UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Caracterización cinética de las variantes silvestre y mutantes I208V, N212A y S238Y de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

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

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

Autor: Joselyn Patricia Sierra Mena

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Agosto – 2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

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

Ambato, 19 de junio de 2024



Firmado electrónicamente por:
MARIO DANIEL GARCIA SOLIS

Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

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



Joselyn Patricia Sierra Mena

1804464772

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

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

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



Joselyn Patricia Sierra Mena

1804464772

AUTORA

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 de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
WILLIAM RICARDO CALERO CACERES

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
JUAN DE DIOS ESPINOZA MOYA

Mg. Juan de Dios Espinoza Moya

1803201431

Firmado electrónicamente por:
CRISTIAN FERNANDO GALARZA GALARZA

Mg. Cristian Fernando Galarza Galarza

1803160272

Ambato, 01 de agosto de 2024

DEDICATORIA

A quienes vagan perdidos en el vasto océano de oscuridad,

les prometo que siempre llegará el amanecer.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por obsequiarme mil bendiciones y sujetarme con amor en los momentos más difíciles.

A mi papi Patricio Sierra, por apoyarme incondicionalmente en todos mis triunfos y fracasos. A mi mami Anita Mena, por acompañarme en las madrugadas con sus agüitas energizantes y motivarme cuando más quería rendirme; su cariño es el motivo de mis esfuerzos. A mi abuelita, por apapacharme cuando más lo necesitaba, sin que ella lo supiera. Y a mi familia tan linda que siempre, siempre, siempre, creyó en mí.

A mis tutores, Mario García y Liliana Cerda, por su paciencia y apoyo, por darme la confianza de formar parte de su laboratorio y por todo el conocimiento que pude adquirir por su enseñanza. Aprecio profundamente el tiempo y esfuerzo que invirtieron en mi formación y el desarrollo de este proyecto.

A Damy, por permitirme ser yo misma en todos los sentidos, atesoro nuestra amistad tan real y llena de cosas bonitas. Anto, las clases siempre fueron divertidas gracias a tus ocurrencias, gracias por ser como un hermano para mí. Bibi, por apreciarme tanto y mostrarme tu lealtad, porque no pude haber tenido mejor *roomie* que tú, gracias por tantas aventuras. Tantas etapas vividas, risas, llantos, y todas son memorables gracias a ustedes. Casualmente los atardeceres eran los más preciosos cuando estábamos juntos.

A Vini por todas esas veces acompañándonos en la confortable tristeza y por enseñarme muchas cosas y a Edi, por ser la alegría más bonita. Nuestros caminos se separaron, pero siempre los guardo en un lugar especial de mi corazón.

A Vivi, por siempre estar dispuesta ayudarme, aconsejarme y acompañarme en toda esta travesía, por todas nuestras risas y por ser un rayito de sol.

A Taty, Dani, Leo y Arlett, que nuestra amistad ha perdurado a pesar de los años, la distancia y los contratiempos. Gracias por ser mi refugio, mi apoyo y por recordarme siempre que sí puedo, incluso cuando yo misma dudaba de mi capacidad.

A la Universidad Técnica de Ambato y la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por sus excelentes docentes y el preciado espacio que me permitió crecer profesionalmente.

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
1.1.1 Justificación 1
1.1.2 Impacto medioambiental derivado del uso de plásticos 2
1.1.2.1 Desafíos en la gestión de desechos plásticos 2
1.1.3 Biodegradación del PET 3
1.1.3.1 Biodegradación del PET mediante *I. sakaiensis* 3
1.1.4 Enzima PETasa de I. *sakaiensis* (IsPETasa) 5
1.1.4.1 Clasificación y estructura de la enzima IsPETasa 5
1.1.4.2 Ventajas estructurales de IsPETasa sobre las cutinasas 6
1.1.4.3 Mutaciones dirigidas en la enzima IsPETasa 7
1.1.5 Cinética enzimática 7
1.1.5.1 Definición de cinética enzimática 8
1.1.5.2 Ecuación de Michaelis – Menten 8
1.1.6 Sustratos para la caracterización cinética 9
1.1.6.1 Polietileno Tereftalato (PET) 9

1.1.6.2 *p*(NP)-acetato (pNPA) 10
1.2 Objetivos 10
1.2.1 Objetivo General 10
1.2.2 Objetivos Específicos 11
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 12
2.1 Materiales 12
2.2 Métodos 13
2.2.1 Producción de las variantes silvestre y mutantes (I208V, N212A y S238Y) de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* 13
2.2.1.1 Plásmido y sistema heterólogo a utilizar 13
2.2.1.2 Transformación de las células competentes de *E. coli* Rosetta (DE3) 13
2.2.1.3 Expresión de la enzima IsPETasa 14
2.2.1.4 Purificación de las enzimas WT y variantes mutantes a través de cromatografía de afinidad 14
2.2.2 Determinación de las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes de la enzima IsPETasa en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato 15
2.2.3 Evaluación del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato .. 16
2.2.3.1 Análisis estadístico 16
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 17
3.1 Expresión y purificación de las enzimas IsPETasa silvestre y mutantes 17
3.1.1 Sistema heterólogo de expresión 17
3.1.2 Medio de inducción 17
3.1.3 Purificación de proteínas 19
3.2 Reacción catalizada por las variantes en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato 21
3.2.1 Sustrato *p*(NP)-acetato 21
3.2.2 Determinación de las constantes cinéticas 22
3.3 Evaluación del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas 26
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 28

4.1 Conclusiones: 28
4.2 Recomendaciones: 28
MATERIAL DE REFERENCIA 30
Referencias Bibliográficas 30
ANEXOS 38
Anexo 1 38
Anexo 2 38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reactivos, material fungible y equipos utilizados en la investigación 12
Tabla 2. Rendimiento de biomasa generada en la autoinducción de las enzimas IsPETasa 18
Tabla 3. Parámetros cinéticos de las variantes silvestre y mutantes de la enzima IsPETasa 25
Tabla 4. ANOVA para el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática 38
Tabla 5. Prueba de Tukey sobre el efecto de la temperatura en la actividad enzimática 38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Degradación microbiana del PET 4
Figura 2. Estructura de la enzima PETasa (6EQE) 6
Figura 3. Purificación de las variantes silvestre (WT) y mutantes S238Y, N212A e I208V 20
Figura 4. Sitio activo de la IsPETasa y su interacción con el PET 23
Figura 5. Gráficas de la cinética de Michaelis – Menten para las variantes de PETasa 24
Figura 6. Efecto de la temperatura sobre las variantes silvestre y mutantes 27

RESUMEN EJECUTIVO

La acumulación de residuos plásticos ha alcanzado niveles críticos, con 8 millones de toneladas contaminando los océanos anualmente. Los microplásticos resultantes se impregnan en ecosistemas y organismos, representando una grave amenaza para la salud humana y ambiental. En respuesta, la biorremediación surge como una alternativa sostenible, empleando microorganismos o enzimas para degradar polímeros. La enzima IsPETasa de *Ideonella sakaiensis* es particularmente más efectiva que otras enzimas degradadoras de PET. De modo que, recientemente se han diseñado mutaciones cercanas al sitio activo (S238Y, N212A e I208V) para mejorar su actividad y termoestabilidad, evaluadas en análisis cualitativos. Por lo que en esta investigación se caracterizó la cinética de estas mutantes mediante la evaluación de los parámetros cinéticos de las reacciones catalizadas por estas enzimas, utilizando *p*(NP)-acetato como sustrato y variando la temperatura (25, 35 y 45 grados Centígrados). Los datos fueron analizados con GraphPad Prism. Se observó una reducción en la K_M en las mutantes, lo que indicó que las mutaciones aumentaron la afinidad por el sustrato, aunque la disminución en la k_{cat} reflejó una menor capacidad catalítica, especialmente para la variante I208V. En términos globales, las tres mutaciones son menos eficientes que la variante WT para hidrolizar fenil ésteres en condiciones de saturación. En cuanto al efecto de la temperatura, la variante N212A mostró la mayor actividad a 45 grados Centígrados, destacándose como la más termoestable. Este estudio busca profundizar en la eficiencia catalítica de las mutantes de IsPETasa, contribuyendo al desarrollo de reciclaje biotecnológico para desechos plásticos.

Palabras clave: enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* (IsPETasa), variantes mutantes, cinética de Michaelis-Menten, termoestabilidad enzimática, *p*(NP)-acetato.

ABSTRACT

The accumulation of plastic waste has reached critical levels, with 8 million tons polluting the oceans annually. The resulting microplastics enter ecosystems and organisms, posing a serious threat to human and environmental health. In response, bioremediation has emerged as a sustainable alternative, employing microorganisms or enzymes to degrade polymers. The enzyme IsPETase from *Ideonella sakaiensis* is particularly more effective than other PET-degrading enzymes. Thus, mutations close to the active site (S238Y, N212A and I208V) have been recently designed to improve its activity and thermostability, evaluated in qualitative analyses. Therefore, in this research the kinetics of these mutants was characterized by evaluating the kinetic parameters of the reactions catalyzed by these enzymes, using p(NP)-acetate as substrate and varying the temperature (25, 35 and 45 degrees Celsius). The data were analyzed with GraphPad Prism. A reduction in KM was observed in the mutants, indicating that the mutations increased the affinity for the substrate, although the decrease in kcat, reflected a lower catalytic capacity, especially for the I208V variant. Overall, all three mutations are less efficient than the WT variant in hydrolyzing phenyl esters under saturated conditions. Regarding the effect of temperature, the N212A variant showed the highest activity at 45 degrees Celsius, standing out as the most thermostable. This study aims to deepen the catalytic efficiency of IsPETase mutants, contributing to the development of biotechnological recycling for plastic wastes.

Keywords: PETase enzyme from *Ideonella sakaiensis* (IsPETase), mutant variants, Michaelis-Menten kinetics, enzyme thermostability, p(NP)-acetate.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Justificación

La acumulación de residuos plásticos ha alcanzado niveles críticos al punto que, anualmente, 8 millones de toneladas de residuos contaminan los océanos, el equivalente a un camión lleno de residuos plásticos por minuto **(United Nations Environment Programme, 2022).** La persistencia de estos materiales resistentes a la degradación representa una amenaza no solo a la vida marina, sino también a la salud del ser humano y el medio ambiente **(Rhodes, 2018).**

La biodegradación surge como una alternativa sostenible a los métodos químicos y mecánicos convencionales para abordar el problema causado por los residuos plásticos y consiste en la utilización de microorganismos (o sus enzimas) capaces de descomponer los polímeros plásticos en materia prima **(Lee et al., 2023).** Se ha reportado que la biodegradación es especialmente efectiva para tratar aquellos residuos elaborados a partir de Polietileno Tereftalato (PET), un poliéster termoplástico ampliamente empleado en la fabricación de envases de un solo uso **(Kim et al., 2022)** y que alcanza las 80.000 toneladas de desechos en el "Gran Parche de Basura del Pacífico" **(Kushwaha et al., 2023).**

Recientemente, se identificó que la bacteria Gram negativa, *Ideonella sakaiensis*, es capaz de utilizar el PET como fuente de carbono y energía, logrando degradar películas de PET en seis semanas a 30 ºC **(Yoshida et al., 2016a).** Esta bacteria emplea la enzima PETasa (IsPETasa), que realiza el primer paso de despolimerización del PET, principalmente, en mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET) y TPA **(Yoshida et al., 2016a).** Por lo tanto, esta enzima ha sido objeto de modificaciones con el fin de aumentar su actividad y termoestabilidad.

Sevilla et al. (2023) diseñaron las mutaciones I208V, N212A y S238Y de IsPETasa que han mejorado la interacción de la enzima con el PET, lo cual fue demostrado a través de estudios de dinámica molecular y alteraciones en la cristalinidad y superficie de *films* de PET comercial, en comparación con la enzima silvestre (WT). No obstante, las técnicas utilizadas para evaluar estos cambios, como la Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) y la Microscopía de Fuerza Atómica (AFM), están orientadas a determinar aspectos físicos ocasionados sobre el PET **(Vlasov et al., 2023).** Por consiguiente, es fundamental comprender el funcionamiento del mecanismo hidrolítico de la enzima IsPETasa y sus variantes mutantes, a través del estudio de su cinética enzimática empleando PET o moléculas análogas como sustratos **(Eugenio et al., 2022),** que requieren de técnicas analíticas menos complejas.

