UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Caracterización cinética de las variantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo, 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" aprobado mediante Resolución Nro. UTA-CONIN-2024-0075-R y reformado mediante la Resolución Nro. UTA-CONIN-2025-0003-R por el Consejo de Investigación e Innovación de la Universidad Técnica de Ambato.

Autor: Darwin Paúl Mena Amaluiza

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Julio - 2025

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, 18 de junio de 2025.

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Darwin Paúl Mena Amaluiza, 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 Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

Darwin Paúl Mena Amaluiza

1850324771

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 consulta 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 de autor.

Darwin Paúl Mena Amaluiza

1850324771

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 disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
LANDER VINICIO PEREZ ALDAS
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
CRISTIAN FERNANDO GALARZA GALARZA
Validar únicamente con FirmaEC

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

1803160272

Firmado electrónicamente por:
MIRARI YOSUNE ARANCIBIA SORIA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

1802142461

Ambato, 07 de julio del 2025

DEDICATORIA

A Dios

A mis padres y hermano

A mi novia

A mi familia y amigos

Y a quienes creen que el auténtico mérito del quehacer científico no radica únicamente en los descubrimientos realizados, sino también en la perseverancia que demostramos frente a paradigmáticas del proceso investigativo.

AGRADECIMIENTO

Primero, agradecer a Dios, por bendecirme y cuidarme siempre en este largo camino recorrido.

A mis papis, Darwin Mena y Amparito Amaluiza que a pesar de no ser el mejor estudiante y de tener muchos tropiezos en el camino siempre me ayudaron con un consejo, con un abrazo o simplemente con su presencia, nunca me dejaron solo.

A mi hermano Ariel Mena que siempre me brindo su apoyo incondicional, que tampoco me dejo solo, que me ayudaba en todo momento, y que especialmente me brindaba tiempo para despejar mi mente mientras jugábamos a la Play.

A mi novia Jael Galarza, que llego en el momento menos esperado, pero en el momento que más lo necesitaba, que con su dulzura y cariño me ayudo a no desviarme del camino, y a saber valorar lo que uno es y lo que uno puede dar, además de siempre alegrar mis peores días con un beso y con un abrazo.

A mis abuelitos, la maminita, el abuelito, la mamita Elcira y el abuelito Pio, se que desde el cielo estarán celebrando juntos lo que he logrado, lamento no haber sido el mejor estudiante, lamento mucho el que no puedan estar hoy aquí conmigo y muchas veces por haberlos decepcionado, espero que estén orgullosos de mí y les mando un beso y un abrazo al cielo, les extraño mucho.

A todos mis primos, especialmente al Pato y el Bukisito, que me enseñaron muchas cosas de la vida durante todo este tiempo y me aconsejaban de todos los problemas que tenía, a la Maguita Tobar por ser quien me ayudo con mis problemas personales y que también tenía siempre un consejo para todo. A toda mi familia que siempre me apoyaron y que siempre creyeron en mi a pesar de todos los problemas que tuve al inicio.

A todos mis amigos de la U, en especial al Fer, al Sebas y a la Nico que fueron quienes en los días más cansados siempre tenían alguna ocurrencia y nos hacían reír a todos, con quienes sufrimos durante la mayor parte de la carrera y con Sebas que desde el primer día de clases de nivelación nos hicimos amigos y vamos a terminar la carrera el mismo semestre.

A mi tutor el Dr. Mario García que con su dedicación me enseñó que con esfuerzo se pude conseguir lo que uno se proponga, además de que me dio las facilidades para poder realizar mi trabajo final. A mis amigos y compañeros del laboratorio, especialmente a la Vivian que me enseño todo lo necesario para poder hacer la Tesis, y todos los que en algún momento formaron parte de mi vida, ya que me ayudaron a ser la persona que soy hoy en día

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 DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS xi
ÍNDICE DE ECUACIONES xii
RESUMEN EJECUTIVO xiii
ABSTRACT xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEORICO 1
1.1 Antecedentes Investigativos 1
1.1.1 Justificación 1
1.1.2. Consecuencias medioambientales de la producción y desecho de plásticos 2
1.1.3. PETasa de *I. sakaiensis* 6
1.1.4. Evaluación de la actividad enzimática de IsPETasa 8
1.2. Objetivos 11
1.2.2. Objetivo General 11
1.2.3. Objetivos Específicos 11
CAPÍTULO II.- METODOLOGIA 12
2.1 Materiales 12
2.2 Métodos 13
2.2.1 Producción de las variantes mutantes (I208V/S238Y, N212A/I208V y 238Y/N212A) de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* 13

2.2.2 Evaluación de los parámetros cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes de la enzima PETasa utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato 16

2.2.3 Análisis del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción de las variantes silvestres y mutantes utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato. 17

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSION 18

3.1 Producción y aislamiento de las variantes doble mutantes de IsPETasa. 18

3.1.1 Purificación de las proteínas mutantes 19

3.2 Actividad catalítica de las variantes enzimáticas frente al sustrato *p*(NP)-acetato 22

3.3 Influencia de la temperatura en los parámetros cinéticos de la catálisis enzimática 26

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 29

4.2 Recomendaciones 31

MATERIALES DE REFERENCIA 32

Referencias Bibliográficas 32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos, material fungible y equipos utilizados para la investigación……...……12

Tabla 2 Rendimiento de biomasa y concentración final de proteína de las variantes de IsPETasa.....19

Tabla 3 Parámetros cinéticos de las variantes de IsPETasa.....24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del polietileno tereftalato (PET) 3
Figura 2. Degradación biológica del polietileno tereftalato (PET) por I. sakaiensis. 5
Figura 3. Síntesis y despolimerización enzimática del PET por la acción combinada de las enzimas PETasa y MHETasa 6
Figura 4. Estructura tridimensional de IsPETasa 7
Figura 5. Purificación de las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y Y N212A/S238Y de la IsPETasa..... 21
Figura 6. Representación de dobles recíprocos de la actividad de las variantes mutantes 23
Figura 7. Estructura de IsPETasa con su sitio activo y sitio de unión con el sustrato 26
Figura 8. Efecto de la temperatura sobre la actividad de las variantes mutantes N212A/S238Y, I208V/N212A e I208V/S238Y de IsPETasa 27

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1.....16
Ecuación 2.....17
Ecuación 3.....17

RESUMEN EJECUTIVO

La acumulación de residuos plásticos, especialmente del polietileno tereftalato (PET), representa un grave problema ambiental global que exige alternativas sostenibles. Una solución prometedora es la biodegradación enzimática, en la cual destaca la PETasa de *I. sakaiensis* por su capacidad para degradar PET en condiciones moderadas. Sin embargo, su limitada termoestabilidad restringe su uso a nivel industrial. En este contexto, la presente investigación tuvo como objetivo caracterizar cinéticamente tres variantes mutantes de la enzima PETasa (I208V-N212A, I208V-S238Y y N212A-S238Y), previamente diseñadas para mejorar su eficiencia catalítica y estabilidad térmica. La metodología consistió en la producción de las variantes mediante expresión en *Escherichia coli* Rosetta (DE3), purificación por cromatografía de afinidad utilizando una columna NiNTA, y posterior evaluación de parámetros cinéticos usando *p*(NP)-acetato como sustrato modelo. Asimismo, se analizó el efecto de la temperatura sobre su actividad enzimática. Los resultados indicaron que todas las variantes siguieron adecuadamente el modelo de Michaelis-Menten, pero la variante I208V-S238Y mostró el mejor rendimiento global, con el valor de Km más bajo (2.77 mM), el Vmax más alto (41.86 U) y la mayor constante de especificidad (CE = 10.08 1 sobre mM por s), lo que refleja una mayor afinidad por el sustrato y eficiencia catalítica. Además, esta variante presentó una buena expresión proteica y estabilidad térmica, cumpliendo con los tres objetivos planteados. En conclusión, la variante I208V-S238Y se perfila como la más prometedora para aplicaciones biotecnológicas enfocadas en la degradación eficiente del PET, ofreciendo una alternativa viable para mitigar la contaminación plástica de manera sostenible.

Palabras clave: Cinética enzimática, variantes mutantes, PETasa*, Ideonella sakaiensis*, biodegradación de PET.

ABSTRACT

The accumulation of plastic waste, especially polyethylene terephthalate (PET), represents a serious global environmental problem that demands sustainable alternatives. One promising solution is enzymatic biodegradation, in which the PETase enzyme from *I. sakaiensis* stands out for its ability to degrade PET under moderate conditions. However, its limited thermostability restricts its industrial use. In this context, the present study aimed to kinetically characterize three mutant variants of the PETase enzyme (I208V-N212A, I208V-S238Y, and N212A-S238Y), previously designed to improve catalytic efficiency and thermal stability. The methodology involved the production of the variants through expression in *Escherichia coli* Rosetta (DE3), purification by affinity chromatography using a Ni-NTA column, and subsequent evaluation of kinetic parameters using *p*(NP)-acetate as a model substrate. Additionally, the effect of temperature on enzymatic activity was analyzed. The results indicated that all variants adequately followed the Michaelis-Menten model, but the I208V-S238Y variant showed the best overall performance, with the lowest Km value (2.77 mM), the highest Vmax (41.86 U), and the greatest specificity constant (CE = 10.08 1 sachet mM per s), indicating higher substrate affinity and superior catalytic efficiency. Moreover, this variant exhibited good protein expression and thermal stability, meeting the three established objectives. The I208V-S238Y variant therefore emerges as the most promising candidate for biotechnological applications focused on efficient PET degradation, offering a viable alternative for sustainably mitigating plastic pollution.

Keywords: Enzyme kinetics, mutant variants, PETase, *Ideonella sakaiensis*, PET biodegradation.

CAPÍTULO I.- MARCO TEORICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Justificación

A nivel global, la acumulación de plásticos comunes aumenta progresivamente a niveles alarmantes, lo cual representa un grave problema para el medio ambiente. Se estima que aproximadamente 8 millones de toneladas (Mt) de plástico contaminan los mares del mundo anualmente (**UNEP, 2022)**. Este material se degrada en un lapso muy prolongado de tiempo, lo que lo convierte en una amenaza directa para la salud de todos los seres vivos y el medio ambiente. La biodegradación emerge como una solución sostenible a este problema global que, además de ser amigable con el ambiente, es más eficiente en comparación con métodos mecánicos y químicos empleados comúnmente que transforman el plástico en gases o resinas contaminantes **(Mohanan et al., 2020).**

La catálisis enzimática es una de las alternativas de biodegradación con mayor proyección, ya que permite la descomposición de los plásticos en monómeros en ausencia de subproductos tóxicos. Esta tecnología ha sido aplicada con éxito específicamente en el reciclaje del polietileno tereftalato (PET), el cual es un poliéster con gran utilidad a nivel industrial en la fabricación de envases desechables o de un solo uso y que, tal como mencionan **Kushwaha et al. (2023)**. El consumo del PET genera 80 millones de toneladas de desechos al año, que se depositan en vertederos o terminan en el denominado “Gran parche de basura del Pacifico”.

Desde 2016, la enzima PETasa de *I. sakaiensis* (IsPETasa) ha sido sujeto de estudio por su elevada capacidad de degradar películas de PET amorfo **(Yoshida et al., 2016).** Sin embargo, la enzima pierde actividad a temperaturas superiores a los 35 °C, las cuales son usualmente necesarias para su aplicación en procesos industriales de reciclaje. Por esta razón, la enzima ha sido motivo de varias modificaciones con la finalidad de alcanzar una mayor actividad y termoestabilidad. **Gavilanes & Garcia (2023)** diseñaron las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima IsPETasa, las cuales han demostrado incrementar la actividad de la enzima incluso a temperaturas de hasta 45 °C. Esto se pudo evidenciar mediante análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM) de films de PET de botellas desechables tratadas enzimáticamente. No obstante, las imágenes SEM únicamente han permitido determinar los aspectos físicos de la degradación inducida por variantes mutantes sobre el PET. Por lo tanto,

es necesario conocer el funcionamiento de las enzimas mediante el análisis de su cinética enzimática empleando sustratos análogos al PET como sustratos **(Eugenio et al., 2022)**.

