



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Diseño de la variante mutante N233K 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.

Autor: Julio Jaker Orellana Cordova

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Julio - 2026

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 ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 4 de junio de 2026

Dr. Mario Daniel García Solís

11XXXXXXX71

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Julio Jaker Orellana Cordova, 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.



Julio Jaker Orellana Cordova

07XXXXXX81

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga uso 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.



Julio Jaker Orellana Cordova

07XXXXXX81

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:

Presidente del Tribunal

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

17XXXXXX59

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

18XXXXXX72

Ambato, 19 de junio de 2026

DEDICATORIA

A Dios, por darme fuerzas en los momentos más difíciles y ser una luz de esperanza en medio de toda la oscuridad que pude haber enfrentado.

A mis padres y hermanos, por estar siempre a mi lado, darme el aliento necesario para seguir adelante y enseñarme que, muchas veces, la vida no se trata de una competencia, sino de constancia.

A mí mismo, por nunca rendirme y entregar mi esfuerzo, tiempo y lágrimas en cada paso de este camino, sabiendo que lo logré con perseverancia y dedicación.

A mis amigos, por su compañía, sus palabras de ánimo y por hacer más llevadero este recorrido. Su amistad fue un apoyo invaluable a lo largo de todo este proceso.

A mi abuelita Elvia, porque sé que en este momento serías la persona más feliz por mí. Gracias por haberme enseñado a tratar a los demás con amor y cariño; este logro también es tuyo.

A mi abuelita Elsa, quien siempre me demostró que hay que afrontar todo con carácter y fortaleza. Sé que también estarías orgullosa de mí.

A mi primo Xavier, quien tuvo que partir demasiado joven. Estoy seguro de que estarías muy feliz al saber que estoy cumpliendo una meta más en mi vida. Me gusta pensar que los tres están en un lugar mejor, en paz y tranquilos.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a la vida, por traerme hasta donde estoy ahora.

Agradezco a mis padres Liliana y Julio que han sido un pilar fundamental en mi vida y siempre han estado para mí apoyándome y brindándome todo su amor y cariño, además de aconsejarme y forjar la persona que soy.

Agradezco a mis hermanos Isan y Juliana por enseñarme que la familia siempre permanece y que a pesar de las dificultades debemos seguir con nuestros objetivos y metas.

Agradezco a mi familia por siempre apoyarme y alentarme a seguir adelante sin importar la distancia.

Agradezco a mi tutor de tesis Dr. Mario García por guiarme, tenerme paciencia y enseñarme que la docencia no se trata solo de formar profesionales si no buenas personas.

Agradezco a mis mejores amigos Marco, Francisco, Joel y Andrés por nunca dejarme solo y ser un apoyo incondicional. A Jackson y Henry que a pesar de la distancia también estuvieron presentes cuando los necesite.

Agradezco a todos mis amigos que me acompañaron en este proceso Javier, Ulises, Luis, Danny, Andy, Patricio y Erick, por los innumerables momentos compartidos y enseñarme que la carrera no se trata solo de estudiar, sino también de aprender a disfrutar el camino

Agradezco a Nicole, por haberme acompañado gran parte de este trayecto, por su apoyo incondicional en los momentos más difíciles y por haber creído siempre en mí, haciendo este camino mucho más llevadero.

Agradezco a todos los docentes que a lo largo de este camino pusieron un granito de arena más allá de la enseñanza si no de la vida.

A todas las personas que formaron parte de esta etapa. Tengan la certeza de que siempre estarán presentes en mí a lo largo de mi vida.

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	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN EJECUTIVO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos.....	1
1.1.2. Contaminación Ambiental por polímeros plásticos	2
1.1.2.1. Toxicidad química y liberación de aditivos	3
1.1.2.2. Micro plásticos y riesgos para la salud humana.....	3
1.1.3. Descubrimiento y caracterización inicial de la enzima <i>IsPETasa</i>	4
1.1.3.1. Estructura molecular y tríada catalítica.....	4
1.1.3.2. Ciclo Catalítico: Acilación y Desacilación	6
1.1.3.3. Limitaciones Críticas para Aplicación Industrial.....	8
1.1.4. Diseño Racional de Variantes Termoestables por IA	8
1.1.4.1. Sustitución N233K en <i>IsPETasa</i>	9
1.1.4.2. Propiedades y estabilidad de la mutante N233K	10
1.1.4.3. Estabilidad conformacional y el rol del puente salino N233K-E204	11

1.1.4.4.	Reducción de la barrera energética y cinética de activación	11
1.1.4.5.	Sinergia entre la termo estabilidad y la transición vítrea del PET	12
1.1.5.	Viabilidad industrial y escalabilidad biotecnológica de la variante N233K	12
1.2.	OBJETIVOS	13
1.2.1.	Objetivo General.....	13
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		14
2.1.	Materiales	14
2.2.	Métodos.....	15
2.2.1.	Construcción de la variante mutante N233K de la enzima PETasa de <i>I.sakaiensis</i>	15
2.2.1.2.	Obtención de la variante N233K	15
2.2.1.3.	Transformación de células competentes <i>Escherichia coli</i> DH5 α	16
2.2.1.4.	Extracción del ADN plasmídico	16
2.2.1.5.	Transformación de células competentes <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Rosetta.....	16
2.2.1.6.	Expresión de la variante N233K de <i>Is</i> PETasa	17
2.2.2.	Aislamiento de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad	17
2.2.2.1.	Lisis celular.....	17
2.2.2.2.	Purificación de la proteína.....	17
2.2.3.	Evaluación de la eficiencia de degradación sobre el PET.....	18
2.2.3.1.	Ensayo de degradación del PET	18
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		19
3.1.	Análisis y discusión de los resultados	19
3.1.1.	Diseño de la variante mutante <i>Is</i> PETasa N233K.....	19
3.1.1.1.	Análisis Estructural de la Mutación Puntual en la Posición 233	19
3.1.1.2.	Estrategia de clonación In Silico y Selección del Vector pET-30a(+).	21

3.1.2. Aislamiento de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad	24
3.1.2.1. Evaluación del perfil de elución hidrodinámica en FPLC-IMAC	24
3.1.2.2. Purificación de las fracciones por filtración en gel	25
3.1.2.3. Verificación de pureza e identidad molecular por SDS-PAGE.....	27
3.1.2.4. Rendimiento operativo de la purificación	30
3.1.3. Evaluación de la eficiencia de degradación de la variante N233K de la enzima PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i> sobre el PET.	31
3.1.3.1. Interpretación de datos gravimétricos sobre la degradación de PET.....	31
3.1.3.2. Análisis comparativo de la línea de desarrollo acumulativa de variantes	32
3.1.3.3. Comparación con <i>IsPETase</i> MT	34
3.1.3.4. Comparación con FAST-PETase	35
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	36
4.1. Conclusiones	36
4.2. Recomendaciones	37
BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes estructurales claves de la IsPETasa y sus funciones catalíticas.	6
Tabla 2. Lista de reactivos, Materiales fungibles y Equipos utilizados en el proyecto de investigación.....	14
Tabla 3. Rendimiento operativo de la purificación de la variante IsPETasa N233K	30
Tabla 4. Registro gravimétrico de la pérdida de masa y eficiencia de degradación de películas de PET por la variante IsPETasa N233K.....	31

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Arquitectura tridimensional del sitio activo de la Is PETasa y posicionamiento distal del sitio de mutación	5
Figura 2. Mecanismo químico del ciclo catalítico de acilación y desacilación en la IsPETasa	7
Figura 3. Comparación estructural entre la enzima silvestre y la variante FAST-PETase destacando el puente salino en N233K.	9
Figura 4. Esquema de mutación puntual en la posición 233 de la enzima IsPETase.	19
Figura 5. Mapa de restricción y elementos regulatorios del vector recombinante pET-30a(+)-IsPETase(N233K).	22
Figura 6. Perfil cromatográfico FPLC-IMAC de variante IsPETasa N233K	25
Figura 7. Perfil de concentración proteica post-filtración en gel de la variante IsPETasa N233K determinado en NanoDrop 2000.	27
Figura 8. Perfil electroforético SDS-PAGE (12%) del proceso secuencial de purificación de la variante IsPETasa N233K	28
Figura 9. Control de calidad electroforético del pool enzimático final de la variante IsPETasa N233K	29
Figura 10. Evaluación comparativa de la eficiencia de degradación de PET a lo largo de la línea evolutiva de variantes mutantes.	33

RESUMEN EJECUTIVO

El incremento exponencial de residuos de tereftalato de polietileno representa una severa crisis ambiental global, demandando alternativas biotecnológicas eficientes. El presente trabajo evalúa el impacto de la mutación puntual N233K sobre la variante M5 de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Esta modificación busca rigidizar un bucle superficial flexible mediante un puente salino intramolecular para aumentar la estabilidad térmica del biocatalizador, ofreciendo una ruta verde y sostenible alineada con la economía circular. Metodológicamente, el gen mutante se expresó en *Escherichia coli* Rosetta (DE3), obteniendo 2,09 gramos de biomasa húmeda en 550 mililitros de medio LB. Tras la lisis por sonicación, la proteína recombinante se aisló mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC-FPLC) con un volumen de elución bruto de 15 mililitros. Posteriormente, el pool se purificó y desaló mediante exclusión molecular por gravedad en un volumen final de 2 mililitros. La cuantificación analítica se realizó en un espectrofotómetro aplicando un coeficiente de extinción de masa específico corregido de 1,239 litros por gramo centímetro. En conclusión, el proceso consolidó una masa neta real de 5,745 miligramos de enzima pura, lo que equivale a un rendimiento global de 7,74 por ciento y una productividad volumétrica final de 11,490 miligramos por litro de cultivo. Los ensayos gravimétricos a 50 grados Celsius por 72 horas confirmaron una pérdida de masa promedio de 10,87 por ciento en las películas de plástico, validando que la sustitución confiere de forma autónoma la termoestabilidad necesaria para catalizar la hidrólisis de PET real.

Palabras clave: PETasa, N233K, *Ideonella sakaiensis*, termoestabilidad, degradación enzimática, IMAC.

ABSTRACT

The exponential increase in polyethylene terephthalate waste represents a severe global environmental crisis, demanding efficient biotechnological alternatives. This work evaluates the impact of the N233K point mutation on the M5 variant of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme. This modification aims to rigidify a flexible surface loop through an intramolecular salt bridge to increase the thermal stability of the biocatalyst, offering a green and sustainable pathway aligned with the circular economy. Methodologically, the mutant gene was expressed in *Escherichia coli* Rosetta (DE3), yielding 2.09 grams of wet biomass in 550 milliliters of LB medium. After cell lysis by sonication, the recombinant protein was isolated using immobilized metal affinity chromatography (IMAC-FPLC) with a gross elution volume of 15 milliliters. Subsequently, the pool was purified and desalinated by gravity size-exclusion chromatography into a final volume of 2 milliliters. Analytical quantification was performed on a spectrophotometer applying a corrected mass-specific extinction coefficient of 1.239 liters per gram centimeter. In conclusion, the process consolidated a real net mass of 5.745 milligrams of pure enzyme, which is equivalent to an overall yield of 7.74 percent and a final volumetric productivity of 11.490 milligrams per liter of culture. Gravimetric assays at 50 degrees Celsius for 72 hours confirmed an average mass loss of 10.87 percent in the plastic films, validating that the substitution autonomously confers the necessary thermostability to catalyze the hydrolysis of real PET.

Keywords: PETase, N233K, *Ideonella sakaiensis*, thermostability, enzymatic degradation, IMAC.

CAPÍTULO I.-MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1. Justificación del problema

A nivel mundial, la contaminación por plásticos (polímeros sintéticos orgánicos) es uno de los problemas ambientales más significativos actualmente. En este escenario, el polímero mayormente utilizado para la elaboración de fibras textiles y material de empaque de alimentos es el polietileno tereftalato (PET), el cual se caracteriza por tener una alta resistencia a la degradación natural y su gran acumulación en los ecosistemas terrestres y marinos. Este problema se vuelve más crítico por el continuo crecimiento de la producción y consumo de plásticos, considerando que el programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (**PNUMA, 2025**) estima que se producen más de 430 millones de toneladas de plástico al año, de las cuales dos tercios corresponden a productos de vida corta que se convierten rápidamente en residuos. La persistencia de ese material no solo afecta a la biodiversidad física, sino que su fragmentación en macro y micro plásticos ha sido vinculada con riesgos graves para la salud pública, detectándose partículas en tejidos humanos y relacionándose con estrés oxidativo y disrupción endocrina. Además, la ONU advierte que cada persona puede ingerir más de 50.000 partículas de plástico al año a través de alimentos, agua y aire (**Naciones Unidas, 2025**).

Frente a este escenario, las estrategias convencionales de gestión de residuos plásticos presentan limitaciones estructurales. El reciclaje mecánico degrada progresivamente las propiedades físicas del polímero con cada ciclo de reprocesamiento, limitando el número de veces que el material puede recuperarse. En este sentido, el descubrimiento de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* en 2016 ha revolucionado la industria del reciclaje del plástico por su capacidad de hidrolizar PET a temperatura ambiente (**Yoshida et al., 2016**). Sin embargo, su aplicación industrial aún presenta varias limitaciones debido a su baja termoestabilidad y relativamente lenta cinética de reacción.