1.1.2 Impacto medioambiental derivado del uso de plásticos

Indiscutiblemente, desde su creación en el siglo XX, los plásticos han contribuido significativamente en mejorar la calidad de vida de millones de personas en todo el mundo **(PlasticsEurope, 2021).** Su destacada flexibilidad, resistencia, durabilidad y eficiencia en términos de costos de producción los han convertido en un material ampliamente utilizado en todos los aspectos de la vida cotidiana **(Andrady & Neal, 2009).** No obstante, estas mismas características han dado lugar a una contaminación sostenida y perjudicial para todo el ecosistema **(Ball, 2020).**

Según la organización ***World Wildlife Fund*** **(2019)** la gran demanda de plástico ha desencadenado la irrefrenable producción mundial de este material, que ha llegado a una cantidad preocupante de 396 millones de toneladas en 2016, equivalente a unos 53 kilogramos de plástico por cada persona en el planeta. Más aún, la gestión inadecuada de estos residuos ha conducido a que solamente el 12 % sean incinerados y el 9 % reciclados, aproximadamente; mientras que el 60 % ha sido acumulado en vertederos y el medio ambiente **(Geyer et al., 2017).**

Esta problemática se agrava al considerar que la mayoría de estos materiales plásticos, fabricados a partir del PET, experimentan una pérdida significativa de valor después de un solo uso **(Carr et al., 2020).** Esto se debe a que, a pesar de las excelentes propiedades mecánicas y térmicas del PET **(Sin & Tueen, 2023)** sus productos, como botellas de plástico, material de embalaje y fibras textiles, están diseñados para una vida útil corta **(Krause, 2021),** provocando un descarte por la desproporcionada acumulación del plástico que contribuye a la alteración medioambiental **(Taniguchi et al., 2019).**

Por ende, la producción masiva, la eliminación ineficiente y la acumulación de plásticos en distintos hábitats, como océanos, terrenos agrícolas y humedales, plantean una seria amenaza para los organismos, los ecosistemas y los seres humanos **(Ball, 2020).** Los microplásticos, derivados de la degradación parcial de los polímeros, incluido el PET, penetran en los organismos a través de las cadenas tróficas **(Cverenkárová et al., 2021)** interfiriendo en los ciclos biogeoquímicos del carbono y el nitrógeno y posiblemente alterando el contenido de nutrientes en el suelo **(J. Wang et al., 2021).** Así también, los plásticos pueden liberar sustancias químicas capaces de ocasionar trastornos en funciones reproductivas, metabólicas, tiroideas, inmunológicas y neurológicas en los seres humanos **(Flaws et al., 2020).**

1.1.2.1 Desafíos en la gestión de desechos plásticos

Últimamente, se ha observado un marcado aumento en la concientización sobre los efectos adversos (primarios y secundarios) que provocan los plásticos en el medio ambiente **(Carr et al., 2020).** Incluso, la Organización de las Naciones Unidas, mediante los Objetivos de Desarrollo Sostenible 12 y 14, busca adoptar medidas sostenibles para gestionar de manera responsable los productos químicos y los desechos. Además, estos buscan conservar y utilizar de manera sostenible los recursos marinos **(Naciones Unidas, 2018)** gravemente afectados por la contaminación por plásticos. Por ejemplo, las estrategias convencionales de tratamiento del PET, como la incineración, vertido de residuos y reciclaje, que abarcan procedimientos químicos y mecánicos **(Kushwaha et al., 2023)**, son consideradas poco efectivas puesto que causan pérdidas económicas y generan residuos igualmente perjudiciales para el medio ambiente **(Lee et al., 2023).** Por consiguiente, es crucial contar con técnicas novedosas que contribuyan a la gestión adecuada de los desechos plásticos **(Taniguchi, 2019).**

1.1.3 Biodegradación del PET

La biodegradación emerge como una alternativa económica, eficaz y respetuosa con el medio ambiente para abordar el creciente problema de contaminación por plásticos **(Jayasekara et al., 2023).** La misma, se ha centrado en la selección y caracterización de microorganismos, como bacterias y hongos, con la capacidad de degradar compuestos plásticos **(Miri et al., 2022).** Las investigaciones más recientes han dirigido su enfoque principalmente hacia la biodegradación del PET, lo que ha permitido identificar diversas comunidades microbiológicas que liberan enzimas como lipasas, esterasas, carboxilesterasas y cutinasas, capaces de escindir los enlaces éster de dicho polímero **(Zhang et al., 2022)**. Entre estas enzimas destacan la lipasa de *Aspergillus oryzae* **(X. Wang et al., 2008)** y las cutinasas de *Fusarium oxysporum* (FsC) **(Dimarogona et al., 2015)**, del compost de ramas de hojas (LCC) **(Sulaiman et al., 2012)** y de bacterias tales como *Thermobifida fusca* (TfH) **(Müller et al., 2005)** e *Ideonella sakaiensis* **(Yoshida et al., 2016a).**

1.1.3.1 Biodegradación del PET mediante *I. sakaiensis*

La bacteria *I. sakaiensis 201-F6,* descubierta en un consorcio bacteriano en Sakai, Osaka, Japón, ha sido destacada por su habilidad para descomponer el PET utilizándolo como principal fuente de carbono y energía para su crecimiento **(Yoshida et al., 2016a)**, siendo aparentemente el primer microorganismo en incluir la degradación del PET en su metabolismo **(Austin et al., 2018)**. Esta bacteria gramnegativa pertenece al género *Ideonella*, clasificada dentro de la familia *Comamonadaceae* de la clase *Betaproteobacteria* **(Tanasupawat et al., 2016)**. Sus cepas se caracterizan por su forma de bastón, su naturaleza aerobia y móvil con flagelo polar, así como por ser mesófilas, con un rango de crecimiento entre 15 y 42 ºC, con un óptimo entre 30 y 37 ºC **(Yoshida et al., 2016b)**. Adicionalmente, se ha establecido que su rango de tolerancia al pH se sitúa entre 5,5 y 9, con un óptimo entre 7 y 7,5. Las

pruebas bioquímicas demuestran que se considera positivo para asimilación de N -acetil glucosamina, maltosa, gluconato de potasio y ácido adípico **(Tanasupawat et al., 2016).**

En cuanto a su capacidad degradativa de PET, se demostró experimentalmente que *I. sakaiensis* es 120, 5,5 y 88 veces más efectiva que TfH, LCC y FsC, respectivamente; a 30 °C después de 6 semanas de actividad **(Yoshida et al., 2016a).** Esto debido a que sus enzimas PET hidrolasa (IsPETasa) y mono (2-hidroxietil) tereftalato hidrolasa (IsMHETasa) trabajan en conjunto para convertir el PET en sus componentes básicos monoméricos **(Yoshida et al., 2021).** Junto con esto, imágenes SEM han identificado apéndices celulares que podrían facilitar el contacto entre las enzimas con la superficie del PET (Figura 1A), estableciendo así la vía metabólica de degradación, cuyos productos finales son mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), bis(2-hidroxiletil) tereftalato (BHET), etilenglicol (EG) y el ácido tereftálico (TPA) en cantidades traza, distinguidos por ser monómeros hidrosolubles **(Mrigwani et al., 2022)** y reutilizables en la fabricación de plásticos vírgenes o reciclables para obtener productos de mayor valor **(Sharma & Jain, 2020; Wei et al., 2020).**

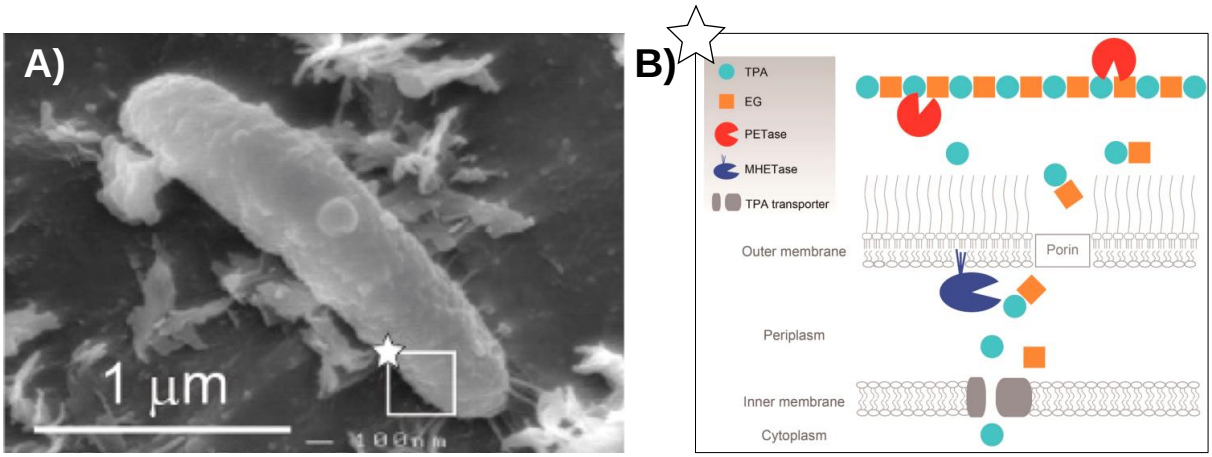


Figura 1. *Degradación microbiana del PET*

Nota: A) Imagen SEM de células de *I. sakaiensis* cultivadas en película de PET durante 60 horas, el recuadro identifica los apéndices que permiten la unión enzima-sustrato. B) Representación gráfica de la vía de degradación del PET. Adaptado de **Yoshida et al., (2016) y Taniguchi et al., (2019).**

De este modo, el proceso metabólico inicia con la acción de la IsPETasa extracelular, que interactúa directamente con la película de PET para hidrolizarla, principalmente en MHET y TPA (Figura 1B). Posteriormente, estos productos se trasladan al espacio periplásmico mediante una proteína, como la porina, que forma canales porosos en la bicapa lipídica de las membranas celulares. En este espacio, la MHETasa, aparentemente anclada a la membrana externa, convierte el MHET en TPA y EG. A continuación, estos últimos son absorbidos hacia el citoplasma para luego integrarse al ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) donde son completamente asimilados por *I. sakaiensis* **(Carr et al., 2020;**

Taniguchi et al., 2019). Por consiguiente, debido a que la IsPETasa es la enzima extracelular responsable de iniciar la degradación del PET, ha suscitado un notable interés investigativo para comprender a detalle su mecanismo enzimático **(Ge et al., 2021).**

1.1.4 Enzima PETasa de I. *sakaiensis* (IsPETasa)

1.1.4.1 Clasificación y estructura de la enzima IsPETasa

Desde una perspectiva filogenética, la IsPETasa se incluye en la familia de las hidrolasas. En términos estructurales, presenta hasta un 47 % de similitud con cutinasas homólogas **(Chen et al., 2018),** enzimas extracelulares especializadas no solo en la hidrólisis de poliésteres presentes en la cutina **(Maity et al., 2021),** sino también en la digestión de ésteres hidrosolubles y triglicéridos **(Sulaiman et al., 2012).** Esta capacidad hidrolítica demuestra su potencial para atacar los enlaces de ésteres aromáticos como los del PET entre el EG y TPA, clasificándola como una enzima éster hidrolasa carboxílico (EC 3.1.1.) según la nomenclatura de la Comisión de Enzimas **(Taniguchi et al., 2019).**

Al igual que las cutinasas, IsPETasa muestra un plegamiento α/β, compuesta por nueve hebras β (que incluye una lámina β central retorcida) intercaladas por seis hélices α **(Chen et al., 2018).** Su actividad catalítica se sustenta en una tríada constituida por los residuos S-H-D **(Nyyssölä, 2015)** específicamente en las posiciones S160, H237 y D206 (Figura 2) **(C. Liu et al., 2018)**. Esto indica la presencia de un mecanismo de transferencia de carga similar al observado en otras hidrolasas con estructuras de pliegues α/β. Además, el complemento W185, ubicado en el sitio activo, forma interacciones de apilamiento π-π con las unidades de fenileno del PET, facilitando la unión con el sustrato **(Austin et al., 2018)**. Cabe resaltar que el dominio catalítico de la enzima tiene forma de L y es rico en aminoácidos hidrófobos como tirosina, triptófano e isoleucina, propiedades que establecen el entorno hidrófobo esencial para estabilizar la interacción enzima-sustrato **(Joo et al., 2018).**

