 Análisis de la degradación del PETc a escala de biorreactor

3.1.3.1 Ensayos de la actividad enzimática a diferentes temperaturas

La PETasa es una enzima con la capacidad de catalizar la hidrólisis de enlaces éster, similar a las esterasas y lipasas. Debido a esto, es posible utilizar la hidrólisis de diferentes compuestos ésteres para llevar a cabo un cribado de alto rendimiento de la variante de la enzima **(Wang et al., 2024)**. En este estudio, se empleó un ensayo colorimétrico con éster p(NP)A para evaluar a la temperatura óptima de actividad de la PETasa. Al utilizar p(NP)A, se evita la lenta descomposición del PETc, logrando así resultados rápidos y eficaces para el cribado y la caracterización de la variante de la enzima a las diferentes temperaturas evaluadas.

Como se puede observar en el histograma **(Figura 4)**, la PETasa mostró una actividad óptima a 30 °C, con una absorbancia máxima de 0.4. Esta absorbancia se correlaciona con la cantidad de p-NP liberado, reflejando una alta actividad hidrolítica de la enzima. Al evaluar la actividad a temperaturas más altas (35, 40, 45 y 50 °C), se observó un rápido descenso en la actividad enzimática, lo que puede indicar una posible inactivación térmica (desnaturalización) de la IsPETasa, o que al aumentar la temperatura se aceleró la tasa catalítica reduciendo su rendimiento **(Meng et al., 2021)**. Además, es importante considerar que a temperaturas cercanas a la T_g del PET (>70 °C) puede ocurrir una rápida recristalización del PET, lo cual es perjudicial **(Tournier et al., 2020)**.

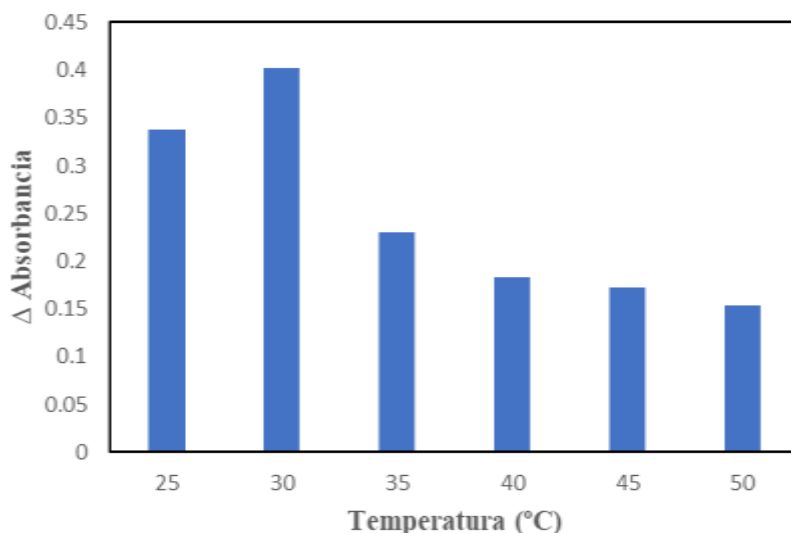


Figura 4: Actividad de la enzima PETasa N212A/S338Y utilizando p(NP)A como sustrato.

Nota. Histograma del efecto de la temperatura sobre la actividad de la enzima PETasa. La actividad enzimática se representa en relación con el valor máximo de absorbancia.

Sin embargo, en estudios como el de **Wang et al. (2024)** reportan una alta actividad a 50 °C con la enzima mutante *IsPETasa*, denominada HotPETasa (HP). Esta diferencia se debe principalmente a los sitios de mutaciones en su cadena de aminoácidos. No obstante, también podría ser que, a temperaturas cercanas a la Tg del PET en solución acuosa, la enzima puede acceder a la fracción amorfa móvil del polímero PET. Esta acción convierte el PET en productos solubles, lo que resulta en un aumento de la actividad enzimática (**Pirillo et al., 2023**).

3.1.3.2 Ensayo de despolimerización del PETc en biorreactor Winpac

La PETasa se caracteriza por tener una hendidura poco profunda y larga en forma de L con una superficie hidrofóbica en su estructura. Este sitio activo es más amplio en comparación a otras cutinas, lo que facilita una mejor interacción del sustrato (PETc) con la enzima, otorgándole una excelente capacidad para hidrolizarlo. Además, presenta una mayor flexibilidad controlada por el enlace disulfuro 2, lo que mejora la interacción enzima-sustrato (**Han et al., 2017**).

Para el proceso de degradación del PETc a escala de biorreactor, se combinó 0.69 μmol de enzima *IsPETasa* N212A/S238Y purificada con 230 mL de buffer 100 mM KPO₄ pH 8 y 20 g de PET micronizado en un vaso de borosilicato de 500 mL, operado por el sistema de control Winpac. Durante

el proceso de degradación, la enzima sufrió de precipitación, impidiendo alcanzar resultados favorables. Aun así, se recolectó el PET al finalizar el proceso y se midió el rendimiento mediante peso seco; sin embargo, se obtuvo un peso de 20.68 g. Este resultado confirmó que no existió actividad de la enzima y que lo recolectado, además del PET, fue el precipitado de la enzima, incrementando el peso.

Para evitar problemas de precipitación, se decidió realizar la despolimerización del PETc utilizando la enzima no purificada. Tras su expresión, se llevó a cabo una lisis celular para romper las membranas celulares de *E. coli*. Luego, mediante centrifugación se logró separar el precipitado del sobrenadante, utilizándose este último en los ensayos, ya que este contenía la mayor cantidad de proteínas solubles (PETasa). Mediante el análisis SDS-PAGE (**Figura 6**), se pudo comprobar la presencia de IsPETasa (cuadro rojo), la cual se encontraba en concentración de 0.67 μmol , determinada a través de la prueba de Biuret y el software ImageJ.