La presente investigación tuvo como objetivo determinar las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y en presencia de *p*(NP)-acetato, un ester aromático análogo del PET, con el fin de comprender mejor su funcionamiento y eficiencia en la degradación del PET a diferentes temperaturas. Se espera que los resultados de esta investigación aporten al desarrollo de soluciones biotecnológicas para el manejo sostenible de residuos plásticos.

1.1.2. Consecuencias medioambientales de la producción y desecho de plásticos

En la actualidad, los materiales plásticos son indispensables para el desarrollo de la sociedad moderna, ya que se los utiliza en varios aspectos de la vida cotidiana, la agricultura, la construcción, la salud, entre otras áreas. Según **Rodrigues et al. (2019)**, cada año se desecha una porción notable de plástico. Se estima que, aproximadamente, el 54 % del plástico se desecha a vertederos o cualquier otro lugar en el medio ambiente. Además, desde 1950, la producción de plásticos ha incrementado sostenidamente cada año. En 2023, la producción global de plásticos alcanzó los 413.8 Mt, con lo que se espera que la producción de desechos también aumente proporcionalmente **(Plastics Europe, 2024)**. El gran problema generado por la contaminación por desechos plásticos se debe principalmente al bajo costo de las materias primas empleadas para la fabricación de los diferentes plásticos, los costos y el poco interés de la sociedad en el reciclaje, y las insuficientes políticas e incentivos para la producción sostenible que normalmente respaldan a la economía circular de los plásticos **(Martino et al., 2022).**

Estudios recientes demuestran que la acumulación de desechos plásticos en ambientes marinos presenta un impacto ambiental severo debido a su resistencia a la degradación **(Martino et al., 2022)**. El deterioro del plástico genera micro y macropartículas que se acumulan en los animales acuáticos y pueden migrar hasta el ser humano mediante la cadena alimentaria. Se conoce que los microplásticos pueden ocasionar trastornos de salud a nivel reproductivo, metabólico, inmunológico y neurológico (**Endocrine Society, 2020).** Además, las fuentes, vías y cantidad de contaminación por plástico en los animales y el medio ambiente son difíciles de cuantificar, ya que los métodos utilizados son ineficientes para la detección de partículas de plástico muy pequeñas **(Boucher et al., 2020)**.

La contaminación en áreas terrestres se estima que es entre 4 y 23 veces mayor a la contaminación plástica anual en aguas marinas, resultado de esto el entorno del suelo sirve como sumidero de micro plásticos. A pesar de conocer estos datos, el conocimiento sobre dicha contaminación terrestre sigue siendo limitado, por lo que es un tema que merece una atención especial **(Bodor et al., 2024).**

1.1.2.1. Polietileno tereftalato (PET)

El polietileno tereftalato, o comúnmente conocido como PET, es un polímero termoplástico muy utilizado en la industria para fabricar materiales de un solo uso, tales como botellas, películas y fibras sintéticas, entre otros. Debido a esto, el PET se ha convertido en uno de los mayores problemas de contaminación a nivel mundial. En 2016, se produjeron 485 mil millones de botellas de PET aproximadamente **(Filella, 2020)**, cantidad que aumenta paulatinamente año tras año. El PET es un polímero perteneciente a la familia de los poliésteres, caracterizado por la presencia de enlaces éster en su cadena molecular principal (Figura 1). Su naturaleza termoplástica permite su reprocesamiento a altas temperaturas, lo que facilita diversos métodos de reciclaje. Entre los métodos de reciclaje existen tres rutas principales **(Nisticò, 2020).**

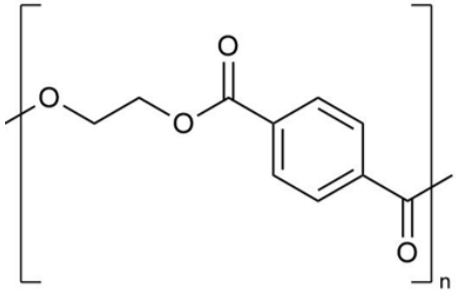

Figura 1. *Estructura química del polietileno tereftalato (PET). La reacción de policondensación de monómeros de etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA) produce PET polimérico, con agua como subproducto. Adaptado de* ***Carr et al. (2020)****.*

El reciclaje del PET se realiza mediante métodos físicos, químicos o biológicos. El reciclaje físico puede realizarse por tratamientos térmicos, como la pirrólisis o la gasificación, cuyos productos pueden ser empleados combustible para automotores, calefacción o generación eléctica, o por trituración mecánica. El tratamiento mecánico es el método más utilizado a nivel global y común para el reciclaje del PET. Este consiste en varios procesos físicos, al final de los cuales se obtienen pequeños fragmentos de plástico que

se transforman nuevamente en otros productos plásticos. Sin embargo, estos productos no alcanzan una alta pureza, lo que restringe su aplicación en envases de grado alimenticio **(Schyns et al., 2021)**. En cuanto al reciclaje químico, este implica la descomposición del PET en sus monómeros originales mediante procesos como la hidrólisis, la glicólisis u otros similares. Dichos monómeros pueden purificarse y reensamblarse para fabricar nuevos productos plásticos. Este proceso es más costoso que el reciclaje mecánico y biológico, razón por la cual una cantidad muy pequeña del plástico reciclado que se genera anualmente a nivel global proviene del reciclaje químico **(Davidson et al., 2021).** El último proceso de reciclaje es el biológico, considerado el más sostenible y amigable con el medio ambiente, ya que se basa en el uso de microorganismos o enzimas capaces de degradar el polímero. Esto permite reducir el uso de productos químicos tóxicos. Se han descrito al menos diez enzimas capaces de degradar el PET, entre las que destaca la enzima PETasa de *I. sakaiensis*, que puede romper los enlaces éster del PET y liberar sus monómeros estructurales **(Kumar et al., 2023).**

1.1.2.2. Degradación enzimática del PET

Recientemente, la degradación enzimática del PET ha emergido como una alternativa sostenible para el reciclaje de este plástico. Se han identificado varias enzimas de tipo cutinasa y lipasa capaces de hidrolizar el PET, pero pocos estudios han demostrado que los productos de la reacción sean integrados en el metabolismo de microorganismos específicos. *I. sakaiensis* 201-F6, un microorganismo Gram negativo aislado por **Yoshida et al. (2016)**, es uno de los pocos ejemplos que demuestran la integración de de una ruta metabólica que permite emplear el PET como principal fuente de carbono. El análisis del genoma de *I. sakaiensis* permitió identificar un marco de lectura abierto que codifica para una lipasa, IsPETasa, que posee una similitud del 51 % con la cutinasa de *Thermobifida fusca*, la cual presenta actividad hidrolítica sobre el PET **(Yoshida et al., 2021).** IsPETasa, hidroliza el PET principalmente en mono-(2-hidroxietil) tereftalato (MHET) y dos subproductos traza, bis(2-hidroxietil)-tereftalato (BHET) y ácido tereftálico (TPA) **(Liu et al., 2019)**. *I. sakaiensis* complementa la actividad de IsPETasa mediante la acción de la enzima MHETasa, la cual hidroliza el producto principal de la reacción, MHET, en TPA y etilenglicol (EG). De esta forma, la bacteria secreta IsPETasa y MHETasa, que actúan coordinadamente, para descomponer el PET en sus monómeros estructurales ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG), los cuales posteriormente sirven como fuente de carbono para el crecimiento del microorganismo. Además, análisis de imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) de células de *I. sakaiensis* cultivada sobre PET han permitido identificar apéndices celulares que facilitan el contacto entre la superficie del PET y la

bacteria (Figura 2). Esto sugiere que el microorganismo ha desarrollado una serie de adaptaciones que le permiten utilizar eficiente el PET como sustrato.

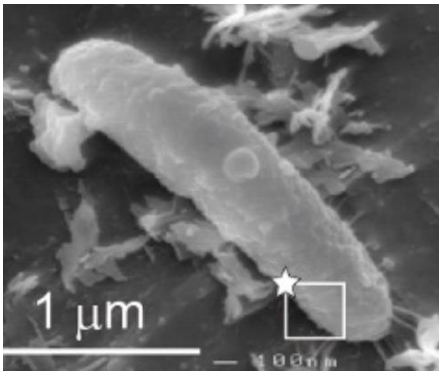

Figura 2. *Degradación biológica del polietileno tereftalato (PET) por Ideonella sakaiensis. Imagen SEM de células de I. sakaiensis en donde se observan apéndices que permiten la unión de la célula al sustrato y favoreen la acción de las enzimas IsPETasa y MHETasa. Adaptado de* ***Yoshida et al. (2016).***

Cabe recalcar que uno de los principales problemas en la biodegradación enzimática, es la pronunciada hidrofobicidad del PET, lo que bloquea su adsorción y unión efectiva a las enzimas **(Liu et al., 2024).** Además, la elevada cristalinidad del PET utilizado en la fabricación de materiales de empaque y fibras textiles representa una barrera significativa para el acceso eficiente de las enzimas a las cadenas poliméricas del polímero. Por esta razón, es necesario aumentar la temperatura del medio de reacción hasta aproximadamente 70 °C, que corresponde a la temperatura de transición vítrea (Tg) del PET. A esta temperatura, las cadenas poliméricas adquieren mayor movilidad y flexibilidad, lo que facilita su reconocimiento y ataque por parte de las enzimas hidrolasas. Actualmente, se conoce un escaso número de hidrolasas capaces de actuar bajo estas condiciones. Una de ellas es la cutinasa de *T. fusca* (TfC), misma que ha demostrado una excelente estabilidad térmica, lo que facilita la hidrolisis de residuos de PET a altas temperaturas superiores a los 50 °C. Además, **Chen et al. (2023)** destacan a la enzima *Leaf-Branch Compost Cutinase* (LCC) por su alta actividad hidrolítica sobre el PET y capacidad de tolerar temperaturas de hasta 75 °C. Por estas características, LCC es considerada una de las enzimas más prometedoras para su utilización en sistemas de degradación eficiente del PET. De igual manera, la cutinasa de *Humicola insolens* (HiC) es una de las enzimas más estudiadas en el campo de la biodegradación de PET, debido a su notable capacidad para romper enlaces éster en este polímero. Aunque su eficiencia catalítica es inferior en comparación con LCC o IsPETasa, especialmente en polímeros cristalinos, HiC ha sido utilizada ampliamente en ensayos preliminares y en estudios comparativos con otras enzimas **(Castro et al., 2019). Yoshida et al. (2016)** demostraron que IsPETasa es hasta 120 veces más eficiente que TfC, LCC e HiC para despolimerizar el PET a 30 ºC, en un periodo de 6 semanas. Por tal motivo, IsPETasa se ha convertido

en una enzima de alta prioridad para su optimización mediante ingeniería de enzimas, con miras a mejorar tanto su actividad como termoestabilidad, y así, conseguir alcanzar niveles de degradación de PET que puedan ser escalados a sistemas industriales de reciclaje.