Estudios recientes han demostrado que la ingeniería de proteínas, particularmente a través de aprendizaje automático, puede superar estas barreras termodinámicas. **Lu et al. (2022)** identificaron que la mutación N233K es crítica para estabilizar la estructura de la enzima, permitiendo el desarrollo de la variante Functional, Active, Stable, and Tolerant PETase, “FAST-

PETase”, la cual es capaz de operar eficientemente a temperaturas de 50 °C y degradar 51 tipos de productos comerciales diferentes elaborados de PET post-consumo en tiempos récord.

El análisis estructural comparativo entre la enzima silvestre y la variante FAST-PETase revela mecanismos críticos de estabilización térmica. La sustitución de asparagina por lisina permite la formación inmediata de un puente salino intramolecular fuerte y directo con el glutamato adyacente (E204), que posee carga negativa. La formación de este enlace K233-E204 es fundamental para la funcionalidad de la enzima, ya que actúa como un “broche” molecular que conecta y estabiliza una región de bucle superficial que, en su estado original, era flexible y vulnerable al calor. Al rigidificar esta zona crítica, la mutación N233K previene el desorden estructural, contribuyendo significativamente a que la FAST-PETase mantenga su actividad catalítica eficiente a temperaturas de 50 °C sin sufrir desnaturalización (Lu et al., 2022).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, el presente proyecto pretende evaluar el efecto de la variante N233K sobre la arquitectura del mutante M5 de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*, desarrollada en la Universidad Técnica de Ambato. De esta manera, se contribuirá al desarrollo de tecnologías de biorremediación, validando una herramienta biotecnológica capaz de transformar los residuos plásticos en monómeros de valor agregado, alineándose con las últimas tendencias de reciclaje enzimático que han logrado despolimerización casi completa de PET a condiciones industriales (Cui et al., 2021, 2024).

1.1.2. Contaminación Ambiental por polímeros plásticos

Desde mediados del siglo XX, la producción acumulada de plásticos ha alcanzado aproximadamente 8.300 millones de toneladas métricas, de las cuales el 79% ha terminado en vertederos o en el ambiente natural, el 12% fue incinerado y apenas el 9% fue reciclado (Geyer et al., 2017). Este patrón de acumulación no muestra señales de reversión: según las proyecciones actuales, si no cambian las tasas de producción y gestión de residuos, para el 2040 el mundo generará cerca de 280 millones de toneladas anuales de desechos plásticos (Pew Charitable Trusts, 2025).

El PET representa una fracción significativa de este flujo, con una producción aproximada de 82 millones de toneladas anuales. Su durabilidad conferida por una temperatura de transición vítrea

de 65-70 °C y una temperatura de fusión de 260 °C garantiza su presencia ambiental durante cientos de años (**Plastics Europe, 2025**),

1.1.2.1. Toxicidad química y liberación de aditivos

El impacto ambiental del PET trasciende su dimensión física. Durante su fragmentación progresiva, la matriz polimérica libera tanto monómeros residuales como aditivos incorporados en su formulación, plastificantes, estabilizadores UV y colorantes, muchos de los cuales poseen actividad biológica demostrada. Entre los compuestos de mayor preocupación destacan el bisfenol A (BPA) y los ftalatos, reconocidos como disruptores endocrinos capaces de interferir en los sistemas hormonal y reproductivo en organismos expuestos (**Landrigan et al., 2018**). A diferencia del polímero intacto, estos compuestos liberados presentan mayor reactividad química, facilidad de bioacumulación en tejidos grasos y capacidad de amplificación a través de las cadenas tróficas, lo que incrementa su riesgo ecológico con el tiempo.

Los océanos actúan como el receptor final de gran parte de los residuos plásticos generados en tierra. Se estima que entre 4.8 y 12.7 millones de toneladas de plástico ingresan al ambiente marino anualmente desde fuentes terrestres, principalmente a través de ríos y sistemas de drenaje urbano (**Jambeck et al., 2015**). Una vez en el entorno marino, los fragmentos de PET y otros polímeros son ingeridos por fauna silvestre que los confunde con presas naturales, dado que su densidad y tamaño pueden asemejarse al plancton o pequeños peces.

Un modelo de evaluación de riesgo cuantitativo publicado recientemente establece que la mortalidad por ingestión de macroplásticos afecta de forma desproporcionada a aves marinas, tortugas y mamíferos, con estimaciones de exposición que alcanza el 35%, 47% y 12% respectivamente en cada grupo taxonómico (**Murphy et al., 2025**). Las consecuencias fisiológicas documentadas incluyen obstrucción gastrointestinal, desnutrición por saciedad falsa y alteraciones endocrinas, que en casos severos resultan en la muerte animal.

1.1.2.2. Micro plásticos y riesgos para la salud humana

La fragmentación mecánica, fotoquímica y biológica del PET genera partículas de tamaño micro y nanométrico que penetran la totalidad de los compartimientos ambientales. La exposición humana ocurre por múltiples vías simultáneas: la vía alimentaria mediante la inhalación de fibras textiles sintéticas en suspensión; y la vía dérmica a través de productos cosméticos con

microesferas plásticas. La evidencia de acumulación sistemática en el organismo humano es creciente. **Leslie et al. (2022)** detectaron partículas plásticas en el 80% de las muestras de sangre analizadas, mientras que **Ragusa et al. (2021)** documentaron por primera vez la presencia de microplásticos en tejido placentario, confirmando la capacidad de estas partículas de atravesar barreras biológicas y alcanzar tejidos fetales. Adicionalmente, la Organización De Naciones Unidas estima que cada persona ingiere más de 50.000 partículas de plástico al año a través de alimentos, agua y aire. “El 92% del agua embotellada contiene micro plásticos, con ingesta humana superior a 50 000 partículas anuales, equivalente a 5 g/semana o una tarjeta de crédito” (**WWF, 2019**).

Desde el punto de vista toxicológico **Koelmans et al. (2019)** advierten que los efectos combinados de partículas físicas y los aditivos que liberan particularmente BPA y ftalatos constituyen una amenaza sanitaria emergente que demanda investigación urgente, dado la evidencia epidemiológica disponible sobre disrupción endocrina, inflamación crónica y riesgo reproductivo aún muestra resultados heterogéneos (**Kovacs et al., 2025; Lü et al., 2024**).

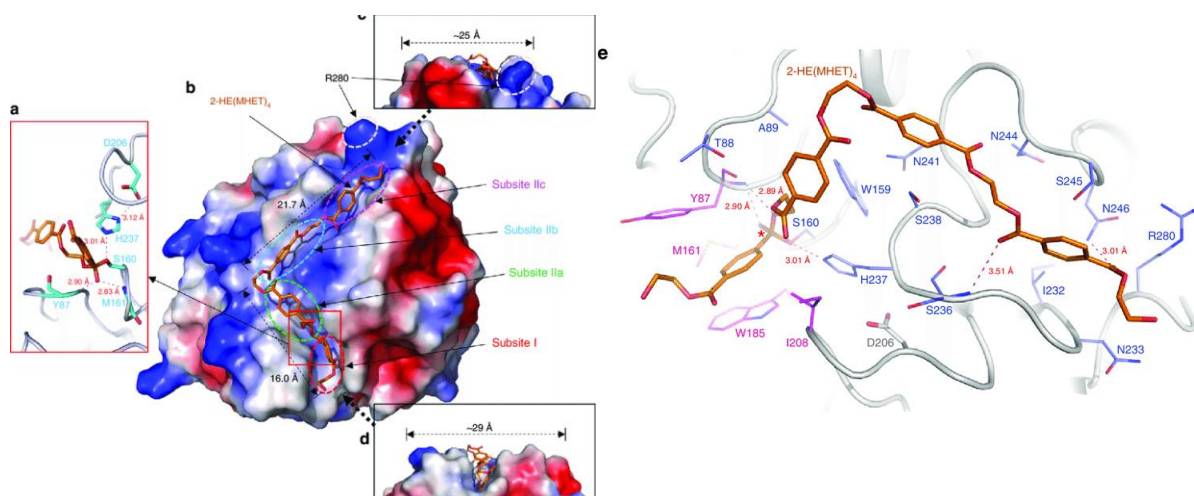
1.1.3. Descubrimiento y caracterización inicial de la enzima *IsPETasa*

La posibilidad de una solución biológica al problema del PET se materializó en 2016 con el aislamiento de *Ideonella sakaiensis* 201-F6 en un sitio de acopio de residuos plásticos en Japón. Esta bacteria había desarrollado, a través de presión evolutiva, un sistema enzimático de dos componentes capaz de utilizar el PET como fuente de carbono y energía: *IsPETasa*, que hidroliza el polímero hasta mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), y *MHETasa*, que completa la degradación hasta los monómeros constituyentes ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) (**Yoshida et al., 2016**). La caracterización cristalográfica de *IsPETasa* (estructuras PDB: 5YFE, 5YNS) reveló una arquitectura α/β hidrolasa con una característica inusual: el sitio activo se ubica en una hendidura superficial abierta y accesible, a diferencia de las cutinasas intracelulares que presentan cavidades más profundas y cerradas. Esta geometría superficial es la que permite a la enzima atacar directamente la superficie sólida de los filmes de PET (**Han et al., 2017; Liu et al., 2018**).

1.1.3.1. Estructura molecular y tríada catalítica

El centro activo de *IsPETasa* contiene la tríada catalítica conservada $Ser^{160} - His^{237} - Asp^{206}$, característica de las serinas hidrolasas. Estos tres residuos forman un sistema de transferencia de protones concertado que activa el grupo hidroxilo de la serina para el ataque nucleofílico sobre el enlace éster del PET. La tríada está flanqueada por un surco hidrofóbico formado por los residuos $Tyr^{58} - Trp^{156} - Trp^{185}$, que facilita el acoplamiento y orientación de los anillos aromáticos del tereftalato durante la unión del sustrato. Adicionalmente, un bucle ω (residuos 205-211) y una región helicoidal *lid*- α 1 regulan la apertura del sitio activo y el posicionamiento óptimo del polímero para la catálisis (Han et al., 2017; Joo et al., 2018).

Figura 1. Arquitectura tridimensional del sitio activo de la *Is PETasa* y posicionamiento distal del sitio de mutación



Nota. Vista de la estructura cristatográfica de la enzima silvestre. Se resalta la organización espacial de la tríada catalítica central ($Ser^{160} - His^{237} - Asp^{206}$), los residuos aromáticos del surco de unión al sustrato y la ubicación periférica de la asparagina original en la posición 233, localizada en un lazo superficial expuesto al solvente. Adaptado de "Perspectives on the Role of Enzymatic Biocatalysis for the Degradation of Plastic PET", por Magalhães et al. (2021), International Journal of Molecular Sciences, 22(20), p. 11257.

Lo que distingue estructuralmente a *IsPETasa* de otras hidrolasas es la posición del residuo Asn^{233} , ubicado en un bucle periférico flexible a aproximadamente 12 Å del sitio activo. En la enzima silvestre, la asparagina en esa posición no establece interacciones estabilizadoras fuertes, lo que confiere alta movilidad conformacional a esa región del bucle. Esa flexibilidad, beneficiosa a 30 °C, se convierte en una vulnerabilidad a temperaturas superiores: el bucle colapsa y arrastra consigo la geometría del sitio activo (García-Meseguer et al., 2023; Lu et al., 2022).

Tabla 1. Componentes estructurales claves de la *IsPETasa* y sus funciones catalíticas.

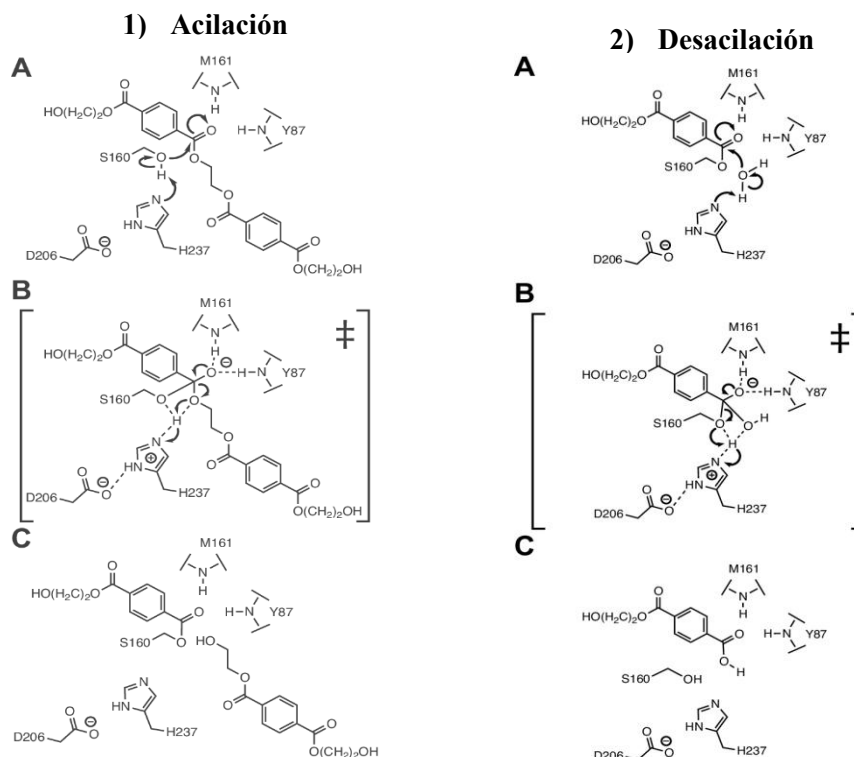
Elemento estructural	Residuos Clave	Función en <i>IsPETasa</i> WT	Efecto de la mutación N233K
Surco hidrofóbico	$Tyr^{58} - Trp^{156} - Trp^{185}$	Acoplamiento hidrofóbico y anclaje de anillos aromáticos del PET	Sin efecto directo debido a que N233K actúa a distancia del sitio de unión
Bucle $\beta 6 - \beta 7$ (región 225-235)	Asn^{233} (WT)/ Lys^{233} (N233K)	Alta flexibilidad conformacional/vulnerable al calor	Rigidización mediante puente salino K233-E204
Tríada catalítica	$Ser^{160} - His^{237} - Asp^{206}$	Acilación y desacilación del sustrato	N233K mejora el carácter básico de Asp^{206} indirectamente, reduciendo $\Delta G^\ddagger$ de 16.5 a 12.1 kcal/mol
Agujero de oxianión	$Tyr^{87} - Met^{161}$	Estabilización del intermediario tetraédrico	Sin efecto directo
Bucle ω	Residuos 205-211	Posicionamiento del polímero para hidrólisis	Sin modificación estructural

Nota. Esta geometría superficial distintiva es la que diferencia a la *IsPETasa* de las cutinasas internas, permitiendo la degradación eficiente de polímeros cristalinos. La información sobre efecto de N233K es basada en **García-Meseguer et al. (2023)** y **Lu et al. (2022)**

1.1.3.2. Ciclo Catalítico: Acilación y Desacilación

La despolimerización enzimática del PET catalizada por la *IsPETasa* sigue un mecanismo bifásico característico de las serinas hidrolasas. Este proceso se compone de cuatro etapas elementales organizadas en dos fases principales: acilación y desacilación. El flujo de transferencia electrónica y la formación de los estados de transición de este ciclo se detallan esquemáticamente en la **Figura 2**.

