UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO

FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Diseño de la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

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

Autor: John Alexander Dutan Atancuri

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, John Alexander Dutan Atancuri, 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.



John Alexander Dutan Atancuri

1850282490

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

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



John Alexander Dutan Atancuri

1850282490

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

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

Para constancia firman:

Firmado electrónicamente por:
ESTEBAN MAURICIO FUENTES PEREZ
Validar únicamente con FirmaEC

Presidente del Tribunal

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

Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

1802142461

Firmado electrónicamente por:
LILIANA ALEXANDRA CERDA MEJIA
Validar únicamente con FirmaEC

Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

1804148086

Ambato, 19 de diciembre de 2025

DEDICATORIA

A Dios, por su guía eterna

A mis padres, por ser mi fortaleza y mis pilares

A mi hermano, que me ha motivado a ser mejor

A mi novia, por su amor y apoyo incondicional

A mis sobrinos, que sepan que todo lo que uno realiza es por un propósito mayor al de nuestras vidas, siendo el motor más fuerte que impulsa a seguir adelante pese a los golpes.

Es de humano errar, pero es bello cuando del error se aprende y se mejora

"No elegimos como comenzar esta vida, la grandeza real es lo que hacemos con las cartas que nos tocan" – Victor Sullivan, Uncharted 3

AGRADECIMIENTO

En mi cabía la duda de poder culminar esta meta que sentía imposible por la prematures de mi elección, pero, el hombre adecuado en el sitio equivocado puede cambiar el rumbo del mundo. Junto a mi camino, están caídas, risas, lamentos, celebraciones, acompañado de personas que reflejan una parte importante y esencial de esta etapa.

Agradeciendo primero a Dios, que fue un refugio en momentos de desesperación, pese a no ser muy allegado a la religión por conflictos internos, pero aun así reconozco una guía celestial y de esperanza cuando todo lo demás está perdido. Siendo esta incluso mi guía por parte de mi familia que ya no se encuentra conmigo en este plano, pero que desde donde estén saben que los sigo amando.

Agradezco a mi madre Rosa, que pese a todos los problemas y enfermedades que hemos enfrentado no me ha dejado desvanecer en todo mi camino. A mi padre José, que, aunque tengamos diferencias, sin su guía y enseñanzas no sería el hombre que soy hoy en día. A mi hermano Juan, que fue mi guía en momentos clave, aunque lo haya visto caer, lo vi levantarse. A mi novia Diana, cuya imagen y presencia me siguen despertando el anhelo de ser una mejor persona cada día, sin perderme en el intento de vivir plenamente. Agradezco a mis sobrinos Ana Paula y Josué, por ser mi motor desde que los tuve en mis brazos, mi motivación a conducirlos a una vida mejor, que sienta que todo lo que hago es por un propósito mayor al cual siento que todos nosotros estamos destinados y estamos buscando.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Liliana Cerda y, en especial, al Dr. Mario García por su apoyo incondicional, también por la paciencia y el tiempo que me han dedicado a lo largo de este proceso, especialmente cuando cometí errores. En cada uno de esos momentos, ustedes supieron orientarme para aprender de mis errores sin nunca perder la fe en mí ni en mi capacidad de mejorar.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Zule y Michael, que formaron parte de varias risas como también de varios errores monumentales. Al igual que mis amigos Gaby, Justin, Andrés, Oso, Alejo, Joha, Joss, Dally que formaron parte de todo mi camino en varios semestres y varias salidas al tan famoso parque de la U. Me faltaría hojas para escribir a todos los que representa una parte de este camino, pero sin animo de ofenderlos, que sepan que, si leen esto, forman parte de mi historia como de mi corazón.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR....ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.... iii
DERECHOS DE AUTOR....iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO v
DEDICATORIA....vi
AGRADECIMIENTO vii
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS.... viii
ÍNDICE DE TABLAS x
ÍNDICE DE FIGURAS....xi
RESUMEN EJECUTIVO....xii
ABSTRACT.... xiii
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO 1
1.1 Antecedentes Investigativos 1
1.1.1 Justificación 1
1.1.2 Producción global de plásticos 2
1.1.3 Contaminación por acumulación de residuos plásticos 2
1.1.4 Polietileno tereftalato (PET) 3
1.1.5 Tratamientos para el reciclaje y degradación del PET 4
1.1.6 PETasa de *Ideonella sakaiensis* 6
1.2 Objetivos 14
1.2.2 Objetivo general 14
1.2.3 Objetivos específicos 14
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA 15
2.1 Materiales 15
2.2 Métodos 16