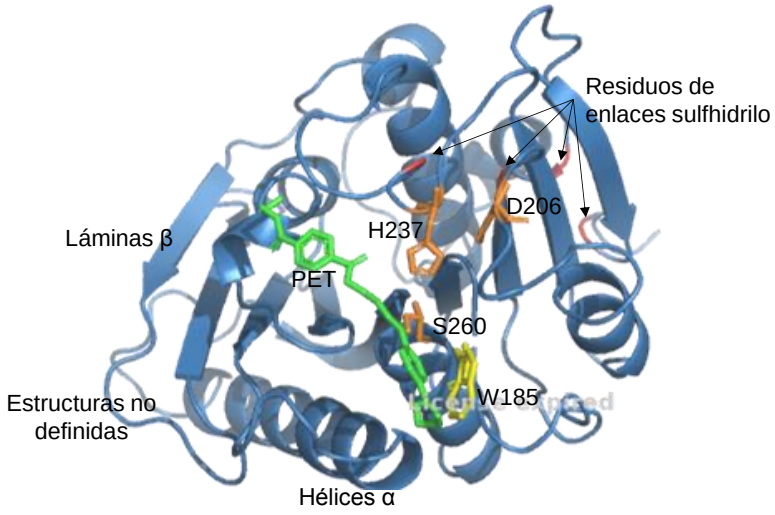


Figura 2. *Estructura de la enzima PETasa (6EQE)*

Nota: En la imagen se observa que los residuos de la triada catalítica están representados en formato sticks de color naranja, mientras que la estructura restante en cartoon (láminas β, hélices α y estructuras no definidas de color azul), además, el complemento W185 se encuentra en amarillo y los enlaces sulfhidrilo de color rojo. La estructura del PET se encuentra de color verde. Adaptado de **C. Liu et al., (2018).**

1.1.4.2 Ventajas estructurales de IsPETasa sobre las cutinasas

Pese al alto grado de similitud entre la estructura cristalina de IsPETasa y cutinasas, la eficiencia catalítica de IsPETasa es varias veces superior a la de otros miembros de la familia de las hidrolasas **(Chen et al., 2018)** como la cutinasa de *Thermobifida fusca* (TfH), del metagenoma del compost de rama de hoja (LC cutinasa, o LCC) y de *F. solani* (FsC) **(Taniguchi et al., 2019).** Esto se debe principalmente a la distribución molecular de los residuos en IsPETasa que permite una mayor interacción enzima-sustrato que sus cutinasas homólogas **(Maity et al., 2021).**

En primer lugar, la conformación oscilante de W185 que adopta los confórmeros A, B y C, generada por la sustitución de H por S en la posición 187 en IsPETasa, cuya cadena lateral pequeña y delgada, a diferencia del grupo imidazol voluminoso de histidina, otorga expansión superior al de cutinasas homólogas en el sitio activo para permitir que las moléculas voluminosas del PET se unan fácilmente a dicho sitio activo **(F. Liu et al., 2023).** Así también, IsPETasa tiene dos puentes disulfuro, DS1 y DS2, de los cuales este último es común en cutinasas y mantienen unidos los bucles β7-α5 y β8-α6 que permiten la estabilidad del ácido aspártico y la histidina pertenecientes a la triada catalítica (Figura 2) **(Chen et al., 2018).** Finalmente, el bucle β8-α6 presenta una mayor extensión que en otras enzimas homólogas ya que contiene los residuos adicionales N244, S245 y N246 que facilitan la creación de un subsitio para la unión al PET **(Chen et al., 2018; Joo et al., 2018).**

Tales características estructurales específicas en IsPETasa sustentan su superior potencial degradador de PET en comparación al observado en otras cutinasas **(Yoshida et al., 2016b)**. Sin embargo, se estima que su eficacia no alcanza los niveles esperados para su aplicación a escala industrial. Incluso se han identificado desafíos relacionados con su baja termoestabilidad y su limitada capacidad de degradar el PET altamente cristalino empleado en la fabricación de botellas para bebidas **(Jayasekara et al., 2023).** Para abordar estas limitaciones, se ha recurrido a la ingeniería enzimática mediante la sustitución de residuos cercanos al sitio activo **(Austin et al., 2018).**

1.1.4.3 Mutaciones dirigidas en la enzima IsPETasa

Se han ensayado varias sustituciones a lo largo de la secuencia de IsPETasa con el fin de incrementar su termoestabilidad, capacidad catalítica y actividad sobre PET cristalino. Estas mutaciones se encuentran localizadas dentro y fuera del sitio activo. Por ejemplo, la doble mutación S238F y W159H, ha mejorado la eficacia de degradación del PET mutante en más de 3,5 veces en comparación con la enzima silvestre (WT) **(Austin et al., 2018).** Otras variantes, como S121E, D186H y R280A, han mejorado la estabilidad térmica y la actividad catalítica hasta 14 veces más que la enzima WT **(Cui et al., 2021).**

En otro enfoque, las sustituciones I208V, N212A y S238Y, localizadas cerca de los residuos catalíticos, han generado las primeras variantes que degradan significativamente el PET altamente cristalino **(Sevilla et al., 2023).** Microfotografías de microscopio electrónico de barrido (SEM) y ensayos de calorimetría diferencial de barrido (DSC) han revelado que las variantes N212A y S238Y alteran la superficie del PET y disminuyen su cristalinidad significativamente, superando a la enzima WT.

Así también, las imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) muestran que la degradación ocasionada por el mutante S238Y sobre la superficie de *films* de PET altamente cristalino genera agujeros 17 veces más profundos que la enzima WT. En síntesis, las variantes S238Y y N212A exhiben una actividad 3,3 y 1,4 veces mayor, respectivamente, con respecto a la enzima WT **(Sevilla et al., 2023).** Esto sugiere que son candidatos excelentes para su aplicación en la degradación enzimática del PET a nivel industrial **(Taniguchi et al., 2019).** Sin embargo, antes de que pueda ser utilizada en aplicaciones industriales, es necesario investigar cómo los factores físicoquímicos y mutaciones afectan la actividad enzimática de la IsPETasa **(C. Liu et al., 2018).**

1.1.5 Cinética enzimática

1.1.5.1 Definición de cinética enzimática

La cinética enzimática es una herramienta fundamental para garantizar la eficiencia de los procesos enzimáticos a gran escala. Su aplicación permite optimizar los procesos industriales, mejorando la eficiencia y reduciendo costos **(Punekar, 2018).** Este enfoque se centra en medir y explicar matemáticamente la velocidad de reacción y sus constantes asociadas en las reacciones enzimáticas, ofreciendo una visión detallada de los pasos en el proceso **(Rogers & Gibon, 2009),** así como información sobre las interacciones involucradas y el mecanismo catalítico específico **(Voet, 2016).**

1.1.5.2 Ecuación de Michaelis – Menten

La ecuación de Michaelis-Menten (MM) es fundamental en la cinética enzimática y describe la variación de la velocidad de una reacción enzimática en función de la concentración del sustrato **(Núñez de Castro, 2001).** Según este modelo, y debido a la naturaleza molecular de la enzima, la reacción global ocurre en dos etapas, la primera involucra que la enzima y el sustrato entren en equilibrio para formar un complejo enzima-sustrato y la segunda implica la descomposición del complejo en enzima y producto, tal como se demuestra en la ecuación 1 **(Robinson, 2015; Voet, 2016):**

$$Enzima + Sustrato \rightleftarrows Complejo\ ES \rightarrow Enzima + Producto \qquad \textbf{(Ecuación 1)}$$

Así también, se asume que el sustrato está mucho más concentrado que la enzima, de modo que satura toda la enzima disponible en ES, convirtiendo esta etapa en la limitante de velocidad **(Chang, 2005).** Estas premisas dilucidan el mecanismo cinético establecido por los bioquímicos Leonor Michaelis y Maud L. Menten en 1913 **(Chang, 2005; Núñez de Castro, 2001).**

Experimentalmente, este comportamiento se evalúa mediante el ensayo de velocidad que analiza la velocidad inicial para distintas concentraciones de sustrato con una concentración constante de enzima **(Choi et al., 2017).** Este método genera una curva hiperbólica ($y = \frac{ax}{b+x}$) que ilustra el incremento de la velocidad conforme aumenta la concentración del sustrato, relación que tiende a disminuir a medida que el sustrato se aproxima a sus niveles saturados, señalando en este punto la línea límite de la función o la velocidad máxima **(Robinson, 2015).**

Las constantes a y b de la relación hiperbólica representan la velocidad de reacción máxima (V_{max}) y la constante de Michaelis-Menten *(K_M)*, respectivamente**.** De tal manera, el modelo establece una relación entre la velocidad de reacción inicial (v_0), la velocidad de reacción máxima (V_{max}) y la concentración

de sustrato inicial [S] utilizando la constante de Michaelis-Menten *(K_M)*, como se expone en la ecuación 2 **(Salmon & House, 2015):**

$$v_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} \qquad \textbf{(Ecuación 2)}$$

Donde K_M representa la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es la mitad de la V_{max}, por lo que mide la afinidad de la enzima por el sustrato **(Voet, 2016).** Mientras que V_{max} se define como la tasa máxima de conversión de sustrato por unidad de tiempo, es decir, es la velocidad a la que la concentración total de enzima está presente como complejo enzima-sustrato **(Núñez de Castro, 2001).**

Adicionalmente, con base a datos experimentales y cinéticos es posible determinar la taza de recambio de la enzima (k_{cat}), la constante de especificidad (CE) y la actividad específica de la enzima (SA) **(Punekar, 2018).**

1.1.6 Sustratos para la caracterización cinética

1.1.6.1 Polietileno Tereftalato (PET)

Con relación a lo mencionado en párrafos anteriores, la evaluación cinética de una enzima, en este caso IsPETasa, implica el registro constante de las velocidades iniciales de reacción a diferentes concentraciones de sustrato, es decir, el PET **(van Eunen & Bakker, 2014)**. Este último es un poliéster compuesto por una matriz polimérica de monómeros de tereftalato de etileno con unidades alternas ($C_{10}H_8O_4$) **(Paladhi et al., 2022),** cuya cristalinidad dificulta la determinación de la cinética enzimática, ya que existen limitaciones estéricas y fenómenos de transferencia de masa que provocan un limitado acceso al sustrato y una lenta tasa de liberación del producto enzimático **(Austin et al., 2018)**, características típicas de una cinética en fase heterogénea **(Thomsen et al., 2023).**

Esta dificultad se intensifica en el caso del PET altamente cristalino debido a que las unidades de tereftalato aromático reducen la movilidad de la cadena **(Taniguchi et al., 2019),** limitando el acceso a las cadenas flexibles de PET **(Carr et al., 2020)**. Es decir que, a medida que aumenta la cristalinidad, la tasa de biodegradación disminuye proporcionalmente **(Taniguchi et al., 2019).** Igualmente, se ha sugerido que la hidrólisis enzimática del PET debería realizarse a temperaturas superiores a la temperatura de transición vítrea (*Tg*) del PET (76 °C) **(Nguyen et al., 2018)** con el fin de mejorar la accesibilidad de la enzima al sustrato, aprovechando así la mayor movilidad de las cadenas amorfas **(Thomsen et al., 2022).** Sin embargo, a estas temperaturas la enzima atravesaría un severo proceso de

desnaturalización debido a su limitada termoestabilidad y pérdida de actividad (observada en un periodo de 24 h a 37 °C) **(Deng et al., 2023).**

1.1.6.2 *p*(NP)-acetato (pNPA)

De manera alternativa, para estudiar la cinética de las enzimas de tipo cutinasa o lipasa, como la IsPETasa, se pueden utilizar compuestos análogos, como las sustancias cromofóricas o *p*-nitrofenil (*p*NP) ésteres, cuya estructura molecular es más accesible que el PET **(De Yan et al., 2013)**. Cabe recalcar que, aunque la capacidad hidrolítica del PET no tenga relación con la especificidad al éster acílico de *p*NP, pueden utilizarse para la caracterización de la enzima de interés **(C. Liu et al., 2018).** Un ejemplo de tales sustancias es el *p*-nitrofenil acetato, también conocido como *p*(NP)-acetato o pNPA, que se utiliza en ensayos de actividad de esterasas y lipasas debido a su fácil detección y medición **(Wheelock et al., 2008).**

El *p*(NP)-acetato, un éster derivado del ácido acético, presenta una estructura química que incluye un grupo acetato (-$COOCH_3$) y un grupo nitro (-NO_2) unidos a un anillo bencénico, resultado de la condensación formal del grupo hidroxi del 4-nitrofenol con el grupo carboxi del ácido acético **(Armendáriz-Ruiz et al., 2018).** Físicamente, se presenta como un sólido cristalino de color blanco y es soluble en compuestos orgánicos **(National Center for Biotechnology Information, 2023).** La hidrólisis de este compuesto libera *p*-nitrofenol, cuya absorbancia puede monitorizarse fácilmente a 415 nm mediante espectrofotometría **(Sigma-Aldrich, 2022).**

Con base a los antecedentes mencionados, el presente estudio tiene como propósito caracterizar la cinética de las variantes mutantes I208V, N212A y S238Y de la enzima IsPETasa en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato, con el fin de profundizar en la eficiencia catalítica en los nuevos mutantes de esta enzima degradadora de PET, pretendiendo así aportar al desarrollo del reciclaje biotecnológico para los desechos plásticos.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

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

1.2.2 Objetivos Específicos

- Producir las variantes silvestre y mutantes (I208V, N212A y S238Y) de la enzima PETasa de *I. sakaiensis.*

- Determinar las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes de la enzima IsPETasa en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato.

