UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Diseño de la variante mutante Q119Y-L117F de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

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

Autor: Michael Ulices Molina Molina

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Enero – 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr, Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

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

Ambato, 12 de diciembre de 2025



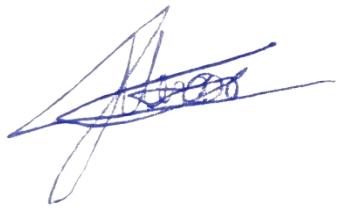
Dr. Mario Daniel García Solís

1103605471

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Michael Ulices Molina Molina, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Michael Ulices Molina Molina

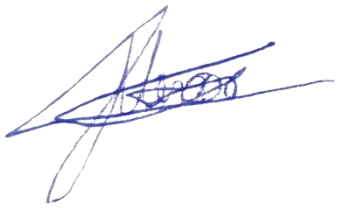
1726633728

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de discusión 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.



Michael Ulices Molina Molina

1726633728

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

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

Presidente del Tribunal

Firmado electrónicamente por:
LILIANA PAULINA LALALEO CORDOVA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

1803601853

Firmado electrónicamente por:
WILLIAM RICARDO CALERO CACERES
Validar únicamente con FirmaEC

Dr. William Ricardo Calero Cáceres

1714348859

Ambato, 22 de diciembre del 2025

DEDICATORIA

A Dios

A la memoria de mis seres queridos que ya no estan, pero cuya presencia continúa acompañándome en cada paso

A Ernesto Molina y Leydy Fernanda, cuya fortaleza y ejemplo de vida permanecen como inspiración constante. Gracias por enseñarme a no rendirme, incluso cuando el camino parece imposible

A mi mamá y hermanos, que me calman con su amor incondicional

A mis tíos Mario Molina y Emma Espín, quienes han hecho este viaje posible

A Nicole Molina, quien me sostuvo en mis días más difíciles y celebro conmigo cada pequeño avance

A mi familia y amigos, que con paciencia, apoyo y fe incondicional han estado a mi lado en cada desafío

A todos ellos dedico este logro, con profundo cariño y gratitud.

AGRADECIMIENTO

"El mundo pertenece a los optimistas, los pesimistas son meros espectadores" Francois Guizot

A Dios por darme el don de la resiliencia y permitirme llevar a cabo este proceso junto a personas extraordinarias amigos, maestros y mentores. Darme la fuerza para llevar a cabo mis propósitos y sueños.

A Ernesto Molina mi padre, cuya compañía siempre estuvo en las malas noches a pesar de no estar vivo siempre sentí su apoyo, por ser un gran padre y enseñarme a trabajar, ser feliz y apreciar cada momento, tu alegría vive en mí. A Leydy Molina mi hermana que siempre estuvo en mis peores momentos como una segunda madre tu cariño me ayudo mucho en esta etapa, un abrazo al cielo.

Quiero dar las gracias especialmente a Sonia Molina mi madre, quien nunca dudo de mi pese a las adversidades de la vida, sin ti no lo hubiera logrado, tu lucha y esfuerzo siempre fue mi ejemplo a seguir, TE AMO MUCHO. A Ernesto Valentín Molina y Heydy Molina mis hermanos, por las risas, bromas, enojos, juegos y comprensión hicieron menos pesado este proceso, gracias, totales hermanos.

A Mario Molina y Emma Espín mis tíos, por acogerme en su hogar y darme ese cariño que solo tiene un padre a un hijo, por corregirme y mantenerme firme en mi camino, a quienes los llevare con mucho cariño en mi corazón. A Sandra Molina y esposo, por regalarme cenas inolvidables y momentos familiares.

A Nicole Molina quien es como una hermana para mí, gracias por tu cariño, ayudarme a desahogarme en mis peores momentos y acompañarme cuando más triste me sentía. A mi familia que no me hizo faltar nada y me hizo sentir querido en esta nueva ciudad.

A mi tutor, el Dr. Mario García, por brindarme su conocimiento y apoyo en este proceso. Fue una experiencia muy grata. De igual forma, a la Dra. Liliana Cerda por abrirme las puertas de su laboratorio. Son personas que admiro mucho.

A Dayra Amores y Jenifer Santo mis licenciadas favoritas, muchas gracias por brindarme su amistad tan linda, por los bueno momentos, las salidas, las comidas y los episodios de llanto compartido, hicieron este viaje mas entretenido, las llevo en mi corazón.

A Alejandra Viteri mi mejor amiga, por ser mi confidente, por preocuparse cuando desaparecía, con la persona que no se siente la distancia, muchas gracias Shingu. A Jason Estrada mi mejor amigo con quien siempre cuento para todo gracias por todo querido amigo.

A MICRO G-9, gracias, amigos por todos los momentos que vivimos juntos hicieron que esta etapa sea inolvidable siempre los llevare en mi corazón chicos, especialmente a Andy Molina y Mauricio Sulqui grandes amigos, gracias por ser buenos amigos en esta etapa de mi vida.

A John Dutan y Zulema Chancusig mis compañeros del laboratorio gracias por todo su apoyo chicos ha sido una experiencia muy bonita. A Jennifer Tigselema una amiga muy especial en quien confió y admiro mucho. A Nicole Vásconez, por su felicidad y mostrarme que la vida no es tan mala. A Andres Silva y David Tapia, dos compañeros incondicionales que han brindado su apoyo sincero en cada etapa y que incluso en las celebraciones más descontroladas han sabido cuidarme y acompañarme.

Por último, pero no menos importante a una persona muy especial Sandy Vivanco agradezco por permitirme ser parte de su vida, por no dejarme solo y brindarme su cariño tan excepcional.

Con mucho cariño Michael Molina.

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 Contaminación ambiental por plásticos. 2

1.1.3 Polietileno tereftalato 3

1.1.4 PETasa de *Ideonella* sakaiensis 201-F6 7

1.1.5 Mecanismos de acción de la enzima *Is*PETasa de *I. sakaiensis* 201-F6 9

1.1.6 Mutaciones dirigidas en la enzima PETasa de *I. sakaiensis* 201-F6 10

1.1.7 Mutación Q119Y-L117F en *Is*PETasa 12

1.2 Objetivos 14

1.2.1 Objetivo General 14

1.2.2 Objetivos Específicos 14

CAPITULO II.- METODOLOGÍA 15

2.1 Materiales 15

2.2 Métodos 16

2.2.1 Construcción de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzima PETasa de *Indeonella*. 16

2.2.2 Aislamiento de la enzima mutante a través de cromatografía de afinidad. 19

2.2.3 Evaluación de la actividad enzimatica de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzim PETasa de *I. sakaiensis.* 20

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 21

3.1 Análisis y discusión de los resultados 21

3.1.1 Obtención de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ 21

3.1.2 Purificación de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ 24

3.1.3 Ensayo de degradación de PET 25

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 29

4.1 Conclusiones 29

4.2 Recomendaciones 30

MATERIALES DE REFERENCIA 31

5.1 Referencias bibliográficas..... 31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones en estructura de IsPETasa para modificar su actividad degradativa en PET **11**

Tabla 2. Lista de reactivos, materiales fungible y equipos que se emplearon. **15**

Tabla 3. Medios de cultivo **17**

Tabla 4. Resultados de la purificación de IsPETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ de E. coli (DE3) Rosetta **25**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la unidad repetitiva del PET **3**

Figura 2. Rutas de síntesis del tereftalato de polietileno (PET) **5**

Figura 3. Caracterización estructural de la enzima IsPETasa (PDB ID:6EQE) **8**

Figura 4. Mecanismo de reacción de la enzima IsPETasa **10**

Figura 5. Plásmido pET-30a(+) con variante mutante IsPETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ **22**

Figura 6. Purificación de la variante mutante IsPETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$. **24**

Figura 7. Degradación de PET por la variante IsPETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ **26**

Figura 8. Comparación estructural de PETasa antes y después de las mutaciones L117F y Q119Y **27**

RESUMEN EJECUTIVO

La acumulación masiva de residuos plásticos constituye un desafío crítico para la sostenibilidad ambiental. En 2022, la producción mundial de plásticos alcanzó 400.3 millones de toneladas, con el polietilino tereftalto (PET) representando el 6.2 por ciento del total; sin embargo, solo se recicló una fracción limitada (35.5 millones de toneladas), evidenciando la necesidad de alternativas biocatalíticas eficientes. Las PETasa de *Ideonella sakaiensis* se ha posicionado como una alternativa biotecnológica. Diversas investigaciones han demostrado que modificaciones en residuos clave pueden mejorar su estabilidad térmica y eficiencia catalítica. En este estudio se construyó la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$, cuyo plásmido fue obtenido a través de un organismo externo especializado. Posteriormente, la enzima recombinante fue expresada y purificada mediante cromatografía de afinidad, asegurando su pureza para el análisis funcional. La actividad enzimática se analizó utilizando gránulos de PET de origen comercial (botellas de bebida post consumo), registrándose una reducción de masa después de incubación a 50 grados centígrados durante 9 días. Los resultados obtenidos evidencian que la ingeniería racional de PETasa puede aportar mejoras significativas en su comportamiento catalítico y ofrece una base científica para continuar el diseño de biocatalizadores más estables y eficientes. Este estudio contribuye así el desarrollo de soluciones sostenibles orientadas a la biodegradación del PET y a la mitigación del impacto ambiental asociado a este polímero.

Palabras clave: variante mutante, *Is*PETasa, polietileno tereftalato, estabilidad térmica, *Ideonella sakaiensis*, PETasa, biodegradation.

ABSTRACT

The massive accumulation of plastic waste poses a critical challenge to environmental sustainability. In 2022, global plastic production reached 400.3 million tons, with polyethylene terephthalate (PET) accounting for 6.2 percent of the total; however, only a limited fraction (35.5 million tons) was recycled, highlighting the need for efficient biocatalytic alternatives. PETase from Ideonella sakaiensis has emerged as a biotechnological alternative. Various studies have shown that modifications to key residues can improve its thermal stability and catalytic efficiency. In this study, the mutant variant *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ was constructed, whose plasmid was obtained through a specialized external organism. Subsequently, the recombinant enzyme was expressed and purified by affinity chromatography, ensuring its purity for functional analysis. Enzymatic activity was analyzed using commercially available PET pellets (post-consumer beverage bottles), with a reduction in mass recorded after incubation at 50 degrees Celsius for 9 days. The results obtained show that rational engineering of PETase can significantly improve its catalytic behavior and provides a scientific basis for continuing the design of more stable and efficient biocatalysts. This study thus contributes to the development of sustainable solutions aimed at the biodegradation of PET and the mitigation of the environmental impact associated with this polymer.

***Keywords*:** mutant variant, IsPETase, polyethylene terephthalate, thermal stability, Ideonella sakaiensis, PETase,

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos.