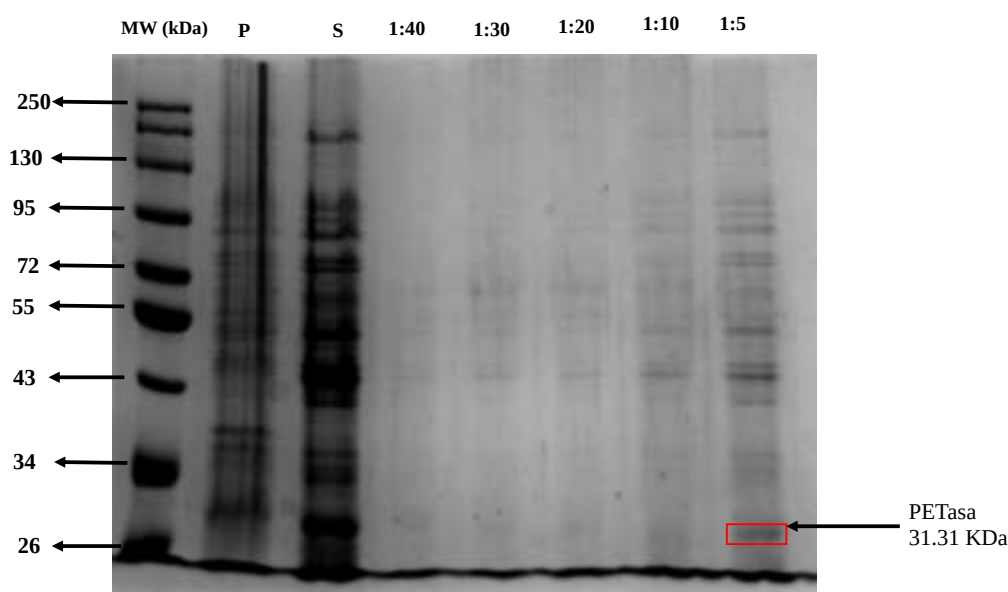


Figura 5. SDS-PAGE del extracto celular *E. coli*.

Nota: Análisis SDS-PAGE donde MW representa el marcador de peso molecular, P el precipitado, S el sobrenadante y 1:40, 1:30, 1:20, 1:10 y 1:5 representan las diferentes diluciones realizadas para encontrar la enzima. Cada muestra (20 μL) se diluyó en 10 μL de buffer de caraga 3X, a excepción del marcador de peso molecular y se cargó en cada posillo 15 μL de muestra en el gel 10 % SDS-PAGE. Seguidamente, se visualizó las proteínas tras el tratamiento con azul de Coomassie.

Al igual que el primer ensayo de degradación, se mezcló 200 ml de buffer 100 mM KPO_4 pH 8, 0.67 μmol de PETasa y 5 g de PETc micronizado en un vaso de borosilicato de 500 ml, manteniendo una

agitación constante de 200 rpm. De acuerdo con los ensayos de temperatura, la enzima alcanza una actividad específica a 30 °C, sin embargo, para no tener problemas de degradación dentro del biorreactor, la temperatura se mantuvo a 25 °C aproximadamente. Después de 48 horas, la enzima al alcanzar su rendimiento final y al no existir cambio en el pH (estabilización), el proceso se detuvo. Para comprobar si la degradación de PET tuvo éxito, se midió el rendimiento de despolimerización a través de la cinética de despolimerización por la disminución del pH, variación de peso seco y análisis de SEM y XRD.

3.1.3.3 Cinética de despolimerización del PET

El curso temporal de la degradación enzimática fue de 48 h, y se muestra en la **Figura 6**, basado en la evolución de la concentración de protones (H^+). En esta progresión se identifican dos fases distintas. En la primera fase (0-16 horas) (**Figura 6B**) se observa una reacción lenta, con velocidad inicial (V_o) de 0.018 nM [H]/min y una actividad específica (SA) de 1.709×10^{-7} μmol [H]/min (**Tabla 5**). Esto sugiere que la enzima empezó a interactuar con el PET y permaneció en un proceso de estabilización y activación con el buffer. Según **Pfaff et al. (2022)** en la etapa inicial, la enzima busca mantener una correlación positiva con el buffer. En la segunda fase (23-26 horas) (**Figura 6C**), se observa un aumento mucho más pronunciado en la concentración de H^+ , con una velocidad de despolimerización que aumenta considerablemente hasta 0.217 nM [H]/min y una actividad específica de 2.06345×10^{-6} μmol [H]/min. Este incremento puede estar asociado a que los productos intermedios catalíticos actúan como catalizadores (**Schubert et al., 2024**) o la enzima encontró una superficie disponible más grande para actuar (**Ronkvist et al., 2009**).

Estas dos fases conformaron una cinética de despolimerización bifásica. La posible causa de esta bifasicidad puede deberse, a la falta de purificación de la enzima, ya que solo se rompió la membrana celular de *E. coli*. Esto pudo haber provocado que la enzima no se plegue completamente o se precipite dentro de la célula, resultando una despolimerización lenta. Probablemente, después de un cierto tiempo de incubación y agitación, la enzima adoptó una forma activa funcional, continuando la despolimerización en lo que se considera una segunda fase.