- Evaluar el efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

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

Tabla 1.

Reactivos, material fungible y equipos utilizados en la investigación

Reactivos	
- Acetonitrilo (ACN)	- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)
- Ácido clorhídrico (HCl)	- Glucosa
- Acrilamida	- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Agar bacteriológico	- Imidazol
- Agua desionizada	- Lactosa
- Agua destilada	- *p*(NP)-acetato
- Albúmina del suero bovino	- Reactivo de Biuret
- Alcohol etílico	- SDS
- Ampicilina (AMP)	- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)
- Cloranfenicol (CAM)	- Triptona
- Cloruro de sodio (NaCl)	- Tris Base
- Cloruro de potasio (KCl)	- Tritón X-100
- Extracto de levadura	
Material fungible	
- Balones de aforo	- Papel absorbente
- Cajas Petri de vidrio	- Papel aluminio
- Columna Ni-NTA	- Papel *film*
- Espátulas estériles	- Papel filtro
- Frascos de tapa azul	- Pipetas
- Gradillas	- Probetas
- Guantes de nitrilo	- Puntas para micropipetas (2-20 µL, 20-200
- Hisopos	µL, 10-1000 µL)
- Malla metálica	- Tubos Falcon
- Matraz Erlenmeyer	- Tubos Eppendorf

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

2.2 Métodos

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

2.2.1.1 Plásmido y sistema heterólogo a utilizar

Se utilizaron los plásmidos pET21b(+)-Is-PETasa, pET21b(+)-Is-PETasa_I208V, pET21b(+)-Is-PETasa_N212A y pET21b(+)-Is-PETasa_S238Y, que contienen las secuencias de las variantes silvestre y mutantes a expresar **(Sevilla et al., 2023).** Estos plásmidos se transformaron en células competentes de *Escherichia coli* Rosetta (DE3), mismas que fueron proporcionadas por la Dra. Liliana Cerda Mejía, docente – investigadora de la FCIAB.

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

La transformación de las células competentes se realizó por choque térmico de acuerdo con la metodología descrita por **Cohen et al. (1972).** Para cada enzima a producir, se tomaron 100 µL de células de *E. coli* Rosetta (conservadas a -80 ºC) y se las descongeló en hielo durante 30 min. Pasado este tiempo, se agregó 100 ng de plásmido y se incubó en hielo por 30 min. Luego, se realizó el choque térmico por incubación en un baño termostático a 42 ºC por 90 s, seguido de 2 min de incubación en hielo. Después, se añadió 500 µL de caldo SOC (20 mL solución de glucosa 20 %, 5 g/L extracto de levadura, 0,584 g/L NaCl, 20 g/L Triptona, 0,186 g/L KCl, 2,4 g/L $MgSO_4$, pH 7,5) y se incubó durante 2 h a 37 ºC, con agitación constante de 220 rpm. 50 µL del cultivo anterior se inoculó en agar LB (5

g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, 20 g/L agar, pH 7,0) suplementado con ampicilina (AMP) y cloranfenicol (CAM) a 37 ºC durante toda la noche **(Cerda-Mejía, 2016).** Finalmente, de dos a cinco colonias de dicho agar se traspasaron a tubos con 5 mL de caldo LB (5 g/L extracto de levadura, 10 g/L NaCl, 10 g/L triptona, pH 7,0) suplementado con AMP Y CAM.

2.2.1.3 Expresión de la enzima IsPETasa

La expresión de las proteínas se llevó a cabo de acuerdo con la metodología propuesta por **Sevilla y Cerda-Mejía (2022),** con modificaciones. En resumen, se utilizó medio LB para la incubación y autoinducción de la expresión génica en las células transformadas. Una colonia de *E. coli* Rosetta (DE3) transformada con los plásmidos para cada una de las variantes mutantes se inoculó en 50 mL de caldo LB suplementado con AMP Y CAM, y se incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm) durante 16 h. Luego, el cultivo se pasó a un matraz con 500 mL de caldo autoinductor suplementado con los mismos antibióticos y lactosa y se incubó nuevamente a 37 °C con agitación constante de 200 rpm por 24 h. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3910 g, a 4 °C por 20 min. Finalmente, se añadió 6 mL de *buffer* de lavado (Tris 25 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, 20mM imidazol) por cada gramo de pasta celular y se almacenó la biomasa de cada variante a -80 °C.

2.2.1.4 Purificación de las enzimas WT y variantes mutantes a través de cromatografía de afinidad

Lisis celular

Se realizó la lisis celular en un disruptor celular de acuerdo con la metodología de **Dermit y Mardakheh (2021)**. Se agregó 0,3 % de tritón X-100 y se homogenizó la mezcla durante 5 min. Finalmente, la muestra se sonicó en un disruptor celular (Benchmarck Pulse 150) por 10 ciclos de 10 s de trabajo constante, con descansos de 10 s a 45 % de amplitud.

Purificación de las proteínas

La purificación de las variantes silvestres y mutantes de la enzima IsPETasa se estableció según el método descrito por **Sevilla et al. (2023)** con modificaciones. En síntesis, la purificación de las proteínas se realizó mediante FPLC con una columna pre-empacada de Ni-NTA (GE, Health Care) debido a la presencia de la cola de histidinas (6xHis) en la enzima IsPETasa. Para ello, se centrifugó el lisado celular a 21130 g por 1 h a 4 °C, cuyo sobrenadante se recolectó y transfirió a la columna previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna (cv) de *buffer* de lavado. Luego, las proteínas no unidas a la matriz cromatográfica se removieron mediante 10 cv de *buffer* de lavado. Las enzimas IsPETasa se

recuperaron de la columna mediante la adición de 5 cv de *buffer* de elución (Tris 25 mM, pH 7,5, 150 mM NaCl, 500 mM imidazol). Las enzimas se colectaron en fracciones de 1 mL en tubos Eppendorf estériles. Por último, la pureza de las fracciones que contienen cada enzima se analizó mediante SDS-PAGE **(Dermit & Mardakheh, 2021).** Además, la cuantificación de proteínas se realizó por absorbancia de acuerdo con **Janairo et al. (2011),** colocando la muestra y reactivo de Biuret en relación 1:5 y contrastando dicha absorbancia con una curva de calibración elaborada con albúmina del suero bovino (BSA).

2.2.2 Determinación de las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes de la enzima IsPETasa en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato

El estudio de los parámetros cinéticos de la reacción catalizada por la enzima IsPETasa (variantes silvestre y mutantes), empleando *p(*NP)-acetato como sustrato, se evaluó según lo descrito por Yoshida et al. (2021). La determinación de K_M y V_{max} se realizó mediante la evaluación de las velocidades iniciales observadas a distintas concentraciones de sustrato, según la cinética de Michaelis-Menten. Se preparó un stock de enzima en *buffer* de enzima (50 mM Na_2HPO_4-HCl, pH 7,0). La reacción se realizó por triplicado en presencia de *buffer* de reacción (50 mM Na_2HPO_4-HCl, 0,3 % (v/v) tritón X-100 pH 7,0) a 30 °C. Las velocidades iniciales se establecieron experimentalmente mediante ensayos a diferentes concentraciones de sustrato (0,006 – 6,25 mM) disuelto en acetonitrilo (ACN) con una concentración constante de enzima 25nM. La concentración del producto de la reacción, *p*-nitrofenol (pNP), fue detectado por espectrofotometría a 415 nm. Estos parámetros se calcularon mediante regresión no lineal empleando el software GraphPad Prism version 10.2.3 para Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, utilizando la ecuación de Michaelis-Menten.

La constante catalítica, k_{cat}, se determinó mediante la ecuación 3.

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E_0]} \qquad \textbf{(Ecuación 3)}$$

Siendo V_{max} la velocidad máxima de la reacción, mientras que $[E_0]$se refiere a la concentración inicial de enzima.

La actividad específica (SA) se calculó mediante la ecuación 4.

$$SA = \frac{U}{mg\ E_0} \qquad \textbf{(Ecuación 4)}$$

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

Finalmente, el coeficiente de especificidad (CE) se determinó mediante la ecuación 5.

$$CE = \frac{k_{cat}}{K_M} \qquad \textbf{(Ecuación 5)}$$

Es decir, el cociente entre la constante catalítica, k_{cat} (s^{-1}) y la constante de Michaelis-Menten, K_M (M).

2.2.3 Evaluación del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de la reacción catalizada por las variantes silvestre y mutantes en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato

El efecto de la temperatura sobre las constantes cinéticas se determinó de acuerdo con la metodología descrita en el apartado 6.2, con la diferencia de que las reacciones catalizadas por las enzimas se ejecutaron a 25, 35 y 45 ºC en baño maría, manteniendo constante la concentración de sustrato (1mM). Los experimentos se realizaron por triplicado y la producción de pNP se monitorizó mediante espectrofotometría a una longitud de onda de 415 nm **(Yoshida et al., 2021).**

2.2.3.1 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de la temperatura sobre las constantes cinéticas se empleó un Diseño Factorial 3×4, es decir, dos factores (temperatura de reacción y variantes mutante con tres y cuatro niveles, respectivamente). El diseño será evaluado mediante un análisis de varianza ANOVA, con un nivel de significancia del 5 %. En caso de evidenciarse un efecto significativo sobre las variables, se realizará una prueba de comparación múltiple Tukey, con un nivel de significancia del 5 %, para conocer el tratamiento más relevante.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Expresión y purificación de las enzimas IsPETasa silvestre y mutantes

3.1.1 Sistema heterólogo de expresión

La expresión de las proteínas se realizó a través del plásmido base pET21b(+)-Is-PETasa diseñado por **Austin et al. (2018).** Por otra parte, los plásmidos pET21b(+)-Is-PETasa_S238Y, pET21b(+)-Is-PETasa_N212A y pET21b(+)-Is-PETasa_I208V, que contienen las secuencias de las variantes mutantes expresadas fueron obtenidos previamente mediante mutación dirigida al sitio **(Sevilla et al., 2023).** Los plásmidos que contienen el vector pET son ampliamente utilizados en la expresión de enzimas recombinantes ya que emplean el promotor T7, tan activo y selectivo para la transcripción de los genes diana, que gran parte de los recursos de la célula pueden ser dirigidos a producir la proteína de interés **(Studier, 2014).** Adicionalmente, los plásmidos de la serie pET permiten el control de la inducción de la expresión de proteína de manera proporcional a la concentración de isopropil-ß-D-tiogalactopiranosido (IPTG) o lactosa en el medio de cultivo.

Además, se utilizó *E. coli* Rosetta (DE3), un derivado de *E. coli* BL21 desarrollado para la producción heteróloga de proteínas que contienen codones raramente sintetizados en dicha bacteria con un plásmido resistente al cloranfenicol **(Novagen, 2005).** Esta cepa es lisógeno del bacteriófago DE3, por lo que en su cromosoma se integra el gen del represor lacI, del promotor LacUV5 y de la ARN polimerasa T7, este último altamente específico para la región promotora e inducido bajo el control de LacUV5 **(Du et al., 2021).** En presencia de un inductor, dicha ARN polimerasa activa el promotor T7 presente en el plásmido insertado, para así transcribir los genes de interés **(Pouresmaeil & Azizi-Dargahlou, 2023).** Así, el plásmido y la cepa, en conjunto, forman un sistema potencial para la expresión de proteínas heterólogas.