1.1.1 Justificación

El uso continuo de plásticos en numerosas aplicaciones industriales ha generado grandes avances tecnológicos y sociales, pero tambien ha provocado un flujo aparentemente imparable de plásticos hacia el medio ambiente. Tan solo en el año 2022, la producción global de plásticos fue de 400.3 Mt. Aproximadamente el 45 % de esta producción se desechó al medioambiente, causando una amenaza creciente a la salud de los ecosistemas y la salud pública **(Europe Plastics, 2023; UNEP, 2021)**. El polietileno tereftalato (PET) es uno de los principales plásticos en los desechos urbanos, debido a que se ha vuelto popular en la producción de botellas desechables por su durabilidad, resistencia y transparencia **(Gomes et al., 2019)**. La corta vida útil del PET y su uso constante en la industria han impulsado la búsqueda de estrategias sostenibles para su degradación.

En 2016 **Yoshida et al. (2016)** identificaron la bacteria gram negativa, *Ideonella sakaiensis*, en sedimentos de una planta de reciclaje de plástico. Importante, la bacteria es capaz de metabolizar el PET principalmente en dos productos: mono(2- hidroxietil) tereftalato (MHET) y ácido tereftálico (TPA). Esta actividad ocurre gracias a la secreción de las enzimas PETasa (IsPETasa) y MHETasa (IsMHETasa), que actúan sinérgicamente para descomponer el PET a una temperatura óptima de 30°C. Sin embargo, **Austin et al. (2018)** demostraron que IsPETasa es activa sobre PET con un bajo índice de cristalinidad (aproximadamente 15%), lo cual implica que es necesario mejorar la eficiencia catalítica de la enzima para poder degradar PET post-consumo, que usualmente presente un índice de cristalinidad del 30 %. Por otro lado, **Joo et al. (2018)** reportaron que la temperatura de fusión (Tm) de IsPETasa es de 46.8 °C, considerablemente más baja que el de enzimas como TfCut2 (67.9 °C), lo que indica que la enzima también requiere modificaciones para alcanzar una mayor estabilidad térmica para facilitar su uso en aplicaciones industriales. En conjunto, la baja eficiencia catalítica y la limitada termoestabilidad de *Is*PETasa en condiciones ambientales subóptimas constituyen un obstáculo relevante para su implementación en estrategias biotecnológicas orientadas a la mitigación del impacto ambiental del PET.

Actualmente, se ha reportado el desarrollo de variantes enzimáticas mejoradas para optimizar su actividad y eficiencia. Por ejemplo, **Brott et al. (2022)** desarrollaron variantes termoestables,

ThermoPETasa (*Is*PETasa$^{K95N/S121E/F201I/R280A}$) caracterizada por un incremento significativo de su temperatura óptima (70.9 °C) y DuraPETasa (*Is*PETasa$^{N233C/S282C}$) presentó una marcada mejora en estabilidad estructural y resistencia térmica (81.1 °C), al igual de una mayor rigidez en su sitio activo, lo que favorece a la degradación de PET semicristalino. Por otra parte, la variante FastPETasa, descrita por **Lu et al. (2022)**, incorpora mutaciones en los sitios N233K, R224Q, S121E, D186H y R280A, permitiendo una rápida degradación de PET posconsumo a temperaturas moderadas (30-50 °C). Mientras que las mutaciones en los sitios I208V, N212A y S238Y, descritas por **Sevilla et al. (2023)** han mejorado 3,3 veces la capacidad de IsPETasa para degradación de PET cristalino (~31%). A pesar de los avances, muchas enzimas modificadas aún presentan limitaciones como inestabilidad térmica, baja afinidad por polímeros cristalizados y dificultades a escala industrial, lo que hace necesaria la investigación continua para desarrollar mutaciones más eficientes.

Con base a estos antecedentes, el presente estudio tiene como objetivo diseñar la variante mutante Q119Y-L117F, las cuales han sido estudiadas mediante modelamiento computacional en donde se los algoritmos indican que su introducción aumento la Tm, en comparación con la enzima silvestre **(Cui et al., 2021)**. Con esto, se pretende contribuir al desarrollo de estrategias sostenibles con miras a conseguir una degradación biocatalítica del PET más efectiva.

1.1.2 Contaminación ambiental por plásticos.

Los polímeros sintéticos también conocidos comúnmente como plásticos son materiales ubicuos y símbolos del antropoceno, dejando su huella en el registro fósil terrestre **(United Nations Environment Programme, 2021)**. Tan solo en el 2022, se han producido aproximadamente 400,3 Mt de plásticos, los cuales solo el 8.9 % y < 0.1% fueron producidos por reciclaje mecánico reciclaje químico, respectivamente. **(PlasticsEurope, 2023)**. En un escenario sin cambios las proyecciones indican una producción de 1014 millones de toneladas para el 2050, con una acumulación global que podría pasar de 9200 Mt (1950 – 2017) a 34000 Mt en 2050 **(United Nations Environment Programme, 2021)**.

Anualmente, aproximadamente 100,000 animales mueren cada año debido al estrangulamiento o ingestión de macroplásticos (>5mm) **(WWF, 2023)**. Además, cuando los macroplásticos se exponen al medio ambiente, se descomponen en microplásticos (<5 mm) los cuales pueden ser fácilmente ingeridos por los seres vivos, causando sensación de llenura o laceraciones en el

intestino **(Chandramouli, et al., 2024)**. Reportes recientes indican que los microplásticos ingeridos pueden cruzar la mucosa intestinal acumulándose en los tejidos **(Schür et al., 2019)**. Se estima que alrededor de 700 organismos acuáticos se han visto gravemente afectados por la ingestión de microplásticos suspendidos en ríos y océanos **(Tong et al., 2020)**. Los microplásticos también impactan la salud humana debido a su transferencia a lo largo de la cadena alimentaria **(Barboza et al., 2020)**. Investigaciones recientes indican que la ingestión de microplásticos pueden causar daño celular, enfermedades inflamatorias y también pueden dañar el ADN **(Tavakolpournegari et al., 2024)**.

1.1.3 Polietileno tereftalato

El polietileno tereftalato (PET) es un poliéster termoplástico semicristalino derivado de la copolimerización de etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA) ambos derivados del refinamiento del petróleo **(Sarda et al., 2022)**. Su unidad repetitiva presenta la fórmula empírica ($C_{10}H_8O_4$) y el fragmento estructural – [O-CH_2- CH_2-O-CO-C_6-H_4-CO]- **(Nisticò, 2020)**.

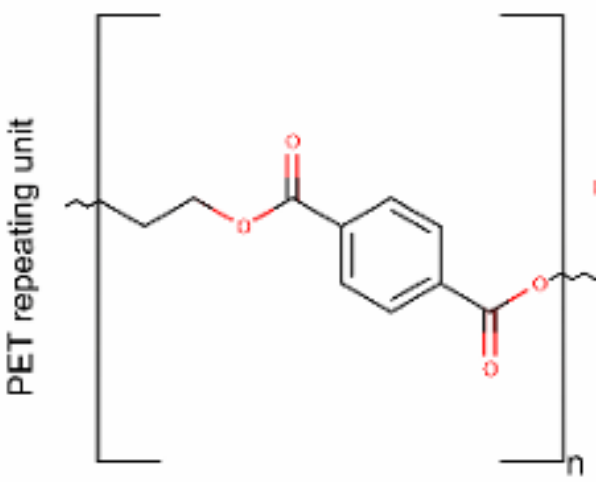


Figura 1. *Esquema de la unidad repetitiva del PET*

Fuente: **(Magalh et al., 2021)**

El PET es un polímero de alta densidad que sedimenta en agua, notable por su transparencia en estado amorfo y sus efectivas propiedades de barrera a gases, las cuales se ven influenciadas por su cristalinidad **(Das et al., 2021)**. Sus anillos aromáticos y los grupos polares que conforman su estructura le otorgan una elevada estabilidad térmica, con un punto de fusión (T_m) de 255-265 °C

para su forma cristalina y una temperatura de transición vítrea (T_g) que varía desde ~67 °C (PET amorfo) hasta ~80 °C (PET semicristalino). Adicionalmente, el PET se distingue por su buena estabilidad química y una robusta resistencia a la tracción que se encuentra en 70 y 75 MPa **(Nisticò, 2020)**.

Estas propiedades físicas y mecánicas han convertido al PET en uno de los principales materiales en el mercado global de plásticos. Particularmente, el PET domina el sector de empaquetado de productos en la industria alimentaria, ya que es un plástico transparente, con alta robustez mecánica, baja permeabilidad de gases y estabilidad a altas temperaturas (de 60° a 220 °C) **(Benyathiar et al., 2022; Tamburini et al., 2025)**.

1.1.3.1 Síntesis del PET.

El PET es sintetizado principalmente a través de dos rutas de reacción. La primera es la esterificación directa del EG con TPA, un proceso que se efectúa a temperaturas en el rango de 240 – 260 °C y presiones de 300 – 500 kPa. La segunda ruta consiste en la transesterificación del dimetil tereftalato (DMT) con EG, la cual se lleva a cabo en condiciones más moderadas, a temperaturas de 140 – 220 °C y una presión de 100 kPa **(Webb et al., 2013)**.

Ambos procesos iniciales convergen en la formación del monómero bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) **(Benyathiar et al., 2022)**. Posteriormente, este monómero se somete a una serie de etapas de polimerización para alcanzar el peso molecular deseado del polímero final. Estas etapas incluyen una transesterificación a 250 – 280 °C y de 2 a 3 kPa, seguida de una policondensación de los oligómeros a 270 – 280 °C. Opcionalmente, se puede realizar una polimerización en estado sólido (SSP) a temperaturas entre 200 y 240 °C y una presión de 100 kPa para incrementar aún más el peso molecular del PET **(Webb et al., 2013)**.

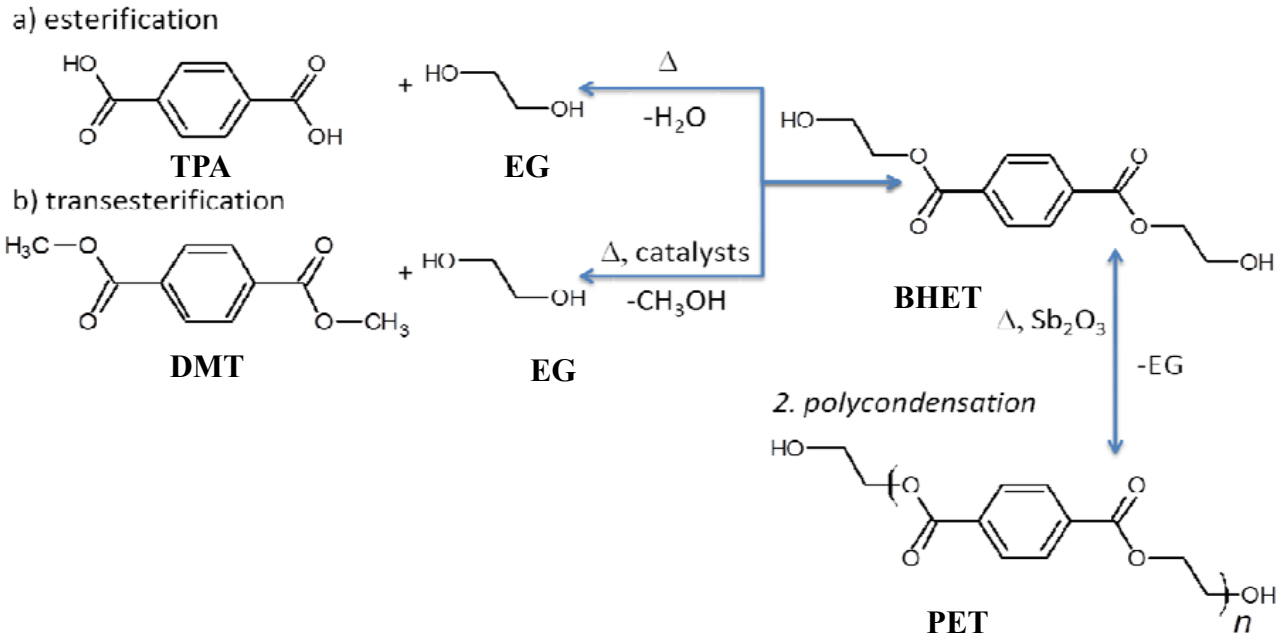


Figura 2. *Rutas de síntesis del polietileno tereftalato (PET).*

Nota. EL monómero bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) se obtiene a través de dos vías principales: **a)** la esterificación directa del ácido tereftálico (TPA) con etilenglicol (EG), o **b)** la transesterificación del dimetil tereftalato (DMT) con EG. Subsecuentemente, el monómero BHET se somete a una policondensación para formar polímero PET.