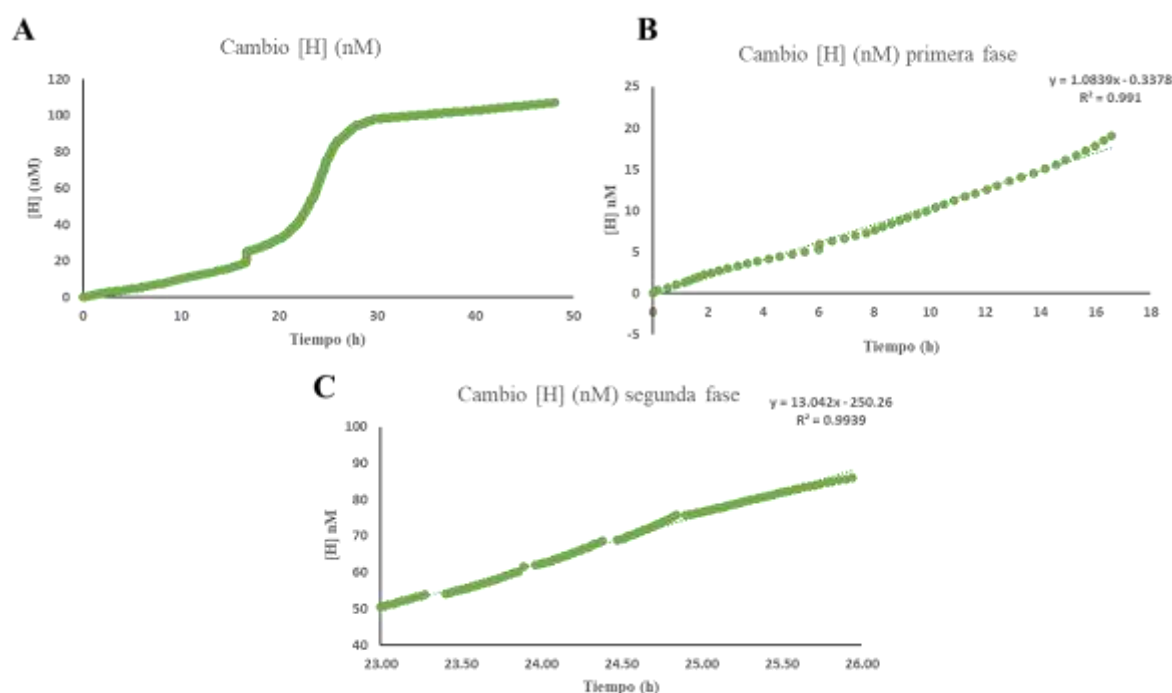


Figura 6. Despolimerización del PETc en relación con el cambio del pH (consumo de protones).

Nota: (A) Cinética de despolimerización general en relación con el cambio en (H⁺) a lo largo del tiempo. (B) Primera fase de degradación del PET en relación con el cambio de (H⁺). (C) Segunda fase de degradación del PET en relación en relación con el cambio de (H⁺).

Se encontró un cambio sustancial en el peso del PET tratado al finalizar el proceso de despolimerización, ya que de un peso inicial de 5 g de PET se obtuvo un peso final de 4.86 g. Este proceso de hidrólisis del PET es considerado endotipo (**Eberl et al., 2009**) debido a que se espera la disminución de peso. **Kawai et al. (2022)** en su estudio sugiere que la hidrólisis del PET ocurre en capas y que al aumentar el área superficial se promueve aún más la degradación enzimática. Una de las formas de aumentar el área superficial fue micronizar el polímero, esto causa un desorden local de las cadenas poliméricas. Con este proceso, se consiguió un 2.8 % de degradación (**Tabla 5**), esto sugiere que el calor de fricción generado durante el proceso de micronizado del PET debe haber causado un envejecimiento físico en la superficie (**Wei et al., 2019**). Para evitar este problema, **Kawai et al., (2022)** sugiere realizar una pre congelación.

Tabla 5. Parámetros medidos en la degradación del PETc.

Parámetros	Cantidad
[E] (g/L)	0.383
V enzima (L)	0.055

Parámetros	Cantidad
V reactor (L)	0.2
[E] reactor (μM)	3.364
[E] reactor (μmol)	0.673
PET inicial (g)	5
PET final (g)	4.86
mg E/g PET (g)	4.213
% degradación	2.8
Vo fase 1 (nM [H]/min)	0.018
Vo fase 2 (nM [H]/min)	0.217
SA fase 1 (μM [H]/min)	1.709E-07
SA fase 2 (μM [H]/min)	2.06345E-06
Temp. promedio ($^{\circ}\text{C}$)	23.8

Nota: Donde [E] representa la concentración de la enzima, (V) el volumen de la enzima y el volumen del reactor, mg E/g PET la actividad enzimática, Vo las velocidades iniciales en las distintas fases de reacción, SA la actividad específica en cada fase y finalmente Temp. promedio indica la temperatura en la que actuó la enzima.

3.1.3.4 Cambios de la microestructura de las muestras de PET durante la degradación enzimática

3.1.3.4.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Para comprobar el resultado de la degradación del PET a nivel cualitativo, se realizaron micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) de las muestras de PET tratado y PET no tratado tras el proceso de despolimerización con la mutación *IsPETasa* N212A/S238Y. Este análisis permite observar a una escala nanométrica el tamaño y forma de partícula, la mecánica de fracturas y dispersión de la matriz polimérica (Guise et al., 2011).

En la micrografía del PET no tratado (**Figura 7A**), se observa un polímero bastante uniforme con bordes lisos. Sin embargo, la muestra sometida a la enzima *PETasa* (**Figura 7B**) presenta daños significativos en la superficie. Esta micrografía muestra numerosas hendiduras con bordes agrietados, lo que sugiere que la enzima actúa principalmente en las áreas más expuestas. Las micrografías también revelan la heterogeneidad espacial del tratamiento enzimático, evidenciada por la presencia de áreas no afectadas como degradadas después de 48 horas de tratamiento. El tiempo de exposición al tratamiento enzimático es un factor crucial, ya que estudios previos, como en el estudio de Kim et al. (2020) han demostrado

que el tratamiento del PET suele requerir varios días de incubación. En dicho estudio, las películas de PET fueron incubadas durante 4 semanas, mostrando solo cambios ligeros. Las micrografías obtenidas por estos autores indican la ausencia de grietas visibles, aunque aún se pueden observar numerosas depresiones y cavidades muy pequeñas a un aumento de 2 μm .