3.1.2 Medio de inducción

Para inducir la transcripción de los genes de interés, se agregan al medio de cultivo isopropil-ß-D-tiogalactopiranosido (IPTG) o lactosa, análogos de la alolactosa, que actúan como inductores de los promotores **(Marschall et al., 2017).** En este estudio, se utilizó un medio suplementado con lactosa como medio de autoinducción, en lugar del método común con IPTG reportado previamente por **Sevilla y Cerda-Mejía (2022).**

La lactosa es un disacárido que puede ser metabolizado como fuente de carbono y como desencadenante de la trascripción del operón LacUV5 en *E. coli.* **(Novagen, 2005).** Este compuesto se convierte en

alolactosa por la acción de la β-galactosidasa del operón lac, que se une a la proteína represora lac y provoca un cambio conformacional que libera al represor del operón LacUV5 **(Wheatley et al., 2013).** Esto permite la transcripción del gen de la ARN polimerasa T7, que posteriormente se une al promotor T7 del plásmido y transcribe los genes de interés **(Du et al., 2021).**

Este mecanismo permite un alto rendimiento en la expresión de proteínas regulado por la concentración de lactosa presente en el medio. Esto resulta más cómodo que la inducción con IPTG puesto que no requiere la intervención del investigador ni la interrupción del crecimiento celular para comprobar la densidad óptica (DO), como es necesario en el método clásico **(Crowley & Rafferty, 2019)**. Además, aunque el promotor T7 es preferido por ser fuerte, puede generar inestabilidad. Incluso niveles bajos de un potente inductor como IPTG pueden desencadenar una elevada tasa de transcripción y expresión del gen de interés, lo que puede provocar estrés celular, mal plegamiento de la enzima recombinante y bajo rendimiento de proteína, volviéndose tóxico para la producción celular **(Shariati et al., 2021).**

En este estudio se confirmó un mayor rendimiento en biomasa en comparación con lo obtenido por **Sevilla y Cerda-Mejía (2022)** quienes expresaron las enzimas con IPTG. Los rendimientos de biomasa en 500 mL de medio fueron de 3,24, 3,58 y 4,74 mg/L para las variantes S238Y, N212A e I208V, respectivamente. De acuerdo con la tabla 2, se obtuvo aproximadamente el doble de biomasa, con el medio de autoinducción.

Tabla 2.

Rendimiento de biomasa generada en la autoinducción de las enzimas IsPETasa

IsPetasa variante	**Rendimiento de biomasa (mg/L)**
WT	6,68
S238Y	18,32
N212A	8,16
1208V	10,82

El alto rendimiento puede también atribuirse a la glucosa en el medio, que actúa como fuente principal de carbono y desencadenante de los genes que promueven el metabolismo de lactosa. Pues, en presencia de dos fuentes de carbono, la bacteria exhibe dos fases de crecimiento: primero consume rápidamente la fuente de carbono preferida: glucosa, hasta alcanzar la fase estacionaria **(Perrin et al., 2020)**. El consumo gradual de glucosa aumenta los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) que al unirse a la proteína activadora de catabolitos (CAP), forma un complejo que se ancla al promotor lac, estimulando la transcripción del promotor lacUV5 y la posterior expresión de la ARN polimerasa T7, pasando así a la segunda fase donde sucede la trascripción de genes **(Du et al., 2021).**

3.1.3 Purificación de proteínas

En todos los casos, las enzimas cuentan con una secuencia de ADN que codifica para una etiqueta de seis histidinas que se expresan en el extremo C-terminal de la proteína diana, facilitando su unión a una columna de Ni-NTA para su purificación en FPLC **(Dermit & Mardakheh, 2021).** La proteína producida se localiza en el citoplasma, por lo que fue necesaria la ruptura de la pared celular para liberar el contenido proteico mediante sonicación y adición de tritón X-100 0,3 % al *buffer* para liberar el contenido proteico.

La Figura 3 muestra los cromatogramas de purificación para cada variante, junto con el análisis complementario de SDS-PAGE, en los que se aprecia que la proteína diana, con un peso de 31,31 kDa **(Sevilla et al., 2023),** se expresó y purificó del extracto celular. Los cromatogramas presentan la absorbancia (mAU) frente al volumen de elución en mL, siendo el primero de estos un indicador de la concentración de proteína en la elución.

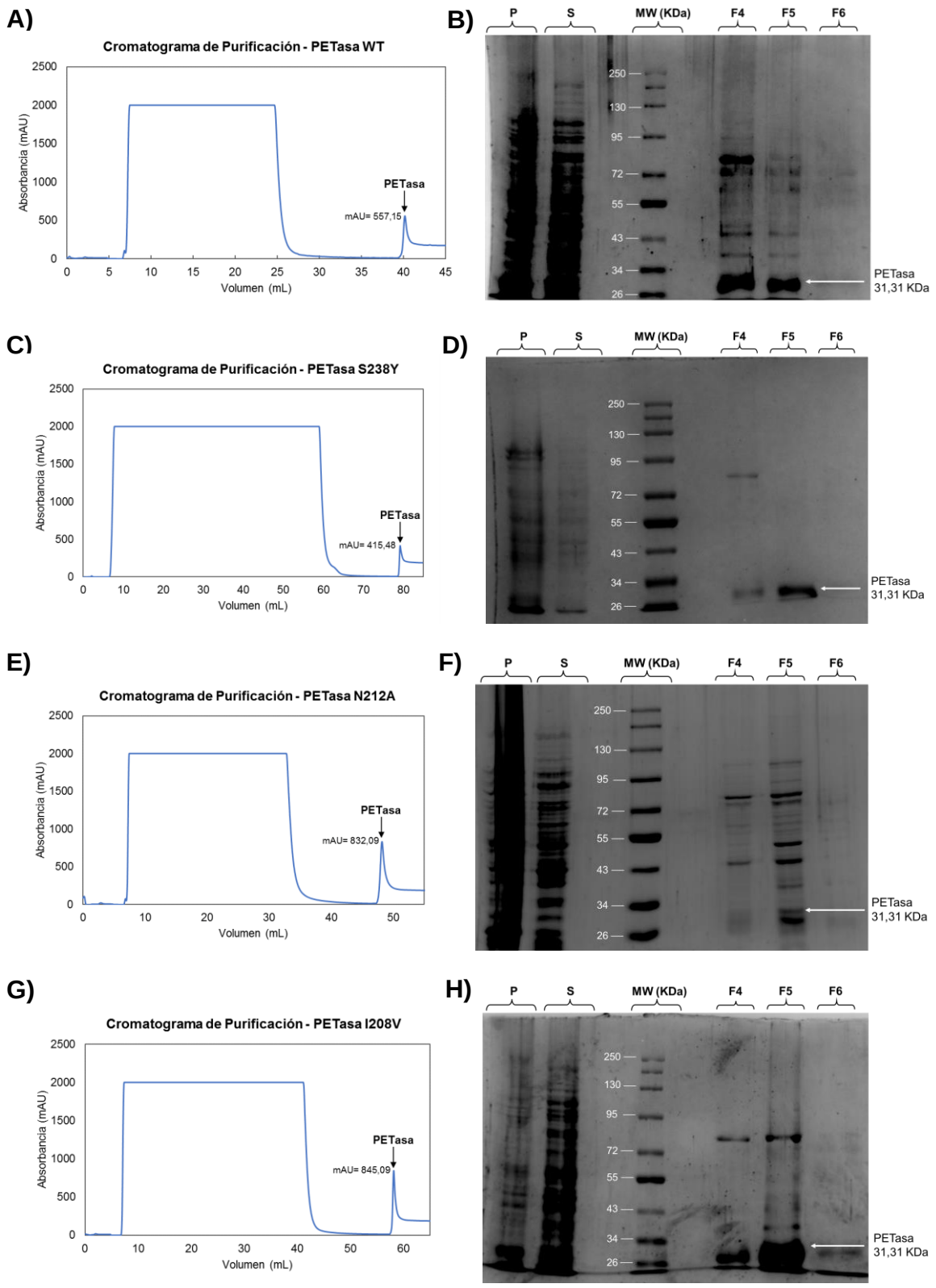


Figura 3. *Purificación de las variantes silvestre (WT) y mutantes S238Y, N212A e I208V*

Nota: (A) Cromatograma de purificación de la variante WT, (B) Análisis SDS-PAGE de la variante WT, (C) Cromatograma de purificación de la variante S238Y, (D) Análisis SDS-PAGE de la variante S238Y, (E) Cromatograma de purificación de la variante N212A, (F) Análisis SDS-PAGE de la variante N212A, (G) Cromatograma de purificación de la variante I208V, (H) Análisis SDS-PAGE de la variante

1208V. En los cromatogramas se encuentra señalado el pico de elución de la IsPETasa con una flecha, junto con la absorbancia obtenida de la proteína. Mientras que, en el gel de electroforesis, teñido con Azul de Comassie, se encuentra señalada la carga de cada carril donde P representa el pellet, S el sobrenadante, MW el marcador de peso molecular, F4, F5 y F6 representan las fracciones recolectadas de proteína purificada siendo la fracción 5 la que mayor concentración de IsPETasa contiene.

En la Figura 3A, correspondiente a la IsPETasa WT se observa que la recolección se produjo a los 40 mL de volumen eluído, con un pico de elución bien definido y aislado, dando indicios de ser una proteína pura en esta fracción. Adicionalmente, demuestra una absorbancia máxima de 557,15 mAU, que corresponde a una concentración significativa de proteína y sugiere un elevado nivel de expresión de la enzima recombinante mediante el sistema de autoinducción empleado. Así también, el gel SDS-PAGE (Figura 3B) muestra que la fracción 5 contiene pocos contaminantes, y que la banda correspondiente a la enzima IsPETasa WT muestra una banda bien definida y con elevada intensidad, relativa a su concentración. Cabe recalcar que, aunque la fracción 4 también contiene la proteína de interés, esta fracción contiene además varias proteínas bacterianas pertenecientes al sistema heterólogo de expresión que co-purificaron en el proceso de separación. Por esta razón, la fracción 4 no se consideró para análisis posteriores.

Los cromatogramas pertenecientes a las tres variantes mutantes de IsPETasa presentaron perfiles similares, con ciertas variaciones en la altura y área de los picos de elución de las enzimas recombinantes. Estas variaciones se deben comúnmente a diferencias en los niveles de expresión, plegamiento y solubilidad de cada enzima derivados de las mutaciones introducidas en la secuencia silvestre. Además, los cambios en los picos de elución también se deben a la cantidad de biomasa obtenida para cada mutante en el proceso de autoinducción, lo cual incide directamente en la cantidad de enzima producida. Cabe notar que, en comparación a la enzima WT, la variante N212A muestra una mayor presencia de proteínas que co-purificaron con la enzima de interés a juzgar por el SDS-PAGE. Por otro lado, se puede apreciar que la enzima de interés se encuentra también en el *pellet* de la variante silvestre WT y las tres mutantes, dando a entender que parte de las enzimas no adoptan el plegamiento adecuado durante su expresión o extracción y se agregan en forma de precipitados que se separan de la fase soluble durante la centrifugación.

3.2 Reacción catalizada por las variantes en presencia de *p*(NP)-acetato como sustrato

3.2.1 Sustrato *p*(NP)-acetato

Las constantes cinéticas de las variantes silvestre y mutantes se obtuvieron mediante la hidrólisis del éster *p*(NP)-acetato (pNPA), detectando el producto *p*-nitrofenol (pNP) a 415 nm **(Armendáriz-Ruiz**

et al., 2018). El pNPA es un éster de *p*-nitrofenol y acetato, un acilo de 2 carbonos de longitud. Este es un sustrato adecuado para hidrolasas debido a su cadena corta, siendo útil para medir la actividad enzimática ya que las hidrolasas son afines a este tipo de ésteres **(Y. Liu et al., 2022).**

Para los ensayos, se estableció un rango de concentraciones de 0,006 a 6,25 mM de sustrato, siendo estos los límites detectados en el espectrofotómetro. Se observó que a concentraciones inferiores a 0,065 mM el pNP generado fue difícil de cuantificar, mientras que concentraciones superiores a 6,25 mM resultaban inconsistentes, debido a la baja solubilidad del pNPA, formando precipitados y turbidez que afectaban las mediciones. Cabe recalcar que el *buffer* de reacción contenía tritón X-100, un surfactante que mejora la solubilidad de los sustratos, como el pNP **(Lam & Ilies, 2022)**. Sin embargo, este efecto fue mínimo a altas concentraciones de sustrato, donde el límite de solubilidad del pNPA en medio acuoso ejerce un marcado efecto negativo en la cuantificación de la actividad enzimática. Por tanto, este estudio sugiere el uso de rangos de concentración de pNPA moderados (0,006 a 6,25 mM) para evaluar la cinética enzimática de las enzimas IsPETasa.