2.2.1 Construcción de la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* 16

2.2.2 Aislamiento de la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad 19

2.2.3 Evaluación de la eficiencia de degradación de la variante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* sobre el PET 19

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN 21

3.1. Construcción de la variante mutante 21

3.2 Purificación de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad 22

3.3 Evaluación de la eficiencia de degradación del PET de la variante mutante W159H ... 24

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES 27

4.1 Conclusiones 27

4.2 Recomendaciones 27

MATERIALES DE REFERENCIA 29

Referencias bibliográficas 29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones de PETasa, afines y efectos clave. 12

Tabla 2. Reactivos, material fungible y equipos utilizados para la investigación..... 15

Tabla 3. Medios de cultivo 17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de superficie de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*, con su triada catalítica expuesta en el centro catalítico. 7
Figura 2 Mecanismo catalítico propuesto para PETasa. 9
Figura 3. Comparación estructural local de *Is*PETasa entre WT vs W159H. 13
Figura 4 Mapa circular de pET-30a_*Is*PETasa_W159H. 21
Figura 5. Purificación de la variante W159H de la enzima *Is*PETasa. 23

RESUMEN EJECUTIVO

El incremento sostenido en la producción y consumo de polietileno tereftalato (PET) ha generado una acumulación significativa de residuos plásticos de difícil gestión, frente a la cual las rutas convencionales de reciclaje presentan limitaciones técnicas y energéticas. En este contexto, la biodegradación mediada por enzimas PET hidrolasas se perfila como una alternativa complementaria para la despolimerización del PET posconsumo. La PETasa de *Ideonella sakaiensis* (*Is*PETasa) destaca por su capacidad de actuar sobre PET semicristalino en condiciones moderadas; sin embargo, su actividad y estabilidad térmica son aún insuficientes para aplicaciones a escala preindustrial. El objetivo de este trabajo fue diseñar y evaluar la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*, con el fin de mejorar su desempeño catalítico frente a PET de botella posconsumo. La mutación puntual W159H se introdujo en la variante M3 de *Is*PETasa, se clonó en el vector pET-30a(+) y se expresó en *Escherichia coli* Rosetta y se caracterizó por SDS-PAGE. La actividad se evaluó incubando gránulos micronizados de PET a 50 grados centígrados y pH 9,4 cuantificando la pérdida de masa del polímero. La variante W159H alcanzó una degradación del 44,9 por ciento de 125.2 miligramos iniciales del PET, evidenciado un desempeño catalítico competitivo. Los resultados demostraron que la sustitución W159H representa un punto de optimización relevante del clamp aromático de *Is*PETasa y aporta evidencia experimental sirviendo como base para el diseño racional de variantes múltiple orientadas al reciclaje biológico de residuos de PET.

Palabras clave: polietileno tereftalato, PETasa, *Ideonella sakaiensis*, biodegradación, ingeniería de proteínas, variante mutante.

ABSTRACT

The sustained increase in the production and consumption of polyethylene terephthalate (PET) has led to a significant accumulation of plastic waste that is difficult to manage, for which conventional recycling routes have technical and energy limitations. In this context, biodegradation mediated by PET hydrolase enzymes is emerging as a complementary alternative for the depolymerization of post-consumer PET. *Ideonella sakaiensis* PETase (*Is*PETase) stands out for its ability to act on semi-crystalline PET under moderate conditions; however, its activity and thermal stability are still insufficient for pre-industrial scale applications. The objective of this work was to design and evaluate the W159H mutant variant of the PETase enzyme from *I. sakaiensis* in order to improve its catalytic performance against post-consumer PET bottles. The point mutation W159H was introduced into the M3 variant of IsPETase, cloned into the pET-30a(+) vector, expressed in *Escherichia coli* Rosetta, and characterized by SDS-PAGE. Activity was evaluated by incubating micronized PET pellets at 50 degrees Celsius and pH 9.4, quantifying the loss of polymer mass. The W159H variant achieved a 44.9 percent degradation of the initial 125.2 milligrams of PET, demonstrating competitive catalytic performance. The results demonstrated that the W159H substitution represents a relevant optimization point of the IsPETase aromatic clamp and provides experimental evidence serving as a basis for the rational design of multiple variants aimed at the biological recycling of PET waste.