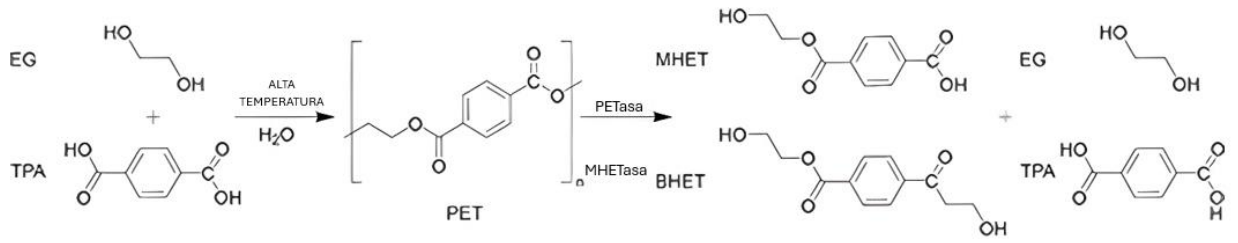

Figura 3. *Síntesis y despolimerización enzimática del PET por la acción combinada de las enzimas PETasa y MHETasa. Adaptado de* ***García-Meseguer et al. (2023).***

En la Figura 3 se ilustra el proceso de despolimerización enzimática del PET. Este polímero está compuesto por dos monómeros estructurales, etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA), los cuales se emplean en su síntesis mediante una reacción de policondensación. Por otro lado, la degradación enzimática del PET, mediada por la acción combinada de PETasa y MHETasa, da lugar a la formación de mono-(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET), TPA y EG.

1.1.3. PETasa de *I. sakaiensis*

1.1.3.1. Estructura y clasificación de la enzima

Estudios estructurales realizados por **Liu et al. (2019)** han demostrado que IsPETasa forma parte de la super familia de las α/β-hidrolasas, las cuales poseen un plegamiento que consta de una lámina de β central que está rodeada por una hélice α. Su centro catalítico consiste en una triada catalítica (S160 - D206 - H237) altamente conservada entre enzimas α/β-hidrolasas de diferentes especies. IsPETasa tiene la capacidad de degradar el PET a temperaturas moderadas (30 ºC) y es la que tiene mayor actividad enzimática degradadora de PET con respecto a otras enzimas homólogas **(Duan et al., 2023).**

La determinación de la estructura cristalina de IsPETasa ha permitido identificar su sitio activo, así como los aminoácidos relevantes responsables de formar el complejo enzima-PET y del proceso bicatalítico (Figura 4). Al fondo del sitio activo se encuentra la triada catalítica y aminoácidos capaces de estabilizar el

oxígeno del grupo carbonilo del PET mediante puentes de hidrógeno y múltiples interacciones no polares que estabilizan el anillo aromático presente en cada monómero de PET **(García-Meseguer et al., 2023).**

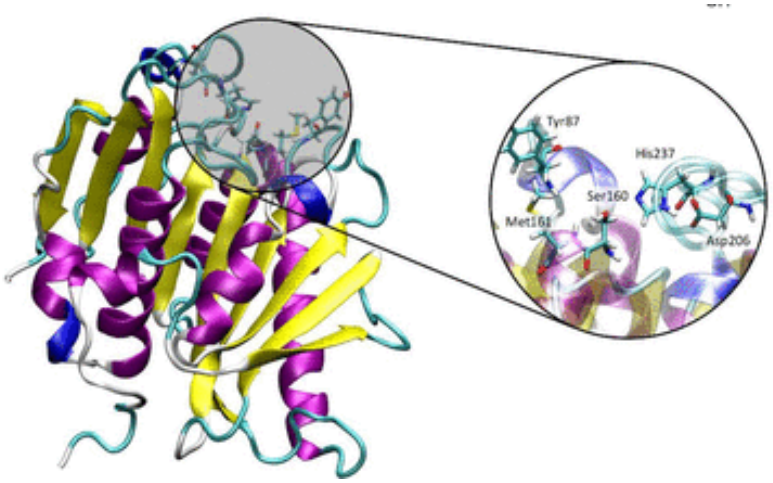

Figura 4. *Estructura tridimensional de IsPETasa (6EQE). La enzima está compuesta por nueve láminas β (amarillo) y siete hélices α (morado), en consonancia con otras hidrolasas. El circulo muestra una ampliación del sitio activo la triada catalítica y los aminoácidos más importantes en el mecanismo de degradación del PET. Adaptado de* ***García-Meseguer et al. (2023).***

1.1.3.2. Mecanismos de reacción

IsPETasa cataliza la degradación del PET mediante un proceso enzimático sustrato limitante que ocurre en la superficie del polímero sólido. Este tipo de mecanismo es típico de enzimas que hidrolizan polímeros, como celulasas y xilanasas. La enzima se adhiere al PET a través de residuos aromáticos del sitio activo que reconocen las unidades de tereftalato, e hidroliza el enlace éster del polímero, gracias a interacciones entre el sustrato y la triada catalítica serina-histidina-aspartato. La acción de la enzima escinde un monomero de PET a la vez, y genera, como se mencionó anteriormente, MHET como principal producto de la reacción **(Burgin et al., 2024).**

El mecanismo molecular de catálisis ocurre en dos fases. En la primera fase, de acilación, la histidina activa la serina catalítica que ataca el enlace éster del PET, formando un intermediario acil-enzima. Mientras, el aspartato estabiliza la carga de la histidina catalítica. En la segunda fase, de desacilación, una molécula de agua activada por la histidina hidroliza el intermediario acil-enzima, liberando el producto y regenerando la enzima **(Burgin et al., 2024).**

1.1.3.3. Optimización de la enzima IsPETasa mediante mutagénesis dirigida

La enzima IsPETasa ha demostrado una capacidad superior para descomponer PET en comparación con otras enzimas homólogas. Sin embargo su aplicación a escala industrial se ve limitada por su sensibilidad a cambios de temperatura **(Gavilánes & Garcia, 2023)**. Por esta razón, diversos estudios se han enfocado en mejorar su estabilidad y actividad mediante ingeniería de proteínas. **Brott et al. (2022)** confirmaron que estas mejoras en la termoestabilidad y actividad enzimática han sido fundamentales para optimizar la degradación del PET.

Sevilla et al. (2023) realizaron un análisis extensivo de la estructura de IsPETasa y diferentes enzimas homólogas, identificando tres mutaciones puntuales que mejoraron la unión al PET en comparación con la enzima silvestre. Dos de estas mutaciones, I208V y S238Y, se introdujeron cerca del residuo catalítico H237, favoreciendo la afinidad de unión del PET mediante la introducción de interacciones no covalentes adicionales. Una tercera mutación, N212A, se introdujo en la proximidad del sitio activo para alterar la flexibilidad de los segmentos de polipéptido que contornean el sitio activo.

Gavilanes & Garcia (2023) se centraron en el desarrollo de variantes dobles de los mutantes identificados por **Sevilla et al. (2023)** (I208V/N212A, I208V/S238Y, y N212A/S238Y) mediante PCR mutagénica. La evaluación de la digestión del PET mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) demostró que la variante N212A/S238Y exhibió aspectos que sugieren una mayor tasa de degradación. Las enzimas con las variaciones I208V/N212A y N212A/S238Y alcanzaron su actividad catalítica óptima a 35 °C, mientras que la mutante I208V/S238Y mostró pérdida de actividad. Estos resultados representan un avance significativo hacia la solución del problema ambiental causado por la contaminación plástica a través de la despolimerización efectiva del PET.

1.1.4. Evaluación de la actividad enzimática de IsPETasa

La cinética enzimática permite caracterizar los parámetros que afectan la velocidad de las reacciones que catalizan las enzimas, así como aspectos sobre el mecanismo de reacción y de las condiciones ideales para que ocurra la conversión del sustrato en producto. Algunos de los factores que afectan la velocidad de las enzimas son la concentración y naturaleza del sustrato, el pH y la temperatura. Por lo tanto, es fundamental conocer el comportamiento de las reacciones catalizadas por enzimas bajo diferentes condiciones de acción enzimática **(Deay et al., 2022).**

El estudio de la cinética enzimática frecuentemente se realiza mediante el análisis de los parámetros cinéticos propuestos por Michaelis y Menten, cuyas variables clave, Km y Vmax, describen y caracterizan principalmente la velocidad con la que ocurre la reacción catalizada por la enzima, y como dicha velocidad puede verse afectada por diferentes concentraciones de sustrato **(Deay et al., 2022).** La relación entre la velocidad de reacción y la concentración de sustrato está definida mediante la ecuación de Michaelis y Menten: $V = (Vmax.[S])/(Km + [S])$.

Según **Ashkan et al. (2021)** la Km se define como la afinidad de la enzima hacia el sustrato, y su interpretación es clave para el estudio de las enzimas. Cuando la Km es más pequeña, la afinidad entre la enzima y el sustrato es mayor, mientras que cuando el valor de la Km es grande, la afinidad de la enzima por el sustrato es pobre. Dicha afinidad puede verse afectada por cambios en la estructura de la enzima, procesos de inmovilización o sustituciones en la secuencia de aminoácidos de la enzima.

Por otra parte, la Vmax representa la actividad máxima que tiene una enzima a concentraciones saturantes de sustrato. Es importante recalcar que el estudio de la cinética enzimática implica la determinación de velocidades iniciales (Vo), mismas que se obtienen cuando la tasa de generación de producto es independiente de la concentración del sustrato. A partir de estos dos parámetros cinéticos se pueden inferir la tasa de recambio de la enzima (kcat), la constante de especificidad (CE) y la actividad específica (SA).

En el caso de la enzima IsPETasa, la reacción que cataliza en presencia de PET sigue una cinética en fase heterogénea debido a que el acceso de la enzima a las cadenas poliméricas del PET está restringido por impedimentos estéricos y fenómenos de transferencia de masas intrínsecos a la estructura cristalina del polímero. Por lo tanto, la caracterización de los parámetros cinéticos de la reacción suele realizarse mediante el uso de sustratos análogos.

El *p*(NP)-acetato es utilizado como sustrato para caracterizar la velocidad de la reacción catalizada por enzimas esterasas, como IsPETasa, principalmente porque es considerado un indicador especifico cuya degradación está asociada directamente con la hidrólisis de poliésteres biodegradables **(Tsuboi et al., 2022).** Este sustrato modelo ofrece ventajas significativas para la caracterización cinética de las variantes de la PETasa. Al hidrolizarse, libera p-nitrofenol, un compuesto cromogénico de color amarillo fácilmente cuantificable mediante espectrofotometría. Esta propiedad permite realizar ensayos cinéticos de alta sensibilidad y reproducibilidad en tiempos cortos, evitando las dificultades asociadas al uso directo de PET como sustrato, que requeriría períodos de incubación prolongados debido a su naturaleza sólida y baja biodisponibilidad. Diversos estudios han demostrado una correlación entre la actividad hidrolítica sobre *p*(NP)-acetato y la capacidad de degradación de PET, validando su uso como indicador de la funcionalidad de estas enzimas modificadas **(Meng et al., 2021).**

La cuantificación del producto de la hidrólisis se realiza mediante el seguimiento del curso de la reacción a una longitud de onda de 415 nm, ya que a esta longitud el p-nitrofenol liberado durante la hidrólisis enzimática presenta su máxima absorbancia, permitiendo una detección precisa incluso a bajas concentraciones **(Lankone et al., 2020).**

Los ensayos espectrofotométricos ofrecen múltiples ventajas para la caracterización cinética de las variantes de PETasa, incluyendo la posibilidad de realizar mediciones en tiempo real, alta sensibilidad y reproducibilidad. Para determinar los parámetros cinéticos (Km, Vmax, kcat) de las variantes mutantes de IsPETasa, es fundamental establecer condiciones óptimas de reacción como pH, fuerza iónica y temperatura. Las mediciones suelen realizarse en modo cinético, registrando el incremento de absorbancia a intervalos regulares durante un período determinado. Complementariamente, técnicas como HPLC, cromatografía de gases o espectrometría de masas pueden emplearse para correlacionar los resultados al analizar la reación que realiza la enzima con PET como sustrato, proporcionando una caracterización más completa de las capacidades hidrolíticas de estas enzimas modificadas **(Lankone et al., 2020).**

1.1.4.1. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de IsPETasa

La temperatura es un factor crítico que modula la actividad de IsPETasa y sus variantes mutantes. A medida que la temperatura aumenta, se incrementa la velocidad de reacción hasta alcanzar su temperatura óptima. La forma silvestre de IsPETasa muestra una temperatura óptima de reacción que oscila entre los 30 y 35 °C por efecto del aumento en la energía cinética y frecuencia de colisiones enzima-sustrato. Este factor afecta directamente la conformación proteica, la afinidad por el sustrato y la estabilidad estructural con respecto al efecto de la temperatura sobre el equilibrio entre la conformación nativa y la desnaturalizada **(Rapp & Nidetzky, 2022).**

Las mutaciones específicas en la PETasa pueden alterar significativamente su perfil de temperatura óptima y estabilidad térmica. El estudio del efecto térmico en las variantes de la enzima IsPETasa es crucial para determinar si estas modificaciones generan variantes con mayor termoestabilidad y actividad a temperaturas elevadas, características deseables para aplicaciones biotecnológicas en la degradación de PET **(Arcus & Mulholland, 2020).**

1.2. Objetivos

1.2.2. Objetivo General

Caracterizar la cinética de las variantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima PETasa de I. sakaiensis.