Figura 2. Mecanismo químico del ciclo catalítico de acilación y desacilación en la *IsPETasa*



Nota. Ciclo catalítico integrado de la enzima *IsPETasa*. Acilación (A–C): Complejo de Michaelis inicial (A), primer estado de transición tetraédrico ($TS_1^\ddagger$) con estabilización en el hueco de oxanión (B) y formación del intermediario covalente acil-enzima (C). Desacilación (D–F): Activación de una molécula de agua por la His^{237} (D), segundo estado de transición tetraédrico ($TS_2^\ddagger$) (E) y liberación final del monómero soluble con regeneración de la tríada libre (F). Adaptado de The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme, por T. Burgin et al., 2024, Communications Chemistry, 7(1) (**Burgin et al., 2024**).

La primera fase, correspondiente a la acilación, se inicia cuando el residuo de Ser^{160} experimenta un incremento drástico en su capacidad nucleofílica. Esto ocurre mediante una transferencia de protones concertada a través de la His^{237} y el Asp^{206} , que actúan como base general. Una vez

activada, la *Ser*¹⁶⁰ ejecuta un ataque nucleofílico directo sobre el carbono del grupo carbonilo C=O del enlace éster del PET, dando lugar a un intermediario tetraédrico transitorio. Este estado de transición es estabilizado electrostáticamente en el agujero de oxianión por los nitrógenos de la cadena principal de la *Tyr*⁸⁷ y la *Met*¹⁶¹. Al colapsar este intermediario, se rompe el enlace covalente C–O de la cadena polimérica, lo que provoca la liberación de un fragmento con un extremo alcohol primario y la formación de un complejo covalente acil-enzima.

Desde una perspectiva cinética y termodinámica, se ha determinado que esta fase de acilación constituye la etapa limitante de la reacción (rate-limiting step). Debido al alto ordenamiento molecular y la cristalinidad intrínseca de la matriz del PET, el proceso requiere superar una elevada barrera de energía libre de activación ($\Delta G^\ddagger \sim 17.1 \text{ kcal/mol}$), lo que restringe la velocidad global de la hidrólisis (Cui et al., 2024; García-Meseguer et al., 2023).

En la desacilación, una molécula de agua activada por la *His*²³⁷ hidroliza el complejo acil-enzima, liberando el producto principal MHET al medio y regenerando la *Ser*¹⁶⁰ para un nuevo ciclo catalítico. La introducción de la mutante N233K en la variante evaluada en el presente trabajo modifica este equilibrio energético al reorganizar la red de interacciones electrostáticas entorno a la tríada, N233K confiere mayor carácter básico al *Asp*²⁰⁶, lo que fortalece la activación de la *His*²³⁷ y reduce la barrera de activación a 12.1 kcal/mol (García-Meseguer et al., 2023).

1.1.3.3. Limitaciones Críticas para Aplicación Industrial

A pesar de su eficiencia biológica, la *IsPETase* silvestre presenta limitaciones severas para su implementación industrial. La enzima es termolábil, con una temperatura de fusión (T_m) de solo 48.1 °C. Su actividad catalítica declina drásticamente cuando la temperatura supera los 40 °C. Esta inestabilidad es un obstáculo crítico, ya que la degradación industrial del PET requiere temperaturas más elevadas para alcanzar la temperatura de transición vítrea (T_g) del polímero (65-70 °C), punto en el cual las cadenas plásticas son más móviles y accesibles para el ataque enzimático (García-Meseguer et al., 2023).

1.1.4. Diseño Racional de Variantes Termoestables por IA

El salto cualitativo desde las variantes naturales hasta enzimas robustas como la FAST-PETase no se logró mediante la evolución dirigida tradicional, que suele ser un proceso laborioso y aleatorio, sino a través de estrategias de ingeniería de proteínas asistida por aprendizaje automático (Machine

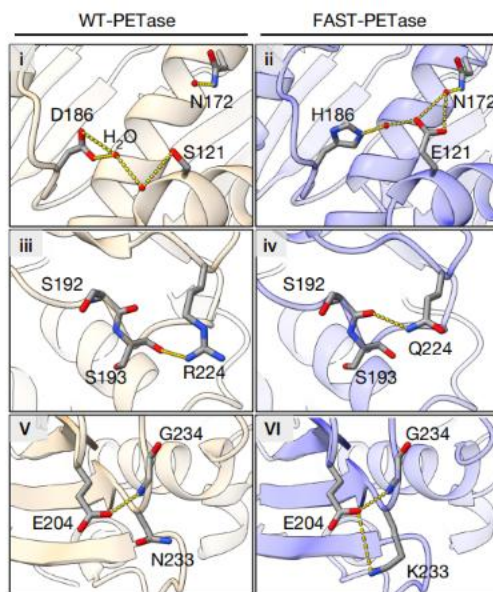
Learning). **Lu et al. (2022)** implementaron una red neuronal convolucional 3D autocurada y mutada (MutantCNA) para predecir qué residuos de aminoácidos, al ser modificados, mejorarían la estabilidad térmica sin comprometer la actividad catalítica. Esta metodología permitió escanear miles de microentornos químicos dentro de la estructura proteica, identificando posiciones que no son intuitivas para un bioquímico humano. El algoritmo predijo que mutaciones distantes del sitio activo, como la N233K, podrían ejercer efectos estabilizadores globales mediante el reordenamiento de las cargas superficiales. Este enfoque basado en datos (Data-driven approach) ha demostrado reducir los tiempos de investigación de años a semanas, permitiendo el diseño de biocatalizadores "a medida" para condiciones industriales específica (**Lu et al., 2022; Tournier et al., 2020**).

1.1.4.1. Sustitución N233K en *IsPETasa*

Para lograr superar la barrera de la termoestabilidad, la investigación actual se ha centrado en el diseño racional y la evolución dirigida de la enzima, utilizando herramientas de inteligencia artificial y aprendizaje automático. Entre las modificaciones más exitosas, destaca la variante conocida como FAST-PETase (Functional, Active, Stable, and Tolerant PETase), la cual incorpora mutaciones puntuales estratégicas, siendo la sustitución N233K (Asparagina por Lisina en la posición 233) un componente determinante para su viabilidad industrial (**Lu et al., 2022**).

A nivel estructural, la sustitución de la asparagina neutra por una lisina de carga positiva en la posición 233 genera una nueva interacción electrostática con el residuo de ácido glutámico en la posición 204 (*Glu*²⁰⁴) como se puede observar en la **figura 3**. Este puente salino intramolecular K233-E204, inexistente en la enzima silvestre, actúa como un ancla molecular que reduce las fluctuaciones conformacionales del bucle adyacente al sitio activo (**Lu et al., 2022**).

Figura 3. *Comparación estructural entre la enzima silvestre y la variante FAST-PETase destacando el puente salino en N233K.*



Nota. La figura ilustra la formación de nuevos enlaces estabilizadores, incluyendo el puente salino Lys233-Glu204 (panel f). Adaptado de "Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization", por **Lu et al., 2022**, Nature, 604(7907), p. 664. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z>.

Esta estabilización estructural tiene un efecto dual: no solo eleva la temperatura de fusión (T_m) de la enzima, sino que también optimiza la interacción electrostática con el sustrato aniónico durante el estado de transición de la catálisis (**García-Meseguer et al., 2023**). Adicionalmente, la mutación N233K trabaja en cooperatividad con otras sustituciones presentes en la FAST-PETase, como S121E y D186H. Estas modificaciones conjuntas fortalecen la red de enlaces de hidrógeno, rigidizando el esqueleto proteico sin comprometer la flexibilidad necesaria del sitio activo para acomodar el polímero (**Bell et al., 2022**).

La sinergia entre la mutación N233K y el resto de las modificaciones estabilizadoras permite que la enzima opere eficientemente a 50 °C, acercándose a la T_g del PET. Esto incrementa la movilidad de las cadenas poliméricas amorfas y facilita su acceso al sitio activo enzimático. Como resultado, esta variante ha demostrado ser capaz de degradar 51 tipos diferentes de productos comerciales de PET post-consumo en tiempos que varían de horas a días, superando en órdenes de magnitud la eficiencia de la enzima silvestre y otras variantes previas como la ThermoPETase (**Cui et al., 2021**).

1.1.4.2. Propiedades y estabilidad de la mutante N233K

Para comprender la trascendencia de la mutación N233K, es imperativo analizar la termodinámica del sustrato. El PET post-consumo posee un alto grado de cristalinidad, donde las cadenas poliméricas están empaquetadas densamente, haciéndolas impermeables a la enzima silvestre que opera a 30 °C. La accesibilidad del sustrato está gobernada por la temperatura de transición vítrea (T_g), que ronda los 65-70 °C (Wei & Zimmermann, 2017).

La innovación crítica de incorporar la lisina en la posición 233 radica en que confiere a la enzima la capacidad de operar a 50 °C. Esta temperatura, inalcanzable para la enzima sin la mutación N233K, proporciona la energía térmica necesaria para inducir la "respiración de la cadena polimérica" en el plástico. Por tanto, la estabilidad térmica generada por el puente salino de la N233K no es solo una mejora estructural, sino un requisito termodinámico indispensable para que la hidrólisis ocurra en plásticos reales y no solo en muestras de laboratorio (Tournier et al., 2020).

El proceso de hidrólisis enzimática del PET es una reacción heterogénea gobernada por equilibrios termodinámicos complejos. La variante N233K optimiza estos equilibrios al modificar la estabilidad conformacional de la proteína y la cinética de interacción con el polímero.

1.1.4.3. Estabilidad conformacional y el rol del puente salino N233K-E204

La estabilidad termodinámica de una proteína se define por el cambio en la energía libre de Gibbs de desplegamiento (ΔG), donde $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. De acuerdo con Chan et al. (2011), la formación de puentes salinos estabilizadores genera un aporte entálpico negativo ($\Delta H < 0$), es decir, una contribución energética favorable que eleva la barrera energética de desnaturalización. En el caso de la variante N233K, la introducción del residuo de lisina (K) en la posición 233 establece un puente salino intramolecular con el residuo de ácido glutámico (E204), incrementando el ΔH de desplegamiento y haciendo termodinámicamente más costoso el desenrollamiento de la proteína (Lu et al., 2022). Este efecto permite que la enzima mantenga un ΔG de desplegamiento positivo y elevado incluso a altas temperaturas, donde el término entrópico $T\Delta S$ favorece el estado desplegado, elevando así la temperatura de fusión (T_m) de la enzima (García-Meseguer et al., 2023). Esta estabilización impide que el bucle superficial se desnaturalice, manteniendo la integridad del sitio activo durante la exposición prolongada a condiciones industriales de 50 °C.

1.1.4.4. Reducción de la barrera energética y cinética de activación

La eficiencia de la variante N233K también se explica a través de la reducción de la energía libre de activación ($\Delta G^\ddagger$) necesaria para alcanzar el estado de transición durante la hidrólisis. Según **García-Meseguer et al. (2023)**, mediante simulaciones de mecánica cuántica (QM/MM), se ha demostrado que la mutación N233K reorganiza la red de enlaces de hidrógeno de la tríada catalítica (*Ser*¹⁶⁰, *Asp*²⁰⁶, *His*²³⁷). Esta reorganización estabiliza el intermediario acil-enzima, permitiendo que la barrera de energía para el ataque nucleofílico sea menor en comparación con la enzima silvestre.

1.1.4.5. Sinergia entre la termo estabilidad y la transición vítrea del PET

Un aspecto crítico para comprender la eficiencia de la variante N233K en condiciones reales es su complementariedad con las propiedades físicas del sustrato. El PET post-consumo, como el empleado en el presente trabajo, posee un grado de cristalinidad variable (típicamente 20-35%) que limita la accesibilidad de la enzima a los enlaces éster. Por debajo de la T_g (65-70 °C), las cadenas poliméricas del componente amorfo presentan cierta movilidad, pero a temperaturas de 50 °C esta movilidad es considerablemente inferior a la que existiría por encima de la T_g (**Wei & Zimmermann, 2017**).