Keywords: polyethylene terephthalate, PETase, *Ideonella sakaiensis*, biodegradation, protein engineering, mutant variant.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes Investigativos

1.1.1 Justificación

En las últimas décadas, el consumo masivo de plásticos ha generado una crisis ambiental de gran magnitud y de afecciones para la salud humana, debido a la baja tasa de degradación que presentan varios polímeros de forma natural o por tratamientos convencionales. A esto se le suma que, al ser descartados en el medio ambiente, los residuos se rompen en fragmentos pequeños, acumulándose año tras año **(Scalenghe, 2018)**. Entre estos polímeros, el polietileno tereftalato (PET) destaca como un termoplástico ampliamente empleado en fibras textiles y envases desechables, por su bajo costo y alta resistencia **(Sarda et al., 2022)**. Estas propiedades han convertido al PET en uno de los plásticos sintéticos más abundantes en vertederos y entornos naturales, incentivando el desarrollo de estrategias sostenibles para su reciclaje. En este marco, la biodegradación mediada por microorganismos o enzimas se perfila como una de las alternativas prometedoras para la despolimerización del PET posconsumo **(Kushwaha et al., 2023)**.

Recientemente, se ha identificado que la bacteria Gram negativa, *Ideonella sakaiensis*, es capaz de emplear el PET como fuente de carbono **(Yoshida et al., 2016)**. Esta capacidad se debe a la acción de la enzima PETasa (*Is*PETasa), que despolimeriza el PET principalmente en mono(2-hidroxietil) tereftalato (MHET). Sin embargo, su actividad se ve limitada por la baja estabilidad a temperaturas superiores a 35 °C, necesaria para flexibilizar las cadenas del PET. Por ello, varios estudios se han enfocado en la optimización de la *Is*PETasa mediante ingeniería de enzimas. Por ejemplo, la variante ThermoPETasa (S121E/D186H/R280A), diseñada por **Son et al. (2019)**, elevó su temperatura de fusión (Tm) en 10 °C, junto con una mayor actividad, en comparación con la enzima silvestre. Asimismo, la variante *Dura*PETasa (L117F/Q119Y/T140D/W159H/G165A/I168R/A180I/S188Q/S214H/R280A), desarrollada por **Cui et al. (2021)**, mostró una Tm cercana a los 75°C. Paralelamente, se han desarrollado variantes con mayor eficiencia catalítica, como *Is*PETaseMT-S214F/S238F, con un incremento de hasta el 80 % en actividad sobre películas de PET **(Stevensen et al., 2025).**

A partir de estos antecedentes, el presente estudio plantea la modificación del sitio activo mediante el diseño de la variante W159H de la enzima *Is*PETasa con el fin de mejorar su actividad y termoestabilidad para la degradación del PET.

1.1.2 Producción global de plásticos

Los plásticos constituyen una vasta familia de materiales sintéticos o semisintéticos basados en polímeros de alto peso molecular. Sus excepcionales propiedades, incluyendo su baja densidad, resistencia a la degradación, coste reducido y excelente procesabilidad, han sido el motor de su rápida y amplia difusión desde la invención de la baquelita en 1907, primer polímero sintético **(Yang et al., 2023)**. Esta innovación marcó el inicio de la era de los polímeros modernos, cuya expansión se aceleró dramáticamente después de la Segunda Guerra Mundial, evidenciado por un aumento en la producción global que pasó de aproximadamente 2 millones de toneladas (Mt) en 1950 a unos 413,8 Mt en 2023 **(Plastics Europe, 2024)**.