Fuente: **(Nisticò, 2020)**

1.1.3.2 Contaminación por PET

El PET es el sexto polímero más importante y el "Rey de las bebidas botellas plásticas". Aproximadamente el 66% de los envases de bebidas fueron fabricadas a partir de PET en 2021 **(Hamade et al., 2020)**. Las botellas de PET típicamente son descartadas luego de su uso, teóricamente son completamente reciclables, sin embargo aproximadamente solo el 15% se reutilizan para fabricar nuevas botellas **(Stegman et al., 2023)**

Para el período 1950-2020, se estima una producción acumulada de 583.3 billones de botellas PET por año. De este total, 426.3 billones corresponde a residuos mal gestionados y 34.1 billones ingresaron a los ecosistemas oceánicos **(Tamburini et al., 2025)**. Sus propiedades lo convierten en un polímero muy estable resistente a la degradación fisicoquímica y bioquímica agravando su impacto ambiental **(Han et al., 2025; Hiraga et al., 2019)**.

1.1.3.3 Métodos de reciclaje del PET

Existen diversas estrategias de reciclaje del plástico PET, que implican la implementación de varios métodos químicos, físicos y procesos térmicos **(Jovanović et al., 2025)**. Los métodos de reciclaje del PET pueden clasificarse en cuatro diferentes tipos de tratamiento: en las etapas primario, secundario, terciaria y cuaternario **(Babaei et al., 2024)**. Varios factores influyen en estos procesos de reciclaje de desechos de PET, que incluyen el uso de disolventes, catalizadores, temperatura y tiempo de reacción tienen efecto significativo en los procesos de reciclaje **(Benyathiar et al., 2022)**.

El reciclaje primario es un procedimiento mecánico en el que incluye la separación, limpieza, trituración, lavado y secado de las partículas de PET **(Babaei et al., 2024)**. No obstante, las botellas de plástico no pueden ser recicladas varias veces, ya que las cadenas de polímeros se acortan después de cada proceso **(Jovanović et al., 2025)**. Esto limita el número de los ciclos de reciclaje a los que puede someterse el PET, lo que conduce al devaluó de los productos reciclados, siendo la principal desventaja de este método.

Por otra parte, el reciclaje secundario combina procesamiento químicos y físicos del PETs, cuya primera etapa consiste en una purificación mediante tratamientos mecánicos y químicos **(Hahladakis & Iacovidou, 2019)**. Sin embargo, el reciclaje secundario presenta un elevado consumo energético, sobre todo en la fusión y el reformado, lo que incrementa la emisión de gases de efecto invernadero. De igual forma, el reciclaje secundario de PET exige una inversión de capital significativo **(Lonca et al., 2020)**.

La transformación química del PET postconsumo en sus monómeros estructurales se denomina reciclaje terciario **(Chanda, 2021)**. Esto incluye la formación de nuevos materiales o productos químicos a través de la despolimerización química del PET. En síntesis, se han descrito cinco procesos básicos para el reciclaje químico del PET, y estos son; metanólisis, hidrólisis, glicólisis, alcoholisis y amonólisis **(Jovanović et al., 2025)**. Sin embargo los residuos de estos tratamientos son tratados con ácidos fuertes, convirtiéndolo en procesos insostenibles debido a la alta demanda de insumos y su alto costo **(Swamy et al., 2024)**.

Por último, el reciclaje cuaternario, tambien conocido como recuperación de energía de residuos, es un proceso en el que se obtiene energía a través de la despolimerización del PET por pirólisis o

gasificación para producir combustibles utilizados para generar calor y electricidad **(Jovanović et al., 2025; Sevilla, Garcia, Castillo, et al., 2023)**.

No obstante, la incineración de plásticos genera preocupación; por la liberación de materiales peligrosos, como las cenizas volantes que contienen residuos tóxicos (plomo y cadmio), la filtración de compuestos químicos tóxicos (como dioxinas, bifenilos policlorados y furanos) y la emisión de gases de efecto invernadero **(Benyathiar et al., 2022)**

En este sentido, cobra importancia la necesidad de generar métodos para degradar el PET con un menor impacto ambiental. En los últimos años, se han desarrollado varias tecnologías y lo investigadores se han centrado en la biodegradación del PET mediante microorganismos capaces de liberar enzimas que despolimerizan el PET para usarlo como su fuente principal de carbono **(Then et al., 2015; Wei & Zimmermann, 2017)**.

Se ha reportado 89 enzimas capaces de hidrolizar el PET (PHEs) **(Maity et al., 2021)**. Entre ellas, destacan las cutinasas TfH y TfCut2 de *Thermobifida fusca*, lipasas FsC de *Fusarium solani*, HiC de *Humicola insolens* y PmC de *Pseudomonas mendocina* e hidrolasas de *I. sakaiensis* denominada *Is*PETasa **(Ru et al., 2020).**

1.1.4 PETasa de *Ideonella* sakaiensis 201-F6

Yoshida et al. (2016), al examinar comunidades microbianas naturales expuestas al PET en una planta de tratamiento de Japón, aislaron una novedosa bacteria gram negativa, que fue taxonómicamente clasificada como *Ideonella sakaiensis*. Después de su análisis, se determinó que el microorganismo tiene la capacidad de utilizar el PET como fuente de carbono y energía. El análisis del transcriptoma de *I. sakaiensis* se revelo que las enzimas PETasa y MHETasa desempeñan un papel fundamental en la descomposición y aprovechamiento del PET a nivel metabólico **(Yoshida et al., 2021)**. La PETasa de *I. sakaiensis* (*Is*PETasa) es un monómero enzimático de la familia esterasa de tipo cutinasa que posee actividad hidrolítica específica sobre el PET. *Is*PETasa muestra una mejor actividad enzimatica sobre el PET en comparación con otras enzimas. Por ejemplo, 88 y 120 veces más eficiente para degradar PET amorfo que TfH, LCC y FsC, bajo condiciones de 30 °C y pH 7 **(Maity et al., 2021; Yoshida et al., 2016; Yoshida et al., 2021).**

*Is*PETasa presenta un plegamiento característico de las $\propto/\boldsymbol{\beta}$- hidrolasas, compuesta por una lámina $\boldsymbol{\beta}$ central de nueve hebras y siete hélices $\propto$. Su estructura se estabiliza mediante dos puentes disulfuro. El sitio activo contiene una tríada catalítica comprendida por Ser160-His237-Asp206 **(Taniguchi et al., 2019)**. Adicionalmente, el residuo Trp159 amplía la superficie hidrofóbica adyacente al sitio activo y confiere una flexibilidad conformacional clave que optimiza la eficiencia catalítica **(Austin et al., 2018; Maity et al., 2021)**. Esta arquitectura molecular resulta en una superficie con carga altamente polarizada y un punto isoeléctrico de 9.6 **(Austin et al., 2018)**

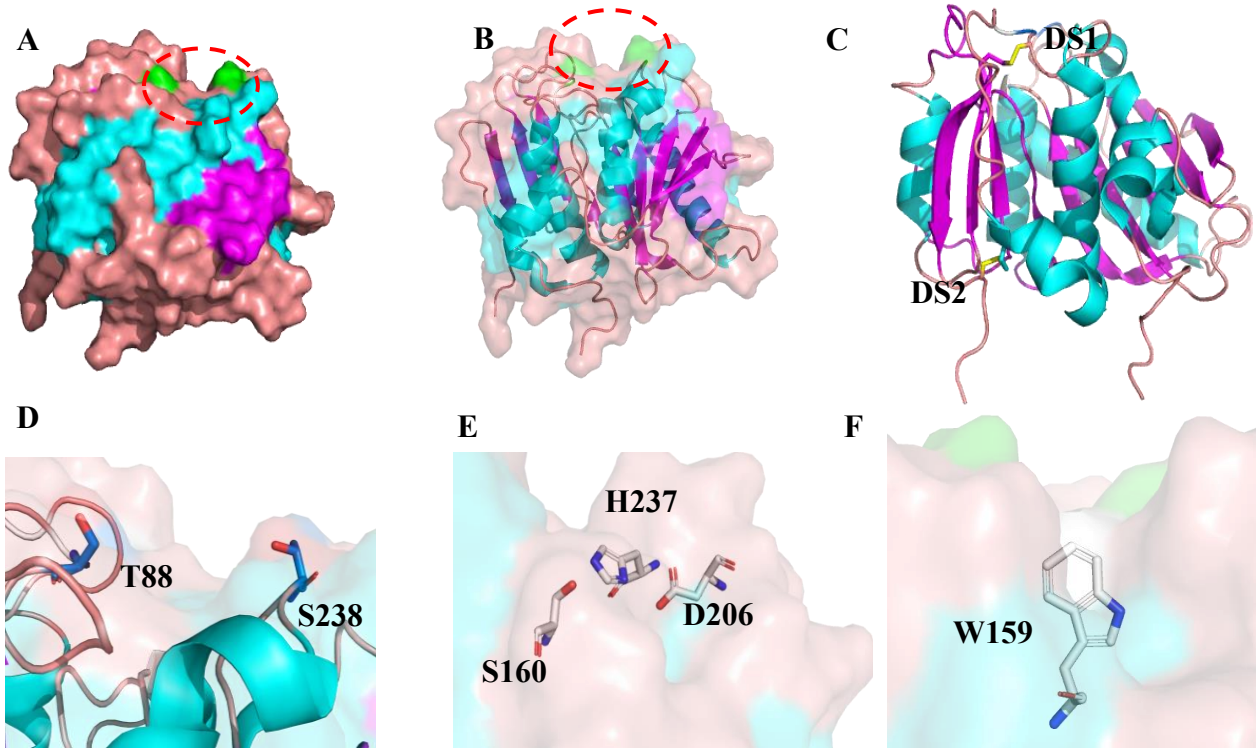


Figura 3. *Caracterización estructural de la enzima IsPETasa (PDB ID:6EQE)*

Nota. **A)** Representación de la superficie molecular de *Is*PETasa, determinada a 0.92 $\boldsymbol{\dot{A}}$ de resolución. El sitio activo se indica con un círculo rojo. **B)** Representación cartoon de IsPETasa. La enzima tiene una estructura típica de las $\propto/\boldsymbol{\beta}$ hidrolasas. Su sitio activo tiene forma de ranura expuesta hacia el solvente. **C)** *Is*PETasa muestra dos puentes disulfuros (representados como sticks

de color amarillo) DS1 es crucial para la catálisis ya que brinda estabilidad a la arquitectura del sitio activo. La presencia de dos puentes disulfuro es una característica única de IsPETasa, no

observada en toras enzimas como LCC o TfCut que solo emplean un puente disulfuro **D)** Vista detallada del surco del sitio activo, correspondiente al área resaltada en (A) y (B). **E)** Ampliación del sitio activo mostrando los residuos de la triada catalítica (H237, S60 y D206) en forma de sticks de color blanco. **F)** Residuo W159 coloreado de blanco.