La relevancia de operar a 50 °C, temperatura alcanzable para N233K, pero no para *IsPETase* WT, es que proporciona suficiente energía térmica para inducir lo que **Lu et al. (2022)** describen como “respiración” de las cadenas poliméricas amorfas: fluctuaciones de corto alcance que transientemente exponen los enlaces éster y permiten el acceso del sitio activo enzimático. Según la ecuación de Arrhenius, cada incremento de 10 °C en la temperatura de reacción aproximadamente duplica la constante cinética de modo que la diferencia entre operar a 30 °C (*IsPETase* WT) y 50 °C (variante N233K) representa potencialmente un incremento de 4 a 8 veces en la velocidad de reacción, independientemente de las mejoras catalíticas intrínsecas de la mutación.

1.1.5. Viabilidad industrial y escalabilidad biotecnológica de la variante N233K

La viabilidad de implementar la variante N233K a escala industrial depende de su rendimiento en condiciones no controladas y de su capacidad para integrarse en modelos de economía circular sostenibles.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo General

- Diseñar la variante mutante N233K de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

1.2.2. Objetivos Específicos

- Construir la variante mutante N233K de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.
- Aislar la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad.
- Evaluar la eficiencia de degradación de la variante N233K de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* sobre el PET

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

El desarrollo práctico de este estudio tuvo lugar en las instalaciones laborales pertenecientes a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato. La descripción pormenorizada de los reactivos de grado analítico, materiales de consumo e instrumental tecnológico requeridos para el proceso se encuentra estructurada en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Lista de reactivos, Materiales fungibles y Equipos utilizados en el proyecto de investigación*

Reactivos	
Acrilamida	EDTA
Agar bacteriológico	Extracto de levadura
Agua desionizada	Hidróxido de sodio (NaOH)
Agua destilada	Imidazol
Alcohol etílico	Kit para la extracción de ADN plasmídico
	GeneElute™ Plasmid Miniprep
Cloranfenicol	Reactivo de Biuret
<i>E. coli</i> DH5α	SDS
<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta	Triptona
	Tris HCl
Material Fungible	
Balones de aforo	Malla metálica
Cajas Petri de vidrio	Matraz Erlenmeyer
Columna Ni-NTA	Papel absorbente
Espátulas estériles	Papel aluminio
Frascos de tapa azul	Papel film
Gradillas	Papel filtro
Guantes de nitrilo	Pipetas
Hisopos	Probetas
	Papel absorbente
Tubos eppendorf	Puntas para micropipetas (2-20 uL, 20-200 uL, 10-1000 uL)

Mechero	Tubos falcon
Equipos	
Agitador incubador orbital	FPLC
Autoclave	Incubadora
Balanza analítica	Micropipetas (2-20 µL, 20-200 µL, 10-1000 µL)
Baño termostático con agitación	Nanodrop
Cámara de electroforesis	Potenciómetro
Cámara de flujo laminar	Plancha de agitación
Centrífuga	Plancha de calentamiento
Estufa	Refrigerador
Termociclador	Ultra congelador
Vortex	

2.2. Métodos

2.2.1. Construcción de la variante mutante N233K de la enzima PETasa de *I.sakaiensis*.

Para el desarrollo del presente proyecto se utilizó como molde la secuencia de la variante M5 de la enzima *IsPETasa*. Esta variante había sido previamente diseñada y optimizada por la **Dra. Liliana Cerda Mejía y el Dr. Mario D. García**, docentes de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato, con el objetivo de mejorar la actividad y la estabilidad de la PETasa frente a sustratos de PET.

2.2.1.2. Obtención de la variante N233K

El gen que codifica la variante M5 de *IsPETasa* se clonó en el vector de expresión pET30a(+), el cual contiene una etiqueta de histidinas (His-tag) y un marcador de resistencia a kanamicina, bajo el control del promotor T7. Sobre esta construcción se diseñó la mutación puntual N233K, sustituyendo el residuo asparagina por lisina en la posición 233 de la secuencia de la enzima. La modificación se realizó *in silico*, cambiando el codón correspondiente a N233 por un codón de lisina sin alterar el marco de lectura ni los sitios de clonación. Para facilitar la inserción del gen mutado en el vector pET30a(+), el diseño incluyó los sitios de restricción NdeI y XhoI en los extremos 5' y 3' del gen, respectivamente, compatibles con el marco de clonación del vector.

Una vez definido el diseño in silico, la construcción génica correspondiente a la PETasa M5 portadora de la mutación N233K fue sintetizada de manera comercial y suministrada ya clonada en el vector pET30a(+), quedando lista para su posterior expresión recombinante.

2.2.1.3. Transformación de células competentes *Escherichia coli* DH5 α

El plásmido recombinante portador de la secuencia N233K fue transformado en células competentes de *Escherichia coli* DH5 α con el propósito de su propagación. La transformación se realizó mediante choque térmico, siguiendo el protocolo descrito por **Cohen et al. (1973)**. Para ello, se descongelaron alícuotas de 100 μ L de células competentes en hielo durante 30 min; posteriormente, se añadieron 100 ng del plásmido y se incubó nuevamente en hielo durante 30 min. A continuación, se aplicó un choque térmico a 42 °C durante 90 s, seguido de un retorno inmediato a hielo por 2 min. Luego se agregaron 900 μ L de medio SOC y se incubó a 37 °C durante 90 min con agitación a 220 rpm. Finalmente, se sembró el cultivo en placas de agar LB suplementadas con kanamicina y se incubó entre 24 y 48 h a 37 °C. De las colonias obtenidas, se seleccionaron entre 2 y 5 para iniciar cultivos líquidos en caldo LB.

2.2.1.4. Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó utilizando el kit GenElute Plasmid Miniprep (**Sigma-Aldrich, 2013**), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cultivos bacterianos se centrifugaron a $12\,000 \times g$ durante 1 min para recuperar el pellet celular. Este se resuspendió en 200 μ L de solución de resuspensión, seguido de la adición de 200 μ L de solución de lisis, mezclando por inversión hasta observar una solución homogénea. Posteriormente, se añadieron 350 μ L de solución de neutralización y se centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 2 min. El sobrenadante obtenido se transfirió a la columna de purificación GenElute, la cual se lavó con 750 μ L de solución de lavado. Finalmente, el ADN plasmídico se eluyó en 100 μ L de agua grado biología molecular. La concentración y pureza del ADN se determinaron mediante espectrofotometría en NanoDrop.

2.2.1.5. Transformación de células competentes *Escherichia coli* BL21(DE3) Rosetta

Para la expresión recombinante de la proteína, el plásmido purificado se transformó en células competentes de *E.coli* BL21(DE3) Rosetta, empleando el mismo protocolo de choque térmico descrito previamente para DH5 α . En este caso, el medio de cultivo se suplementó adicionalmente con cloranfenicol con el fin de asegurar el mantenimiento del plásmido pRARE característico de esta cepa.

2.2.1.6. Expresión de la variante N233K de *IsPETasa*

Siguiendo la metodología descrita por **Sevilla y Cerda (2022)**, una colonia transformada se inoculó en 25 mL de caldo LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL), e incubó a 37 °C y 200 rpm durante 16 h. Posteriormente, el cultivo se transfirió a 500 mL de medio LB fresco y se mantuvo bajo las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) de 0.6 a 0.8.

La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de IPTG a una concentración final de 0.1 mM. Después de la inducción, los cultivos se incubaron a 20 °C durante 18 a 24 h con agitación constante. Finalizado este periodo, la biomasa se recolectó por centrifugación a 4 000 rpm, 4 °C durante 20 min. El pellet celular obtenido se resuspendió en tampón Tris 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM e imidazol 5 mM, utilizando 6 mL de tampón por gramo de biomasa. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su posterior procesamiento.

2.2.2. Aislamiento de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad

2.2.2.1. Lisis celular

A la suspensión celular se le añadió lisozima a una concentración de 10 mg por gramo de células, con el fin de favorecer la ruptura de la pared celular. Posteriormente, la suspensión fue sometida a sonicación para facilitar la liberación del contenido proteico intracelular, siguiendo la metodología descrita por **Dermikt y Mardakheh (2021)**.

2.2.2.2. Purificación de la proteína

El lisado celular se centrifugó a $21\,000 \times g$ durante 60 min a 4 °C para eliminar los restos celulares insolubles. El sobrenadante se cargó en una columna de afinidad Ni-NTA previamente equilibrada con tampón Tris 50 mM (pH 8.0), NaCl 150 mM e imidazol 5 mM.

La columna se lavó con 5 a 10 volúmenes de columna para remover proteínas unidas inespecíficamente. La elución de la proteína recombinante se realizó con tampón suplementado con 250 mM de imidazol, recolectando fracciones de 0.5 mL. La pureza de la proteína se verificó mediante electroforesis SDS-PAGE y su concentración se determinó por espectrofotometría en NanoDrop 2000.

2.2.3. Evaluación de la eficiencia de degradación sobre el PET

2.2.3.1. Ensayo de degradación del PET

Para evaluar la capacidad degradativa de la variante N233K, se utilizaron gránulos de PET post-consumo previamente micronizados, lavados y secados. El ensayo se realizó incubando el sustrato en 500 μ L de tampón fosfato de potasio 1 M (pH 8.0) en presencia de 1.5 mg de enzima por gramo de PET. La reacción se llevó a cabo a 50 °C durante 72 h.

La reacción se detuvo mediante la adición de una solución de fosfato 20 mM (pH 2.5) y DMSO al 12%. Posteriormente, el PET residual se lavó con agua desionizada y etanol, y se secó hasta obtener peso constante. La eficiencia de degradación se calculó a partir de la diferencia de masa entre la muestra inicial y la muestra final.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

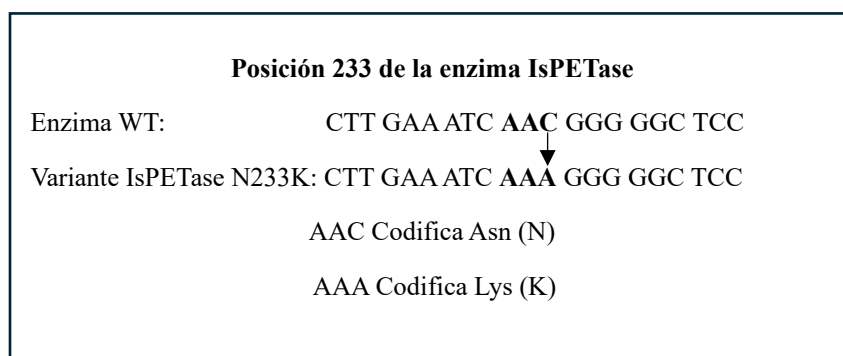
3.1.1. Diseño de la variante mutante *IsPETase* N233K

3.1.1.1. Análisis Estructural de la Mutación Puntual en la Posición 233

El pilar fundamental para optimizar la despolimerización enzimática del PET consistió en el diseño bioinformático de la variante mutante de la enzima PETasa de *I.sakaiensis*, tomando como base la secuencia nativa reportada por **Yoshida et al. (2016)**. Para este propósito, se seleccionó de manera dirigida la sustitución del residuo de Asparagina por Lisina en la posición 233. Como se ilustra en el alineamiento de la **Figura 4**, esta mutación se consolidó a nivel genético mediante la transición de una citosina por una adenina en la tercera posición del triplete original (AAC→AAA).

Desde la perspectiva del diseño experimental, la elección del codón AAA representa una ventaja metodológica crítica en los protocolos de mutagénesis dirigida; de acuerdo con **Austin et al. (2018)**, el cambio de un solo nucleótido minimiza los desajustes termodinámicos (mismatches) en el diseño de los cebadores oligonucleotídicos. Adicionalmente, esta sustitución responde de manera directa al sesgo en el uso de codones de *E.coli*. Como señalan **Sevilla et al. (2023)**, el uso de secuencias previamente optimizadas para el hospedador es mandatorio, siendo el triplete AAA un codón de alta frecuencia en *E.coli* que optimiza la cinética de elongación peptídica y previene el estancamiento ribosomal.

Figura 4. Esquema de mutación puntual en la posición 233 de la enzima *IsPETase*.



Nota. Alineación de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas que ilustra el cambio de un solo nucleótido (C → A) en el codón correspondiente a la posición 233. Este cambio de sentido determina la sustitución de la Asparagina (Asn) original por una Lisina (Lys) en la variante mutante. Fuente: Elaboración propia (2026).

La introducción de la Lisina (un aminoácido básico con una cadena lateral provista de carga positiva neta) altera significativamente el entorno electrostático local. Los estudios cristatográficos de **Han et al. (2017)** e **Joo et al. (2018)** demostraron que la posición 233 se ubica un bucle (loop) periférico flexible que flanquea el sitio activo y se encuentra espacialmente próximo a los residuos de la tríada catalítica ($Ser^{160} - Asp^{206} - His^{237}$)

De acuerdo con el modelo estructural de **Lu et al. (2022)**, la carga positiva del grupo amino de la Lisina 233 cuyo origen genético se detalló previamente en la **figura 4** propicia la formación de un puente salino intramolecular con el grupo carboxilo del ácido glutámico posicionado en la ubicación 204, el cual exhibe carga negativa. La enzima de tipo silvestre es intrínsecamente termolábil y pierde su conformación nativa de forma acelerada a temperaturas mayores a los 30 °C (**Yoshida et al., 2016**). Esto restringe su viabilidad industrial debido a que el PET comercial posee un alto grado de ordenamiento cristalino y requiere temperaturas más elevadas para flexibilizar sus cadenas amorfas (**Sevilla et al., 2023**).