Las condiciones de reacción fueron pH 7,00 a 30 ºC, en lugar de las óptimas para la IsPETasa (pH 8,00 y 35 ºC) de acuerdo con **C. Liu et al. (2018)**, debido a que la estabilidad del sustrato disminuye cuando las condiciones superan el pH 8,00 y 40 ºC **(Sulaiman et al., 2012).** Así también, el tiempo de reacción se definió para 5 minutos ya que durante este tiempo se observó linealidad en las velocidades iniciales.

3.2.2 Determinación de las constantes cinéticas

Estructuralmente, el pNP es similar al grupo carboxilo del TPA y MHET, productos de la hidrólisis del PET, pues se constituye de un anillo bencénico con sustituyentes en la posición *para*, de manera que su modo de unión al sitio activo y descomposición podría ser igual al del PET (Figura 4) **(Chen et al., 2018).** El grupo carbonilo del pNPA es atraído al centro de unión, alineándose cerca del residuo H237 con quien forma un enlace de hidrógeno, estabilizando el complejo enzima-sustrato. En esta posición, el nucleófilo S160 de la triada catalítica ataca el grupo carbonilo del éster y el agujero de oxianión, formado por M160 y Y87, estabiliza el oxianión intermedio hasta la ruptura del éster **(Han et al., 2017).** Luego de la escisión, el producto se apila cara a cara (interacción $\pi - \pi$) con la cadena W185 y se desplaza del centro catalítico.

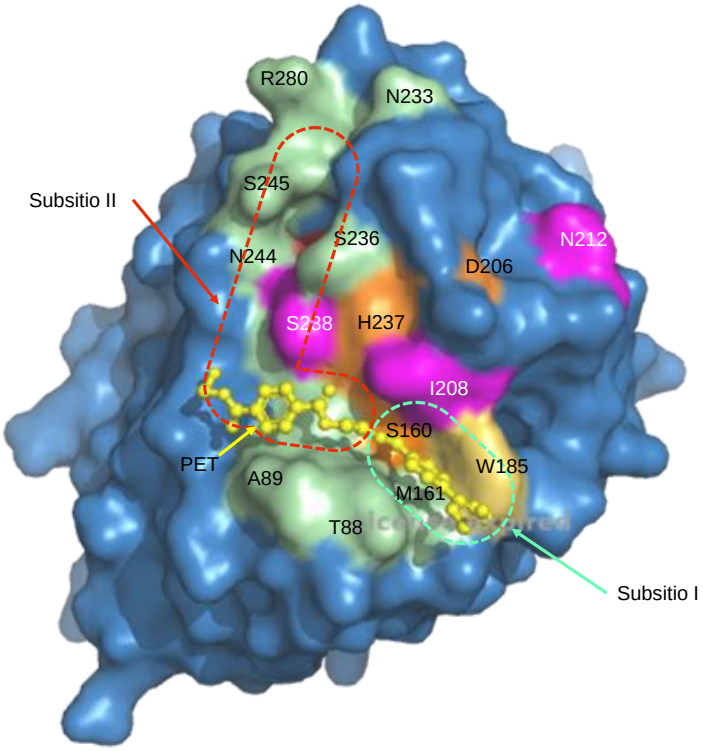


Figura 4. *Sitio activo de la IsPETasa y su interacción con el PET*

Nota: Los residuos de color verde claro conforman los subsitios I (silueta celeste) y II (silueta roja), los residuos naranjas representan la triada catalítica y el complemento W185 se encuentra de color dorado. Así también, los residuos magenta constituyen los residuos que se desean mutar dentro y cerca del sitio catalítico. Además, la molécula de PET se representa en esferas y palillos amarillos. Adaptado de **C. Liu et al., (2018).**

En este mecanismo enzimático, el residuo **I208** y M161, establecen interacciones hidrófobas en el subsitio I del sitio de unión, facilitando un acoplamiento favorable del éster **(Chen et al., 2018).** De igual manera, el subsitio II conformado por residuos como T88, A89, N233, S236, **S238**, N244, S245, y R280, median la interacción enzima-sustrato a través de interacciones hidrófobas **(Joo et al., 2018).** Por otro lado, **N212,** aunque fuera del sitio de unión, podría contribuir a la flexibilidad del bucle β7-α5 donde se encuentra D206, un componente de la triada catalítica **(Sevilla et al., 2023).** Los residuos resaltados fueron objeto de mutaciones para mejorar la actividad enzimática de la IsPETasa, la misma que se evaluó a través de su cinética enzimática en presencia de pNPA como sustrato.

Los datos de la actividad enzimática, en términos de velocidad inicial para cada concentración de sustrato, fueron ingresados en el software GraphPad Prism version 10.2.3 para Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA, para calcular los parámetros cinéticos mediante regresión no lineal utilizando la ecuación de Michaelis-Menten.

La Figura 5 ilustra la cinética de Michaelis-Menten para las variantes WT, S238Y, N212A e I208V. En dicha gráfica, se esperaría observar una curva hiperbólica cuyo límite representa la velocidad máxima a concentraciones saturantes de enzima. Sin embargo, la escasa solubilidad del pNPA en medio acuoso no permitió llegar a la saturación de la enzima. Aun así, el ajuste de los datos a la cinética de Michaelis-Menten permitió establecer una predicción del comportamiento de la enzima con un elevado coeficiente de determinación R^2 (superior a 0,9; tabla 3), lo que sugiere un adecuado ajuste al modelo. La variante I208V, sin embargo, no se acopló a dicho modelo, en realidad, la gráfica muestra un comportamiento sigmoideal (en forma de S) donde la fase inicial, es decir a las concentraciones más bajas de sustrato, logra de cierta manera imitar asemejarse a la curva hiperbólica, por lo que sólo se tomó en cuenta dichas concentraciones para alcanzar el mayor ajuste posible (R^2 de 0,72; tabla 3).

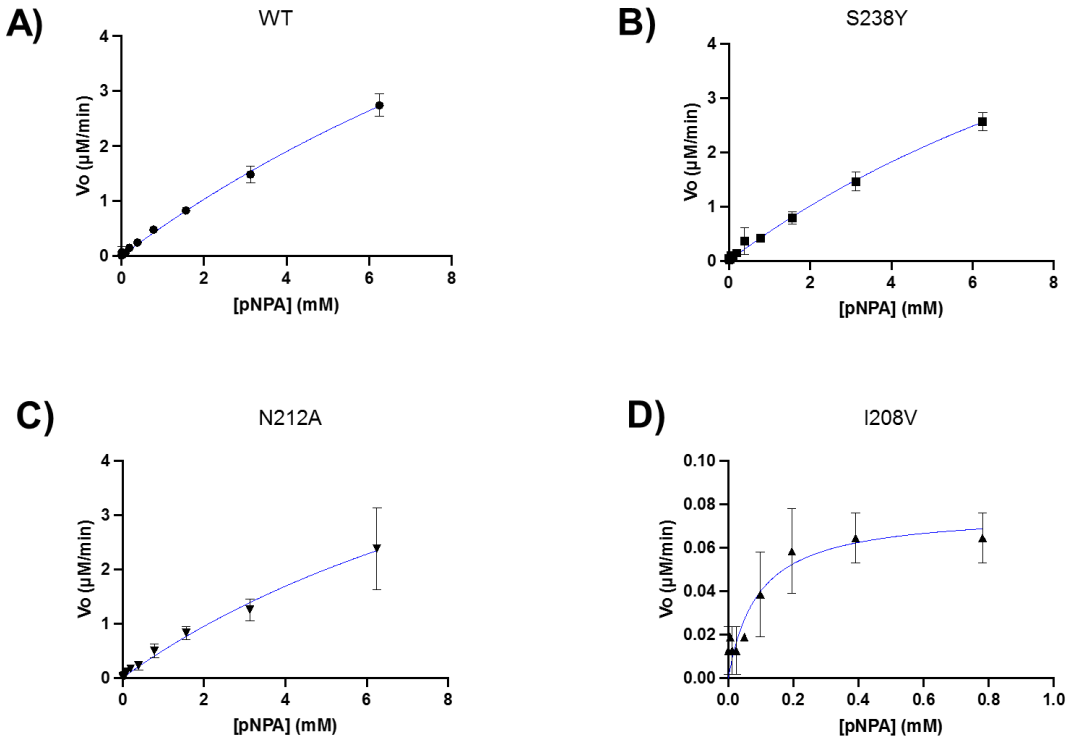


Figura 5. *Gráficas de la cinética de Michaelis – Menten para las variantes de PETasa*

La tabla 3 presenta los parámetros cinéticos para cada mutante y la forma silvestre de la enzima. En primer lugar, la constante de Michaelis-Menten (K_M) representa la afinidad que tiene la enzima por su sustrato. Valores bajos de K_M significan que se necesita bajas concentraciones de sustrato para llegar a alcanzar la mitad de la velocidad máxima de la reacción, y, por tanto, esto se traduce en una mayor afinidad de la enzima por el sustrato **(Robinson, 2015).** En este caso, los mutantes S238Y, N212A e I208V mostraron una significativa disminución en el valor de la K_M (1.3, 1.5 y 235.1 veces menor en comparación a la enzima WT, respectivamente). Esto se correlaciona con lo propuesto por **Sevilla et al. (2023),** quienes determinaron que las mutaciones S238Y, N212A e I208V disminuyen la energía

libre de unión del sustrato al sitio activo de la enzima en comparación a los valores determinados para la forma WT.

Tabla 3.

Parámetros cinéticos de las variantes silvestre y mutantes de la enzima IsPETasa

Parámetro cinético	***Unidades***	***Variantes de la enzima IsPETasa***			
		WT	**S238Y**	**N212A**	**I208V**
Vmax	(µM/min)	12,04	9,17	7,61	0,08
K_M	µM	21,31	16,15	14,05	0,09
R^2	-	0,99	0,98	0,92	0,73
k_{cat}	s^{-1}	8,03	6,12	5,08	0,05
CE	$M^{-1}s^{-1}$	6278	6311	6021	9309
SA	U/mg	3,51	3,28	3,04	1,43

Los cambios en el valor de la K_M se pueden atribuir a que la sustitución de asparagina (N) por alanina (A) en la posición 212 otorga cierta flexibilidad al bucle y por tanto el sustrato puede unirse de mejor manera al sitio de unión. De igual manera, el reemplazo de la serina (S) por una tirosina (Y) en la posición 238, presumiblemente aumente la afinidad por el sustrato debido a que mejoraría su interacción gracias a su anillo aromático que lo hace más hidrofóbico que la serina. Por otra parte, la sustitución de isoleucina (I) por valina (V) disminuyó radicalmente la capacidad degradadora de IsPETasa, presumiblemente por un deterioro de las interacciones que la histidina catalítica forma con el resto de isoleucina **(Sevilla et al. 2023).**

En el presente estudio, el análisis cinético permite concluir que el mutante I208V eleva drásticamente la afinidad del sustrato por la enzima y, probablemente, en ausencia de la reacción, esto provoca el secuestro del sustrato en el sitio activo. Las mutaciones introducidas también influyeron en el valor de la V_{max}, con una diminución de 1,3 (S238Y), 1,6 (N212A) y 150 (I208V) veces, en comparación al valor determinado para la variante silvestre. En términos globales, las tres variantes mutantes alcanzan la saturación más rápidamente, lo cual implica que son menos eficientes que IsPETasa WT para hidrolizar fenil ésteres en condiciones de saturación. Las posibles implicaciones de esta variación podrían ser difíciles de determinar ya que no es factible alcanzar la saturación de la enzima con PET comercial altamente cristalino debido al limitado acceso de la enzima a las cadenas libres del polímero.