1.1.5 Mecanismos de acción de la enzima *Is*PETasa de *I. sakaiensis* 201-F6

El mecanismo catalítico propuesto para *Is*PETasa es el mecanismo clásico de acción de las serina hidrolasas, y particularmente, de las cutinasas. Este mecanismo, involucra varias caracteristicas estructurales únicas que permiten la unión la unión del sustrato (PET) y la liberación coordinada de los productos de la reacción. Por lo general, *Is*PETasa hidroliza el PET mono (2-hidroxietil) tereftalato (MHET), aunque la enzima también puede producir bis (2-hidroxietil) tereftalato (BHET), y ácido tereftálico (TPA) en cantidades traza **(Shi et al., 2021)**.

Todo comienza con el acoplamiento de la enzima al sustrato. La enzima en su forma apo (sin ligando) presenta una hendidura superficial poco profunda donde se acomoda el PET **(Austin et al., 2018)**. El residuo W159, adyacente al centro catalítico exhibe diferentes conformaciones (wobbling) en la forma apo. Por lo tanto, se asume que cuando el PET se une al grupo carbonilo unido al primer anillo de TPA, el TPA es dirigido hacia el centro de la hendidura de unión al sustrato, donde forman una interacción $\boldsymbol{\pi}$ de apilamiento (T-stacking) con el residuo W185 (figura 4) **(Taniguchi et al., 2019)**.

A continuación, la triada catalítica S160-H237-D206 activa a S160 mediante la formación de una red de transmisión de carga, quien participa como nucleófilo (figura 4) **(Han et al., 2017)**. El nucleófilo (S160) ataca el enlace éster del PET formando un intermedio tetraédrico. Durante el proceso catalítico, el grupo carbonilo del sustrato se orienta en el sitio activo. El agujero oxianión, conformado principalmente por los residuos M161 y Y87 (figura 4), induce la polarización del enlace éster y estabiliza el intermedio tetraédrico generado. Posteriormente, se produce la formación del intermedio acil-enzima, en el cual la hidrólisis progresa a través de un segundo ataque nucleofílico ejercido por una molécula de agua. Este proceso conduce finalmente a la escisión del enlace éster y a la liberación del producto de la reacción **(Joo et al., 2019)**.

La reacción culmina con la liberación del producto. Tras la escisión del enlace éster, el anillo bencénico del producto resultante adopta una conformación planar extendida. Esto conduce una rotación del producto que favorece una interacción de π de apilamiento tipo sándwich con la cadena lateral de W159. Dicho proceso promueve el desplazamiento del producto desde su sitio original, facilitando así su liberación de la enzima **(Han et al., 2017)**.

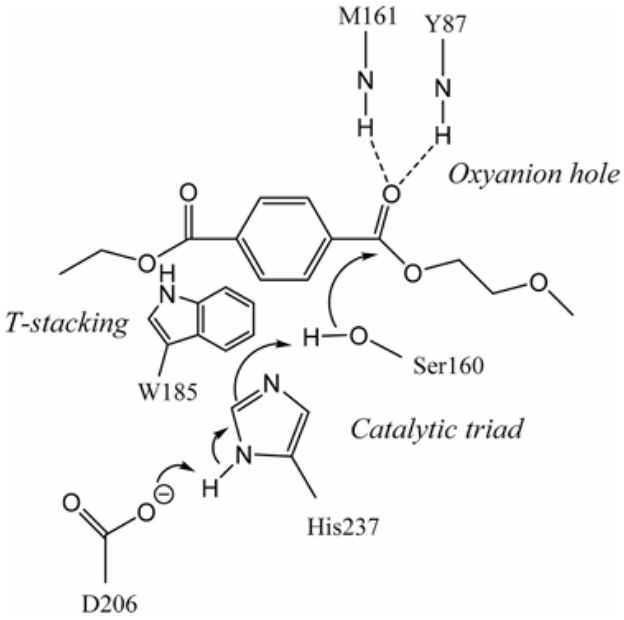


Figura 4. *Mecanismo de reacción de la enzima IsPETasa*

Fuente: **(Taniguchi et al., 2019)**

1.1.6 Mutaciones dirigidas en la enzima PETasa de *I. sakaiensis* 201-F6

La enzima *Is*PETasa ha sido objetivo de modificaciones genéticas para mejorar su estabilidad térmica y afinidad con el PET. En este sentido, se han empleado varios enfoques basados en elementos críticos encontrados en enzimas cutinasas y lipasas, además de enfoques computacionales que integran la inteligencia artificial y análisis de estabilidad mediante dinámica molecular **(Tabla 1) (Wang et al., 2024)**.

Tabla 1. *Mutaciones en estructura de IsPETasa para modificar su actividad degradativa en PET*

Mutaciones	Efecto en la actividad enzimatica		Sustrato	Referencia
I208V	Decrece			(Sevilla et al., 2023)
N212A	Incrementa	Influye en la fijación del sustrato	PET films	(Sevilla et al., 2023)
S238Y	Incrementa			(Sevilla et al., 2023)
S131A	No detectado			(Liu et al., 2018)
D177A	No detectado			(Liu et al., 2018)
H208A	No detectado		PET bottle	(Liu et al., 2018)
W130A	Incrementa	Influye en la fijación del sustrato		(Liu et al., 2018)
W130H	Incrementa	Influye en la fijación del sustrato		(Liu et al., 2018)
M132A	Decrece			(Liu et al., 2018)
W16A	Decrece			(Liu et al., 2018)
W180A	Decrece			(Liu et al., 2018)
A180I	No hay cambios obvios	Influye en la fijación del sustrato	PET bottle	(Liu et al., 2018)
Q90A	Decrece			(Liu et al., 2018)
S185H	Incrementa	Influye en la fijación del sustrato		(Liu et al., 2018)
S209F	Decrece			(Liu et al., 2018)
Q153L	No hay cambios obvios	Cambio en la propiedad hidrofóbica		(Liu et al., 2018)
S238F/W159H	Incrementa	Aumento de 9,73 °C T_m en comparación con WT *Is*PETasa		(Erickson et al., 2022)
S121E/D186H/N246D	Incrementa	Incremento de la estabilidad térmica y actividad catalítica	PET film	(Son et al., 2020)

M161A	Incrementa	Aumento 52% de la actividad hidrolítica	PET	(Joo et al., 2019)
W159H/F229Y	Incrementa	Degradación de PET de 23.4 mg_{PET}/mg_{enzima} * h	PET	(Meng et al., 2021)
R280A	Incrementa	Aumenta 22.4% en comparación con WT *Is*PETasa	PET film	(Joo et al., 2019)

Pese a los esfuerzos realizados, aún no se ha alcanzado la actividad enzimatica necesaria para degradar PET altamente cristalino, empleado principalmente en la elaboración de botellas de bebidas gaseosas. Así mismo, aún es necesario mejorar la estabilidad de la enzima para trabajar en condiciones idóneas, a escala industrial. Por ello, aún es necesario aplicar nuevas estrategias con miras a mejorar la estabilidad y actividad de *Is*PETasa.

1.1.7 Mutación Q119Y-L117F en *Is*PETasa

La caracterización de los parámetros cinéticos y estructural de *Is*PETasa ha permitido identificar segmentos del polipéptido que podrían ser susceptibles de modificaciones con miras a mejorar la actividad y termoestabilidad de la enzima. Parte de estos segmentos incluyen la hélice ∝ 3, próxima al bucle que se forma entre forma entre ∝3 y $\boldsymbol{\beta}$4, y que es adyacente al subsitio I de unión del sustrato **(Joo et al., 2019)**. **Cui et al., (2021)** identificaron que al introducir las sustituciones Q119Y y L117F, que forman parte de la hélice ∝ **3** se lograba estabilizar una serie de interacciones hidrofóbicas que contribuían significativamente al aumento de la estabilidad térmica de la enzima (Tm), donde la variante presente una Tm de 77 °C, comparada con los 48,2 °C de la enzima silvestre. Además, estas mutaciones ejercen un efecto sinérgico. Es decir, su contribución al incremento en termoestabilidad es mayor cuando estas mutaciones se encuentran en combinación en comparación al efecto que consiguen individualmente.

Con estos antecedentes, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto de las sustituciones Q119Y y L117F en la variante mutante M2 de la enzima de *I. sakaiensis,* variante que muestra mayor actividad y termoestabilidad en comparación a la forma silvestre de *Is*PETasa.

De esta forma, se busca desarrollar nuevas opciones que permitan aplicar sistemas de biodegradación del PET a gran escala.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Diseñar la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis.*

1.2.2 Objetivos Específicos

- Construir la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis.*
- Aislar la variante mutante obtenida mediante cromatografía de afinidad.
- Evaluar la actividad enzimatica de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis.*

CAPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1 Materiales

El presente trabajo se realizó en las instalaciones 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 en la presente investigación.

Tabla 2. *Lista de reactivos, materiales fungible y equipos que se emplearon.*

Reactivos	
- Acrilamida	- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Agar bacteriológico	- Imidazol
- Agua desionizada	- Kit para la extracción de ADN plasmídico GenElute™ Plasmid Miniprep
- Agua destilada	
- Alcohol etílico	
- Cloranfenicol	- Reactivo de Biuret
- *E. coli* DH5α	- SDS
- *E. coli* Rosetta (DE3)	- Triptona
- EDTA	- Tris HCl
- Extracto de levadura	
- Glicerol	
- Qcosa	
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 uL, 20-200 uL, 10-1000 uL)
- Hisopos	
- Malla metálica	- Tubos falcon
- Matraz Erlenmeyer	- Tubos eppendorf
- Mechero	

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

2.2 Métodos

2.2.1 Construcción de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzima PETasa de *Indeonella*.

2.2.1.1 Secuencia del gen de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

En el presente proyecto de titulación se empleó, como punto de partida, la secuencia de la variante M2 de la enzima *Is*PETasa de la fue previamente diseñada por la Dra. Liliana Cerda y Dr. Mario D. García, docentes de la facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

2.2.1.2 Obtención de la variante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$

La variante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ fue obtenida mediante un servicio externo de síntesis, clonación y secuenciación. Para ello, las substituciones Q119Y – L117F se introdujeron en la secuencia del gen que codifica para la variante M2 de la enzima *Is*PETasa mediante mutación *in silico*. Para las mutaciones, se consideró la frecuencia de uso de codones en *Escherichia coli* B. El producto de las substituciones se sintetizó y clonó en el vector pET30a(+) empleando los sitios de restricción Ndel y XhoI. Una vez recibido el plásmido generado mediante el servicio externo, se lo almacenó a -20 ° C para futuros análisis.