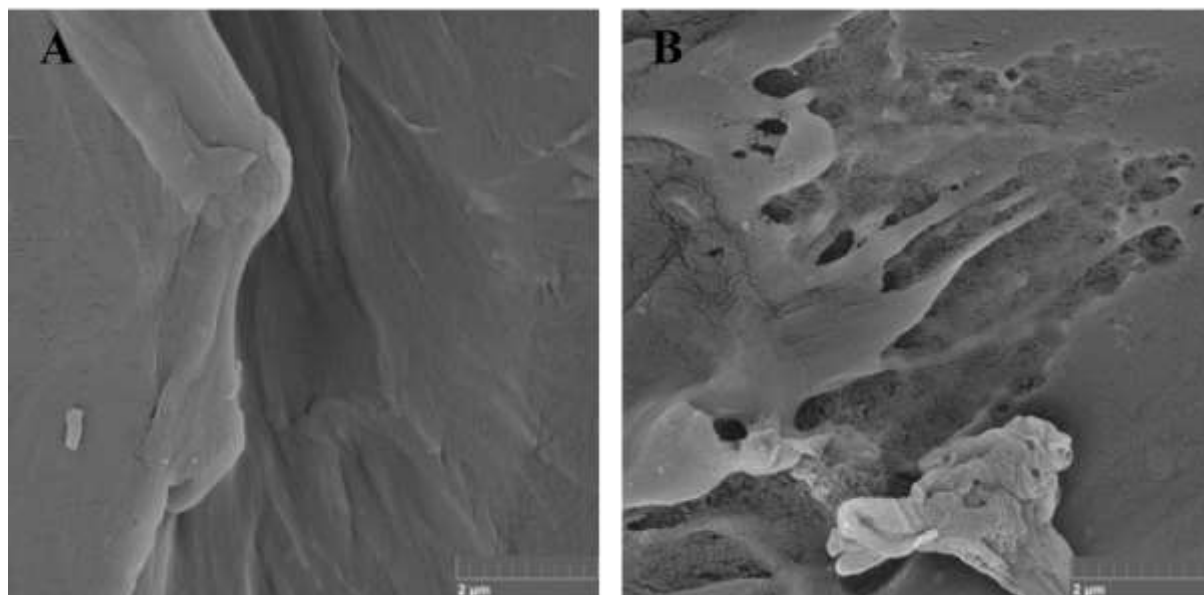


Figura 7: Microscopía electrónica de barrido (SEM) del PET.

Nota. Análisis de la despolimerización del PET en biorreactor mediante SEM. (A) PET tratado. (B) PET no tratado. Visión general con un aumento de 2 μm .

3.1.3.4.2 Difracción de rayos X (XRD)

A pesar de que el aumento de la superficie es crucial para mejorar la degradación del polímero, su efecto en la hidrólisis es menor en comparación con la cristalinidad. Esto se debe a que a una menor cristalinidad incrementa el movimiento de las cadenas poliméricas y la accesibilidad de la enzima al sustrato (**Puspitasari et al., 2021**). Además, la cristalinidad está estrechamente relacionada con la hidrólisis enzimática (**Bai et al., 2018**). Los patrones XRD (**Figura 8**) muestran una disminución de la cristalinidad (aprox. 8 %) después de la degradación enzimática, la cual fue de 50 % para el PET no tratado y 42 % para el PET tratado. Al comparar la intensidad de la difracción de ambas muestras se puede observar que el PET no tratado muestra una marcada reducción en el rango de los 17 a 22° en 2 θ (flechas azules en la **Figura 8**). La diferencia en el área es muy pequeña; esto puede deberse a que la cristalinidad del PETc fue alta, lo que resultó en una degradación lenta con la enzima IsPETasa N212A/S238Y. Sin embargo, la fracción cristalina del PET fue susceptible a los ataques enzimáticos.

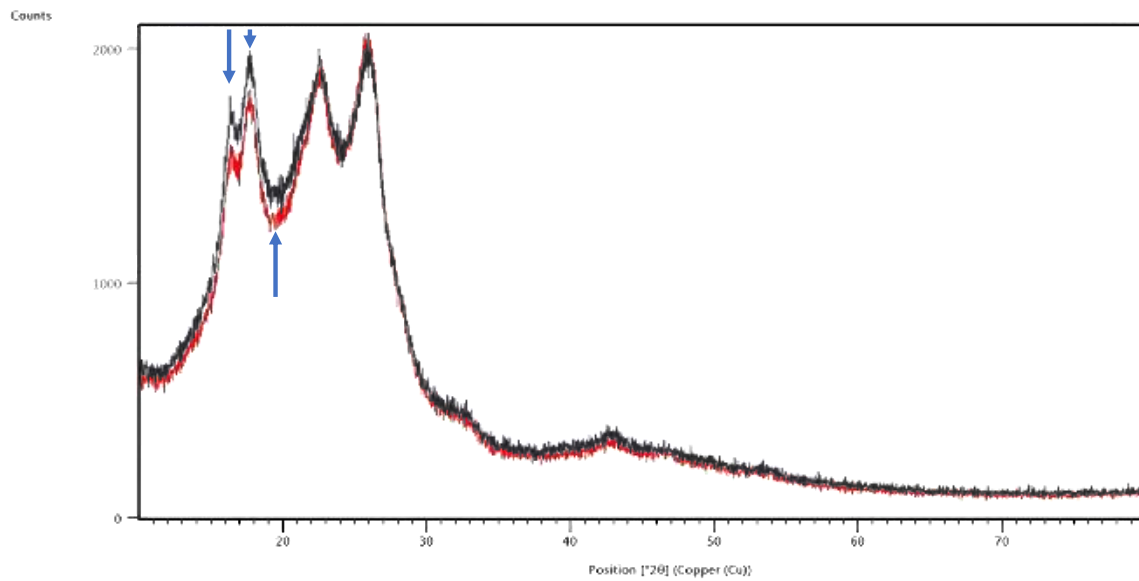


Figura 8: Difracción de rayos X (XRD) del PET.

Nota. Superposiciones de gráficas del análisis del grado de cristalinidad del PET. Donde, la gráfica de color negro indica la cristalinidad del PET no tratado y la gráfica de color rojo evidencia la cristalinidad del PET tratado.