1.2.3. Objetivos Específicos

- Producir las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.
- Evaluar los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por las variantes mutantes de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato.
- Analizar el efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes mutantes de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato.

CAPÍTULO II.- METODOLOGIA

2.1 Materiales

El presente trabajo de titulación fue de tipo experimental y se llevó a cabo en los laboratorios de investigación de la Facultad de Ciencia 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 durante la investigación.

Tabla 1.

Reactivos, material fungible y equipos utilizados para la investigación

Reactivos	
- Acetonitrilo - Acrilamida - Agar – agar - Agua destilada - Agua desionizada - Albúmina del suero bovino - Alcohol etílico - Ampicilina - Cloranfenicol - Cloruro de sodio (NaCl) - Extracto de levadura	- Glucosa - Hidróxido de sodio (NaOH) - Imidazol - Lactosa - *p*(NP)-acetato - Reactivo de Biuret - SDS - Triptona - Tris Base - Tritón X-100
Material Fungible	
- Balones de aforo - Cajas Petri de vidrio - Columna Ni-NTA - Espátulas estériles	- Micropipetas - Papel absorbente - Papel aluminio - Papel film

- Frascos de tapa azul	- Papel filtro
- Gradillas	- Pipetas
- Guantes de nitrilo	- Probetas
- Hisopos	- Puntas para micropipetas
- Matraz Erlenmeyer	- Tubos Falcon
- Mechero	- Tubos Eppendorf

Equipos	
- Agitador incubador orbital	- FPLC
- Autoclave	- Incubadora
- Balanza analítica	- Nanodrop
- Baño termostático con agitación	- Plancha de agitación
- Cámara de electroforesis	- Plancha de calentamiento
- Centrífuga	- Potenciómetro
- Disruptor celular (Benchmarck Pulse 150)	- Refrigerador
	- Termociclador
- Espectrofotómetro	- Ultra congelador
- Estufa	- Vortex

2.2 Métodos

2.2.1 Producción de las variantes mutantes (I208V/S238Y, N212A/I208V y 238Y/N212A) de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

2.2.1.1 Plásmidos y sistema heterólogo

Se utilizaron los plásmidos pET21b(+)-Is-PETasa_I208V/S238Y, pET21b(+)-IsPETasa_N212A/I208V y pET21b(+)-Is-PETasa_S238Y/N212A. Estos vectores de expresión contienen en su estructura los genes de las variantes mutantes que se buscaba expresar. La importancia de estos plásmidos radica en su

capacidad para transformar células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3). Los plásmidos y las células competentes fueron proporcionados por la Dra. Liliana Cerda Mejía, docente e investigadora de la FCIAB.

2.2.1.2 Transformación de las células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3)

El proceso de transformación de las células competentes se realizó siguiendo la metodología descrita por **Cohen et al. (1972)**, mediante choque térmico. Se tomaron 100 µL de células de *E. coli* Rosetta (conservadas a -80 ºC) para cada una de las enzimas a producir y se las descongeló durante 30 min en hielo. Trascurrido dicho tiempo, se añadieron 100 ng de plásmido y se llevó a incubación en hielo durante 30 min. Posteriormente, se indujo el choque térmico mediante incubación en un baño termostático a 42 ºC por 90 s, seguido de 2 min de incubación en hielo. A continuación, se añadieron 500 µL de caldo SOC (20 mL solución de glucosa 20 %, 5 g/L extracto de levadura, 0.584 g/L NaCl, 20 g/L Triptona, 0.186 g/L KCl, 2.4 g/L $MgSO_4$, pH 7.5) y se llevó a incubación a 37 ºC, con agitación continua a 200 rpm durante 2 h. A continuación, se inocularon 50 µL de este cultivo en agar LB (5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 20 g/L agar, pH 7.0) enriquecido con ampicilina (100 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL) y se incubó a 37 ºC durante toda la noche **(Cerda - Mejía, 2016)**.

Por último, se transfirió una colonia a 5 mL de caldo LB (5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, pH 7.0) enriquecido con antibiótico para la elaboración de stocks de glicerol que se conservaron a -80 ºC.

2.2.1.3 Expresión de la enzima PETasa

La expresión de las enzimas se realizó según el método descrito por **Sevilla y Cerda-Mejía (2022)**, con modificaciones. El proceso inició cultivando una colonia de *E. coli* Rosetta (DE3), transformada con los plásmidos de cada variante mutante, en 50 mL de medio LB con ampicilina y cloranfenicol. La incubación fue a 37°C con agitación de 200 rpm durante 16 h.

Posteriormente, el cultivo se transfirió a 500 mL de medio TB suplementado con antibióticos y cloranfenicol, manteniéndose en las mismas condiciones de temperatura y agitación por 24 h, además de añadir IPTG a 0,1 mM. Las células se recolectaron por centrifugación a 5000 rpm y 4 °C durante 20 min. La pasta celular se almacenó a -80 °C.

2.2.1.4 Purificación de las variantes mutantes de la enzima IsPETasa a través de cromatografía de afinidad

- Lisis celular

La lisis celular se realizó utilizando un disruptor celular según el método descrito por **Dermit & Mardakheh (2021).** Primero, se agregó buffer de lavado (Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, imidazol 20 mM) a la biomasa celular y se agitó levemente hasta conseguir la completa resuspensión de las células. Se adicionó tritón X100 y se homogenizó por 5 min mediante sonicación en un disruptor celular Benchmarck Pulse 150, aplicando 10 ciclos de 10 s de trabajo con intervalos de descanso de 10 s.

- Purificación de las proteínas

La purificación de las variantes mutantes de IsPETasa se realizó según el protocolo descrito por **Austin et al. (2018),** con algunas modificaciones. Inicialmente, el lisado celular se sometió a centrifugación a 21130 g durante 1 h a 4 °C para eliminar los restos celulares y material insoluble. El sobrenadante resultante, que contenía las proteínas de interés, fue purificado mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) utilizando una columna pre-empacada de Ni-NTA (GE, Health Care). Esta técnica aprovechó la afinidad entre los iones de níquel inmovilizados en la matriz y la cola de histidinas (6xHis) incorporada en el diseño de la enzima IsPETasa.

El proceso cromatográfico inició equilibrando la columna con 10 volúmenes de columna (cv) de buffer de lavado. A continuación, la muestra se cargó en la columna y se eliminaron las proteínas que no se habían unido específicamente a la matriz mediante 10 cv de buffer de lavado. La elución de las enzimas se llevó a cabo mediante la adición de 5 cv de buffer de elución (Tris 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, imidazol 500 mM), recolectando el eluato en fracciones de 1 mL en tubos eppendorf estériles. Finalmente, se realizó un intercambio de buffer empleando una columna PD10 equilibrada con tampón de almacenamiento (20 M Tris-HCl, pH 8, 300 mM NaCl). La enzima se eluyó de la columna empleando el mismo buffer.

Para verificar la pureza de las fracciones obtenidas, se realizó un análisis mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) siguiendo el método propuesto por **Dermit &**

Mardakheh (2021). La determinación de la concentración proteica se realizó mediante un ensayo colorimétrico de ácido bicinconínico (BCA). Para cada determinación, se preparó una mezcla de reacción que consistió en 196 µL de solución BCA y 4 µL de sulfato de cobre al 4 %, a la cual se añadieron 25 µL de muestra por pocillo. Las placas se incubaron a una temperatura controlada de 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se midió la absorbancia a 562 nm utilizando un espectrofotómetro lector de microplacas. La concentración se determinó por comparación con una curva de calibración elaborada con albúmina de suero bovino (BSA) como proteína estándar.

2.2.2 Evaluación de los parámetros cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes de la enzima PETasa utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato

Los parámetros cinéticos de las variantes mutantes de la enzima IsPETasa se determinaron utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato, según el método de **Yoshida et al. (2016).** Las reacciones se efectuaron en buffer Na_2HPO_4 45 mM (pH 7.0), NaCl 90 mM y DMSO 10 % (v/v) a 30 °C. La formación del producto p(NP) se monitoreó espectrofotométricamente a 415 nm.

La concentración óptima de sustrato se estableció mediante ensayos usando diferentes concentraciones (0.78 - 8.0 mM), siguiendo el protocolo de **Ma et al. (2018).** Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Las constantes cinéticas Km y Vmax se determinaron midiendo las velocidades iniciales (Vo) a diferentes concentraciones de sustrato y ajustando los datos al modelo de Michaelis-Menten mediante regresión no lineal usando el software Prism 10.

La constante catalítica, kcat, se determinó mediante la Ecuación 1.

Ecuación 1

$$kcat = \frac{Vmax}{[E_o]}$$

La actividad específica (SA) se calculó mediante la Ecuación 2.

Ecuación 2

$$SA = \frac{U}{mg\ E_o}$$

Donde U corresponde a las unidades de actividad enzimática descritas en función de los µmol de producto generados por minuto.

Finalmente, el coeficiente de especificidad (CE) se determinó mediante la Ecuación 3.

Ecuación 3

$$CE = \frac{kcat}{Km}$$

2.2.3 Análisis del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción de las variantes silvestres y mutantes utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato.

El efecto de la temperatura sobre la reacción catalizada por las variantes mutantes de la enzima IsPETasa se evaluó siguiendo el protocolo anterior, empleando concentraciones saturantes de sustrato y variando la temperatura de reacción (35, 45 y 55 °C). La formación de *p*(NP) se monitoreó espectrofotométricamente a 415 nm **(Yoshida et al., 2016)** y se evaluó el efecto de la temperatura sobre la Vmax y se expresó en función de la actividad residual (Aobs/Ao) y la actividad mínima (Amin). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Producción y aislamiento de las variantes doble mutantes de IsPETasa.