2.2.1.3 Transformación de las células componentes *E. coli* DH5∝

El plásmido que contiene la secuencia que codifica para la variante L117F/Q119Y se transformó en *E. coli* DH5∝ para su multiplicación y almacenamiento. La transformación de las células de *E. coli* DH5∝ se llevo acabo mediante el método de choque térmico, conforme al protocolo descrito

por **Cohen et al., (1972)**. Para ello, se generaron alícuotas 100 µL de células competentes, previamente almacenadas a –80 °C, las cuales se descongelaron en hielo durante 30 min. Seguidamente, se incorporó 100 ng de vector y se incubó las células en hielo por 30 min adicionales.

El proceso de choque térmico se efectuó mediante inmersión en un baño termostático a 42 °C por 90 segundos, seguido de un retorno inmediato al hielo durante 2 minutos. A continuación, se añadió 900 µL de medio de recuperación SOC **(Tabla 3)** y se incubo la suspensión a 37 °C durante 90 minutos bajo agitación constante a 220 rpm. Posteriormente, se realizó la siembra en placas de agar LB **(Tabla 3)** suplementado con kanamicina, y las células se incubaron a 37 °C durante 24 horas. Por último, se seleccionaron entre dos y cinco colonias para su inoculación en matraces que contuvieron 10 mL de caldo LB también suplementado con antibiótico, a fin de iniciar el cultivo líquido para su posterior conservación y extracción de ADN plasmídico.

Tabla 3. *Medios de cultivo*

Reactivo	**Cantidad por L de medio de cultivo**		
	SOC	**Luria Bertani (LB)**	**Terrific Broth (TB)**
Solución de Qcosa 20 %	20 mL	-	-
Extracto de levadura	5 g	5 g	24 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.584 g	10 g	-
Kanamicina	-	50 µg/mL	-
Triptona	20 g	10 g	12 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.186 g	-	-
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	2.4 g	-	-
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	-	-	12.54 g
Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)	-	-	2.313 g
Glicerol	-	-	4 mL
Agar	-	20 g	-

Fuente: **(Agilent Technologies, 2015) (Sigma-Aldrich, 2013)**

Nota. Ajustar el pH a 7.0 con Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M. Para la elaboración de medios líquidos se omitirá la adición de Agar.

2.2.1.4 Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico para su almacenamiento y uso posterior se desarrolló con kit GenElute Plasmid Miniprep, siguiendo la metodología descrita por el fabricante (Sigma-Aldrich, 2013). Los cultivos fueron sometidos a centrifugación (12000 x g) durante un minuto. A continuación, se descartó el sobrenadante, mientras que el pellet se resuspendió mediante la adición de 200 µL de solución de resuspensión y agitación en vórtex. Posteriormente, se incorporaron 200 µL de solución de lisis y se realizó una mezcla por inversión de 6 a 8 veces, hasta lograr observar una solución clara y viscosa. Para precipitar los restos celulares, se adicionaron 350 µL de solución de neutralización, realizando nuevamente una mezcla por inversión de 4 a 6 veces, seguida de una centrifugación a una fuerza de 12000 x g durante 2 min.

A continuación, se insertó una columna GenElute Miniprep en un tubo de microcentrífuga. La columna se equilibró con 500 µL de solución de preparación y se centrifugó a 12000 x g durante un minuto y se desechó el flujo. Posteriormente, la muestra se transfirió a la columna y se sometió a una nueva centrifugación bajo las mismas condiciones, eliminando el líquido de paso. Luego, se adicionaron 750 µL de la solución de lavado y se centrifugó nuevamente a 12000 x g por un minuto, se descartó el flujo y se procedió a una segunda centrifugación a velocidad máxima durante 1 a 2 minutos para la eliminación de residuos remanentes. Finalmente, la columna fue transferida a un tubo de recolección estéril, se adicionaron 100 µL de solución de elución (o agua estéril grado biología molecular) para llevarla a una última centrifugación de 12000 x g por un minuto para la recuperación del ADN plasmídico, cuya concentración y pureza se determinaron mediante Nanocrop.

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

La metodología de transformación de *E. coli* Rosetta (DE3), para la expresión de la variante mutante fue la misma descrita en la sección 2.2.1.2 mediante choque térmico, con la única diferencia que tambien se añadió cloranfenicol al medio de cultivo

2.2.1.6 Expresión de la variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ de la enzima PETasa de *I. sakaiensis.*

La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por **Sevilla y Cerda-Mejía (2022)**. En primera instancia, se tomó una colonia de *E. coli* Rosetta (DE3)

previamente transformada con el plásmido que porta la variante mutante y se inoculó en 25 mL de caldo LB suplementado con kanamicina (50 µg/mL) y cloranfenicol (34 µg/mL). Este cultivo fue incubado durante 16 horas a 37 °C bajo agitación constante a 200 rpm. Finalizado este tiempo, el cultivo fue transferido a un matraz que contenía 500 mL de medio TB **(Tabla 3)** con los mismos antibióticos, continuando la incubación a 37 °C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO600) entre 0,6 y 0,8, lo cual se esperó que ocurriera aproximadamente a las 4 horas.

Al alcanzar la densidad óptica requerida, se indujo la expresión génica mediante la adición de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido) a una concentración final de 0.1 mM. El cultivo se incubó a 20 °C durante 18-24 horas adicionales. Posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 4000 rpm y 4 °C por un periodo de 20 minutos para recolectar la biomasa celular. Finalmente, el pellet obtenido fue resuspendido utilizando 6 mL de tampón Tris 50 mM, pH 8, con 150 mM de NaCl por cada gramo de pasta celular, y la muestra fue almacenada a –80 °C para su posterior procesamiento.

2.2.2 Aislamiento de la enzima mutante a través de cromatografía de afinidad.

2.2.2.1 Lisis celular.

Para llevar a cabo la lisis celular, se añadió a la suspensión celular 0.3% de Triton X – 100 y se incubó las células por 10 min. Enseguida, la muestra se sónico, conforme al protocolo descrito por **Dermit & Mardakheh (2021).**

2.2.2.2 Purificación de la proteína.

Una vez obtenido el lisado celular, la muestra se centrifugó a 21000 g durante 60 minutos a 4 °C con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante fue cuidadosamente transferido a una columna de afinidad Ni-NTA, previamente equilibrada con diez volúmenes de columna (cv) de tampón Tris 50 mM, pH 8, 150 mM NaCl, 5 mM de imidazol.

Una vez que la muestra estuvo cargada en la columna, se aplicó un lavado utilizando de diez cv del mismo buffer, para remover proteínas unidas de forma inespecífica. La elución de la enzima PETasa recombinante se realizó mediante la aplicación de un tampón que contenía 250 mM de imidazol, recolectándose las fracciones eluídas en alícuotas de 1 mL en tubos estériles. Posteriormente, las fracciones que contuvieron la proteína de interés fueron agrupadas para evaluar

su pureza mediante electroforesis SDS-PAGE. Finalmente, la concentración proteica fue determinada utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

2.2.3 Evaluación de la actividad enzimatica de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y-L117F}$ de la enzim PETasa de *I. sakaiensis.*

2.2.3.1 Ensayo de degradación del PET

Gránulos de polietileno tereftalato (PET) de origen comercial (botella de bebida post consumo) micronizados fueron sometidos a un lavado con agua desionizada estéril, seguido de un secado a temperatura ambiente hasta peso constante. Una vez completado este proceso, el PET fue incubado con 5 mL de Na_2HPO_4 1 mM, pH 8, tanto en presencia como en ausencia de la enzima mutante (en una relación 1.5 mg de enzima por g de PET). Las condiciones de incubación se mantuvieron a 50 °C durante un periodo de 72 horas. Al término de la reacción, esta se detuvo mediante la adición de una solución de fosfato 20 mM pH 2.5, DMSO al 12 %. La muestra de PET resultante se lavó tres veces con agua desionizada, una vez con DMSO y una vez con etanol y se dejó secar a temperatura ambiente hasta peso constante. Posteriormente, la actividad de la variante mutante se determinó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la final. La actividad de la enzima se expresó en función de la eficiencia de degradación del PET.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1 Obtención de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$

La construcción del plásmido recombinante se basó en el diseño *in silico* de un vector de expresión que permitiera la inserción de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ bajo un sistema regulado y eficiente. Debido a la complejidad del diseño y la necesidad de precisión en la secuencia, la síntesis del constructo fue encargada a GeneUniversal, la cual garantizó la fidelidad del ensamblaje y la verificación mediante secuenciación. Este enfoque permitió optimizar el tiempo experimental, redujo el riesgo de errores de clonación o mutaciones indeseadas durante los pasos de digestión y ligadura tradicionales, tal como menciona **(Ramírez et al., 2024)** en las estrategias de construcción plasmídica asistida por síntesis.

El vector base seleccionado fue pET-30a(+), un plásmido ampliamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* debido a su promotor T7, su origen de replicación ColE1 y su marcador de resistencia a kanamicina, que garantiza una alta tasa de transcripción como selección efectiva de células transformadas **(Khananisho et al., 2023)**. Para el proceso de diseño, se eligieron las enzimas de restricción NdeI y XhoI debido a su compatibilidad con el marco de lectura del gen PETasa y a la ausencia de sitios de corte internos en la secuencia codificante. Ambas enzimas generan extremos cohesivos, lo que facilita una ligadura direccional y reduce la posibilidad de inserciones en sentido inverso. Según **Danaher Life Sciences (2022)**, la elección de enzimas que produzcan extremos compatibles y direccionales es clave para evitar auto-ligaduras del vector y mejorar la eficiencia de clonación. Además, la enzima NdeI incluye el codón de inicio ATG dentro de su sitio de restricción (CATATG), lo que permite mantener el inicio de traducción nativo del gen sin introducir secuencias adicionales. Por su parte, el uso de XhoI en el extremo 3’ permitió conservar la región codificante completa, evitando la adición de aminoácidos no deseados y permitiendo una expresión correcta de la proteína fusionada a la etiqueta His del vector.

El sitio 6xHis codifica una secuencia de seis histidinas unidas al extremo C-terminal de la proteína PETasa **(Stanbury et al., 2017)**. La histidina tiene grupos imidazol, que se coordinan con iones metálicos como Ni^{2+} **(Żamojć et al., 2021)**. Facilitando su purificación mediante cromatografía de afinidad.