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se diseñó un medio de autoinducción para la expresión de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y utilizando una combinación de medio YT y lactosa. Este método mostró una mayor eficiencia de expresión y pureza en comparación con el uso de IPTG. Sin embargo, se observó que a mayor concentración de lactosa afectada negativamente la expresión de la enzima.
- Se logró producir altos rendimiento de la enzima *IsPETasa* N212A/S238Y a escala de biorreactor utilizando *E. coli* como organismos huésped. Tras el proceso de purificación, se obtuvieron concentraciones de 2.08, 40.86 y 5.70 mg/mL en las fracciones 4, 5 y 6 respectivamente.
- Se identificó una cinética bifásica en la despolimerización del PET utilizando la enzima *IsPETasa* mutante N212A/S238Y, debido a que se evidenció dos fases distintas de despolimerización. Durante la primera fase, la despolimerización alcanzó una velocidad inicial de 0.018 U /mg_{enzima} y una actividad específica de 1.709×10^{-7} $\mu\text{mol [H]}/\text{min}$. Sin embargo, en la segunda fase, la despolimerización aumentó considerablemente alcanzando una velocidad de 0.217 U/mg_{enzima} con una actividad específica de 2.06345×10^{-6} $\mu\text{mol [H]}/\text{min}$.
- La consiguió una degradación del 2.8 % del PET a escala de biorreactor. Considerando que la enzima no fue purificada, la cinética de despolimerización mostró un rendimiento significativamente alto. Además, las micrografías revelan hendiduras en la superficie y bordes agrietados. Las gráficas del análisis XRD evidencian la degradación del PET, ya que muestran una disminución de intensidad del pico de difracción.

4.2 Recomendaciones

- Se recomienda precongelar el polímero previo al proceso de micronizado, con el fin de no provocar un envejecimiento físico en la superficie debido al calor de fricción generado.
- Utilizar una menor cantidad de PET y una mayor concentración de la enzima PETasa para los ensayos de degradación con el fin evitar precipitaciones de la enzima y aumentar la eficiencia de la misma.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Aer, L., Jiang, Q., Gul, I., Qi, Z., Feng, J., & Tang, L. (2022). Overexpression and kinetic analysis of *Ideonella sakaiensis* PETase for polyethylene terephthalate (PET) degradation. *Environmental Research*, 212. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113472>
- Aggarwal, R. K., & Narang, A. (2022). Positive feedback exists and drives the glucose-mediated repression in *Escherichia coli*. *Biophysical Journal*, 121(5). <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2022.01.017>
- Alvina, M. J., Wei, J., & Sun, F. (2022). PETase gets hot. In *Chem Catalysis* (Vol. 2, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.09.033>
- Arnal, G., Anglade, J., Gavalda, S., Tournier, V., Chabot, N., Bornscheuer, U. T., Weber, G., & Marty, A. (2023). Assessment of Four Engineered PET Degrading Enzymes Considering Large-Scale Industrial Applications. *ACS Catalysis*, 13, 13156–13166. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.3C02922/ASSET/IMAGES/LARGE/CS3C02922_0002.JPEG
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. El, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Lee Woodcock, H., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115>
- Bai, Z., Liu, Y., Su, T., & Wang, Z. (2018). Effect of hydroxyl monomers on the Enzymatic degradation of poly(ethylene succinate), poly(butylene succinate), and poly(hexylene succinate). *Polymers*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/polym10010090>
- Bhandari, K. K., Joshi, J. R., & Patel, J. V. (2023). Recycling of polyethylene terephthalate (PET Or PETE) plastics – An alternative to obtain value added products: A review. In *Journal of the Indian Chemical Society* (Vol. 100, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100843>
- Buhari, S. B., Nezhad, N. G., Normi, Y. M., Shariff, F. M., & Leow, T. C. (2024). Insight on recently discovered PET polyester-degrading enzymes, thermostability and activity analyses. *3 Biotech*, 14(1), 1–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13205-023-03882-8>

- Cao, F., Wang, L., Zheng, R., Guo, L., Chen, Y., & Qian, X. (2022). Research and progress of chemical depolymerization of waste PET and high-value application of its depolymerization products. In *RSC Advances* (Vol. 12, Issue 49). <https://doi.org/10.1039/d2ra06499e>
- Carr, C. M., Clarke, D. J., & Dobson, A. D. W. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571265>
- Chan, K., & Zinchenko, A. (2023). Design and synthesis of functional materials by chemical recycling of waste polyethylene terephthalate (PET): Opportunities and challenges. *Journal of Cleaner Production*, 139828. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2023.139828>
- Chen, Z., Duan, R., Xiao, Y., Wei, Y., Zhang, H., Sun, X., Wang, S., Cheng, Y., Wang, X., Tong, S., Yao, Y., Zhu, C., Yang, H., Wang, Y., & Wang, Z. (2022). Biodegradation of highly crystallized poly(ethylene terephthalate) through cell surface codisplay of bacterial PETase and hydrophobin. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34908-z>
- Cho, W. (2016, June 17). *PETase (PET-degrading enzyme, origin I. sakaiensis)*. https://parts.igem.org/Part:BBa_K2010000
- Cusano, I., Campagnolo, L., Aurilia, M., Costanzo, S., & Grizzuti, N. (2023). Rheology of Recycled PET. In *Materials* (Vol. 16, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/ma16093358>
- Das, S. K., Eshkalak, S. K., Chinnappan, A., Ghosh, R., Jayathilaka, W. A. D. M., Baskar, C., & Ramakrishna, S. (2021). Plastic Recycling of Polyethylene Terephthalate (PET) and Polyhydroxybutyrate (PHB)—a Comprehensive Review. *Materials Circular Economy*, 3(1). <https://doi.org/10.1007/s42824-021-00025-3>
- de Andrade, B. C., Migliavacca, V. F., Okano, F. Y., Grafulin, V. Y., Lunardi, J., Roth, G., de Souza, C. F. V., Santos, D. S., Chies, J. M., Renard, G., & Volpato, G. (2019). Production of recombinant β -galactosidase in bioreactors by fed-batch culture using DO-stat and linear control. *Biocatalysis and Biotransformation*, 37(1). <https://doi.org/10.1080/10242422.2018.1493105>
- de Souza, T. C., Oliveira, R. C., Bezerra, S. G. S., Manzo, R. M., Mammarella, E. J., Hissa, D. C., & Gonçalves, L. R. B. (2021). Alternative Heterologous Expression of l-Arabinose Isomerase from *Enterococcus faecium* DBFIQ E36 By Residual Whey Lactose Induction. *Molecular Biotechnology*, 63(4). <https://doi.org/10.1007/s12033-021-00301-2>
- Deng, B., Yue, Y., Yang, J., Yang, M., Xing, Q., Peng, H., Wang, F., Li, M., Ma, L., & Zhai, C. (2023). Improving the activity and thermostability of PETase from *Ideonella sakaiensis* through modulating its post-translational glycan modification. *Communications Biology*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04413-0>