Esta producción masiva sigue dominada por resinas derivadas de combustibles fósiles, con Asia, particularmente China, consolidándose como el epicentro manufacturero de las familias poliméricas más representativas que son el polietileno (PE), el polipropileno (PP), el cloruro de polivinilo (PVC) y el polietileno tereftalato (PET) que, en el último corte comparable, representa ≈6,2 % de la producción mundial **(d'Ambrières, 2019; Patel et al., 2022)**. El desafío ambiental se agrava por el alto porcentaje de la producción destinado a usos de ciclo corto, principalmente envases, lo que genera un volumen masivo de residuos. En Europa, los envases aportaron ≈57,3% de los ≈32,3 Mt de residuos plásticos posconsumo en 2023, ya que mientras que el ≈37,8% de los envases fue dirigido al input de reciclaje, el reciclaje efectivo (output) de todos los residuos plásticos se redujo a solo ≈26,9% **(IUCN, 2024; Plastics Europe, 2024)**.

1.1.3 Contaminación por acumulación de residuos plásticos

La contaminación por los residuos plásticos es consecuencia directa de un desfase estructural entre la generación de residuos y la capacidad global de gestionarlos. A escala histórica, se estima que hasta el 2015 la humanidad produjo alrededor de 8300 Mt de plásticos y generó 6300 Mt de residuos; de estos, el 9% se recicló, 12% se incineró y 79 % se acumuló en vertederos o en el medio ambiente, delineando un stock persistente que condiciona la calidad de suelos y cuerpos de agua **(Dokl et al., 2024; Geyer et al., 2017)**. Proyecciones basadas en tendencias señalan que, sin cambios sistémicos, el residuo acumulado podría aproximarse a 12000 Mt hacia 2050, evidenciando la inercia del sistema y la magnitud del stock ambiental **(Borrelle et al., 2020; Statista, 2020).**

En el flujo anual, las fugas a ecosistemas acuáticos se estimaron de 19 a 23 Mt/año para 2016, equivalentes a 2000 camiones de basura por día descargados en ríos, lagos y mares, mientras que la carga en ecosistemas terrestres, se estima que es de 4 a 23 veces mayor, convirtiendo al suelo en un sumidero critico **(Bodor et al., 2024; Pottinger et al., 2024)**. La exposición a las condiciones ambientales, genera el deterioro del plástico ocasionado su fraccionamiento, generando los denominados macro y microplásticos que se acumulan y se insertan en los ciclos naturales, logrando migrar hasta el ser humano mediante la cadena alimentaria. En el cuerpo humano, los riegos se asocian principalmente a aditivos plásticos con potencial de disrupción endocrina (EDCs), sustancias capaces de alterar el funcionamiento del sistema hormonal y, por ende, afectar el desarrollo, la reproducción y la homeostasis del organismo **(Flaws, et al., 2020)**.

1.1.4 Polietileno tereftalato (PET)

El polietilentereftalato (PET) es un poliéster termoplástico semicristalino cuya unidad repetitiva $–O–CH_2–CH_2–O–C(O)–C_6H_4–C(O)–_n$ se obtiene por policondensación de ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) o, alternativamente, por transesterificación de dimetiltereftalato (DMT) con EG **(Kim et al., 2022; Panowicz et al., 2021)**. La arquitectura macromolecular combina un segmento alifático flexible (–CH_2–CH_2–) con anillos aromáticos rígidos (tereftalato), otorgando un equilibrio distintivo entre rigidez, resistencia mecánica y estabilidad dimensional (X. Zhang et al., 2021). Históricamente patentado en la década de 1940, el PET se consolidó como material de ingeniería y de envase gracias a su procesabilidad y desempeño en servicio.