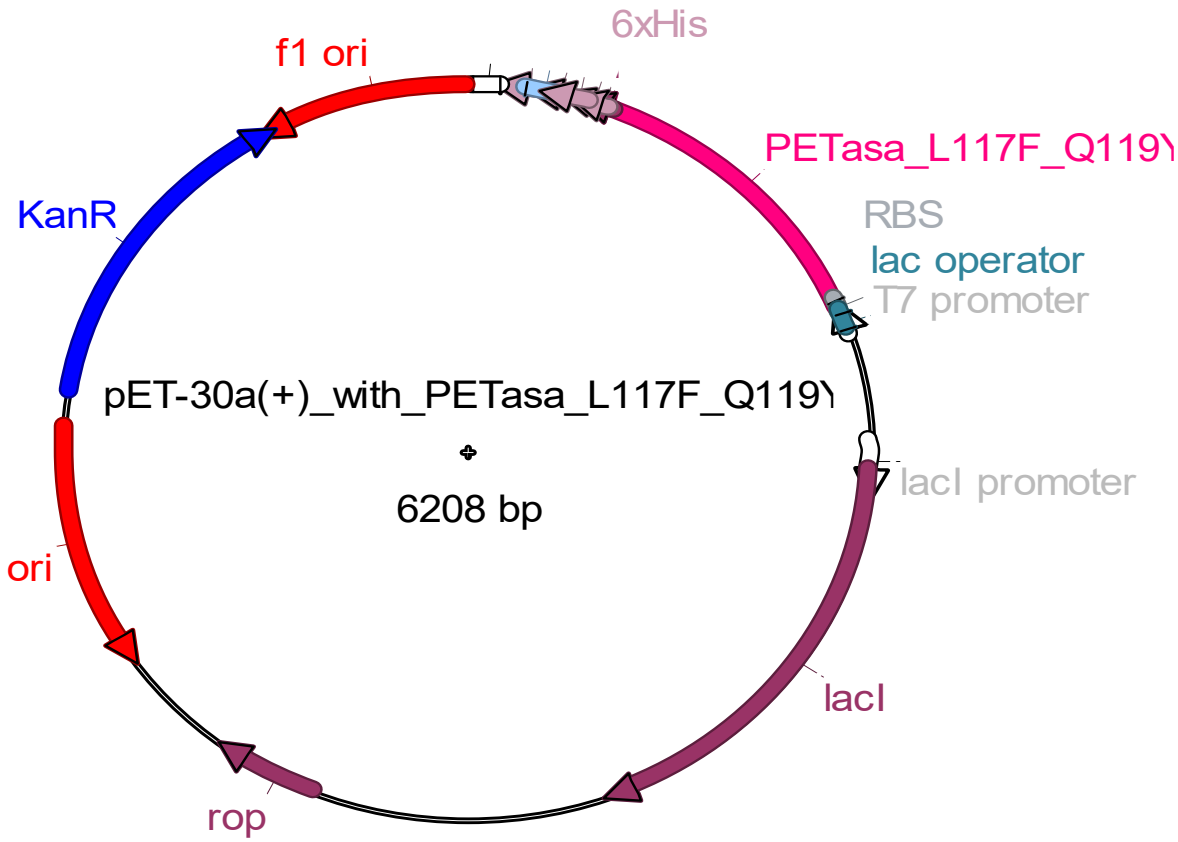


Figura 5. *Plásmido pET-30a(+) con variante mutante Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$

Nota. La construcción del plásmido para la expresión de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ incluye un gen de resistencia a la ampicilina, un promotor T7 inducible por IPTG, un operón lac y una etiqueta 6xHis.

3.1.1.1 Inducción

Los mutantes generados tras la transformación se seleccionaron por su crecimiento en placas con medio LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol. Posteriormente, las células transformadas se utilizaron para inducir la producción de la enzima mutante mediante la adición de IPTG a una concentración de 0,1 mM, al obtener una densidad óptica de 1.330 (OD_{600} = 1.330), que se incubó durante 24 horas a 18 °C con agitación de 150 rpm en 500 ml de Terrific Broth. Aunque en la mayoría de los estudios recomienda inducir con IPTG en fases tempranas del crecimiento (OD_{600}≈ 0.4-0.6) **(Puengsawad et al., 2021)**, La diferencia observada en el OD_{600} determinado experimentalmente en este estudio y los valores comúnmente reportados en la literatura no implica un error metodológico, sino que refleja la variabilidad en los sistemas de

expresión recombinante. Diversos autores han documentado que el punto óptimo de inducción puede variar ampliamente dependiendo de factores como el medio de cultivo, cepa de *E coli* utilizada, la carga metabólica asociada a la proteína recombinante y la naturaleza estructural de la proteína expresada, incluyendo sus mutaciones específicas. Estudios como los de **Mühlmann et al. (2017)** y **Rajacharya et al. (2024)** muestran que la inducción puede realizarse desde fases tempranas ($OD_{600} \approx 0.4\text{-}0.6$) hasta densidades celulares significativamente superiores ($OD_{600} > 3$), dependiendo de las condiciones experimentales y los objetivos de expresión.

La biomasa obtenida tras la incubación en TB (500 mL por matraz, n = 3) fue de 3,62 g en total, lo que corresponde a una biomasa media de 1,21 g por matraz equivalente a un rendimiento de 2,41 $\frac{g}{L}$. Aunque valores reportados en la literatura para cultivos en TB varían ampliamente según condiciones experimentales, el rendimiento observado refleja un crecimiento moderado para cultivos de *E. coli* realizados bajo condiciones de baja temperatura y aireación moderada. La literatura señala que la temperatura es uno de los factores más influyentes en la velocidad de crecimiento. Estudios como el de **Kasli et al. (2019),** demostraron, que la biomasa generada en matraces agitados a 18-20 °C suele ser significativamente menor que la obtenida a temperaturas óptimas (30 -37 °C), aun cuando se emplean medios ricos como TB. Asimismo, diversos autores han destacado que cuando el objetivo del cultivo es la producción de proteínas recombinantes, especialmente aquellas susceptibles a agregación o mal plegamiento, las condiciones de crecimiento deben priorizar a la solubilidad y calidad de la proteína, más que la máxima biomasa. **Rosano & Ceccarelli. (2014),** enfatizan que temperaturas bajas, aunque reducen la biomasa, promueven un ambiente celular más favorable para el plegamiento correcto. Por lo tanto, el rendimiento obtenido es consistente entre crecimiento y expresión soluble.

3.1.2 Purificación de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$

El extracto celular de la variante mutante se purificó mediante cromatografía de afinidad con una columna de níquel Ni-NTA (Figura 5A). La muestra obtenida fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE para verificar su pureza **(Figura 5B).**

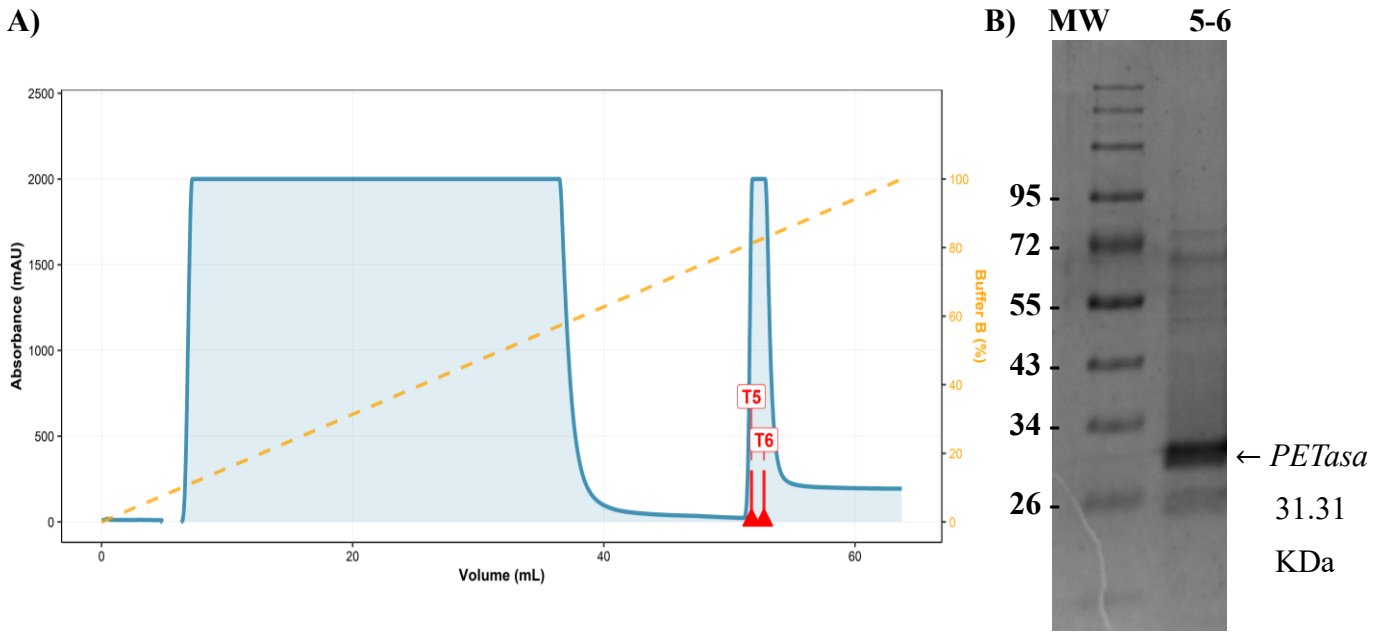


Figura 6. Purificación de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$.

Nota. **A)** Cromatograma de la purificación de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ bajo un gradiente de elución. Donde el gradiente de concentración del Buffer (%) se visualiza mediante una línea descontinua en color naranja y las fracciones T5 y T6 se encuentran marcadas con flechas rojas, representan las fracciones seleccionadas por su señal máxima asociada a la presencia de *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$. **B)** SDS-PAGE de la variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$. MW: marcador de peso molecular y **5-6:** unión de fracciones.

La purificación de la variante enzimática *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ permitió obtener un pico único y bien definido en el perfil cromatográfico, lo que indica una separación eficiente respecto proteínas no específicas presentes en el extracto crudo. El pico de elución observado entre 50-55 mL indica la recuperación de proteína activa en las fracciones T5 y T6 **(Figura 5A)** coincide con lo

documentado en cultivos recombinantes de PETasa donde la proteína tiende a concentrarse en un intervalo estrecho de elución. **Yu et al. (2021),** reportan picos agudos en la purificación de proteínas mutadas, atribuyendo un plegamiento estable y una baja heterogeneidad conformacional, lo que facilita su purificación a través de columnas de afinidad y gradientes suave.

En comparación con otros trabajos previos, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que la doble mutación Q119Y-L117F podría haber favorecido la estabilidad estructural durante la purificación, lo que explicaría el único pico simétrico observado. Este patrón coincide con los estudios de **Joo et al. (2018)** y **Son et al. (2020),** quienes reportaron que mutaciones localizadas cerca del bolsillo activo de PETasa pueden mejorar tanto la estabilidad como la facilidad de purificación.