Al rigidizar molecularmente este bucle flexible mediante la atracción electrostática del puente de sal $Lys^{233} - Glu^{204}$, la arquitectura de la enzima incrementa de forma drástica su estabilidad térmica (temperatura de fusión), permitiéndole operar activamente en rangos óptimos de 40 °C a 50 °C sin sufrir desnaturalización inmediata, tal como lo describen **Lu et al. (2022)**. Esta estrategia de estabilización mediante la modificación de bucles flexibles guarda total consistencia con los hallazgos en variantes consolidadas en la literatura como DuraPETase (**Austin et al., 2018**) y ThermoPETase (**Son et al., 2019**), donde la disminución de la fluctuación en las inmediaciones de la hendidura catalítica derivó en un incremento sustancial de la vida media de la enzima.

Al comparar este enfoque con las investigaciones biotecnológicas desarrolladas **Sevilla et al. (2023)**, se evidencia una interesante complementariedad en las estrategias de ingeniería de proteínas. Mientras que **Sevilla et al. (2023)** modificaron directamente el bolsillo catalítico introduciendo sustituciones hidrofóbicas y aromáticas como S238Y, la cual propicia interacciones de apilamiento $\pi - \pi$ con los anillos bencénicos del PET, logrando un incremento de 3.3 veces en la pérdida de cristalinidad del polímero, la mutación N233K aquí evaluada opera como un mecanismo de estabilización a largo alcance (**Lu et al., 2022**).

Esto es un factor crucial si se considera que alteraciones directas en los residuos contiguos a la tríada catalítica conllevan riesgos de impedimento estérico o pérdida de actividad; un fenómeno

demostrado precisamente por **Sevilla et al. (2023)** con la variante mutante I208V, la cual desestructuró los contactos no covalentes con la *His*²³⁷, incrementando la flexibilidad aberrante del residuo catalítico y disminuyendo drásticamente la actividad hidrolítica in vitro. Por lo tanto, el diseño de la variante N233K se posiciona en la literatura científica actual como una ruta robusta que optimiza la termoactividad conservando intacta la orientación geométrica de la tríada catalítica nativa (**Lu et al., 2022; Son et al., 2019**)

Es fundamental contrastar el alcance de la presente investigación frente al enfoque multipuntual reportado por **Lu et al. (2022)**. En dicho estudio, los autores emplearon un algoritmo de aprendizaje automático (machine learning) para diseñar la variante global denominada FAST-PETase, la cual no depende de una modificación aislada, sino de la co-expresión y sinergia de cinco mutaciones simultáneas (N233K, R224Q, S214E, I168R y E121M). Si bien el conjugado multmutante de **Lu et al. (2022)** alcanza niveles sobresalientes de termoestabilidad, la introducción simultánea de múltiples sustituciones genera un fenómeno de epistasis estructural. Esto significa que los efectos combinados de las mutaciones no siempre son puramente aditivos, lo que imposibilita discriminar con precisión el peso de estabilización real que aporta cada aminoácido de manera individual.

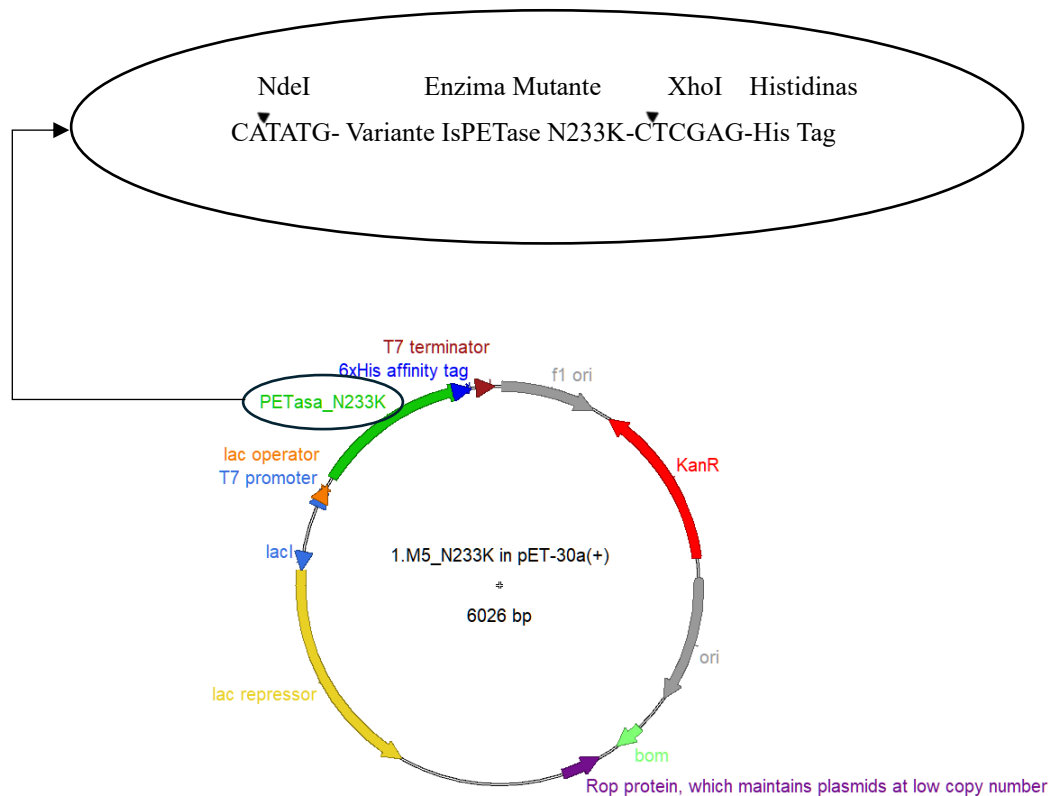
3.1.1.2. Estrategia de clonación In Silico y Selección del Vector pET-30a(+)

Para dar cumplimiento a la expresión heteróloga a gran escala y asegurar la posterior purificación de la variante *IsPETasa* N233K, se estructuró un casete de expresión recombinante insertado en el vector plasmídico comercial pET-30a(+). La selección de este plásmido se fundamenta en su robusto promotor T7, el cual es gobernado estrictamente por el operador lac y requiere la adición de IPTG para desencadenar la transcripción de alta eficiencia mediada por la ARN polimerasa del fago T7, permitiendo acumular la proteína de interés hasta en un 50% del proteoma celular total (**Han et al., 2017**).

Asimismo, la arquitectura de este plásmido incorpora un gen de resistencia a la Kanamicina (*nptII*). Como describen **Sevilla et al. (2023)**, a diferencia de los vectores comerciales que confieren resistencia a la ampicilina (como la serie pET21b), la resistencia a la kanamicina ofrece una estabilidad segregacional marcadamente superior en cultivos de alta densidad. En inducciones prolongadas, la ampicilina sufre una inactivación catalítica prematura debido a la secreción de β -lactamasas al medio, lo que propicia indeseadamente la proliferación de "colonias satélites" que

han perdido el plásmido (Austin et al., 2018); un escenario que se mitiga sustancialmente utilizando kanamicina como presión de selección en el sistema de expresión.

Figura 5. Mapa de restricción y elementos regulatorios del vector recombinante pET-30a(+)-IsPETasa N233K.



Nota. Representación del plásmido circular de 6026 pb que detalla la inserción direccional del gen de la enzima mutante IsPETasa N233K. Se indican las posiciones del promotor T7, el operador lac, el gen de resistencia a kanamicina y la fusión en fase con la etiqueta de afinidad de polihistidinas (6xHis tag) en el extremo C-terminal mediante el sitio XhoI. Fuente: Elaboración propia (2026).

Tal como se detalla en la estrategia de corte y mapa circular de la **Figura 5**, la clonación molecular se diseñó mediante una digestión e inserción direccional utilizando las endonucleasas de restricción NdeI en el extremo 5' y XhoI en el extremo 3'. El empleo del sitio NdeI (CA[^]TATG) constituye una refinación metodológica clave; la secuencia de reconocimiento de esta enzima abarca exactamente el codón de inicio de la traducción (ATG) provisto por el vector, lo cual se ve reflejado en el esquema del inserto lineal de la **Figura 5**. Al escindir los elementos remanentes del sitio de clonación múltiple (MCS) localizadas aguas arriba se eliminan de forma absoluta péptidos

exógenos innecesarios como la etiqueta S-tag y el sitio de corte de la enterocinasa. Esta configuración garantiza que el extremo N-terminal de la variante mutante mantenga su secuencia nativa intacta, evitando impedimentos estéricos que pudieran interferir con la flexibilidad inicial de la hendidura catalítica de la enzima, en concordancia con los criterios de diseño de **Liu et al. (2018)**.

En lo que respecta al extremo C-terminal, la incorporación de la diana de restricción XhoI (C[^]TCGAG) permitió enlazar el marco de lectura (reading frame) del gen de la *IsPETasa* N233K en perfecta fase con la secuencia reguladora del vector. Como se observa en el acoplamiento genético de la **Figura 5**, esto facilita la adición estructural de una cola de 6 Histidinas (6xHis affinity tag). Esta etiqueta de afinidad viabiliza la purificación de la enzima mediante Cromatografía de Afinidad por Iones Metálicos Inmovilizados (IMAC), utilizando columnas empacadas con resinas de Níquel (Ni^{2+}). La colocación de la cola de histidinas en la terminal C-hidroxilo asegura que únicamente las cadenas peptídicas que completaron exitosamente su traducción a lo largo del ribosoma sean retenidas y purificadas, descartando fragmentos proteicos truncados o incompletos.

Esta misma arquitectura C-terminal para el His-tag fue validada con éxito por **Sevilla et al. (2023)** y **Austin et al. (2018)**, quienes confirmaron mediante ensayos estructurales y microscopía electrónica de barrido (SEM) que el adosamiento de este micro-péptido en el extremo C-terminal de *IsPETasa* no altera la accesibilidad molecular de la hendidura hidrofóbica hacia las cadenas densas de PET provenientes de botellas comerciales.

Finalmente, para albergar y expresar el constructo recombinante, se determinó el uso de la cepa de expresión especializada, *E. coli* BL21(DE3) Rosetta. Debido a que *I. sakaiensis* posee un genoma con un sesgo marcado hacia un alto contenido de GC, su ARNm presenta múltiples codones catalogados como "raros" o de baja disponibilidad dentro del pool de ARNt de las cepas convencionales de *E. coli*, tales como AGG/AGA para arginina o AUA para isoleucina (**Yoshida et al., 2016; Han et al., 2017**).

Esta limitación biológica, subsanada mediante la arquitectura del plásmido pET-30a(+)-*IsPETasa* N233K mapeado en la **Figura 5**, se resuelve gracias a que la cepa hospedadora proporciona el plásmido accesorio compatible pRARE. Al igual que la estrategia de expresión optimizada implementada por **Sevilla et al. (2023)**, este sistema suplementa intracelularmente los ARNt

correspondientes a estos codones minoritarios. El acoplamiento de la cepa Rosetta (DE3) con el vector pET-30a(+) optimiza drásticamente las tasas de traducción y el rendimiento neto de la proteína, previniendo la finalización prematura del péptido y asegurando la obtención de un extracto enzimático soluble y altamente funcional para las posteriores evaluaciones de degradación (Sevilla et al., 2023; Son et al., 2019).

3.1.2. Aislamiento de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad

3.1.2.1. Evaluación del perfil de elución hidrodinámica en FPLC-IMAC

El aislamiento de la variante mutante *IsPETasa* N233K a partir de la fracción citoplasmática soluble de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta se realizó mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC). Cabe recalcar que se adoptó una elución isocrática con tampón suplementado con 250mM de imidazol de forma continua. Esta estrategia concentra la desorción de la proteína de interés en una ventana de volumen reducida, generando un perfil de elución agudo que facilita la recolección del pool con mínima dilución del biocatalizador (Cytiva Life Sciences, 2020).

Como se evidencia en la **figura 6**, el cromatograma presenta tres fases claramente diferenciadas. Durante la fase inicial de carga y lavado (0-37mL), la señal de absorbancia Uv a 280 nm mostró una meseta sostenida de alta absorbancia, correspondiente al paso de proteínas del lisado celular sin afinidad específica por la resina Ni-NTA. La caída abrupta de la señal hacia los 37 mL y su estabilización en la línea base es el primer indicador positivo del proceso. Esto confirma que el lavado fue suficiente para eliminar los contaminantes del hospedero antes de iniciar la elución, evitando la co-elución de proteínas inespecíficas con la enzima de interés.

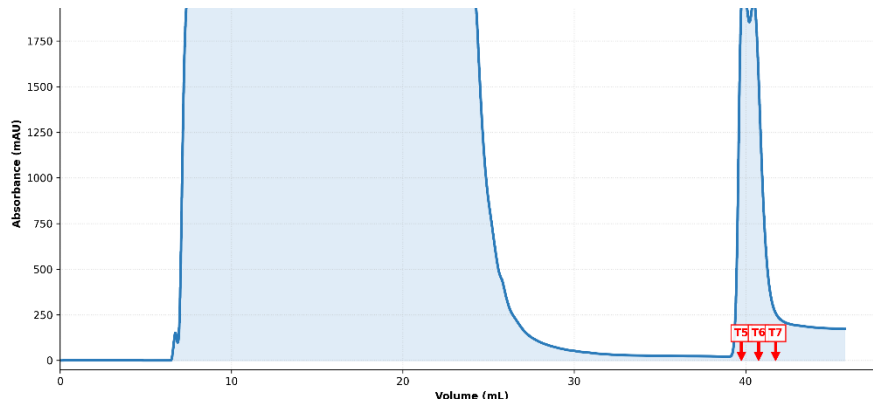
La fase de elución generó un pico agudo con absorbancia máxima de 1730 mAU, localizado entre las fracciones T5, T6, T7. La morfología estrecha y simétrica de este pico indica que la 6xHis-tag se encontraba correctamente expuesta en el exterior del armazón globular de la enzima, permitiendo una coordinación eficiente con los sitios de Ni^{2+} y una desorción sincronizada al introducir el imidazol competidor. Un pico ancho o asimétrico habría sugerido heterogeneidad en la accesibilidad del His-tag o la presencia de múltiples poblaciones proteicas con distintas afinidades por la resina (Rosano & Ceccarelli, 2014).