- Dermitt, M., & Mardakheh, F. K. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, 2(2). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100462>
- Dhaka, V., Singh, S., Anil, A. G., Sunil Kumar Naik, T. S., Garg, S., Samuel, J., Kumar, M., Ramamurthy, P. C., & Singh, J. (2022). Occurrence, toxicity and remediation of polyethylene terephthalate plastics. A review. In *Environmental Chemistry Letters* (Vol. 20, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01384-8>
- Donovan, R. S., Robinson, C. W., & Click, B. R. (1996). Review: Optimizing inducer and culture conditions for expression of foreign proteins under the control of the lac promoter. In *Journal of Industrial Microbiology* (Vol. 16, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/BF01569997>
- Dutta, S., & Bose, K. (2022). Protein Purification by Affinity Chromatography. In *Textbook on Cloning, Expression and Purification of Recombinant Proteins*. https://doi.org/10.1007/978-981-16-4987-5_6
- Eberl, A., Heumann, S., Brückner, T., Araujo, R., Cavaco-Paulo, A., Kaufmann, F., Kroutil, W., & Guebitz, G. M. (2009). Enzymatic surface hydrolysis of poly(ethylene terephthalate) and bis(benzoyloxyethyl) terephthalate by lipase and cutinase in the presence of surface active molecules. *Journal of Biotechnology*, 143(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2009.07.008>
- Eunomia, & Zero Waste Europe. (2022). *How Circular is PET?* <https://zerowasteurope.eu/library/how-circular-is-pet/>
- Fernández-Castané, A., Vine, C. E., Caminal, G., & López-Santín, J. (2012). Evidencing the role of lactose permease in IPTG uptake by *Escherichia coli* in fed-batch high cell density cultures. *Journal of Biotechnology*, 157(3). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.12.007>
- Gatti-Lafranconi, P., Dijkman, W. P., Devenish, S. R. A., & Hollfelder, F. (2013). A single mutation in the core domain of the lac repressor reduces leakiness. *Microbial Cell Factories*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-67>
- Gavilanes, S., & García, M. (2023). *Construcción de las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*. [Tesis de ingeniería no publicada]. Universidad Técnica de Ambato.
- Graf, L. G., Michels, E. A. P., Yew, Y., Liu, W., Palm, G. J., & Weber, G. (2021). Structural analysis of PET-degrading enzymes PETase and MHETase from *Ideonella sakaiensis*. *Methods in Enzymology*, 648, 337–356. <https://doi.org/10.1016/BS.MIE.2020.12.015>

- Greenpeace Internacional. (2020). ¿Cómo Llega El Plástico a Los Océanos Y Qué Sucede Entonces? In *Greenpeace Internacional*, (pp. 4–8). <https://es.greenpeace.org/es/trabajamos-en/consumismo/plasticos/como-llega-el-plastico-a-los-oceanos-y-que-sucede-entonces/>
- Guisse, O., Strom, C., & Preschilla, N. (2011). STEM-in-SEM method for morphology analysis of polymer systems. *Polymer*, 52(5), 1278–1285. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2011.01.030>
- Han, W., Zhang, J., Chen, Q., Xie, Y., Zhang, M., Qu, J., Tan, Y., Diao, Y., Wang, Y., & Zhang, Y. (2024). Biodegradation of poly(ethylene terephthalate) through PETase surface-display: From function to structure. *Journal of Hazardous Materials*, 461, 132632. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2023.132632>
- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- IBA Solutions For Life Sciences. (2021). *Expression and purification of proteins using 6xHistidine-tag*.
- Janairo, G., Sy, L., Leonisa, Y., Nancy, L.-L., & Robles, J. (2011). Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Bio. *E-Journal of Science & Technology*, 6(5).
- Jayasekara, S. K., Joni, H. D., Jayantha, B., Dissanayake, L., Mandrell, C., Sinharage, M. M. S., Molitor, R., Jayasekara, T., Sivakumar, P., & Jayakody, L. N. (2023). Trends in in-silico guided engineering of efficient polyethylene terephthalate (PET) hydrolyzing enzymes to enable bio-recycling and upcycling of PET. In *Computational and Structural Biotechnology Journal* (Vol. 21). <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.06.004>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Kawai, F., Furushima, Y., Mochizuki, N., Muraki, N., Yamashita, M., Iida, A., Mamoto, R., Tosha, T., Iizuka, R., & Kitajima, S. (2022). Efficient depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and polyethylene furanoate by engineered PET hydrolase Cut190. *AMB Express*, 12(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-022-01474-y>
- Khlebnikov, A., & Keasling, J. D. (2002). Effect of lacY expression on homogeneity of induction from the Ptac and Ptrc promoters by natural and synthetic inducers. *Biotechnology Progress*, 18(3). <https://doi.org/10.1021/bp010141k>