El análisis por SDS-PAGE permitió evaluar la pureza y el peso molecular estimado de la variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ después del proceso de purificación **(figura 5B)**. En el gel se observó una banda predominante alrededor de 26-34 kDa, lo cual coincide con el peso molecular reportado por la PETasa nativa y sus variantes recombinadas **(Austin et al., 2018; Yoshida et al., 2016)** la presencia de una banda única y definida respalda que la purificación fue exitosa y que las fracciones seleccionadas (T5-T6) contenían mayoritariamente la proteína objetivo.

Tabla 4. *Resultados de la purificación de IsPETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ de E. coli (DE3) Rosetta*

Paso de purificación	Total vol. (mL)	Concentración de proteína µM	Concentración de proteína mg/mL
Enzima purificada por FPLC	2.0	194.98	5.6074

3.1.3 Ensayo de degradación de PET

En el presente ensayo se evaluó la capacidad degradativa de la variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ utilizando PET únicamente triturado y lavado, sin procesos adicionales de amorfización o pretratamientos térmicos. Este detalle es relevante, ya que el PET post-consumo triturado tiende a presentar alta cristalinidad, reduciendo sustancialmente la accesibilidad de la enzima a las cadenas poliméricas por lo tanto limita el rendimiento degradativo **(Wei & Zimmermann, 2020)**.

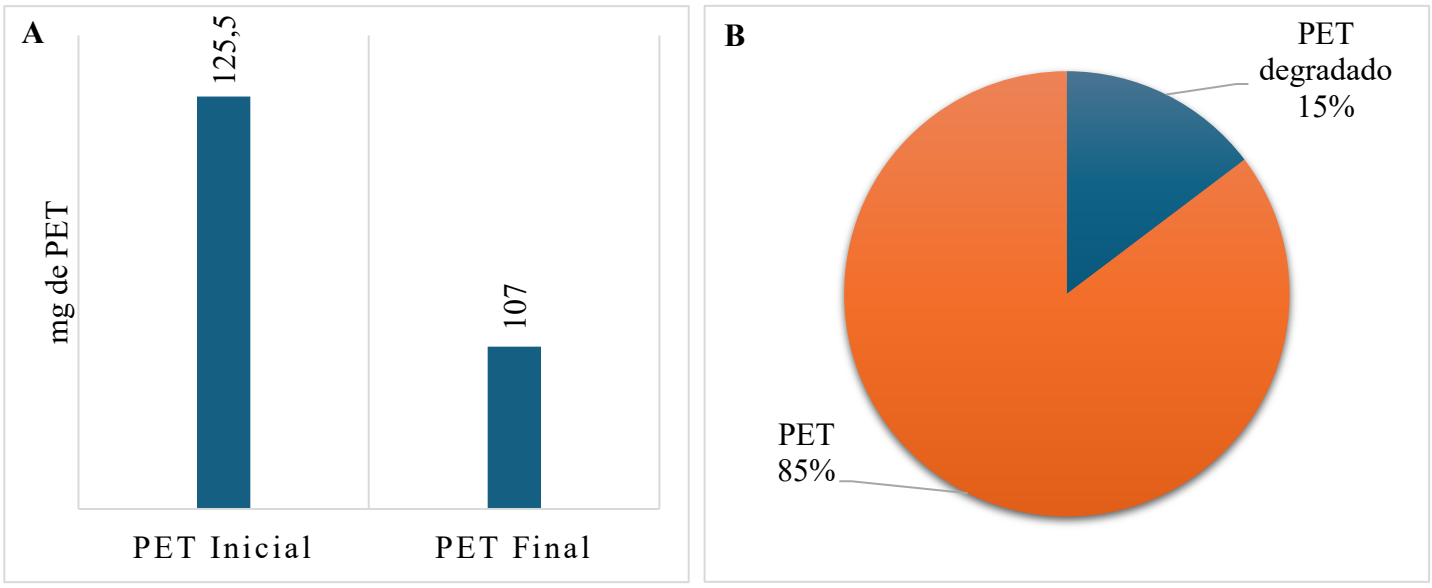


Figura 7. *Degradación de PET por la variante Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$

***Nota*. A)** Representación del peso inicial y final de PET triturado y lavado tras 9 días de incubación con la variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ (194.98 $\boldsymbol{\mu M}$) a 50 °C. **B)** Porcentaje de degradación de PET triturado y lavado. Se observó una reducción del 14.7% en la masa inicial del polímero.

A partir de 125.5 mg de PET iniciales. Tras 5 días de incubación a 50 °C s obtuvieron 107 mg de material residual **(figura 6A)**, Indicando una pérdida de masa del 14,7% **(figura 6B)**. Aunque este porcentaje puede considerarse moderado, debe interpretarse bajo la limitación clave de que el PET no fue amorfizado; estudios previos han demostrado que PETasa silvestre apenas degrada PET de alta cristalinidad (<1-2%), mientras que materiales amorfos alcanzan tasas muy superiores **(Lu et al., 2022; Yoshida et al., 2016)**.

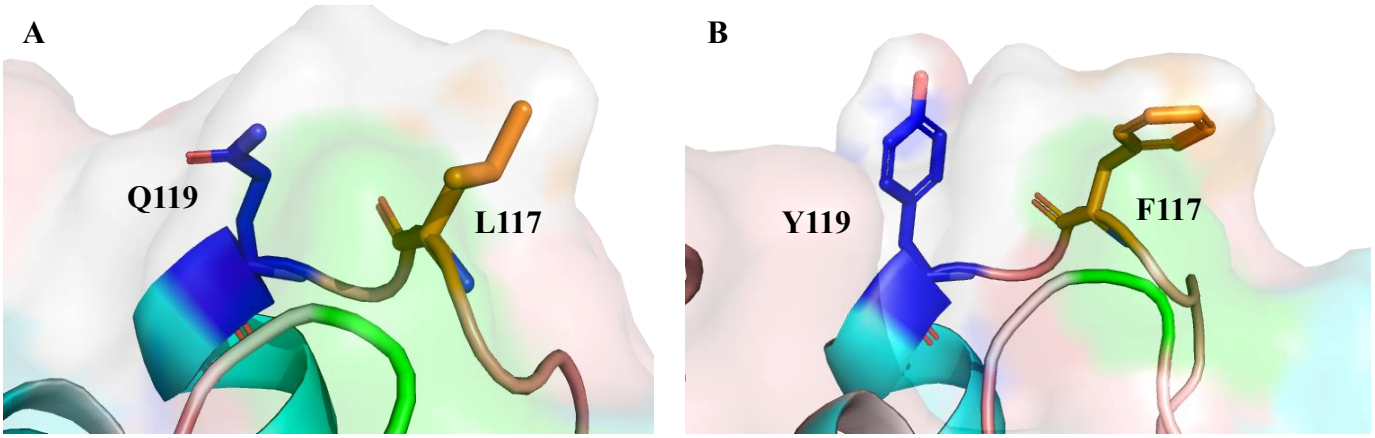


Figura 8. *Comparación estructural de PETasa antes y después de las mutaciones L117F y Q119Y*

Nota. **A)** Residuo salvaje Q119 y L117 en la estructura nativa de *Is*PETasa. **B)** Variante mutante mostrando los residuos Y119 y F117 (grupos aromáticos). La imagen evidencia el cambio en la conformación y el entorno estérico resultante de las mutaciones.

Desde el punto de vista estructural, en la enzima nativa, los residuos Q119 y L117 **(figura 8A)** presentan cadenas laterales alifáticas y polares que contribuyen modestamente al posicionamiento del sustrato. Sin embargo, en la variante generada, estos residuos fueron sustituidos por Y119 y F117 **(figura 8B)**, dos aminoácidos aromáticos capaces de establecer interacciones $\boldsymbol{\pi - \pi}$ con los anillos tereftalatos presentes en la estructura del PET. Este tipo de interacciones ha sido ampliamente reportado como un factor clave en la captura y orientación del polímero enzimático.

Estudios recientes, como **Cui et al. (2021)** y **Li et al. (2022)**, indican que los residuos aromáticos en proximidad al bolsillo catalítico facilitan el apilamiento con los anillos del PET, promoviendo un alineamiento más favorable hacia el centro catalítico Ser-His-Asp. Esta reorganización electrónica y espacial contribuye a reducir la energía necesaria para la hidrólisis del enlace éster, acelerando la degradación del sustrato.

Por otro lado, la sustitución de L117→F117 **(figura 8)** incrementa el volumen lateral y la rigidez local. De acuerdo con estudios de ingeniería de PETasa como **Cui et al., (2021),** aumenta ligeramente el valor de Tm por la rigidez estructural inducida por residuos aromáticos, permitiendo que la enzima mantenga su conformación catalíticamente competente a temperaturas superiores a su óptimo natural. Esto coincide con los resultados obtenidos a 50 °C, donde la variante mostró conservación de actividad pese a estar por encima de la temperatura óptima reportada para PETasa nativa ($\approx \boldsymbol{37 - 45\ °C}$).

En conjunto, los resultados siguieren que la introducción de grupos aromáticos en posiciones 117 y 119 no solo mejoran la afinidad por el PET mediante interacciones $\boldsymbol{\pi - \pi}$, sino que también aporta mayor termoestabilidad, lo cual explica la capacidad de la enzima para degradar PET sólido. Esta tendencia también ha sido descrita en otras variantes de PETasa mejoradas, como la variante FAST-PETasa desarrollada por **Lu et al. (2022)**, donde el fortalecimiento de la red de interacciones estabilizantes permitió degradar PET más rápido y a temperaturas cercanas a la Tg del PET.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La variante mutante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ fue obtenida de manera satisfactoria mediante la síntesis y construcción del plásmido por GeneUniversal, garantizando de la secuencia confirmó que el diseño mutacional fue implementado correctamente, asegurando la disponibilidad del constructo necesario para siguientes etapas experimentales.
- La variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ pudo ser expresada y purificada de manera efectiva utilizando cromatografía de afinidad, obteniéndose una fracción proteica homogénea y con integridad estructural adecuada. El perfil cromatográfico y el análisis por SDS-PAGE confirmaron la obtención de la proteína objetivo con un nivel de pureza suficiente para ensayos bioquímicos posteriores.
- La variante *Is*PETasa$^{Q119Y\text{-}L117F}$ mostró actividad frente a PET triturado, logrando una reducción del sustrato después del periodo de incubación evaluado. Lo resultados indican que las mutaciones introducidas favorecen la interacción con el PET y permiten mantener la actividad catalítica a temperaturas evaluadas. Esto demuestra que la modificación racional de lo residuos L117F y Q119Y puede mejorar la capacidad de degradación de PET en condiciones relevantes para bioprocesos.

4.2 Recomendaciones

- Futuras investigaciones deberían determinar parámetros como Km, Vmax y kcat utlizndo sustratos modelo para cuantificar con mayor precisión el efecto de las mutaciones aromáticas en la eficiencia catalítica.
- Se recomienda estudiar la actividad de la variante mutada a diferentes temperaturas, pH y tiempos extendidos de incubación, considerando condiciones relevantes para bioprocesos de degradación de PET.