Por otra parte, el número de recambio (k_{cat}) describe el número de moléculas de sustrato que se convierten en producto por unidad de tiempo, lo cual refleja la eficiencia catalítica de la enzima. Valores elevados de k_{cat} determinan una alta eficiencia en la conversión de sustrato en productos **(Roskoski, 2015).** Según los valores presentados en la tabla 3, las mutantes S238Y y N212A muestran tasas de recambio más bajas que la enzima WT, sugiriendo una disminución en su actividad catalítica debido a

las mutaciones introducidas en el sitio activo de IsPETasa. Sin embargo, es importante destacar que el coeficiente de especificidad (CE), que combina la eficiencia catalítica y la afinidad de la enzima por el sustrato, es bastante similar entre las variantes WT y mutantes en la conversión de un sustrato bajo condiciones no saturantes **(Park, 2022),** con un ligero incremento para el mutante S238Y. Esto sugiere que el cambio de serina por tirosina en esta posición incrementa ligeramente la especificidad de la enzima por fenil ésteres, como el pNPA.

De igual manera, la actividad específica (SA), un indicativo de la eficiencia enzimática y de la pureza de las soluciones enzimáticas **(Blanco & Blanco, 2017)**, sugiere que la actividad es similar para las variantes y la enzima silvestre. En el caso del mutante I208V, la especificidad de la enzima aumenta significativamente con respecto a la forma WT (1.5 veces), lo cual se debe principalmente a la marcada disminución en el valor de la K_M. No obstante, según el k_{cat}, esta mutante no es muy activa para convertir el sustrato en productos. Esto tiene correlación con los hallazgos de **Sevilla et al. (2023)**, cuyas micrografías reflejan que la mutante tuvo muy baja actividad sobre el PET. De tal manera que el cambio de una isoleucina (I) por una valina (V) tiene un efecto negativo en la capacidad catalítica.

3.3 Evaluación del efecto de la temperatura en las constantes cinéticas de las reacciones enzimáticas

La actividad de las diferentes variantes enzimáticas fue evaluada a 25, 35 y 45 ºC en *buffer* de reacción a pH 7,00 y utilizando pNPA como sustrato. La Figura 6 muestra la actividad de cada variante para cada temperatura. En primer lugar, se observa que la enzima WT aumenta su actividad a 35 ºC, pero esta decrece drásticamente a los 45 ºC. Este comportamiento es consistente con lo reportado con **Deng et al. (2023)** quien menciona que la enzima es termosensible y pierde gran parte de su actividad a 37 ºC.

Como se conoce, la temperatura de transición vítrea (*Tg*) del PET es de 76 °C **(Nguyen et al., 2018)**, lo que resalta la necesidad de aumentar la termoestabilidad de la enzima mediante mutaciones. En este caso, se demuestra que las mutantes al menos mantuvieron su actividad enzimática con el aumento de la temperatura (Figura 6). En particular, la variante I208V, mostró un leve incremento de la actividad de 25 a 35 ºC seguido de un aumento más pronunciado a 45 ºC. Un comportamiento similar se observó en las mutantes S238Y y N212A. Lo que podría deberse a que, a temperaturas más elevadas se incrementan las interacciones y colisiones moleculares, aumentando de igual manera la probabilidad de que el sustrato se una al sitio activo de la enzima **(Sokač Cvetnić et al., 2023).**

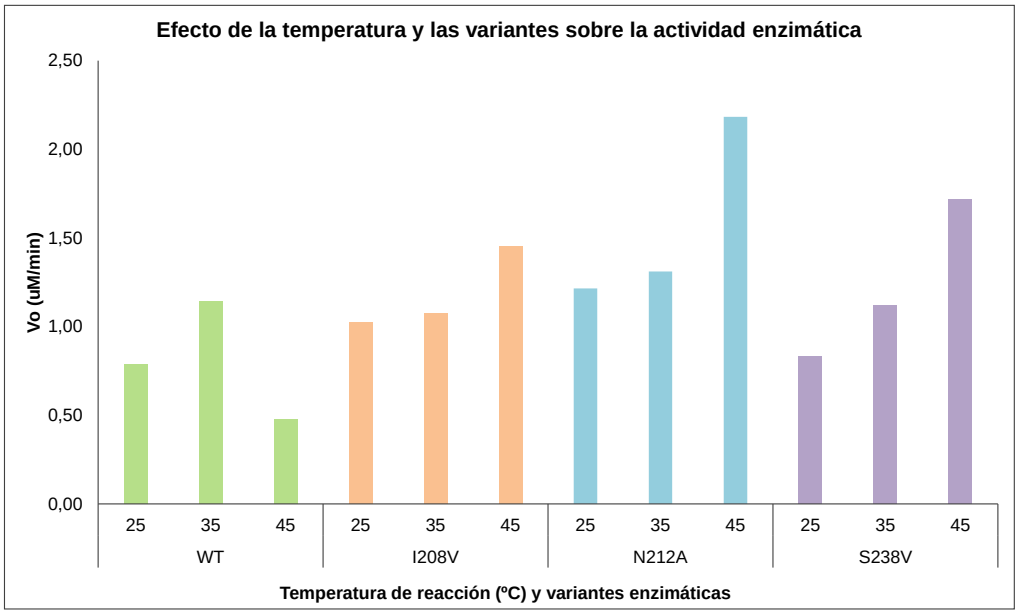


Figura 6. *Efecto de la temperatura sobre las variantes silvestre y mutantes*

De acuerdo con el análisis ANOVA (Anexo 1), a un nivel de significancia del 5%, se evidencia una diferencia significativa sobre los tratamientos ($p<0,05$), lo que quiere decir que tanto la temperatura como las mutaciones inciden sobre la actividad enzimática. La prueba de comparación Tukey (Anexo 2) da como resultado que la variante N212A a 45 ºC exhibe la mayor actividad sobre la hidrólisis de pNPA, determinando que es una mutación más termoestable y, por lo tanto, la más adecuada para la degradación del PET. En resumen, aumentó su actividad 2,77 veces más que la enzima silvestre a 25 ºC y 4,58 veces más a 45 ºC. A pesar de que la mutación pudo haber afectado su capacidad catalítica, la actividad registrada se debió principalmente a la termoestabilidad de la enzima. Sin embargo, aún está lejos de la temperatura de transición vítrea del PET, por lo que sería beneficioso evaluar la velocidad de reacción a temperaturas más elevadas y en presencia de compuestos que estabilicen la reacción como el cloruro de calcio $CaCl_2$ **(Tournier et al., 2020).**

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones:

- Se logró expresar las enzimas IsPETasa WT, S238Y, N212A e I208V en un medio autoinductor que resultó en un mayor rendimiento de biomasa en comparación con el método tradicional de inducción con IPTG. Mostrando aproximadamente el doble de biomasa cuando se usó lactosa en lugar de IPTG, lo que sugiere que las secuencias modificadas se adaptan mejor a la inducción gradual que proporciona la lactosa.

- La purificación de las enzimas IsPETasa, tanto la variante silvestre como las mutantes, se logró exitosamente utilizando cromatografía de afinidad con Ni-NTA y análisis SDS-PAGE. Sin embargo, se observó que la lisis celular no fue completamente efectiva, ya que la proteína de interés aún se encontraba presente en el pellet de las células lisadas. Resulta que, aunque el sistema de purificación es eficiente, el proceso de ruptura de la pared celular necesita optimización para liberar completamente las proteínas producidas y mejorar aún más el rendimiento de purificación.

- Se establecieron las reacciones catalizadas por las enzimas silvestre y mutantes en presencia de pNPA, cuya cinética demostró que las mutaciones S238Y y N212A resultaron en una mayor afinidad por el sustrato pNPA, reflejado en la disminución significativa en los valores de K_M en comparación con la variante silvestre, aunque estas mutaciones también redujeron la eficiencia catalítica global (k_{cat}). Por otro lado, el coeficiente de especificidad (CE) y la actividad específica (SA) indican un balance entre la afinidad del sustrato y la actividad catalítica, estableciendo valores similares entre las mutantes y la enzima WT.

- Las mutaciones en las enzimas IsPETasa, especialmente la variante N212A, mejoran significativamente la termoestabilidad, permitiendo que mantengan o incluso aumenten su actividad enzimática a temperaturas de hasta 45 ºC. Esto sugiere que estas mutaciones podrían ser efectivas para aplicaciones que requieren la degradación del PET a temperaturas cercanas a su temperatura de transición vítrea.

4.2 Recomendaciones:

- Determinar la actividad enzimática mediante la detección de los productos de hidrólisis de PET en HPLC para obtener un estudio más realista con respecto a la capacidad degradadora del plástico.

- Estudiar la termoestabilidad de las variantes mutantes a temperaturas más elevadas e incluso en presencia de $CaCl_2$ que permite aumentar la estabilidad de las proteínas degradadoras de PET con respecto a su actividad en altas temperaturas.

MATERIAL DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

Andrady, A. L., & Neal, M. A. (2009). Applications and societal benefits of plastics. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526). https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0304

Armendáriz-Ruiz, M., Rodríguez-González, J. A., Camacho-Ruíz, R. M., & Mateos-Díaz, J. C. (2018). Carbohydrate esterases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, *1835*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8672-9_2

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), 4350–4357. https://doi.org/10.1007/s00253-015-6596-z

Ball, P. (2020). The plastic legacy. *Nature Materials*, *19*(9). https://doi.org/10.1038/s41563-020-0785-6

Blanco, A., & Blanco, G. (2017). Enzymes. *Medical Biochemistry*, 153–175. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803550-4.00008-2

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

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

Chang, R. (2005). *Physical Chemistry for the Biosciences*. University Science Books.

Chen, C. C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., & Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *FEBS Journal*, *285*(20). https://doi.org/10.1111/febs.14612

Choi, B., Rempala, G. A., & Kim, J. K. (2017). Beyond the Michaelis-Menten equation: Accurate and efficient estimation of enzyme kinetic parameters. *Scientific Reports*, *7*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-017-17072-z

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

Crowley, E. L., & Rafferty, S. P. (2019). Review of lactose-driven auto-induction expression of isotope-labelled proteins. *Protein Expression and Purification*, *157*. https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.01.007

Cui, L., Qiu, Y., Liang, Y., Du, C., Dong, W., Cheng, C., & He, B. (2021). Excretory expression of IsPETase in E. coli by an enhancer of signal peptides and enhanced PET hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, *188*. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.012

Cverenkárová, K., Valachovičová, M., Mackul'ak, T., Žemlička, L., & Bírošová, L. (2021). Microplastics in the Food Chain. *Life*, *11*(12), 1349. https://doi.org/10.3390/LIFE11121349

De Yan, H., Zhang, Y. J., Liu, H. C., Zheng, J. Y., & Wang, Z. (2013). Influence of ammonium salts on the lipase/esterase activity assay using p-nitrophenyl esters as substrates. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *60*(3). https://doi.org/10.1002/bab.1095

Deng, B., Yue, Y., Yang, J., Yang, M., Xing, Q., Peng, H., Wang, F., Li, M., Ma, L., & Zhai, C. (2023). Improving the activity and thermostability of PETase from Ideonella sakaiensis through modulating its post-translational glycan modification. *Communications Biology*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s42003-023-04413-0

Dermit, M., & Mardakheh, F. K. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, *2*(2). https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100462

Dimarogona, M., Nikolaivits, E., Kanelli, M., Christakopoulos, P., Sandgren, M., & Topakas, E. (2015). Structural and functional studies of a Fusarium oxysporum cutinase with polyethylene terephthalate modification potential. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1850*(11). https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.08.009

Du, F., Liu, Y. Q., Xu, Y. S., Li, Z. J., Wang, Y. Z., Zhang, Z. X., & Sun, X. M. (2021). Regulating the T7 RNA polymerase expression in E. coli BL21 (DE3) to provide more host options for recombinant protein production. *Microbial Cell Factories*, *20*(1). https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6

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

Flaws, J., Damdimopoulou, P., Patisaul, H. B., Gore, A., Raetzman, L., & Vandenberg, L. N. (2020). *Plastics, EDCs & Health: A guide for public interest organizations and policy-makers on endocrine disrupting chemicals & plastics*. https://www.endocrine.org/-/media/endocrine/files/topics/edc_guide_2020_v1_6bhqen.pdf

Ge, B. K., Hu, G. M., & Chen, C. M. (2021). Plastic bioconversion: Reaction mechanism of PETases. *Chinese Journal of Physics*, *73*. https://doi.org/10.1016/j.cjph.2021.07.027

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, *3*(7). https://doi.org/10.1126/SCIADV.1700782/SUPPL_FILE/1700782_SM.PDF

Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, *8*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z

Janairo, G., Linley, M., Leonisa, Y., Llanos-Lazaro, N., & Robles, J. (2011). Determination of the Sensitivity Range of Biuret Test for Undergraduate Biochemistry Experiments. *E -Journal of Science & Technology (e-JST)* , *5*(6).