- Kim, J. W., Park, S. Bin, Tran, Q. G., Cho, D. H., Choi, D. Y., Lee, Y. J., & Kim, H. S. (2020). Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae. *Microbial Cell Factories*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01355-8>
- Kim, N. K., Lee, S. H., & Park, H. D. (2022). Current biotechnologies on depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and repolymerization of reclaimed monomers from PET for bio-upcycling: A critical review. In *Bioresource Technology* (Vol. 363). <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127931>
- Koshti, R., Mehta, L., & Samarth, N. (2018). Biological Recycling of Polyethylene Terephthalate: A Mini-Review. In *Journal of Polymers and the Environment* (Vol. 26, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s10924-018-1214-7>
- Krause, M., Ukkonen, K., Haataja, T., Ruottinen, M., Glumoff, T., Neubauer, A., Neubauer, P., & Vasala, A. (2010). A novel fed-batch based cultivation method provides high cell-density and improves yield of soluble recombinant proteins in shaken cultures. *Microbial Cell Factories*, 9. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-11>
- Kushwaha, A., Goswami, L., Singhvi, M., & Kim, B. S. (2023). Biodegradation of poly(ethylene terephthalate): Mechanistic insights, advances, and future innovative strategies. In *Chemical Engineering Journal* (Vol. 457). <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141230>
- Laksmi, F. A., Nuryana, I., Vivid, C., & Hadi, M. I. (2023). Autoinduction expression of Bst DNA polymerase using lac operoncontrolled expression systems in *Escherichia coli*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 1255(1). <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1255/1/012050>
- Li, H., Aguirre-Villegas, H. A., Allen, R. D., Bai, X., Benson, C. H., Beckham, G. T., Bradshaw, S. L., Brown, J. L., Brown, R. C., Cecon, V. S., Curley, J. B., Curtzwiler, G. W., Dong, S., Gaddameedi, S., García, J. E., Hermans, I., Kim, M. S., Ma, J., Mark, L. O., ... Huber, G. W. (2022). Expanding plastics recycling technologies: chemical aspects, technology status and challenges. In *Green Chemistry* (Vol. 24, Issue 23). <https://doi.org/10.1039/d2gc02588d>
- Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y., & Bao, R. (2018). Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(Ethylene terephthalate) hydrolase petase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 19(14). <https://doi.org/10.1002/cbic.201800097>
- Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. C. (2019). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella sakaiensis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.148>

- Ma, Y., Yao, M., Li, B., Ding, M., He, B., Chen, S., Zhou, X., & Yuan, Y. (2018). Enhanced Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering. *Engineering*, 4(6). <https://doi.org/10.1016/j.eng.2018.09.007>
- Magalhães, R. P., Cunha, J. M., & Sousa, S. F. (2021). Perspectives on the role of enzymatic biocatalysis for the degradation of plastic pet. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 20). <https://doi.org/10.3390/ijms222011257>
- Maity, W., Maity, S., Bera, S., & Roy, A. (2021). Emerging Roles of PETase and MHETase in the Biodegradation of Plastic Wastes. In *Applied Biochemistry and Biotechnology* (Vol. 193, Issue 8). <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03562-4>
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). Lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of Biotechnology*, 157(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
- Meng, X., Yang, L., Liu, H., Li, Q., Xu, G., Zhang, Y., Guan, F., Zhang, Y., Zhang, W., Wu, N., & Tian, J. (2021). Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.058>
- Mobayed, F. H., Nunes, J. C., Gennari, A., de Andrade, B. C., Ferreira, M. L. V., Pauli, P., Renard, G., Chies, J. M., Volpato, G., & Volken de Souza, C. F. (2021). Effect of by-products from the dairy industry as alternative inducers of recombinant β -galactosidase expression. *Biotechnology Letters*, 43(3). <https://doi.org/10.1007/s10529-020-03028-3>
- Nisticò, R. (2020). Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. In *Polymer Testing* (Vol. 90). <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2020.106707>
- Oreski, G., Ottersböck, B., Barretta, C., Christöfl, P., Radl, S., & Pinter, G. (2023). Degradation of PET – Quantitative estimation of changes in molar mass using mechanical and thermal characterization methods. *Polymer Testing*, 125. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2023.108130>
- Panda, T. (2011). *Bioreactors: Analysis and Design* (1st ed.). McGraw-Hill Education. <https://www.accessengineeringlibrary.com/content/book/9780070704244>
- Pfaff, L., Gao, J., Li, Z., Jäckering, A., Weber, G., Mican, J., Chen, Y., Dong, W., Han, X., Feiler, C. G., Ao, Y. F., Badenhorst, C. P. S., Bednar, D., Palm, G. J., Lammers, M., Damborsky, J., Strodel, B., Liu, W., Bornscheuer, U. T., & Wei, R. (2022). Multiple Substrate Binding Mode-Guided Engineering of a Thermophilic PET Hydrolase. *ACS Catalysis*, 12(15). <https://doi.org/10.1021/acscatal.2c02275>

- Phillips, K. N., Widmann, S., Lai, H. Y., Nguyen, J., Ray, J. C. J., Balázs, G., & Cooper, T. F. (2019). Diversity in lac operon regulation among diverse *Escherichia coli* isolates depends on the broader genetic background but is not explained by genetic relatedness. *MBio*, 10(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.02232-19>
- Pinto, C., Melo-Miranda, R., Gordo, I., & Sousa, A. (2021). The Selective Advantage of the lac Operon for *Escherichia coli* Is Conditional on Diet and Microbiota Composition. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709259>
- Pirillo, V., Orlando, M., Battaglia, C., Pollegioni, L., & Molla, G. (2023). Efficient polyethylene terephthalate degradation at moderate temperature: a protein engineering study of LC-cutinase highlights the key role of residue 243. *FEBS Journal*, 290(12). <https://doi.org/10.1111/febs.16736>
- PlasticsEurope. (2022). Plastics – the Facts (2022). *PlasticsEurope*, 16–78. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2022/>
- PlasticsEurope. (2023). Plastics – the fast Facts 2023. *Plastics Europe*. <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2023/>
- Ponnusami, R., & Singh, P. (2022). *Biotechnological Approaches in Waste Management*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781003188292>
- Puspitasari, N., Tsai, S. L., & Lee, C. K. (2021). Class I hydrophobins pretreatment stimulates PETase for monomers recycling of waste PETs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.026>
- Rangel-Buitrago, N., & Neal, W. J. (2023). A geological perspective of plastic pollution. In *Science of the Total Environment* (Vol. 893). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164867>
- Roe, S. (2001). *Protein Purification Techniques* (Second Edition). OXFORD UNIVERSITY PRESS.
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, 42(14). <https://doi.org/10.1021/ma9005318>
- Schubert, S. W., Thomsen, T. B., Clausen, K. S., Malmendal, A., Hunt, C. J., Borch, K., Jensen, K., Brask, J., Meyer, A. S., & Westh, P. (2024). Relationships of crystallinity and reaction rates for enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate), PET. *ChemSusChem*. <https://doi.org/10.1002/cssc.202301752>
- Scott, C., & Gazaille, B. (2019). *Bioreactor Scale-Up from Pilot to Commercial Scale in the Modern Era*. <https://bioprocessintl.com/upstream-processing/bioreactors/ebook-bioreactor-scale-up-from-pilot-to-commercial-scale-in-the-modern-era/>