La determinación de las constantes cinéticas de la reacción de las variantes mutantes de la enzima IsPETasa se realizó con enzimas expresadas y purificadas en condiciones de laboratorio. La expresión de las proteínas se llevó a cabo mediante el uso de los plásmidos pET21b(+)-Is-PETasa_I208V/S238Y, pET21b(+)-IsPETasa_N212A/I208V y pET21b(+)-Is-PETasa_S238Y/N212A que en su estructura contienen las secuencias que codifican para las variantes mutantes dobles I208V/S238Y, N212A/I208V y S238Y/N212A obtenidas previamente por **Gavilánes & García (2023)** mediante mutagénesis dirigida al sitio. El plásmido pET21b(+) se caracteriza por su alta eficiencia para expresión de proteínas recombinantes en *E. coli.* Este vector de expresión contiene un promotor T7 y el gen *lacI* que permiten que la proteína de interés sea sobre expresada y que la expresión sea controlada e inducible. Esto es crucial para obtener altos niveles de producción sin alterar la viabilidad celular **(Schuster & Reisch, 2021)**. La construcción de los vectores pET21b(+)-Is-PETasa_I208V/S238Y, pET21b(+)-IsPETasa_N212A/I208V y pET21b(+)-Is-PETasa_S238Y/N212A incluye una secuencia para la expresión de una cola de histidinas en el extremo C-terminal de cada variante mutante. Se ha demostrado que esta modificación no altera la actividad de IsPETasa y permite purificar la enzima eficientemente mediante cromatografía de afinidad (IMAC). Gracias a estas características, el plásmido pET21b(+) es una herramienta ideal para la expresión y purificación de IsPETasa con miras a realizar estudios estructurales y funcionales **(Ayoub et al., 2023).**

La inducción de la transcripción de los genes de interés se realizó mediante la adición de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) al medio de cultivo, similar a lo descrito previamente por **Sevilla & Cerda-Mejía (2022).** El IPTG es un análogo no metabolizable de la alolactosa que actúa como inductor de la expresión de la proteína recombinante. Esto ocurre mediante un mecanismo que libera al represor *lac* (producto del gen *lacI*) del operador ubicado aguas arriba del gen de interés mediante un cambio conformacional que ocurren tras la asociación del IPTG al represor. Esto permite que la ARN polimerasa T7 se reclute en el promotor e inicie la transcripción de los genes objetivo **(Liu et al., 2024)**. A diferencia de la lactosa, el IPTG no es degradado por la β-galactosidasa, lo que asegura una concentración constante del inductor durante todo el proceso de expresión, garantizando así una producción continua y estable de la proteína recombinante **(Lalwani et al., 2021).**

La inducción con IPTG fue esencial para activar la expresión de las variantes mutantes de IsPETasa en *E. coli* Rosetta (DE3). Como se observa en la Figura 5, la proteína fue sobreexpresada tras la adición de IPTG,

lo cual se observa como una banda intensa de alrededor de 31 kDa en las fracciones soluble e insoluble del lisado celular. Esta estrategia fue clave para obtener rendimientos adecuados de cada enzima mutante, lo cual fue indispensable para su posterior purificación y caracterización cinética. La expresión efectiva inducida por IPTG permitió obtener concentraciones suficientes de las enzimas para evaluar su cinética empleando *p*(NP)-acetato como sustrato. Como se verá más adelante, el rendimiento de proteína soluble obtenida fue distinto para cada variante mutante (Tabla 2). Esto sugiere que las mutaciones puntuales introducidas en cada variante de IsPETasa podrían influir en su solubilidad durante el proceso de expresión. Si bien este estudio no se enfocó en la optimización del proceso de expresión de las enzimas de interés, los resultados obtenidos podrían servir como linea base para el diseño de un protocolo de expresión apropiado para cada variante mutante.

3.1.1 Purificación de las proteínas mutantes

La purificación de las variantes mutantes de la enzima IsPETasa se realizó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), empleando una columna de Ni-NTA. La cantidad de proteína obtenida para cada variante mutante no fue dependiente de la cantidad de biomasa generada durante el proceso de expresión (Tabla 2). Por ejemplo, la mayor cantidad de biomasa fue obtenida para la variante I208V/N212A, con un peso húmedo total de 12.05 g biomasa/L. En contraste, el rendimiento de enzima purificada (mg E/g biomasa) para esta variante fue el menor en este estudio (0.22 mg E/g biomasa). En contraste, el mayor rendimiento de enzima fue obtenido para la variante I208V/S238Y (1.03 mg/g biomasa), de la cual se logró obtener 8.21 g biomasa/L durante el proceso de expresión. Como se mencionó anteriormente, estos resultados sugieren que la introducción de mutaciones puntuales podría haber alterado la solubilidad de las enzimas y por consiguiente afectar sus rendimientos después de la purificación.

Tabla 2

Rendimiento de biomasa, concentración final de proteína y rendimiento de las variantes de IsPETasa

Variante IsPETasa	Rendimiento de Biomasa (g biomasa/L)	Concentración final de proteína (mg/mL)	Rendimiento de enzima (mg E/g biomasa)
I208V/N212A	12.05	0.75	0.2

I208V/S238Y	8.21	2.42	1.03
N212A/S238Y	6.37	1.18	0.65

A su vez se puede deducir que existe una relación aparentemente inversa entre el rendimiento de biomasa y la concentración final de proteína, ya que la variante I208V/ S238Y, a pesar de tener un rendimiento de biomasa menor al de la variante I208V/N212A, posee una concentración final mucho mayor siendo esta de 2.42 mg/mL. Este fenómeno se puede deber a la compensación metabólica que sucede cuando las células equilibran lo recursos que poseen para su crecimiento y los que emplean para la síntesis de proteína de forma recomninante **(Rajacharya et al., 2024)**. De igual manera la variante S238Y tiene una mejor eficiencia de expresión proteica cuando la mutación I208V también está presente, posiblemente debido a factores que favorecen su estabilidad o correcto plegamiento, lo cual reduce su degradación intracelular **(de Marco, 2025)**.

Por otro lado, el análisis de los cromatogramas producto de la purificación de las variantes mutantes mediante cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) con columna de afinidad Ni-NTA muestra un solo pico de elución correspondiente a cada enzima de interés (Figura 5). En ningún caso se observó la presencia de hombros en los picos de elución, que usualmente sugieren la co-purificación de distintas proteínas con diferente afinidad a la columna cromatográfica. El pico de elución de la variante I208V/N212A fue el más bajo en este estudio. Cabe destacar que tanto la altura como el área bajo la curva de estos picos se correlacionan directamente con la concentración de proteínas presentes en cada muestra **(Kunz & Lönnerdal, 1989)**. En cambio, la variante I208V/S238Y mostró el pico más alto, lo que coincide con la mayor concentración de proteína obtenida (2.42 mg/mL) entre las tres variantes. Los análisis de las muestras colectadas durante la elución mediante SDS-PAGE muestra que las enzimas tienen una elevada pureza. Existen bandas tenues que podrían corresponder a proteínas nativas del sistema de expresión heteróloga y que podrían tener un bajo grado de afinidad por la columna Ni-NTA. En conjunto, los perfiles cromatográficos y electroforéticos de las tres variantes mutantes indican que el protocolo de purificación basado en cromatografía por afinidad con Ni-NTA fue eficiente y específico. Las diferencias en la intensidad del pico cromatográfico y de las bandas en los geles sugieren variaciones en la expresión y solubilidad de cada variante, aspectos que como se mencionó anteriormente pueden estar relacionados con los efectos estructurales de las mutaciones puntuales introducidas en cada constructo **(Brott et al., 2022; Gavilanes & García, 2023).** A partir de estos resultados se pudo concluir que las variantes mutantes de IsPETasa fueron expresadas y purificadas a niveles adecuados para el estudio de su cinética empleando *p*(NP)-acetato como sustrato.

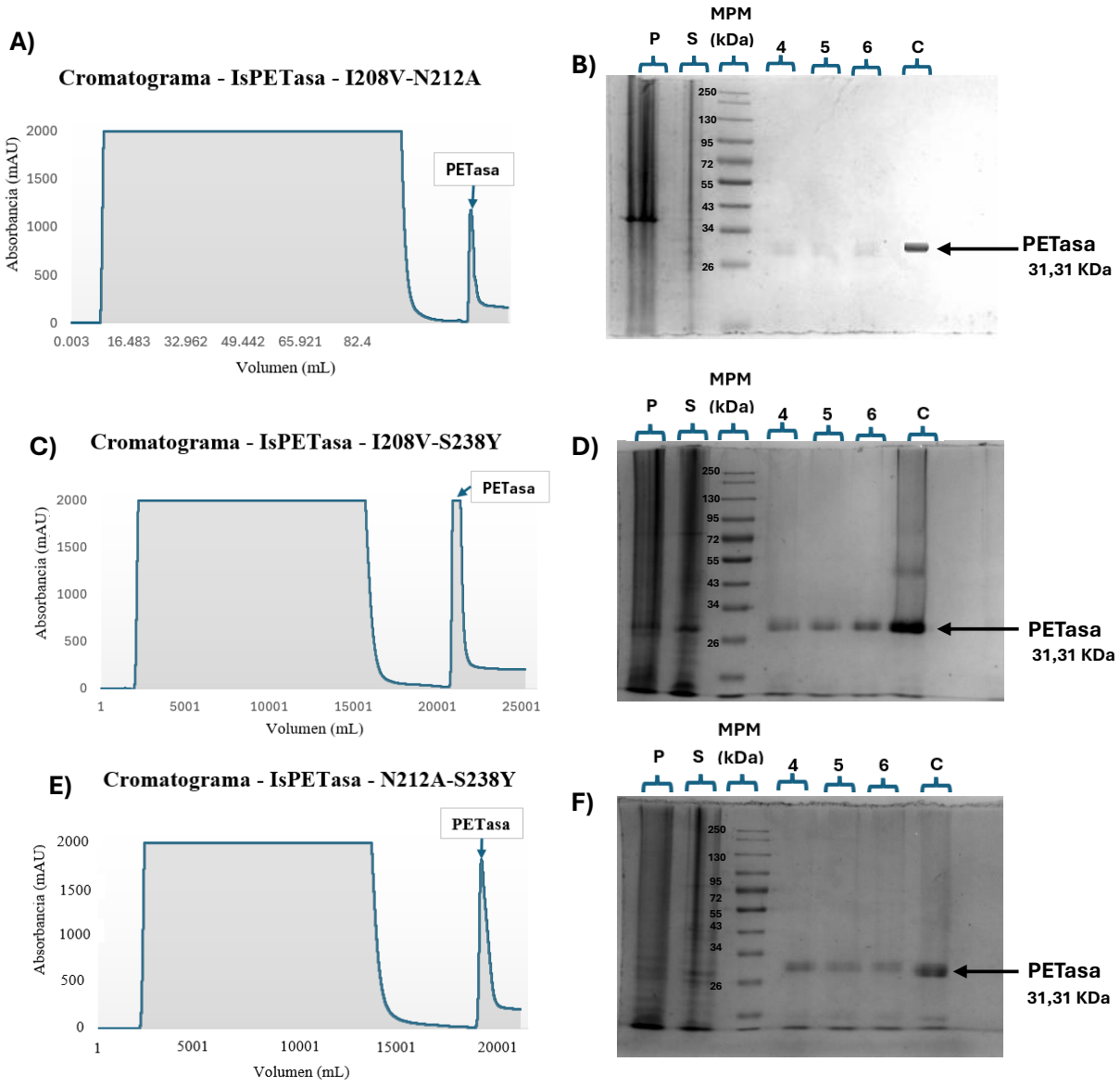

Figura 5. *Purificación de las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y Y N212A/S238Y de la IsPETasa. En donde A) Cromatograma de la purificación de la variante I208V/N212A, B) SDS-PAGE de la variante I208V/N212A, C) Cromatograma de la purificación de la variante I208V/S238Y, D) SDS-PAGE de la variante I208V/S238Y, E) Cromatograma de la purificación de la variante N212A/S238Y y F) SDS-PAGE de la variante N212A/S238Y.* ***P****: fracción insoluble del extracto celular,* ***S****: fracción soluble del extracto celular,* ***MPM****: marcador de peso molecular,* ***4, 5*** *y* ***6****: fracciones de proteína purificada,* ***C****: unión de las fracciones 4, 5 y 6, siendo esta la que mayor concentración de enzima posee.*

3.2 Actividad catalítica de las variantes enzimáticas frente al sustrato *p*(NP)-acetato

La determinación de los parámetros cinéticos de las variantes de IsPETasa se llevó a cabo mediante la hidrólisis enzimática del enlace éster entre la fracción acilo y el p-nitrofenol (*p*(NP)) del *p*(NP)-acetato (*p*(NP-Ac)), liberando el anión 4 nitrofenolato, cuya formación se cuantificó espectrofotométricamente a 415 nm. Según **Pirillo et al. (2021)** el sustrato *p*(NP-Ac) es uno de los sustratos más utilizados en la detección de diferentes actividades de esterasas, específicamente en hidrolasas y lipasas, además el uso de *p*(NP) esterificado con ácidos grasos de diferente longitud de cadena es útil para identificar el tamaño del sitio activo de la enzima y a su vez para determinar el alcance que tiene el sustrato de las hidrolasas activas en sustratos lineales grandes, como lo son las cutinasas.