MATERIALES DE REFERENCIA

5.1 Referencias bibliográficas

Agilent Technologies. (2015). *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit User Manual*. https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.434

Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., … Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(19). https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115

Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., … Wagner, A. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115

Babaei, M., Jalilian, M., & Shahbaz, K. (2024). Chemical recycling of Polyethylene terephthalate: A mini-review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *12*(3), 112507. https://doi.org/10.1016/j.jece.2024.112507

Benyathiar, P., Kumar, P., Carpenter, G., Brace, J., & Mishra, D. K. (2022a). Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry : A Review. *Polymers*, *14*(2366), 1–29.

Benyathiar, P., Kumar, P., Carpenter, G., Brace, J., & Mishra, D. K. (2022b). Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry : A Review.

Chanda, M. (2021). Chemical aspects of polymer recycling. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, *4*(3), 133–150. https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2021.06.002

Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., … Wu, B. (2021). Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy. *ACS Catalysis*, *11*(3), 1340–1350. https://doi.org/10.1021/acscatal.0c05126

Danaher Life Sciences. (2022). Plasmid construction: Techniques, design & components. https://lifesciences.danaher.com

Das, S. K., Eshkalak, S. K., Chinnappan, A., Ghosh, R., Jayathilaka, W. A. D. M., Baskar, C., &

Ramakrishna, S. (2021). Plastic Recycling of Polyethylene Terephthalate (PET) and PolyhydroxybuYate (PHB)—a Comprehensive Review. *Materials Circular Economy*, *3*(1). https://doi.org/10.1007/s42824-021-00025-3

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

Erickson, E., Shakespeare, T. J., Bratti, F., Buss, B. L., Graham, R., Hawkins, M. A., … Beckham, G. T. (2022). Comparative Performance of PETase as a Function of Reaction Conditions, Substrate Properties, and Product Accumulation. *ChemSusChem*, *15*(1). https://doi.org/10.1002/cssc.202101932

Hahladakis, J. N., & Iacovidou, E. (2019). An overview of the challenges and trade-offs in closing the loop of post- consumer plastic waste (PCPW): Focus on recycling. *Journal of Hazardous Materials*, *380*(June), 120887. https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.120887

Hamade, R., Hadchiti, R., & Ammouri, A. (2020). ScienceDirect ScienceDirect Making Environmental Case Case for for Reusable Reusable PET PET Bottles Bottles Making the the Environmental. *Procedia Manufacturing*, *43*, 201–207. https://doi.org/10.1016/j.promfg.2020.02.137

Han, X., Liu, W., Huang, J.-W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T.-P., … Guo, R.-T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, *8*(1), 2106. https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z

Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H.-Y., Shin, T. J., … Kim, K.-J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, *9*(1), 382. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1

Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H., Shin, T. J., … Kim, K. (2019). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, *018*(02881). https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1

Jovanović, A., Bugarčić, M., Simić, M., Pejić, J., & Dimitrijević, J. (2025). The Global Market of PET Production: from Origins to Recycling. *Metallurgical and Materials Data*, *2*(4), 113–118. https://doi.org/10.30544/mmd46

Kasli, I. M., Thomas, O. R. T., & Overton, T. W. (2019). Use of a design of experiments approach

to optimise production of a recombinant antibody fragment in the periplasm of Escherichia coli: selection of signal peptide and optimal growth conditions. *AMB Express*, *9*(1). https://doi.org/10.1186/s13568-018-0727-8

Khananisho, D., Cumming, A., Kulakova, D., Shilling, P., & Daley, D. (2023). Tips for efficiently maintaining pET expression plasmids. *Current Genetics*, *69*(4), 277–287. https://doi.org/10.1007/s00294-023-01276-0

Li, Z., Zhao, Y., Wu, P., Wang, H., Li, Q., Gao, J., … Liu, W. (2022). Structural insight and engineering of a plastic degrading hydrolase Ple629. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *626*, 100–106. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.07.103

Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., … Bao, R. (2018). Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from Ideonella sakaiensis. *ChemBioChem*, *19*(14), 1471–1475. https://doi.org/10.1002/cbic.201800097

Lonca, G., Lesage, P., Majeau-bettez, G., & Bernard, S. (2020). Resources , Conservation & Recycling Assessing scaling effects of circular economy strategies : A case study on plastic bottle closed-loop recycling in the USA PET market. *Resources, Conservation & Recycling*, *162*(May), 105013. https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.105013

Lu, H., Diaz, D. J., Czarnecki, N. J., Zhu, C., Kim, W., Shroff, R., … Alper, H. S. (2022). Machine learning-aided engineering of hydrolases for PET depolymerization. *Nature*, *604*, 661–667. https://doi.org/10.1038/s41586-022-04599-z

Magalh, R. P., Cunha, J. M., & Sousa, S. F. (2021). Perspectives on the Role of Enzymatic Biocatalysis for the Degradation of Plastic PET.

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), 2699–2716. https://doi.org/10.1007/s12010-021-03562-4

Meng, X., Yang, L., Liu, H., Li, Q., Xu, G., Zhang, Y., … Tian, J. (2021). Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse. *International Journal of Biological Macromolecules*, *180*, 667–676. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.058

Mühlmann, M., Forsten, E., Noack, S., & Büchs, J. (2017). Optimizing recombinant protein

expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures. *Microbial Cell Factories*, *16*, 1–12. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0832-4

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

Puengsawad, P., Piyapittayanun, C., Sawangwan, T., & Chantorn, S. (2021). Characterization of Bacillus subtilis GA2(1) mannanase expressed in Escherichia coli Rosetta (DE3) for enzymatic production of manno- oligosaccharides from spent coffee grounds and in vitro assessment of their prebiotic properties. *Agriculture and Natural Resources*, *55*, 319–330.

Rajacharya, G. H., Sharma, A., & Yazdani, S. S. (2024). Proteomics and metabolic burden analysis to understand the impact of recombinant protein production in E . coli. *Scientific Reports*, *14*, 1–15. https://doi.org/10.1038/s41598-024-63148-y

Ramírez, D., Liu, Z., & Dekker, N. (2024). De novo fabrication of custom-sequence plasmids for the synthesis of long DNA constructs with extrahelical features. *Biophysical Society*, *123*, 31–41. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2023.11.008

Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, *5*(APR), 1–17. https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172

Ru, J., Huo, Y., & Yang, Y. (2020). Microbial Degradation and Valorization of Plastic Wastes. *Frontiers in Microbiology*, *11*(April), 1–20. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00442

Sarda, P., Hanan, J. C., Lawrence, J. G., & Allahkarami, M. (2022). Sustainability performance of polyethylene terephthalate, clarifying challenges and opportunities. *Journal of Polymer Science*, *60*(1), 7–31. https://doi.org/10.1002/pol.20210495

Schür, C., Rist, S., Baun, A., Mayer, P., Hartmann, N. B., & Wagner, M. (2019). When Fluorescence Is not a Particle: The Tissue Translocation of Microplastics in Daphnia magna Seems an Artifact. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *38*(7), 1495–1503. https://doi.org/10.1002/ETC.4436

Sevilla, M. E., & Cerda-Mejía, L. (2022). *Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis*. Universidad Técnica de Ambato. https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/36572/1/CBT 018.pdf

Sevilla, M., Garcia, M., Castillo, Y., Jaramillo, V., Casado, S., Vizuete, K., … Cerda, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered Ideonella sakaiensis PETase. *Polymers*, *15*, 1–15.

Shi, L., Liu, H., Gao, S., Weng, Y., & Zhu, L. (2021). Enhanced extracellular production of IsPETase in Escherichia coli via engineering of the pelB signal peptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(7), 2245–2252. https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07469

Sigma-Aldrich. (2013). *GenElute ™ Plasmid Miniprep Kit User Manual*.

Son, H. F., Joo, S., Seo, H., Sagong, H., Lee, S. H., Hong, H., & Kim, K. (2020). Enzyme and Microbial Technology Structural bioinformatics-based protein engineering of thermo-stable PETase from Ideonella sakaiensis. *Enzyme and Microbial Technology*, *141*(May), 109656. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109656

Stanbury, P., Whitaker, A., & Hall, S. (2017). The production of heterologous proteins. *Principles of Fermentation Technology*, *1*, 725–775. https://doi.org/10.1016/B978-0-08-099953-1/00012-0

Stegman, P., Junginger, M., Gerritse, T., Shen, L., Londo, M., & Puente, Á. (2023). The global warming potential and the material utility of PET and bio-based PEF bottles over multiple recycling trips. *Cleaner Production*, *395*(June 2022). https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.136426

Swamy, T. M. C., Nagarathna, S. V, Reddy, P. V, & Nayak, A. S. (2024). Ecotoxicology and Environmental Safety Efficient biodegradation of Polyethylene terephthalate (PET) plastic by Gordonia sp . CN2K isolated from plastic contaminated environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *281*(January), 116635. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116635

Tamburini, E., Krozer, Y., & Castaldelli, G. (2025). How much are we paying for drinking water in (PET) bottles? A global assessment of the hidden costs and potential damage to the environment. *Environmental Challenges*, *18*(January), 101083. https://doi.org/10.1016/j.envc.2025.101083

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), 4089–4105. https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171

Then, J., Wei, R., Oeser, T., Barth, M., Belisário-ferrari, M. R., & Zimmermann, W. (2015). Ca 2+ and Mg 2+ binding site engineering increases the degradation of polyethylene terephthalate films by polyester hydrolases from. *Biotechnology Journal*, *10*, 1–16. https://doi.org/10.1002/biot.201400620.Submitted

United Nations Environment Programme. (2021). *FROM POLLUTION TO SOLUTION*.

Wang, T., Yang, W. tao, Gong, Y. ming, Zhang, Y. kang, Fan, X. xin, Wang, G. cheng, … Zhu, Y. shuang. (2024). Molecular engineering of PETase for efficient PET biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *280*(February), 116540. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116540

Webb, H. K., Arnott, J., Crawford, R. J., & Ivanova, E. P. (2013). Plastic Degradation and Its Environmental Implications with Special Reference to Poly(ethylene terephthalate), 1–18. https://doi.org/10.3390/polym5010001

Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Opinion Biocatalysis as a green route for recycling the recalcitrant plastic polyethylene terephthalate. *Microbial Biotechnology*, *10*(633962), 1302–1307. https://doi.org/10.1111/1751-7915.12714

Wei, R., & Zimmermann, W. (2020). Minireview Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroLm-based plastics : how far are we ? *Microbial Biotechnology*, *2020*(633962). https://doi.org/10.1111/1751-7915.12710

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., … Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethyline terephthalate). *Science*, *353*(6301), 759.

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* (1st ed., Vol. 648). Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007

Yu, H., Gao, D., Zhou, W., Xia, B., He, Z., Wu, B., … Zhao, J. (2021). Expression, purification, and bioactivity of a soluble recombinant ovine interferon-tau in Escherichia coli. *Sciendo*,

65(22), 101–108. https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0011

Żamojć, K., Wyrzykowski, D., Sabatino, G., Papini, A. M., Wieczorek, R., Chmurzyński, L., & Makowska, J. (2021). Key role of histidine residues orientation in affinity binding of model pentapeptides with Ni2+ ions: A theoretical supported experimental study. *Journal of Molecular Liquids*, *341*. https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117414