Jayasekara, S. K., Joni, H. D., Jayantha, B., Dissanayake, L., Mandrell, C., Sinharage, M. M. S., Molitor, R., Jayasekara, T., Sivakumar, P., & Jayakody, L. N. (2023). Trends in in-silico guided engineering of efficient polyethylene terephthalate (PET) hydrolyzing enzymes to enable bio-recycling and upcycling of PET. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, *21*. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.06.004

Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, *9*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1

Kim, N. K., Lee, S. H., & Park, H. D. (2022). Current biotechnologies on depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and repolymerization of reclaimed monomers from PET for bio-upcycling: A critical review. *Bioresource Technology*, *363*. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127931

Krause, R. M. (2021). Why are we doing this? Issue framing, problem proximity, and cities' rationale for regulating single-use plastics. *Journal of Environmental Policy and Planning*, *23*(4). https://doi.org/10.1080/1523908X.2021.1881463

Kushwaha, A., Goswami, L., Singhvi, M., & Kim, B. S. (2023). Biodegradation of poly(ethylene terephthalate): Mechanistic insights, advances, and future innovative strategies. *Chemical Engineering Journal*, *457*. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141230

Lam, L., & Ilies, M. A. (2022). Evaluation of the Impact of Esterases and Lipases from the Circulatory System against Substrates of Different Lipophilicity. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3). https://doi.org/10.3390/ijms23031262

Lee, S., Lee, Y. R., Kim, S. J., Lee, J.-S., & Min, K. (2023). Recent advances and challenges in the biotechnological upcycling of plastic wastes for constructing a circular bioeconomy. *Chemical Engineering Journal*, *454*, 140470. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140470

Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. C. (2018). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from Ideonella sakaiensis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *508*(1). https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.148

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

Liu, Y., Gan, L., Feng, P., Huang, L., Chen, L., Li, S., & Chen, H. (2022). An artificial self-assembling peptide with carboxylesterase activity and substrate specificity restricted to short-chain acid p-nitrophenyl esters. *Frontiers in Chemistry*, *10*. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.996641

Maity, W., Maity, S., Bera, S., & Roy, A. (2021). Emerging Roles of PETase and MHETase in the Biodegradation of Plastic Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *193*(8). https://doi.org/10.1007/s12010-021-03562-4

Marschall, L., Sagmeister, P., & Herwig, C. (2017). Tunable recombinant protein expression in E. coli: promoter systems and genetic constraints. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *101*(2). https://doi.org/10.1007/s00253-016-8045-z

Miri, S., Saini, R., Davoodi, S. M., Pulicharla, R., Brar, S. K., & Magdouli, S. (2022). Biodegradation of microplastics: Better late than never. *Chemosphere*, *286*. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131670

Mrigwani, A., Thakur, B., & Guptasarma, P. (2022). Conversion of polyethylene terephthalate into pure terephthalic acid through synergy between a solid-degrading cutinase and a reaction intermediate-hydrolysing carboxylesterase. *Green Chemistry*. https://doi.org/10.1039/d2gc01965e

Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from T. fusca. *Macromolecular Rapid Communications*, *26*(17). https://doi.org/10.1002/marc.200500410

Naciones Unidas. (2018). *La Agenda 2030 y los Objetivos de Desarrollo Sostenible: una oportunidad para América Latina y el Caribe*.

https://repositorio.cepal.org/server/api/core/bitstreams/cb30a4de-7d87-4e79-8e7a-ad5279038718/content

National Center for Biotechnology Information. (2023). *PubChem Compound Summary for CID 13243, 4-Nitrophenyl acetate*.

Nguyen, H. T. H., Qi, P., Rostagno, M., Feteha, A., & Miller, S. A. (2018). The quest for high glass transition temperature bioplastics. *Journal of Materials Chemistry A*, *6*(20). https://doi.org/10.1039/c8ta00377g

Novagen. (2005). *pET System Manual* (11th Edition). EMD Biosciences, Inc.

Núñez de Castro, I. (2001). *Enzimología*. Pirámide.

Nyyssölä, A. (2015). Which properties of cutinases are important for applications? *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(12). https://doi.org/10.1007/s00253-015-6596-z

Paladhi, A. G., Vallinayagam, S., Rajendran, S., Rathinam, V., & Sharma, V. K. (2022). Microalgae: a promising tool for plastic degradation. In *Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation*. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90452-0.00049-9

Park, C. (2022). Visual Interpretation of the Meaning of kcat/ KMin Enzyme Kinetics. *Journal of Chemical Education*, *99*(7). https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.1c01268

Perrin, E., Ghini, V., Giovannini, M., Di Patti, F., Cardazzo, B., Carraro, L., Fagorzi, C., Turano, P., Fani, R., & Fondi, M. (2020). Diauxie and co-utilization of carbon sources can coexist during bacterial growth in nutritionally complex environments. *Nature Communications*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41467-020-16872-8

PlasticsEurope. (2021). *Plásticos – Situación en 2020: Un análisis de los datos sobre producción, demanda y residuos de plásticos en Europa*. https://plasticseurope.org/es/wp-content/uploads/sites/4/2021/11/ES_Plastics_the_facts-WEB-2020_May21_final_updatedJuly2021.pdf

Pouresmaeil, M., & Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in E. coli host. *Archives of Microbiology*, *205*(5). https://doi.org/10.1007/s00203-023-03541-9

Punekar, N. S. (2018). Enzymes: Catalysis, Kinetics and Mechanisms. In *ENZYMES: Catalysis, Kinetics and Mechanisms*. Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-0785-0

Rhodes, C. J. (2018). Plastic pollution and potential solutions. *Science Progress*, *101*(3), 207–260. https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211

Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, *59*. https://doi.org/10.1042/BSE0590001

Rogers, A., & Gibon, Y. (2009). Enzyme Kinetics: Theory and Practice. In J. Schwender (Ed.), *Plant Metabolic Networks*. Springer.

Roskoski, R. (2015). Michaelis-Menten Kinetics☆. In *Reference Module in Biomedical Sciences*. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-801238-3.05143-6

Salmon, S., & House, A. (2015). Novel Materials for Carbon Dioxide Mitigation Technology. Chapter 2 - Enzyme-catalyzed Solvents for CO2 Separation. In *Novel Materials for Carbon Dioxide Mitigation Technology*.

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

Sevilla, M. E., Garcia, M. D., Perez-Castillo, Y., Armijos-Jaramillo, V., Casado, S., Vizuete, K., Debut, A., & Cerda-Mejía, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered Ideonella sakaiensis PETase. *Polymers*, *15*(7). https://doi.org/10.3390/polym15071779

Shariati, F. S., Keramati, M., Valizadeh, V., Cohan, R. A., & Norouzian, D. (2021). Comparison of E. coli based self-inducible expression systems containing different human heat shock proteins. *Scientific Reports*, *11*(1). https://doi.org/10.1038/s41598-021-84188-8

Sharma, B., & Jain, P. (2020). Deciphering the advances in bioaugmentation of plastic wastes. *Journal of Cleaner Production*, *275*. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123241

Sigma-Aldrich. (2022). *[Acetato de 4-nitrofenilo] Ficha de datos de seguridad* . https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/sds/sial/46021?userType=anonymous

Sin, L. T., & Tueen, B. S. (2023). Plastics and environmental sustainability issues. In *Plastics and Sustainability*. https://doi.org/10.1016/b978-0-12-824489-0.00006-4

Sokač Cvetnić, T., Šalić, A., Benković, M., Jurina, T., Valinger, D., Gajdoš Kljusurić, J., Zelić, B., & Jurinjak Tušek, A. (2023). A Systematic Review of Enzymatic Kinetics in Microreactors. *Catalysts*, *13*(4). https://doi.org/10.3390/catal13040708

Studier, F. W. (2014). Stable expression clones and auto-induction for protein production in E. Coli. *Methods in Molecular Biology*, *1091*. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-691-7_2

Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J. J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch

compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(5). https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11

Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., & Oda, K. (2016). Ideonella sakaiensis sp. nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*(8). https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001058

Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *ACS Catalysis*, *9*(5). https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171

Thomsen, T. B., Hunt, C. J., & Meyer, A. S. (2022). Influence of substrate crystallinity and glass transition temperature on enzymatic degradation of polyethylene terephthalate (PET). *New Biotechnology*, *69*. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.02.006

Thomsen, T. B., Schubert, S., Hunt, C. J., Borch, K., Jensen, K., Brask, J., Westh, P., & Meyer, A. S. (2023). Rate Response of Poly(Ethylene Terephthalate)-Hydrolases to Substrate Crystallinity: Basis for Understanding the Lag Phase. *ChemSusChem*, *16*(13). https://doi.org/10.1002/cssc.202300291

Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., Kamionka, E., Desrousseaux, M. L., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, *580*(7802). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4

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

van Eunen, K., & Bakker, B. M. (2014). The importance and challenges of in vivo-like enzyme kinetics. *Perspectives in Science*, *1*(1–6). https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.02.011

Vlasov, E., Denisov, N., & Verbeeck, J. (2023). Low-cost electron detector for scanning electron microscope. *HardwareX*, *14*. https://doi.org/10.1016/j.ohx.2023.e00413

Voet, D. (2016). *Fundamentos de Bioquímica*. Editorial Médica Panamericana.

Wang, J., Peng, C., Li, H., Zhang, P., & Liu, X. (2021). The impact of microplastic-microbe interactions on animal health and biogeochemical cycles: A mini-review. *Science of The Total Environment*, *773*. https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.145697

Wang, X., Lu, D., Jönsson, L. J., & Hong, F. (2008). Preparation of a PET-hydrolyzing lipase from Aspergillus oryzae by the addition of bis(2-hydroxyethyl) terephthalate to the culture medium and enzymatic modification of PET fabrics. *Engineering in Life Sciences*, *8*(3). https://doi.org/10.1002/elsc.200700058

Wei, R., Tiso, T., Bertling, J., O'Connor, K., Blank, L. M., & Bornscheuer, U. T. (2020). Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. *Nature Catalysis*, *3*(11). https://doi.org/10.1038/s41929-020-00521-w

Wheatley, R. W., Lo, S., Jancewicz, L. J., Dugdale, M. L., & Huber, R. E. (2013). Structural explanation for allolactose (lac operon inducer) synthesis by lacZ β-galactosidase and the evolutionary relationship between allolactose synthesis and the lac repressor. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(18). https://doi.org/10.1074/jbc.M113.455436

Wheelock, C. E., Phillips, B. M., Anderson, B. S., Miller, J. L., Miller, M. J., & Hammock, B. D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, *195*. https://doi.org/10.1007/978-0-387-77030-7_5

World Wildlife Fund. (2019). *Pollution plastique: à qui la faute?* . https://www.wwf.fr/sites/default/files/doc-2019-07/20190305_Rapport_Pollution-plastique_a_qui_la_faute-min.pdf

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016a). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, *351*(6278), 1196–1199. https://doi.org/10.1126/science.aad6359

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016b). Supplementary for Yoshida 2016 A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, *351*(6278).

Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. *Methods in Enzymology*, *648*. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007

Zhang, Y., Pedersen, J. N., Eser, B. E., & Guo, Z. (2022). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*, *60*. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107991

ANEXOS

Anexo 1

Análisis de Varianza (ANOVA) realizado en el software GraphPad Prism version 10.2.3 para Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA para establecer el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de las variantes mutantes de IsPETasa.

Tabla 4.

ANOVA para el efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (DF)	Promedio de Cuadrados (MS)	Valor F	Valor P
Entre grupos	0,04411	11	0,004010	F (11, 12) = 3,785	P=0,0153
Dentro de grupos	0,01272	12	0,001060		
Total	0,05683	23			

Anexo 2

Prueba de Tukey realizado en el software GraphPad Prism version 10.2.3 para Mac, GraphPad Software, Boston, Massachusetts USA para determinar el mejor tratamiento sobre la actividad enzimática de las variantes mutantes de IsPETasa.

Tabla 5.

Prueba de Tukey sobre el efecto de la temperatura en la actividad enzimática

Visor de letras compacto	
N212A-45	A
S238Y-45	A B
I208V-45	A B
N212A-35	A B
N212A-25	A B
WT-35	A B
S238Y-35	A B
I208V-35	A B
I208V-25	A B

Visor de letras compacto	
S238Y-25	B
WT-25	B
WT-45	B