Para el estudio de la cinética de las variantes mutantes de IsPETasa, se estableció un rango de concentración de sustrato, siendo la concentración más baja 0.78 mM y la más alta 8 mM. Esto se debió a que a concentraciones menores a 0.78 mM no fue posible cuantificar el producto generado mediante la reacción enzimática, ya que los valores de absorbancia eran similares al control sin enzima. Por otra parte, a concentraciones mayores a 8 mM tampoco fue posible cuantificar la absorbancia real del producto formado, ya que el sustrato precipitó en el buffer de reacción al exceder su solubilidad en agua. De esta forma. la turbidez generada en la muestra interfirió en la determinación de la absorbancia del compuesto coloreado. Los parámetros cinéticos de cada una de las variantes se obtuvieron utilizando una regresión no lineal mediante el análisis cinético de Michaelis y Menten como se observa en la Figura 6, utilizando el análisis de dobles recíproco propuesto por Lineweaver y Burk. Los resultados sugieren que los datos experimentales se ajustan adecuadamente al modelo de Michaelis-Menten ($R^2 > 0.94$), lo que nos indica que su comportamiento catalítico sigue una cinética convencional.

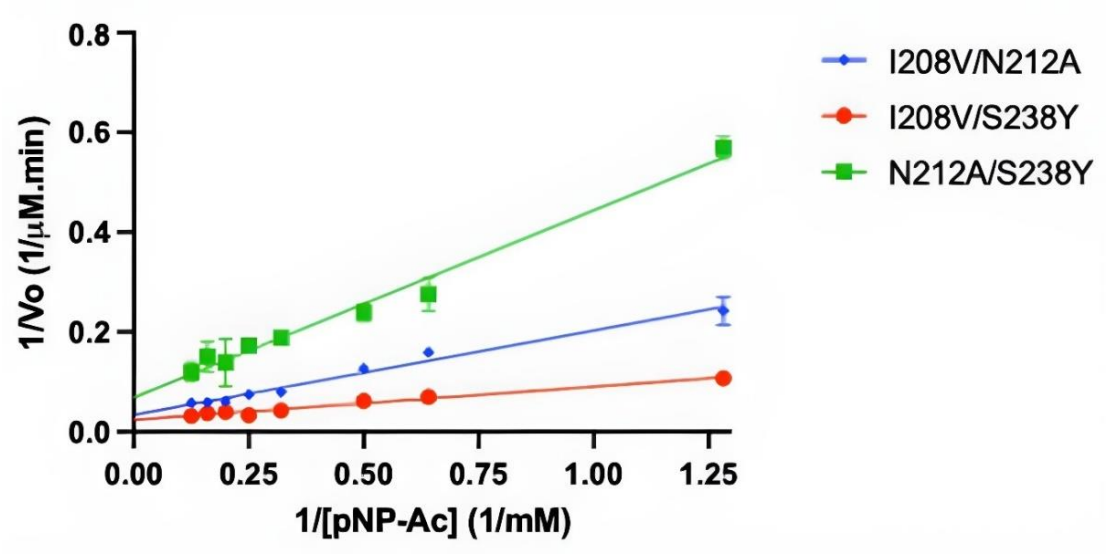

Figura 6. *Representación de dobles recíprocos de la actividad de las variantes mutantes N212A/S238Y, I208V/N212A e I208V/S238Y de IsPETasa al emplear p(NP-Ac) como sustrato. La línea de tendencia obtenida mediante regresión no lineal empleando los datos experimentales.*

La Tabla 3 muestra los valores de los parámetros cinéticos determinados para cada una de las variantes estudiadas, en donde Km representa la constante de Michaelis-Menten, el cual teóricamente representa a la afinidad que tiene la enzima hacia el sustrato **(Miao et al., 2024).** La variante I208V/S238Y mostró la mayor afinidad por el sustrato, *p*(N)-Ac), con un Km de 2.77 ± 0.39 mM. En contraste, la variante N212A/S238Y mostró la menor afinidad por este sustrato, con una Km de 7.81 ± 3.51 mM. Estos resultados sugieren que al mutar los residuos que flanquean a la histidina catalítica, H237, se consigue incrementar la afinidad de la enzima por el *p*(N)-Ac). Aparentemente, la sustitución I208V genera un mayor efecto en la modulación de la unión de la enzima al sustrato que la mutación S238Y. De esta forma, estos resultados se suman a otros estudios que señalan que la introducción de substituciones en el sitio activo de la enzima puede modular la afinidad de IsPETasa hacia diferentes sustratos **(Joo et al., 2018).**

En cuanto a la velocidad máxima (Vmax) y actividad específica, la variante I208V/S238Y alcanzó los valores más altos, 41.86 ± 5.25 μM/min y 0.167 U/mgE, respectivamente, lo que permite concluir que esta combinación de mutaciones no solo mejora la afinidad de la enzima hacia el sustrato sino que también incrementa la eficiencia catalítica de la enzima. Este hallazgo es consistente con estudios previos que demuestran cómo combinaciones sinérgicas de mutaciones pueden mejorar tanto Vmax en enzimas PETasas **(Brott et al., 2022).**

Tabla 3

Parámetros cinéticos de las variantes de IsPETasa

Variantes de IsPETasa	Km (mM)	Vmax ($\frac{uM}{min}$)	kcat ($\frac{1}{s}$)	CE ($\frac{1}{s*mM}$)	U ($\frac{umol}{min}$)	SA ($\frac{U}{mg*E}$)	R^2
I208V/N212A	4.99 ± 0.91	29.55 ± 5.08	19.7	3.94	0.0074	0.394	0.9506
I208V/S238Y	2.77 ± 0.39	41.86 ± 5.25	27.91	10.08	0.010	0.167	0.9458
N212A/S238Y	7.81 ± 3.51	19.88 ± 8.81	13.25	1.70	0.00497	0.165	0.9677

Nota: Los parámetros cinéticos fueron determinados utilizando p-nitrofenil acetato como sustrato modelo a 37 °C en tampón fosfato 50 mM, pH 7.5. Los valores de Km, Vmax y Kcat corresponden a los ajustes de las curvas de velocidad inicial mediante el modelo de Michaelis-Menten.

La variante I208V/S23as8Y también mostró una mayor tasa de recambio de la enzima (kcat) (27.91 s^{-1}), la cual mide el número de moléculas de sustrato transformadas por molécula de enzima por segundo. En contraste, la variante N212A/S238Y presentó el valor más bajo (13.25 s^{-1}). La constante de especificidad (CE = kcat/Km) mostró un patrón similar, con la variante I208V/S238Y destacándose por encima de las otras dos variantes mutantes (10.08 $s^{-1}\cdot mM^{-1}$). Esto sugiere que las substituciones I208V/S238Y favorecen significativamente la eficiencia catalítica de la enzima probablemente al mejorar la orientación del sustrato en el sitio activo y facilitar el paso del estado de transición, lo cual resulta en una mayor velocidad de conversión sin comprometer severamente la afinidad por el sustrato.

El *p*(NP)-acetato es un análogo del PET que permite abalizar la actividad global de enzimas esterasas, como IsPETasa. Por lo tanto, es importante tomar estos resultados con cautela, ya que no pueden ser directamente relacionados con la actividad de las variantes mutantes sobre el PET. Por ejemplo, **Gavilanes & Garcia (2023)** demostraron que la variante N212A/S238Y es altamente eficiente para degradar la superficie de films de PET posconsumo, incluso con mayor eficiencia que la variante I208V/S238Y, altamente efectiva

para hidrolizar el *p*(NP-Ac). Por lo tanto, es crucial realizar ensayos adicionales que permitan caracterizar aún mas las variantes mutantes consideradas en este estudio con el fin de generar aplicaciones biotecnológicas que permitan la biodegradación de plásticos **(Taniguchi et al., 2019).**

En cuanto a la estructura de IsPETasa, resulta esencial comprenderla para interpretar su comportamiento catalítico bajo las condiciones experimentales previamente descritas. Esta enzima presenta una arquitectura estructural similar a la de las cutinasas, caracterizada por un pliegue α/β y una triada catalítica Ser–His–Asp, responsable de la escisión de enlaces éster (Figura 7A). Una de sus características distintivas es la conformación más abierta y flexible de su sitio activo en comparación con otras cutinasas homólogas. Esta particularidad estructural permite a IsPETasa interactuar eficientemente con sustratos voluminosos, como las cadenas poliméricas del PET, favoreciendo su hidrólisis incluso en condiciones mesofílicas **(Zeng et al., 2022).**

De acuerdo con **Liu et al. (2023**), la región de conexión entre las láminas β1 y β2 de IsPETasa presenta una elevada flexibilidad estructural, lo que contribuye significativamente a su mayor actividad catalítica. Esta región se encuentra alejada del sitio activo, pero su flexibilidad parece influir en la dinámica general de la enzima y en su capacidad para adaptarse a sustratos voluminosos. Como se observa en la Figura 7B, el sitio de unión al sustrato está conformado por una hendidura poco profunda rodeada por residuos hidrofóbicos. En el estudio de **Liu et al. (2023**), el ligando unido a la enzima es el MHET, mientras que en la presente investigación se utilizó *p*(NP-Ac). Aunque ambos compuestos se enlazan en la misma región que la triada catalítica, las diferencias estructurales entre los sustratos hacen que no se unan de manera idéntica ni ocupen el mismo volumen dentro del sitio activo. En IsPETasa, el residuo W159 es clave para el reconocimiento y posicionamiento del sustrato. Es posible que el *p*(NP-Ac) se vea favorecido por estas interacciones clave debido al tamaño de la molécula y al escaso volumen que ocupa el substituyente acetato.

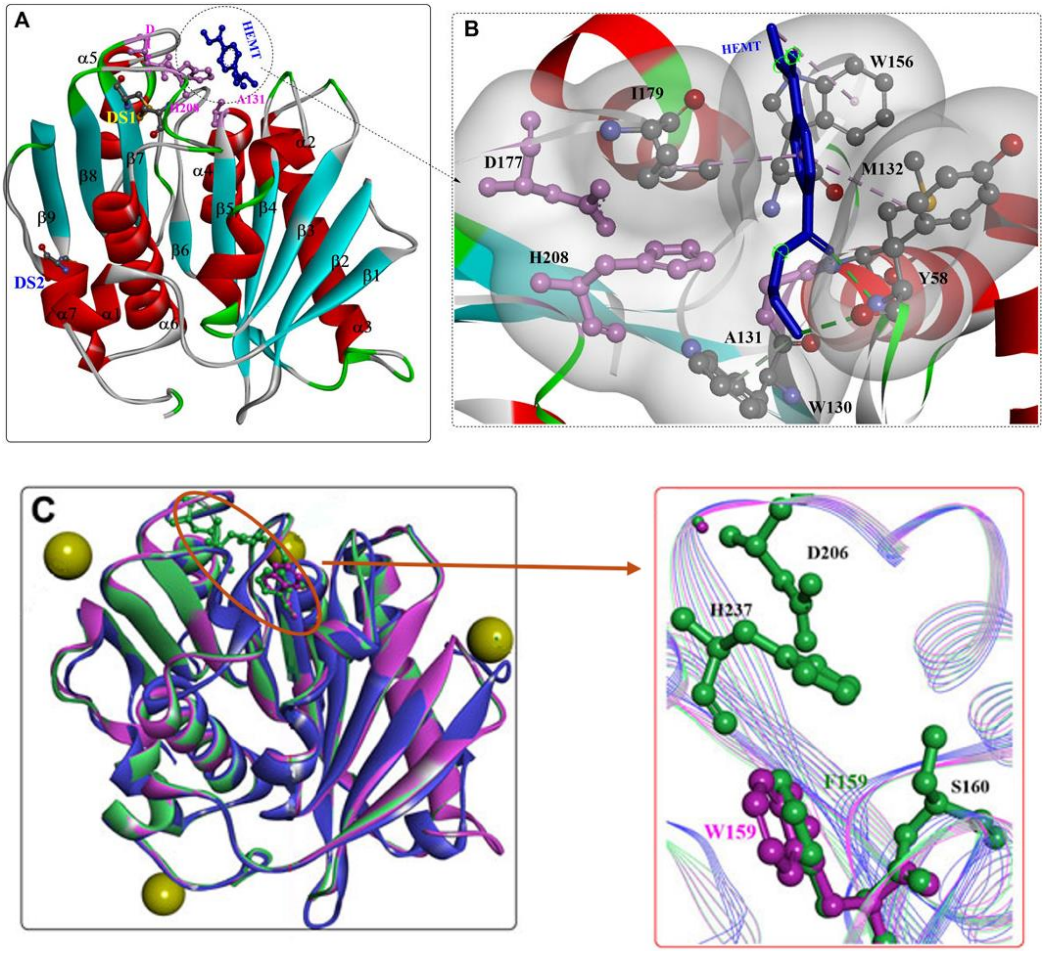

Figura 7. *Estructura de IsPETasa con su sitio activo y sitio de unión con el sustrato. En donde A) Estructura general de la enzima IsPETasa, B) Sitio de unión de sustrato, en este caso unión de HEMT, C) Sitio activo de la enzima ampliada. Adaptado de* ***Liu et al. (2023)****.*