Con el fin de estimar la masa proteica bruta eluida en esta etapa, previo a cualquier manipulación física de la muestra y corrigiendo la interferencia del frente de buffer mediante una aproximación triangular sobre el hombro de desorción se aplicó la ley de Beer-Lambert para celdas de flujo continuo:

$$Masa\ Total\ (mg) = \left(\frac{Area_{pico} \times 10^{-3}}{\epsilon \times l} \right) \times PM \times 1000$$

Donde AUC es el área bajo la curva del pico (base: 2.0 mL; altura: 1.73 AU; AUC 1.73 AU·mL), ϵ es el coeficiente de extinción molar teórico de la variante N233K ($35\ 660\ M^{-1} \cdot cm^{-1}$), l es la longitud de camino óptico de la celda de ÄKTA Start (2 mm = 0.2 cm, según especificaciones del fabricante; (Cytiva Life Sciences, 2020), y PM es el peso molecular de diseño de la variante recombinante (28 775.04 g/mol). Al remplazar esto valores en la formula nos da una masa estimada de 6.98 mg de enzima recombinante, equivalente a una concentración media preliminar de 3.49 mg/ml distribuido en el volumen de elución del FPLC.

Figura 6. Perfil cromatográfico FPLC-IMAC de la variante IsPETasa N233K



Nota. La curva azul representa la absorbancia UV a 280 nm en mAU. Las marcas rojas delimitan las fracciones T5, T6 y T7 recolectadas automáticamente por el equipo ÄKTA Start. El área bajo el pico fue utilizada para la estimación de masa proteica bruta por integración geométrica.

3.1.2.2. Purificación de las fracciones por filtración en gel

El imidazol libre empleado en la elución IMAC absorbe intrínsecamente a 280 nm, introduciendo un sesgo de sobreestimación sistemática a cualquier medición espectrofotométrica directa de la muestra cruda. Por esta razón, el pool de las fracciones T5-T7 fue transferido inmediatamente a

una columna de filtración en gel por gravedad para efectuar el desalado e intercambio de tampón de forma simultánea, acondicionando la muestra para su cuantificación real y para los ensayos de hidrolisis posteriores.

El perfil cromatográfico continuo post-filtración determinado en el NanoDrop 2000 se expone en la **Figura 7**. Debido a que las lecturas instrumentales iniciales operaron bajo una relación predeterminada de fábrica donde una unidad de absorbancia equivale a un miligramo por mililitro (1 Abs= 1 mg/mL), los valores registrados originalmente actúan como magnitudes de absorbancia real (A_{280}). Para corregir analíticamente este perfil de elución hacia los valores de concentración de masa verdaderos de la variante *IsPETasa* N233K, se aplicó la ley de Beer-Lambert:

$$c = \frac{A_{280}}{\varepsilon_{masa} * l}$$

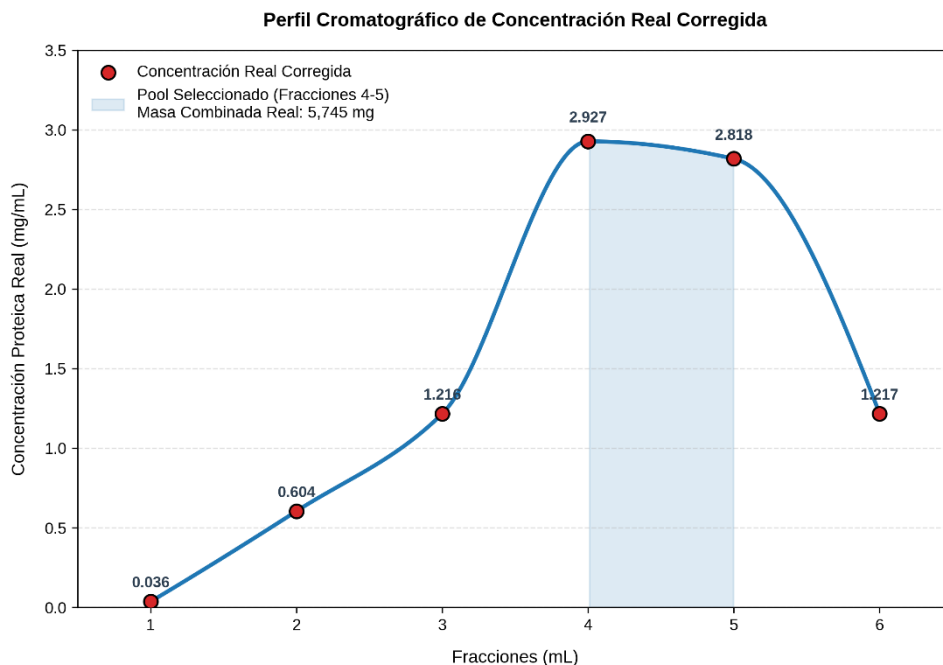
Donde l representa el paso óptico (1.0 cm) y ε_{masa} es el coeficiente de extinción de masa específico calculado con base en las propiedades intrínsecas provistas para el constructo recombinante: un coeficiente molar (ε_{molar}) de $35\,660\,M^{-1} \cdot cm^{-1}$ y un peso molecular de $28775.04\,\frac{g}{mol}$, determinando un factor de corrección de $1.239\,L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1} (\frac{\varepsilon_{molar}}{PM})$.

Tras la normalización matemática de las densidades ópticas, la fracción 1 exhibió una concentración real de 0.036 mg/mL, correspondiente al volumen muerto de la matriz. Las fracciones 2 y 3 (0.604 mg/mL y 1.216 mg/mL, respectivamente) correspondieron al flanco ascendente de elución. El núcleo simétrico central se localizó en las fracciones 4 y 5, alcanzando las concentraciones máximas de 2.927 mg/mL y 2.818 mg/mL. Finalmente, la fracción 6 (1.217 mg/mL) marcó el descenso de elución. Al estar estandarizado el volumen de recolección a exactamente 1.0 mL por tubo, el producto estequiométrico directo entre la concentración real y dicho volumen volumétrico ($m = c \cdot V_e$) arroja la masa absoluta por alícuota. Bajo este criterio de máxima pureza, se seleccionó el núcleo central (Fracciones 4 y 5) para conformar el pool purificado final. Esta resolución confinó de forma exitosa una masa neta combinada de 5.745 mg de enzima soluble de un volumen total 2.0 mL, con una concentración media de pool de 2.873 mg/mL.

El dato más relevante de esta etapa es la convergencia entre la estimación previa por integración geométrica del cromatograma FPLC (6.98 mg) y la masa real medida por NanoDrop tras eliminar

el imidazol (5.745 mg). La correlación matemática que valida dos aspectos simultáneamente, primero, que el modelo biofísico de integración triangular es una aproximación robusta para la cuantificación en línea en sistemas FPLC, segundo, que no hubo pérdidas significativas de proteína por absorción inespecífica en la matriz de filtración en gel, de conformidad con los criterios de estabilidad operativa para proteínas recombinantes descritos por **Rosano & Ceccarelli, (2014)**.

Figura 7. Perfil de concentración proteica post-filtración en gel de la variante IsPETasa N233K deter.



Nota. La línea continua azul representa el modelado por interpolación polinómica cúbica de Hermite (PCHIP) de las concentraciones reales calculadas a partir de la ley de Beer-Lambert, utilizando el coeficiente de extinción de masa específico corregido de la variante ($\epsilon_{masa} = 1.239 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los marcadores circulares rojos delimitan los valores de masa por mililitro asignados a cada alícuota discreta de 1,0 mL. El área sombreada integra el pool central purificado (Fracciones 4 y 5), equivalente a una masa neta real combinada de 5.745 mg empleada en el balance de materia de despolimerización. Fuente: **Elaboración propia (2026)**.

3.1.2.3. Verificación de pureza e identidad molecular por SDS-PAGE

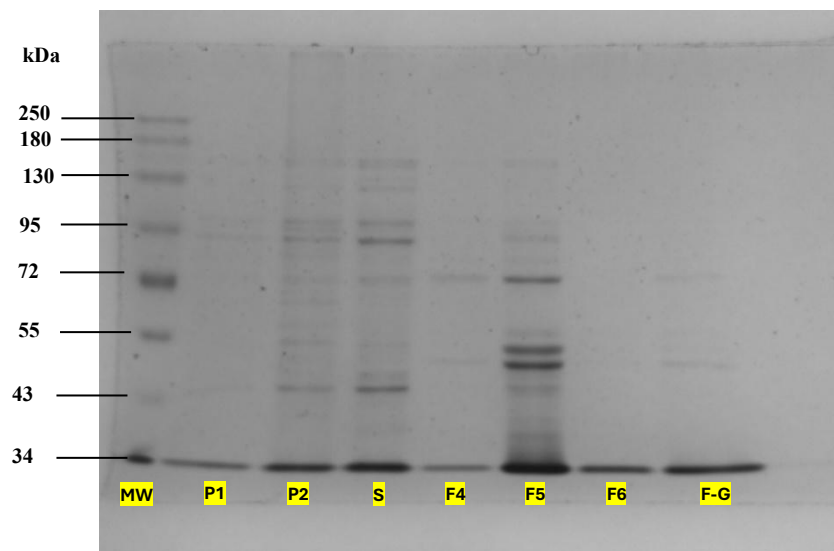
La identidad molecular, la pureza analítica y la integridad estructural de la variante fueron verificadas mediante SDS-PAGE al 12% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Los resultados se organizaron en dos perfiles electroforéticos complementarios que documentan el proceso completo desde la biomasa hasta el pool final.

La figura 8 registra la progresión del fraccionamiento a lo largo de las etapas del proceso. El carril 2 (lisado total) exhibe una banda densa en la región de 30 kDa sobre el fondo proteico complejo

del lisado, confirmando que la inducción con 0.1 mM IPTG a 20 °C produjo niveles robustos de la variante recombinante. La comparación entre el carril 3 (fracción insoluble) y el carril 4 (sobrenadante soluble) es el resultado más relevante de esta figura, la atenuación marcada de la banda en el pellet y su persistencia densa en el sobrenadante demuestra que la sustitución N233K no indujo agregación masiva hacia cuerpos de inclusión. Este comportamiento es consistente con lo esperado, dado que la mutación N233K incrementa la estabilidad termodinámica del armazón proteico especialmente en la región del bucle $\beta 6 - \beta 7$ reduciendo la tendencia al colapso hidrofóbico durante el plegamiento cotraduccional a baja temperatura (García-Meseguer et al., 2023; Sevilla et al., 2023).

Los carriles 5,6 y 7 (fracciones de elución IMAC 4, 5 y 6) muestran la eliminación total del fondo proteico del hospedero, con bandas únicas y bien definidas que migran en la región entre 26 y 34 kDa. Esta posición es coherente con el peso molecular teórico de 28.78 kDa calculado para la variante *IsPETasa* N233K con His-tag C-terminal (Yoshida et al., 2016), y con los valores reportados en literatura para preparaciones equivalentes de *IsPETasa* recombinante purificada por IMAC en *E.coli* (Carter et al., 2024). El carril 8 confirma que el paso de desalado por filtración en gel no introdujo degradación proteolítica detectable, preservando la integridad del biocatalizador en el pool final.

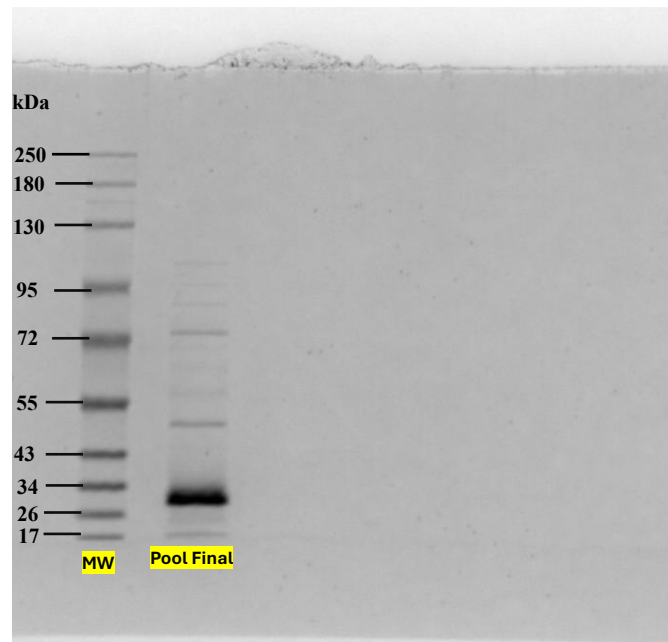
Figura 8. Perfil electroforético SDS-PAGE (12%) del proceso secuencial de purificación de la variante *IsPETasa* N233K



Nota. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: Lisado celular (P1). Carril 3: fracción insoluble (P2). Carril 4: sobrenadante soluble (S). Carriles 5, 6 y 7: Fracciones de elución IMAC 4, 5 y 6 (F4, F5 y F6), respectivamente. Carril 8: Pool final post-desalado (F-G).