- Segal, L., Creely, J. J., Martin, A. E., & Conrad, C. M. (1959). An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer. *Textile Research Journal*, 29(10). <https://doi.org/10.1177/004051755902901003>
- Seo, H., Kim, S., Son, H. F., Sagong, H. Y., Joo, S., & Kim, K. J. (2019). Production of extracellular PETase from *Ideonella sakaiensis* using sec-dependent signal peptides in *E. coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.087>
- Sevilla, M., & Cerda-Mejía, L. (2022). *Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*. Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36572/1/CBT%20018.pdf>
- Shi, L., Liu, H., Gao, S., Weng, Y., & Zhu, L. (2021). Enhanced extracellular production of IsPETase in *Escherichia coli* via engineering of the pelB signal peptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7). <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07469>
- Sigma-Aldrich. (2013). *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit User Manual*.
- Simas, R. G., Pessoa Junior, A., & Long, P. F. (2023). Mechanistic aspects of IPTG (isopropylthio- β -galactoside) transport across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* - a rate limiting step in the induction of recombinant protein expression. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 50(1). <https://doi.org/10.1093/jimb/kuad034>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41(1). <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Sui, B., Wang, T., Fang, J., Hou, Z., Shu, T., Lu, Z., Liu, F., & Zhu, Y. (2023). Recent advances in the biodegradation of polyethylene terephthalate with cutinase-like enzymes. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1265139. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2023.1265139/BIBTEX>
- Tahara, N., Tachibana, I., Takeo, K., Yamashita, S., Shimada, A., Hashimoto, M., Ohno, S., Yokogawa, T., Nakagawa, T., Suzuki, F., & Ebihara, A. (2021). Boosting Auto-Induction of Recombinant Proteins in *Escherichia coli* with Glucose and Lactose Additives. *Protein & Peptide Letters*, 28(10). <https://doi.org/10.2174/0929866528666210805120715>
- Tournier, V., Duquesne, S., Guillamot, F., Cramail, H., Taton, D., Marty, A., & André, I. (2023). Enzymes' Power for Plastics Degradation. In *Chemical Reviews* (Vol. 123, Issue 9). <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.2c00644>
- Tournier, V., Topham, C. M., 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(7802). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>
- UN Environment Programme. (2021, October 21). *Pollution to Solution*. <https://www.unep.org/interactives/pollution-to-solution/>
- UN Environment Programme. (2023, April 25). *Everything you need to know about plastic pollution*. <https://www.unep.org/news-and-stories/story/everything-you-need-know-about-plastic-pollution>
- Van Heugten, A. J. P., & Vromans, H. (2018). Scale up of Semisolid Dosage Forms Manufacturing Based on Process Understanding: from Lab to Industrial Scale. *AAPS PharmSciTech*, 19(5). <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1063-7>
- Walker, T. R., & Fequet, L. (2023). Current trends of unsustainable plastic production and micro(nano)plastic pollution. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 160). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2023.116984>
- Wang, T., Yang, W., Gong, Y., Zhang, Y., Fan, X., Wang, G., Lu, Z., Liu, F., Liu, X., & Zhu, Y. (2024). Molecular engineering of PETase for efficient PET biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 280, 116540. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2024.116540>
- Wei, R., Breite, D., Song, C., Gräsing, D., Ploss, T., Hille, P., Schwerdtfeger, R., Matysik, J., Schulze, A., & Zimmermann, W. (2019). Biocatalytic Degradation Efficiency of Postconsumer Polyethylene Terephthalate Packaging Determined by Their Polymer Microstructures. *Advanced Science*, 6(14). <https://doi.org/10.1002/advs.201900491>
- Wei, R., Von Haugwitz, G., Pfaff, L., Mican, J., Badenhorst, C. P. S., Liu, W., Weber, G., Austin, H. P., Bednar, D., Damborsky, J., & Bornscheuer, U. T. (2022). Mechanism-Based Design of Efficient PET Hydrolases. In *ACS Catalysis* (Vol. 12, Issue 6). <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05856>
- Wei, R., & Weber, G. (2022). Performance of PET hydrolases with tethered binding modules in large-scale applications. In *Chem Catalysis* (Vol. 2, Issue 10). <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.09.027>
- Wong, P., Gladney, S., & Keasling, J. D. (1997). Mathematical model of the lac operon: Inducer exclusion, catabolite repression, and diauxic growth on glucose and lactose. *Biotechnology Progress*, 13(2). <https://doi.org/10.1021/bp970003o>
- Yang, S. S., Wu, W. M., Pang, J. W., He, L., Ding, M. Q., Li, M. X., Zhao, Y. L., Sun, H. J., Xing, D. F., Ren, N. Q., Yang, J., Criddle, C. S., & Ding, J. (2023). Bibliometric analysis of publications

- on biodegradation of plastics: Explosively emerging research over 70 years. *Journal of Cleaner Production*, 428, 139423. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139423>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278). <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). *Ideonella sakaiensis*, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. In *Methods in Enzymology* (Vol. 648). <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007>
- Yuan, Y., Yang, X., Yang, J., Zhang, J., Xu, S., Xu, K., Zeng, L., & Liu, D. (2010). Over-expression and purification of recombinant methylparathion degrading enzyme by lactose induction. *2010 4th International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering, ICBBE 2010*. <https://doi.org/10.1109/ICBBE.2010.5515948>
- Zhang, W., Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2018). Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial Cell Factories*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y>
- Zhao, H., Xu, Y., Li, X., Li, G., Zhao, H., & Wang, L. (2021). Expression and Purification of a Recombinant Enterotoxin Protein Using Different *E. coli* Host Strains and Expression Vectors. *Protein Journal*, 40(2). <https://doi.org/10.1007/s10930-021-09973-w>
- Zhao, M., Tao, X. Y., Wang, F. Q., Ren, Y. H., & Wei, D. Z. (2018). Establishment of a low-dosage-IPTG inducible expression system construction method in *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(9). <https://doi.org/10.1002/jobm.201800160>