3.3 Influencia de la temperatura en los parámetros cinéticos de la catálisis enzimática

La temperatura es uno de los factores más determinantes en la actividad enzimática, ya que afecta tanto la velocidad de reacción como la estabilidad estructural de la enzima. En este apartado se analiza el efecto de diferentes temperaturas sobre los parámetros cinéticos de las variantes estudiadas de IsPETasa manteniendo constante la concentración de sustrato.

La Figura 8 muestra que la actividad catalítica de todas las variantes disminuye progresivamente a medida que la temperatura se incrementa de 35 °C a 55 °C. En todos los casos, la velocidad inicial alcanza su valor máximo a 35 °C, lo que indica que esta es la temperatura óptima para la actividad enzimática de las variantes evaluadas. Este comportamiento refleja la sensibilidad térmica característica de IsPETasa, cuya estabilidad

se ve comprometida a temperaturas cercanas o superiores a su límite térmico funcional. Estos resultados concuerdan con estudios recientes, como el de **Stockinger et al. (2025)**, en el que se analizó la enzima Fast-PETasa. En dicho estudio, se demostró que variantes mejoradas mediante ingeniería de proteínas pueden mantener su estabilidad y actividad en un rango de temperatura más amplio (30–50 °C), gracias a la introducción de mutaciones puntuales que estabilizan regiones estructuralmente lábiles, reducen la flexibilidad conformacional y aumentan la energía de plegamiento de la enzima.

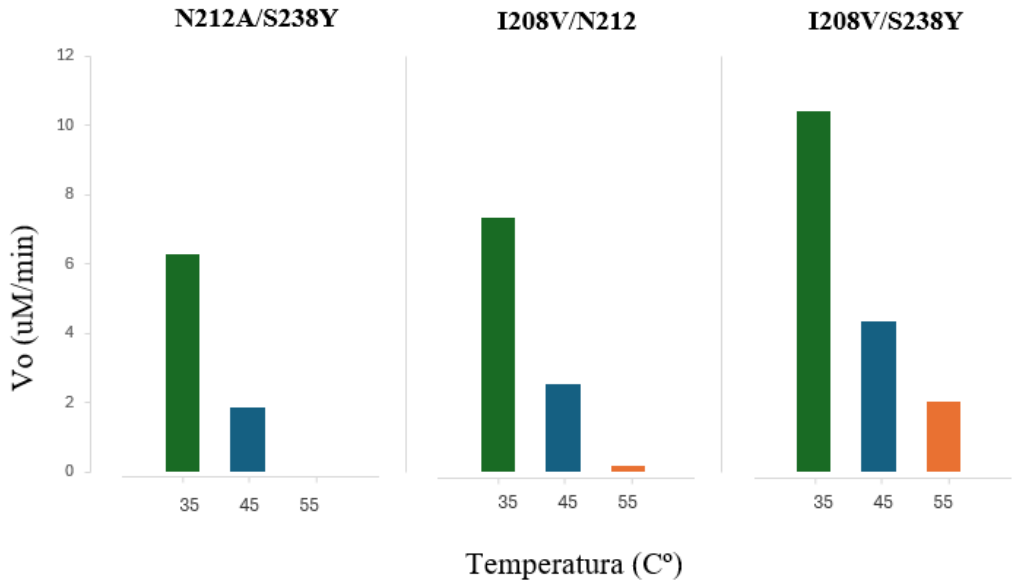

Figura 8. *Efecto de la temperatura sobre la actividad de las variantes mutantes N212A/S238Y, I208V/N212A e I208V/S238Y de IsPETasa. En donde Vo (uM/min) hace referencia a la velocidad inicial de las variantes a 35, 45 y 55 ºC.*

La variante I208V/S238Y presentó la mayor velocidad inicial a 35 °C (~11 mM/min), lo que coincide con sus valores superiores de Vmax y Kcat observados en los parámetros cinéticos. Sin embargo, esta variante también mostró una disminución progresiva de Vo con el aumento de la temperatura, aunque mantuvo una mejor actividad a 55 °C en comparación con las otras variantes. Este comportamiento sugiere que la combinación de mutaciones I208V/S238Y no solo mejora la eficiencia catalítica sino que también otorga cierta tolerancia térmica, en línea con estudios recientes sobre el diseño racional de PETasas termotolerantes **(Lu et al., 2022)**. Según esto guarda relación con estudios de ingeniería de IsPETaseMT, en los cuales se reportó que ciertas modificaciones genéticas incrementan la temperatura de fusión (Tm) en ~15 °C, permitiendo actividad catalítica efectiva incluso cerca de 60 °C **(Xu et al., 2024).**

Por otro lado, la variante I208V/N212A mostró una marcada pérdida de actividad a 55 °C, con valores de Vo prácticamente nulos. La variante N212A/S238Y, aunque también sufrió una disminución a temperaturas

elevadas, mantuvo niveles de actividad superiores a los de I208V/N212A. Adicionalmente, en condiciones de temperatura elevada, se observa un comportamiento enzimático condicionado por el balance entre estabilidad y flexibilidad funcional. Esto ya ha sido subrayado en variantes de Thermo-PETase, donde se reporta que dichas enzimas logran mantenerse activas a temperaturas altas, y funcionan eficientemente debido a que su rigidez dinámica se ajusta al sustrato PET en estas condiciones térmicas **(Liu et al., 2023).**

CAPITULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se demostró que la ingeniería de variantes mutantes de la enzima IsPETasa es una estrategia efectiva para mejorar su capacidad catalítica y estabilidad térmica, en la cual las tres variantes dobles estudiadas fueron expresadas y purificadas con éxito, el uso del sistema de expresión heterólogo en *E. coli* Rosetta (DE3), junto con plásmidos pET21b (+) optimizados y la inducción con IPTG, permitió obtener biomasa suficiente y proteínas de alta pureza para la caracterización cinética. Los resultados mostraron que las combinaciones de mutaciones afectaron de manera diferencial la expresión y estabilidad de las proteínas, observándose que la variante I208V/N212A presentó el mayor rendimiento de biomasa, mientras que la variante I208V/S238Y alcanzó la mayor concentración de proteína purificada. lo que permitió caracterizar de forma precisa sus parámetros cinéticos.

- Las modificaciones en la secuencia de aminoácidos no solo impactan la actividad catalítica, sino también los niveles de expresión y la estabilidad estructural de las enzimas recombinantes. Además, la eficacia del protocolo de purificación mediante cromatografía de afinidad (Ni-NTA) y la validación por SDS-PAGE permitieron obtener muestras de alta calidad para los ensayos cinéticos.

- El análisis cinético detallado mostró que todas las variantes estudiadas siguen la cinética de Michaelis-Menten, lo que demuestra un comportamiento enzimático adecuado. Sin embargo, se observaron diferencias marcadas en la afinidad por el sustrato y en la actividad máxima alcanzada, este hallazgo es especialmente relevante porque en aplicaciones industriales de degradación de PET, la capacidad de operar a temperaturas más altas es crucial para aumentar la eficiencia global del proceso, ya que el PET se vuelve más amorfo y accesible a temperaturas superiores.

- El uso del sustrato modelo *p*(NP)-acetato demostró ser una herramienta metodológica sumamente efectiva para la caracterización cinética de las variantes de PETasa estudiadas. Aunque el PET es el sustrato objetivo final, su naturaleza sólida y semi cristalina dificulta la obtención de datos cinéticos precisos en ensayos convencionales. permitiendo correlacionar de manera eficiente estos resultados con la potencial actividad sobre PET real.

- Existe una gran relevancia estratégica de la ingeniería de PETasa como herramienta biotecnológica en el contexto de la economía circular del plástico. Los resultados obtenidos no solo evidencian mejoras significativas en la eficiencia y estabilidad de las variantes estudiadas, sino que también abren nuevas perspectivas para su aplicación práctica en la mitigación de la contaminación plástica. La capacidad de la variante I208V/S238Y para mantener actividad catalítica a temperaturas superiores a 35 °C resulta particularmente prometedora para procesos industriales, donde las condiciones de operación suelen requerir enzimas termoestables y robustas. Además, el enfoque utilizado en este trabajo basado en el diseño racional y la evaluación cinética exhaustiva proporciona un marco metodológico aplicable a otras enzimas hidrolasas de interés ambiental.

4.2 Recomendaciones

- Se pueden realizar estudios transcriptómicos, como RNA-Seq o RT-qPCR dirigida, para analizar la expresión global de genes en *E. coli* durante la producción de las variantes de PETasa. Estos análisis permitirían identificar si la sobreexpresión de las enzimas genera respuestas celulares asociadas a estrés, activación de chaperonas o alteraciones en rutas metabólicas relevantes. Además, el análisis comparativo entre cepas que expresan diferentes variantes podría explicar las diferencias observadas en los niveles de expresión proteica y en el rendimiento de biomasa, proporcionando información valiosa para optimizar las condiciones de producción.

- Se pueden complementar estos estudios también con análisis proteómicos, mediante técnicas como LC-MS/MS o SDS-PAGE con análisis densitométrico, para identificar y cuantificar las proteínas expresadas durante la producción enzimática. Este enfoque permitiría detectar la presencia de proteínas mal plegadas, agregados proteicos o cuerpos de inclusión, factores que podrían limitar la actividad enzimática final. Asimismo, el estudio de la expresión de chaperonas naturales o inducidas podría orientar estrategias para mejorar el plegamiento y estabilidad de las variantes de PETasa.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Arcus, V. L., & Mulholland, A. J. (2020). Temperature, Dynamics, and Enzyme-Catalyzed Reaction Rates. *Annual Review of Biophysics*, *49*(Volume 49, 2020), 163–180. https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOPHYS-121219-081520/CITE/REFWORKS

Ashkan, Z., Hemmati, R., Homaei, A., Dineri, A., & Tashakor, A. (2021). Immobilization of enzymes on nanoinorganic support materials: An update. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.127.

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

Ayoub, N., Roth, P., Ucurum, Z., Fotiadis, D., & Hirschi, S. (2023). Structural and biochemical insights into His-tag-induced higher-order oligomerization of membrane proteins by cryo-EM and size exclusion chromatography. *Journal of Structural Biology*, *215*(1), 107924. https://doi.org/10.1016/J.JSB.2022.107924

Bodor, A., Feigl, G., Kolossa, B., Mészáros, E., Laczi, K., Kovács, E., Perei, K., & Rákhely, G. (2024). Soils in distress: The impacts and ecological risks of (micro)plastic pollution in the terrestrial environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *269*, 115807. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2023.115807.