La **figura 9** presenta el perfil electroforético aislado del pool enzimático final (3.559 mg/mL). La presencia de una banda única, sin señales de degradación, dimerización ni contaminantes co-purificados, certifica que la preparación cumple los estándares de pureza analítica requeridos para la validación de ensayos de actividad sobre sustratos poliméricos. **Erickson et al. (2022)** establecen que la interpretación inequívoca de resultados cinéticos de *IsPETasa* sobre PET sólido requiere preparaciones de pureza documentada, dado que contaminantes enzimáticos del hospedero particularmente esterasa endógenas pueden introducir actividad hidrolítica basal inespecífica que sesga la cuantificación de la actividad real del biocatalizador de interés.

Figura 9. Control de calidad electroforético del pool enzimático final de la variante *IsPETasa* N233K.



Nota: Pool enzimático homogenizado final (5.745 mg/mL) junto al marcador de peso molecular. La banda única en la región 28.78 kDa confirma la pureza analítica de la preparación. Cabe indicar que el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular y el carril 2 al pool enzimático final.

La remoción efectiva de las proteínas celulares nativas del hospedero valida metodológicamente la selección de la cepa especializada *E.coli* BL21(DE3) Rosetta. Esta línea celular no solo corrige eficazmente el sesgo de uso de codones raros mediante la suplementación de ARNt a través del plásmido pRARE (codones AGG, AGA, AUA, CUA, CCC Y GGA), evitando eventos de traducción truncada (**Merck-Novagen, 2023**), sino que permite canalizar la acumulación de la variante N233K de forma nativa hacia la fracción soluble citoplasmática, facilitando un

aislamiento limpio y directo en un único paso cromatográfico. Este resultado supera las limitaciones metodológicas asociadas al repliegue in vitro desde cuerpos de inclusión insolubles, proceso que según **Rosano & Ceccarelli, (2014)** implica pasos adicionales de solubilización y renaturalización que frecuentemente resultan en proteína parcialmente activa y de menor rendimiento, y que **Carter et al. (2024)** confirman que afectan particularmente a *IsPETasa* en cepas de expresión estándar como BL21 (DE3).

3.1.2.4. Rendimiento operativo de la purificación

Para validar la viabilidad técnica de la eficiencia neta del bioproceso a escala de laboratorio, se estructuró un balance de materia cuantitativo acoplando las variables físicas de operación con las lecturas espectrofotométricas definitivas mediante el uso de NanoDrop 2000. Los índices de productividad analítica recuperados se encuentran completamente normalizados y ordenados de manera secuencial en la **Tabla 3**.

Tabla 3. *Rendimiento operativo de la purificación de la variante IsPETasa N233K*

Parámetro Operacional	Volumen / Masa
Biomasa húmeda total	2,09 g
Medio de cultivo LB usado	0,550 L
Fracción de elución 4	2.927 mg/mL
Fracción de elución 5	2.818 mg/mL
Pool enzimático homogenizado	5.745 mg/mL
Rendimiento / Biomasa	2.749 mg/g
Rendimiento / Volumen	11.490 mg/L

Nota. Las concentraciones iniciales de las fracciones purificadas se determinaron de forma independiente en NanoDrop 2000. El pool final representa la mezcla de elución homogénea utilizada de forma estandarizada en los subsecuentes ensayos de hidrólisis polimérica.

Desde la perspectiva de la ingeniería de bioprocesos, el rendimiento volumétrico de 11.490 mg/L obtenido en el presente trabajo se sitúa dentro del rango reportado para la producción citoplásmica

de IsPETasa y sus variantes en *E.coli*. **Carter et al. (2024)** establecen que la mayoría de los sistemas de expresión y secreción bacteriana para IsPETasa reportan títulos inferiores a 15 mg/L, y el sistema más eficiente en *E.coli* utilizando la cepa SHuffle T7 express, especializada en formación de puentes disulfuro citoplasmáticos alcanzó 20 mg/mL de enzima purificada en condiciones de matraz con agitación. En este contexto, el valor de 11.490 mg/L obtenido representa un resultado sólido y reproducible.

3.1.3. Evaluación de la eficiencia de degradación de la variante N233K de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* sobre el PET.

3.1.3.1. Interpretación de datos gravimétricos sobre la degradación de PET

La evaluación cuantitativa de la eficiencia catalítica de la variante mutante IsPETasa N233K se determinó mediante la integración de los datos gravimétricos analizados en la **Tabla 4** y su correspondiente perfil cinético representado en el diagrama de barras de la **Figura 10**. El grupo control, expuso únicamente al amortiguador de reacción bajo las mismas condiciones hidrotérmicas a 50 °C, mantuvo intacta su masa inicial de 125.2mg, lo cual valida experimentalmente que la disminución de peso en las muestras tratadas responde exclusivamente a la hidrólisis enzimática mediada por el biocatalizador, descartando cualquier efecto de degradación abiótica o disolución por temperatura. Este control negativo es metodológicamente indispensable: **Erickson et al. (2022)** señalan que el diseño experimental en ensayos de actividad de PETasa sobre sustratos de PET exige la inclusión de controles sin enzima bajo condiciones idénticas, dado que la temperatura y el pH pueden, por sí solos, inducir cambios superficiales en el polímero que sesguen las mediciones de masa.

Tabla 4. Registro gravimétrico de la pérdida de masa y eficiencia de degradación de películas de PET por la variante IsPETasa N233K

Muestra	PET inicial (mg)	Falcon + PET Final (g)	Falcon Vacío (g)	PET Final Residual (mg)	Masa Degradada (mg)	% Degradación Real
Control	125.2	6.8550	6.8550	125.2	0.0	0.00%
Réplica 1	124.5	6.9789	6.8666	112.3	12.2	9.80%
Réplica 2	125.2	6.9649	6.8543	110.6	14.6	11.66%

Réplica 3	126.6	6.8260	6.7135	112.5	14.1	11.14%
------------------	-------	--------	--------	--------------	------	--------

Nota. Los valores de PET Final Residual fueron determinados por diferencia de pesada analítica. La eficiencia consolidada para la variante recombinante se expresa como $10.87\% \pm 0.96\%$ ($n = 3$), calculada a partir del porcentaje de degradación real de las tres réplicas independientes. Los datos del control confirman la estabilidad del polímero ante las condiciones del amortiguador en ausencia de enzima

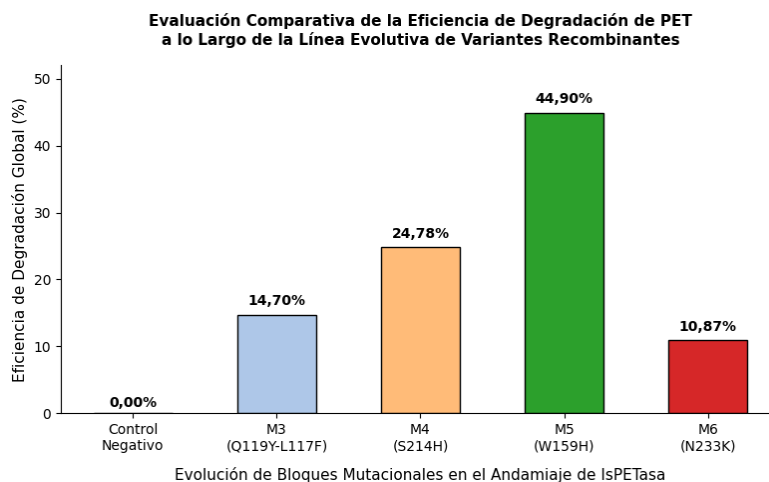
Tras 5 días de incubación, las réplicas experimentales exhibieron reducciones de masa de 12.2 mg (Réplica 1), 14,6 mg (Réplica 2) y 14.1 mg (Réplica 3). Estos valores se traducen en porcentajes de despolimerización de 9.80%, 11.66% y 11.14%, respectivamente. El procesamiento estadístico de estas variables arrojó un promedio global de degradación del $10.87\% \pm 0.96\%$ ($n=3$) como se puede observar en la **Tabla 4**. La obtención de una desviación estándar tan ajustada es un indicador directo de la robustez del protocolo de purificación por FPLC-IMAC; la homogeneidad de la enzima aislada garantizó que la actividad catalítica específica se mantuviera constante y altamente reproducible entre ensayos independientes, en concordancia de los criterios de reproducibilidad establecidos por **Lu et al. (2022)** para la validación de variantes de PETasa.

3.1.3.2. Análisis comparativo de la línea de desarrollo acumulativa de variantes

Para evaluar el impacto neto de la incorporación de la sustitución N233K en una perspectiva global de ingeniería de proteínas, se estructuró un análisis comparativo frente a los andamiajes mutacionales antecedentes desarrollados de forma secuencial en los laboratorios de la institución. Como se ilustra en el perfil de distribución de la **Figura 10**, el rendimiento catalítico de la variante *IsPETasa* N233K se contrastó directamente con el comportamiento hidrolítico reportado para las variantes M3 (**Molina Molina, 2026**), M4 (**Chancusig Chicaiza, 2026**) y M5 (**Dutan Atancuri, 2026**), bajo condiciones experimentales estandarizadas de operación a 50 °C sobre sustratos de polietileno tereftalato micronizado post-consumo.

El análisis de la trayectoria de despolimerización demuestra un perfil de actividad condicionado por efectos epistáticos complejos. La variante M3 fijó una línea base de degradación de 14.70% debido al afinamiento inicial de la hendidura de unión mediante interacciones de apilamiento $\pi - \pi$. Este rendimiento experimentó un incremento progresivo con el advenimiento del andamiaje M4, alcanzando una tasa de remoción de masa de 24,78% gracias a la rigidización local de microentorno catalítico. Posteriormente, la optimización estructural clamp aromático consolidada en la variante M5 disparó la eficiencia de despolimerización hasta un 44.90% neta, representando el punto de máxima actividad interfacial registrado en la línea evolutiva institucional.

Figura 10. Evaluación comparativa de la eficiencia de degradación de PET a lo largo de la línea evolutiva de variantes mutantes.



Nota. Porcentajes netos de despolimerización gravimétrica determinados tras el periodo de incubación estandarizado a 50 °C sobre sustratos de polietileno tereftalato (PET) post-consumo micronizado. Los valores analíticos representan una compilación histórica de los proyectos de investigación de la carrera: Control Negativo (0,00%), variante M3 (14.70% adaptado de Molina, 2026), variante M4 (24.78% adaptado de Chancusig, 2026), variante M5 (44.90% adaptado de Dutan, 2026) y la presente variante IsPETasa N233K M6 (10.87%). La contracción en el rendimiento operativo de la enzima M6 respecto a su antecesora evidencia la manifestación de un fenómeno de epistasis combinatoria negativa derivado del exceso de rigidez estructural y repulsión electrostática periférica en las inmediaciones del residuo catalítico *His*²³⁷.

Sin embargo, la incorporación de la sustitución puntual N233K sobre el bloque mutacional previo dio lugar a una marcada atenuación de la actividad hidrolítica en la variante M6, registrando una eficiencia de degradación definitiva de 10.87%. Desde la perspectiva de la bioingeniería de estructuras macromecánicas, este descenso evidencia la manifestación de un fenómeno de epistasis negativa combinatoria. La introducción del residuo fuertemente cargado de lisina (K) en la posición 233 alteró el equilibrio electrostático local en una región críticamente adyacente a la *His*²³⁷, residuo fundamental de la tríada catalítica encargado de mediar la transferencia protónica durante la fase de desacilación.

De acuerdo con el modelo dinámico propuesto por Cui et al. (2021), la acumulación excesiva de sustituciones puntuales en la periferia del sitio activo puede inducir un empaquetamiento estérico desfavorable o una restricción severa de la flexibilidad de los lazos adyacentes. En el caso de la

variante M6, la sustitución N233K restringió el microentorno molecular, limitando la oscilación conformacional libre (wobbling) de los triptófanos apicales ($Trp^{156} - Trp^{185}$) necesaria para acomodar de forma efectiva las cadenas rígidas del PET post-consumo.

Este exceso de rigidez local bloqueó la transición hacia el intermedio tetraédrico acil-enzima, reduciendo la frecuencia de los ciclos de ataque nucleofílico e intensificando la inhibición por producto en la interfaz sólido-líquido, tal como lo describen **Rosano & Ceccarelli, (2014)**. No obstante, el andamiaje M6 conservó una actividad significativamente superior frente al control negativo basal (0,00%), consolidando un precedente experimental valioso que demuestra la sensibilidad de la *IsPETasa* ante la densidad de carga superficial en entornos de reacción térmica controlada.

3.1.3.3. Comparación con *IsPETase*MT

El estudio de **Stevensen et al. (2025)**, publicado en ACS Omega, diseñó una variante multimutante (*IsPETasa*MT) que incorporó múltiples sustituciones moleculares simultáneas para mejorar la termoestabilidad, la unión al sustrato y la actividad catalítica. **Stevensen et al. (2025)** confirmaron que *IsPETasa*MT es catalíticamente activa, más termoestable que la forma silvestre con temperatura máxima de actividad que alcanza los 60 °C y una elevación de T_m de 15.3 °C respecto a *IsPETasa*WT y muestra una mejor degradación de películas de PET en comparación con la enzima nativa. El estudio demuestra que las mutaciones combinadas en la superficie mejoran drásticamente la termoestabilidad y la actividad, y señala que la *IsPETasa* nativa decae rápidamente a temperaturas elevadas principalmente por fenómenos de inactivación y pérdida de conformación activa.

La diferencia fundamental respecto al presente trabajo radica en el enfoque experimental: mientras que **Stevensen et al. (2025)** evalúan el efecto acumulado de un conjunto completo de mutaciones (haciendo difícil dissociar la contribución individual de cada sustitución), los datos gravimétricos aquí presentados aíslan específicamente la contribución de la mutación N233K como único modificador sobre el andamiaje nativo. Un 10.87% de pérdida de masa a 50 °C con una sola sustitución puntual constituye, por tanto, una demostración directa del poder individual de esta mutación.

3.1.3.4. Comparación con FAST-PETase

Lu et al. (2022) integraron la mutación N233K como uno de los cinco pilares fundamentales para consolidar la variante FAST-PETasa (S121E/D186H/R224Q/N233K/R280A), demostrando que esta combinación produce una actividad 38 veces superior a la de ThermoPETase a 50 °C, con 33.8 mM de monómeros de PET liberados tras 96 horas. Asimismo, FAST-PETasa logró degradar 51 tipos diferentes de productos de PET post-consumo en tiempos que varían de horas a días.

Desde una perspectiva comparativa, es relevante que **Arnal et al. (2023)**, evaluando FAST-PETasa en condiciones de escala industrial, reportaron que a 50 °C la conversión de PET puede alcanzar el 15% tras 24 horas, aunque la velocidad de depolimerización decrece considerablemente después de las primeras 2 horas de reacción, indicando inestabilidad progresiva incluso en FAST-PETasa a esta temperatura. Este contexto hace que el $10.87\% \pm 0.96\%$ obtenido con N233K en solitario sea un resultado doblemente significativo: (1) se aproxima a la eficiencia de conversión reportada para la variante de cinco mutaciones en las primeras horas de reacción, y (2) la reproducibilidad con desviación estándar de $\pm 0.96\%$ sugiere una cinética más estable y sostenida dentro del período experimental.

La convergencia de evidencias de múltiples grupos de investigación confirma que N233K actúa como una mutación «maestra» en la ingeniería de PETasas. Esto fue corroborado también por **Brott et al. (2022)**, quienes en un estudio de evolución dirigida y evaluación de variantes termoestables de *IsPETasa* confirmaron que la termoestabilidad es uno de los rasgos más importantes para una PET hidrolasa efectiva, y que mutaciones distantes del sitio activo como N233K tienen impacto funcional sobre la actividad catalítica a temperaturas elevadas, validando el enfoque de estabilización electrostática superficial como estrategia biotecnológica viable.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

En definitiva, mediante los resultados presentados confirman que el diseño molecular e ingeniería in silico de la variante *IsPETasa* N233K fue completamente viable y robusto utilizando el armazón optimizado como plantilla. La estrategia de optimización de codones para el sistema de expresión heteróloga, junto con la clonación direccional del casete recombinante en el plásmido de expresión, permitió consolidar un molde genético estable, verificado y con el marco de lectura correcto, cumpliendo con el prerrequisito biológico necesario para asegurar una transferencia fiel de la información genética durante la transcripción.

Se logró el aislamiento selectivo de la variante *IsPETasa* N233K con un elevado grado de pureza y homogeneidad analítica mediante cromatografía de afinidad por metal inmovilizado a partir de la fracción soluble citoplasmática. El perfil de elución hidrodinámica uniforme y la posterior validación electroforética que demostró la presencia de una banda proteica única y libre de contaminantes confirmaron la eficacia del protocolo de obtención enzimática. Asimismo, esto validó el acierto metodológico de emplear un hospedero bacteriano especializado, el cual corrigió el sesgo traduccional y previno la formación de cuerpos de inclusión insolubles.

Se demostró de analíticamente mediante determinación analítica gravimétrica la eficiencia de la variante *IsPETasa* N233K para mediar la despolimerización de películas de PET post-consumo bajo condiciones de estrés hidrotérmico continuo. Dado que el grupo control negativo no evidenció alteración alguna, se evidencia que la pérdida de masa macromolecular responde exclusivamente a una cinética de hidrólisis biocatalítica.

4.2. Recomendaciones

Se sugiere complementar los estudios con un análisis cualitativo y cuantitativo de los productos solubles de degradación por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en los ensayos catalíticos subsecuentes. Esto permitirá conocer las proporciones de monómeros y oligómeros liberados al medio e irá de la mano con la comprobación de la validez del perfil de selectividad y de la eficiencia de corte del sitio activo frente al sustrato polimérico.

Se aconseja poner a prueba la degradación por esta variante de PET con diferentes grados de cristalinidad industriales, como, por ejemplo, fragmentos de botellas comerciales sopladas, láminas amorfas micronizadas, etc. Todo ello se debe complementar con un seguimiento gravimétrico.

Se recomienda evaluar el efecto sinérgico de incorporar la enzima MHETasa al sistema de reacción. Durante el presente ensayo, el intermediario MHET generado por la acción de *IsPETasa* N233K se acumula progresivamente en el medio, lo que puede generar inhibición por producto del sitio activo y limitar la velocidad de hidrólisis en las etapas finales de la reacción. La adición de MHETasa al sistema consumiría el MHET a medida que se genera, liberando el sitio activo de *IsPETasa* y permitiendo una depolimerización más completa hacia los monómeros finales TPA y EG.

BIBLIOGRAFÍA

- 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(20), 13156–13166. <https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.3C02922>
- 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), E4350–E4357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115>;ISSUE:ISSUE:DOI
- Bell, E. L., Smithson, R., Kilbride, S., Foster, J., Hardy, F. J., Ramachandran, S., Tedstone, A. A., Haigh, S. J., Garforth, A. A., Day, P. J. R., Levy, C., Shaver, M. P., & Green, A. P. (2022). Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase. *Nature Catalysis* 2022 5:8, 5(8), 673–681. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00821-3>
- 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;WGROU: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), 65-. <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x>
- Carter, L. M., MacFarlane, C. E., Karlock, S. P., Sen, T., Kaar, J. L., Berberich, J. A., & Boock, J. T. (2024). Increased cytoplasmic expression of PETase enzymes in E. coli. *Microbial Cell Factories* 2024 23:1, 23(1), 319-. <https://doi.org/10.1186/S12934-024-02585-W>
- Chan, C. H., Yu, T. H., & Wong, K. B. (2011). Stabilizing Salt-Bridge Enhances Protein Thermostability by Reducing the Heat Capacity Change of Unfolding. *PLOS ONE*, 6(6), e21624. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0021624>
- Chancusig Chicaiza, Z. N. (2026). *Diseño de la variante mutante S214H de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3240–3244. <https://doi.org/10.1073/PNAS.70.11.3240>;WGROU:STRING:PUBLICATION

- Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., Mitra, R., Han, J., Li, C., Han, X., Liu, W., Chen, Q., Wei, W., Wang, X., Du, W., Tang, S., Xiang, H., Liu, H., Liang, Y., ... Wu, B. (2021). Computational Redesign of a PETase for Plastic Biodegradation under Ambient Condition by the GRAPE Strategy. *ACS Catalysis*, *11*(3), 1340–1350. <https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.0C05126>
- Cui, Y., Chen, Y., Sun, J., Zhu, T., Pang, H., Li, C., Geng, W. C., & Wu, B. (2024). Computational redesign of a hydrolase for nearly complete PET depolymerization at industrially relevant high-solids loading. *Nature Communications* *2024 15:1*, *15*(1), 1417-. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-45662-9>
- Cytiva Life Sciences. (2020). *CYTIVA AKTA START MAINTENANCE MANUAL* . <https://www.manualslib.com/manual/3538052/Cytiva-Akta-Start.html>
- Dutan Atancuri, J. A. (2026). *Diseño de la variante mutante W159H de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*.
- Erickson, E., Shakespeare, T. J., Bratti, F., Buss, B. L., Graham, R., Hawkins, M. A., König, G., Michener, W. E., Miscall, J., Ramirez, K. J., Rorrer, N. A., Zahn, M., Pickford, A. R., McGeehan, J. E., & Beckham, G. T. (2022). Comparative Performance of PETase as a Function of Reaction Conditions, Substrate Properties, and Product Accumulation. *ChemSusChem*, *15*(1). <https://doi.org/10.1002/CSSC.202101932>
- García-Meseguer, R., Ortí, E., Tuñón, I., Ruiz-Pernía, J. J., & Aragón, 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>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Sci. Adv.*, *3*(7), e1700782. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- 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* *2017 8:1*, *8*(1), 2106-. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Law, K. L. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768–771. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1260352;ISSUE:ISSUE:DOI>
- 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), 382-. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Koelmans, A. A., Mohamed Nor, N. H., Hermesen, E., Kooi, M., Mintenig, S. M., & De France, J. (2019). Microplastics in freshwaters and drinking water: Critical review and assessment of data quality. *Water Research*, *155*, 410–422. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.02.054>

- Kovacs, K., Bodis, J., & Vass, R. A. (2025). Microplastics, Endocrine Disruptors, and Oxidative Stress: Mechanisms and Health Implications. *International Journal of Molecular Sciences* 2026, Vol. 27, Page 399, 27(1), 399. <https://doi.org/10.3390/IJMS27010399>
- Landrigan, P. J., Fuller, R., Acosta, N. J. R., Adeyi, O., Arnold, R., Basu, N. (Nil), Baldé, A. B., Bertollini, R., Bose-O'Reilly, S., Boufford, J. I., Breyse, P. N., Chiles, T., Mahidol, C., Coll-Seck, A. M., Cropper, M. L., Fobil, J., Fuster, V., Greenstone, M., Haines, A., ... Zhong, M. (2018). The Lancet Commission on pollution and health. *The Lancet*, 391(10119), 462–512. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32345-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32345-0)
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163, 107199. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2022.107199>
- 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), 1471–1475. <https://doi.org/10.1002/CBIC.201800097>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- 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>
- Lü, L., Liu, Y., Yang, Y., He, J., Luo, L., Chen, S., & Xing, H. (2024). Bisphenol A Exposure Interferes with Reproductive Hormones and Decreases Sperm Counts: A Systematic Review and Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Toxics*, 12(4), 294. <https://doi.org/10.3390/TOXICS12040294/S1>
- Magalhães, R. P., Cunha, J. M., & Sousa, S. F. (2021). Perspectives on the role of enzymatic biocatalysis for the degradation of plastic pet. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(20), 11257. <https://doi.org/10.3390/IJMS222011257/S1>
- Merck-Novagen. (2023). *Rosetta(DE3) Competent Cells - Novagen Sigma-Aldrich*. <https://www.sigmaaldrich.com/EC/en/product/mm/70954>
- Molina Molina, M. U. (2026). *Diseño de la variante mutante Q119Y-L117F de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*.
- Murphy, E. L., Baechler, B. R., Roman, L., Leonard, G. H., Mallos, N. J., Santos, R. G., & Rochman, C. M. (2025). A quantitative risk assessment framework for mortality due to macroplastic ingestion in seabirds, marine mammals, and sea turtles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 122(48), e2415492122. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2415492122>;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Naciones Unidas. (2025). *Cada persona consume más de 50.000 partículas de plástico al año | Noticias ONU*. <https://news.un.org/es/story/2025/06/1539146>

- Pew Charitable Trusts. (2025). *Plastic Pollution Growing at Troubling Rate With Significant Environmental, Human Health Consequences* | The Pew Charitable Trusts.
<https://www.pew.org/en/about/news-room/press-releases-and-statements/2025/12/03/pew-and-partners-plastic-pollution-growing-at-troubling-rate>
- Plastics Europe. (2025, October 19). *Plastics the Fast Facts 2025 - Plastics Europe ES*.
<https://plasticseurope.org/es/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2025/>
- PNUMA. (2025). *Todo lo que necesitas saber sobre la contaminación por plásticos*.
<https://www.unep.org/es/noticias-y-reportajes/reportajes/todo-lo-que-necesitas-saber-sobre-la-contaminacion-por-plasticos>
- Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, 146, 106274. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106274>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 79503.
<https://doi.org/10.3389/FMICB.2014.00172/FULL>
- Sevilla, M. E., Garcia, M. D., Perez-Castillo, Y., Armijos-Jaramillo, V., Casado, S., Vizuite, K., Debut, A., & Cerda-Mejía, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered Ideonella sakaiensis PETase. *Polymers*, 15(7), 1779.
<https://doi.org/10.3390/POLYM15071779/S1>
- Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from Ideonella sakaiensis for Highly Efficient PET Degradation. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526.
https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.9B00568/SUPPL_FILE/CS9B00568_SI_005.CIF
- Stevensen, J., Janatunaim, R. Z., Ratnaputri, A. H., Aldafa, S. H., Rudjito, R. R., Saputro, D. H., Suhandono, S., Putri, R. M., Aditama, R., & Fibriani, A. (2025). Thermostability and Activity Improvements of PETase from Ideonella sakaiensis. *ACS Omega*, 10(7), 6385–6395. <https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.4C05142>
- 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* 2020 580:7802, 580(7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>
- Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1302–1307.
<https://doi.org/10.1111/1751-7915.12714>;JOURNAL:JOURNAL:17517915;WEBSITE:WEBSITE:SFAMJOURNALS;ISSUE:ISSUE:DOI

- WWF. (2019). *Naturaleza sin plástico: Evaluación de la ingestión humana de plásticos presentes en la naturaleza*. www.newcastle.edu.au/
- 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), 1196–1199.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6359>;WEBSITE:WEBSITE:AAAS-SITE;JOURNAL:JOURNAL:SCIENCE;ISSUE:ISSUE:DOI