Boucher, J., Faure, F., Pompini, O., Plummer, Z., Wieser, O., & Felippe, L. (2020). (Micro) plastic fluxes and stocks in Lake Geneva basin. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.11.037.

Brott, S., Pfaff, L., Schuricht, J., Schwarz, J. N., Böttcher, D., Badenhorst, C. P. S., Wei, R., & Bornscheuer, U. T. (2022). Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation. *Engineering in Life Sciences*, *22*(3–4), 192–203. https://doi.org/10.1002/ELSC.202100105;JOURNAL:JOURNAL:15213846;WGROUP:STRING:PUBLICATION

Burgin, T., Pollard, B. C., Knott, B. C., Mayes, H. B., Crowley, M. F., McGeehan, J. E., Beckham, G. T., & Woodcock, H. L. (2024). The reaction mechanism of the Ideonella sakaiensis PETase enzyme. *Communications Chemistry 2024 7:1*, *7*(1), 1–14. https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x

Carr, C. M., Clarke, D. J., & Dobson, A. D. W. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 571265. https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.571265/XML/NLM

Castro, A. M. de, Carniel, A., Stahelin, D., Chinelatto Junior, L. S., Honorato, H. de A., & de Menezes, S. M. C. (2019). High-fold improvement of assorted post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using Humicola insolens cutinase as a single biocatalyst. *Process Biochemistry*, *81*, 85–91. https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2019.03.006

Cerda-Mejía, L. (2016). Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelero. Universitat de Barcelona.

Chen, Y., Zhang, S., Zhai, Z., Zhang, S., Ma, J., Liang, X., & Li, Q. (2023). Construction of Fusion Protein with Carbohydrate-Binding Module and Leaf-Branch Compost Cutinase to Enhance the Degradation Efficiency of Polyethylene Terephthalate. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(3), 2780. https://doi.org/10.3390/IJMS24032780/S1

Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *69*(8), 2110–2114. https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110.

Davidson, M. G., Furlong, R. A., & McManus, M. C. (2021). Developments in the life cycle assessment of chemical recycling of plastic waste – A review. *Journal of Cleaner Production*, *293*, 126163. https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2021.126163

de Marco, A. (2025). Recent advances in recombinant production of soluble proteins in E. coli. *Microbial Cell Factories*, *24*(1), 21. https://doi.org/10.1186/S12934-025-02646-8/METRICS

Deay, D., Seibold, S., Battaile, K., Lovell, S., Ritcher, M., & Petillo, P. (2022). Improving the kinetic parameters of nicotine oxidizing enzymes by homologous structure comparison and rational design. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109122.

Dermit, M., & Mardakheh, F. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, *2*(2).

Duan, S., Zhang, N., Chao, T., Wu, Y., & Wang, M. (2023). The structural and molecular mechanisms of type II PETases: a mini review. Springer Nature. doi:https://doi.org/10.1007/s10529-023-03418-3.

Endocrine Society. (2020). Plastics, EDCs & Health. IPEN.

Eugenio, E. de Q., Campisano, I. S. P., Dias, A. G., Castro, A. M. de, Coelho, M. A. Z., & Langone, M. A. P. (2022). Novel efficient enzymatic synthesis of the key- reaction intermediate of PET depolymerization, mono(2-hydroxyethyl terephthalate) – MHET. *Journal of Biotechnology*, *358*. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2022.08.019.

Fatima, K., Naqvi, F., & Younas, H. (2021). A Review: Molecular Chaperone-mediated Folding, Unfolding and Disaggregation of Expressed Recombinant Proteins. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *79*(2), 153–174. https://doi.org/10.1007/S12013-021-00970-5.

Filella, M. (2020). Antimony and PET bottles: Checking facts. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127732.

García-Meseguer, R., Ortí, E., Tuñón, I., Ruiz-Pernía, J. J., & Aragó, J. (2023). Insights into the Enhancement of the Poly(ethylene terephthalate) Degradation by FAST-PETase from Computational Modeling. *Journal of the American Chemical Society*, *145*(35), 19243–19255. https://doi.org/10.1021/JACS.3C04427/ASSET/IMAGES/LARGE/JA3C04427_0006.JPEG

Gavilanes, V. M., & García, M. (2023). Construcción de las variantes mutantes I208V/N212A, I208V/S238Y y N212A/S238Y de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/39262

Heyde, S., Arnling, J., Westh, P., Norholm, M., & Jensen, K. (2021). Surface display as a functional screening platform for detecting enzymes active on PET. Springer Nature. doi:https://doi.org/10.1186/s12934-021-01582-7.

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 2018 9:1*, *9*(1), 1–12. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1

Kumar, R., Sadeghi, K., Jang, J., & Seo, J. (2023). Mechanical, chemical, and bio-recycling of biodegradable plastics: A review. *Science of The Total Environment*, *882*, 163446. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.163446

Kunz, C., & Lönnerdal, B. (1989). Human milk proteins: separation of whey proteins and their analysis by polyacrylamide gel electrophoresis, fast protein liquid chromatography (FPLC) gel filtration, and anion-exchange chromatography. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *49*(3), 464–470. https://doi.org/10.1093/ajcn/49.3.464

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, 457. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141230

Lalwani, M. A., Ip, S. S., Carrasco-López, C., Day, C., Zhao, E. M., Kawabe, H., & Avalos, J. L. (2021). Optogenetic control of the lac operon for bacterial chemical and protein production. *Nature Chemical Biology*, *17*(1), 71–79. https://doi.org/10.1038/S41589-020-0639

Lankone, R. S., Deline, A. R., Barclay, M., & Fairbrother, D. H. (2020). UV–Vis quantification of hydroxyl radical concentration and dose using principal component analysis. *Talanta*, *218*, 121148. https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121148.

Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. (2019). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from Ideonella sakaiensis. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.148.

Liu, F., Wang, T., Yang, W., Zhang, Y., Gong, Y., Fan, X., Wang, G., Lu, Z., & Wang, J. (2023). Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *11*, 1263996. https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1263996/XML/NLM

Liu, M., Li, Z., Huang, J., Yan, J., Zhao, G., & Zhang, Y. (2024). OptoLacI: optogenetically engineered lactose operon repressor LacI responsive to light instead of IPTG. *Nucleic Acids Research*, *52*(13), 8003–8016. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAE479

Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., Acosta, D. J., Alexander, B. R., Cole, H. O., Zhang, Y., Lynd, N. A., Ellington, A. D., & Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature 2022 604:7907*, *604*(7907), 662–667. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z

Ma, Y., Yao, M., Li, B., Ding, M., He, B., Chen, S., … Yuan, Y. (2018). Enhanced Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase Activity by Protein Engineering. *Engineering.* doi:10.1016/j.eng.2018.09.007

Martino , A., Sanyé, E., & Sala, S. (2022). Modeling the EU plastic footprint: Exploring data sources and littering potential. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2021.106086.

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*, 667–676. https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.03.058

Miao, R., Xu, G., Ding, Y., Ding, Z., Woodard, J., Tu, T., Luo, H., Wu, N., Yao, B., Guan, F., & Tian, J. (2024). Engineering dual-functional and thermophilic BMHETase for efficient degradation of polyethylene terephthalate. *Bioresource Technology*, *414*, 131556. https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2024.131556

Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P., & Levin, D. (2020). *Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics.* Frontiers. doi:https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709

Nisticò, R. (2020). Polyethylene terephthalate (PET) in the packaging industry. *Polymer Testing*, *90*, 106707. https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106707

Plastics Europe (2024). An analysis of European plastics production – the fast Facts 2024.

Pirillo, V., Pollegioni, L., & Molla, G. (2021). Analytical methods for the investigation of enzyme-catalyzed degradation of polyethylene terephthalate. *FEBS Journal*, *288*(16), 4730–4745. https://doi.org/10.1111/FEBS.15850;SUBPAGE:STRING:FULL

Rapp, C., & Nidetzky, B. (2022). Hydride Transfer Mechanism of Enzymatic Sugar Nucleotide C2 Epimerization Probed with a Loose-Fit CDP-Glucose Substrate. *ACS Catalysis*, *12*, 6816–6830. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.2C00257/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CS2C00257_M009.GIF

Rajacharya, G. H., Sharma, A., & Yazdani, S. S. (2024). Proteomics and metabolic burden analysis to understand the impact of recombinant protein production in E. coli. *Scientific Reports*, *14*(1), 1–15.https://doi.org/10.1038/S41598-024-63148.

Rodrigues, M., Abrantes, N., Gonçalves, F., Nogueira, H., Marques, J., & Gonçalves, A. (2019). Impacts of plastic products used in daily life on the environment and human health: What is known? ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103239.

Schuster, L. A., & Reisch, C. R. (2021). A plasmid toolbox for controlled gene expression across the Proteobacteria. *Nucleic Acids Research*, *49*(12), 7189–7202. https://doi.org/10.1093/NAR/GKAB496

Schyns, Z. O., Shaver, M. P., G Schyns, Z. O., & Shaver, M. P. (2021). Mechanical Recycling of Packaging Plastics: A Review. *Macromolecular Rapid Communications*, *42*(3), 2000415. https://doi.org/10.1002/MARC.202000415

Sevilla, M. E., & Cerda-Mejía, L. (2022). *Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36572

Sevilla, M.E.; Garcia, M.D.; Perez-Castillo, Y.; Armijos-Jaramillo, V.; Casado, S.; Vizuete, K.; Debut, A.; Cerda-Mejía, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered Ideonella sakaiensis PETase. Polymers 2023, 15, 1779. https://doi.org/10.3390/ polym15071779

Stockinger, P., Niederhauser, C., Farnaud, S., & Buller, R. (2025). Computational analysis reveals temperature-induced stabilization of FAST-PETase. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *27*, 969. https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2025.03.006

Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. ACS Catalysis. doi:http://dx.doi.org/10.1021/acscatal.8b05171.

Tsuboi, S., Yamamoto, K., Takada, A., Yonemura, S., Takada, Y., & Hiroko, K. (2022). Selection of p-nitrophenyl fatty acid substrate suitable for detecting changes in soil esterase activity associated with degradation of biodegradable polyester mulch films: A field trial. Italian Journal. doi:https://doi.org/10.4081/ija.2022.2040.

United Nations Environment Programme (2022). Circular Solutions for Plastic Pollution: Community-based Plastic Credit Solution – A Holistic Attempt to Make Coastlines Plastic-free. https://wedocs.unep.org/20.500.11822/41082

Wandrey, G., Bier, C., Binder, D., Hoffmann, K., Jaeger, K. E., Pietruszka, J., Drepper, T., & Büchs, J. (2016). Light-induced gene expression with photocaged IPTG for induction profiling in a high-

throughput screening system. *Microbial Cell Factories*, *15*(1), 1–16. https://doi.org/10.1186/S12934-016-0461

Xu, S., Huo, C., & Chu, X. (2024). Unraveling the Interplay between Stability and Flexibility in the Design of Polyethylene Terephthalate (PET) Hydrolases. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *64*(19), 7576–7589. https://doi.org/10.1021/ACS.JCIM.4C00877

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). Chapter Nine - Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. ScienceDirect. doi:https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007.

Zeng, W., Li, X., Yang, Y., Min, J., Huang, J. W., Liu, W., Niu, D., Yang, X., Han, X., Zhang, L., Dai, L., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2022). Substrate-Binding Mode of a Thermophilic PET Hydrolase and Engineering the Enzyme to Enhance the Hydrolytic Efficacy. *ACS Catalysis*, *12*(5), 3033–3040. https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.1C05800/SUPPL_FILE/CS1C05800_SI_001.PDF