Desde la perspectiva fisicoquímica, el PET presenta morfología semicristalina con fracciones cristalinas típicas del 0–40 % según historial térmico y de procesado; exhibe una temperatura de transición vítrea Tg ≈ 70–80 °C y de fusión ≈ 245–260 °C, con densidad ≈ 1.38–1.41 $g \cdot cm^{-3}$. **(Panowicz et al., 2021)**. La cristalinidad y la orientación inducida por estirado gobiernan propiedades barrera (O_2/CO_2), mecánicas (módulo, resistencia a la tracción) y ópticas (transparencia), de modo que el control térmico (enfriamiento, recocido) y reológico durante el procesado define su microestructura y, por ende, el rendimiento del producto final **(Cosimbescu et al., 2021)**.

En términos industriales, se distinguen grados fibra (para filamentos y textiles) y grados botella/ingeniería (preformas, láminas y piezas), con viscosidad intrínseca (IV) ajustada al uso, típicamente ~0.60–0.84 $dL \cdot g^{-1}$ en envases, para asegurar procesabilidad por inyección–

estirado, soplado, rigidez y retención de gas **(Benyathiar et al., 2022; Nisticò, 2020)**.La combinación de baja densidad, propiedades barrera y estabilidad dimensional explica su presencia en envases de bebidas, fibras y películas técnicas, constituyendo el contexto material sobre el cual se evalúan estrategias de mejora del desempeño del PET en condiciones operativas reales.

1.1.5 Tratamientos para el reciclaje y degradación del PET

1.1.5.1 Tratamientos convencionales

Los tratamientos convencionales del PET se agrupan en una jerarquía de gestión de residuos que van desde la re-extrusión, reciclaje mecánico, químico y recuperación de energía **(Al-Salem et al., 2010)**. Las dos primeras preservan la integridad macromolecular sin la ruptura de enlaces del polímero, pero son muy sensibles a la calidad del flujo posconsumo y a la morfología semicristalina del polímero. En cadenas de envase se aplican separación, lavado en caliente, molienda, secado y extrusión/peletizado; para contacto con alimentos se añaden descontaminación "super-clean" y policondensación en estado sólido (SSP) para restaurar la viscosidad intrínseca del PET (IV). Estas rutas, tanto la de re-extrusión y reciclaje mecánico, son tecnologías industrialmente consolidadas y escalables cuando el *feedstock* es limpio, pero muestran pérdida de IV por degradación termo-oxidativa/hidrolítica, propagación de impurezas y tendencia al down-cycling tras múltiples ciclos si no se emplean estabilizantes **(Benyathiar et al., 2022; Dzoh et al., 2025)**.

Por otro lado, el reciclaje químico rompe selectivamente los enlaces éster del PET para la recuperación de intermediarios o monómeros de alta pureza que permiten la resíntesis del PET, cerrando el ciclo a nivel químico. En la glicólisis, el PET reacciona con EG a180-220ºC, con presencia de catalizadores como acetatos de Zn/Mn/Co, obteniendo bis(2-hidroxietil) tereftalato (BHET), con opciones de intensificación (microondas/disolventes). La metanólisis emplea metanol para la obtención de DMT +EG, mientras que la hidrólisis (ácida, alcalina o neutra/sub-/supercrítica), rinde TPA + EG. Por último, la aminólisis produce tereftalamidas útiles como plataforma química **(Cao et al., 2022; Ndagano et al., 2025)**. Las bondades del reciclaje químico son la tolerancia a flujos complejos/contaminados y la obtención de productos comparables al plástico virgen. Las dificultades que limitan la ampliación de este método de reciclaje, incluyen una alta demanda energética, gestión o pérdidas de catalizador y purificación que condicionan viabilidad técnico-económica y ambiental **(Raheem et al., 2019).**

Cuando la recuperación de material no es viable, ya sea por cuestiones técnicas o económicas, la recuperación energética por pirolisis o gasificación convierte el PET en combustibles o gas de síntesis. La pirólisis (400–700 °C) produce fracciones líquidas y gaseosas cuya calidad puede mejorarse con catálisis para modular craqueo y selectividad. La gasificación (T > 800 °C) genera una mezcla de $H_2/CO/CO_2$ aprovechables en refinería o química de síntesis **(Bashir et al., 2025; Shah et al., 2023)**. Aunque estas rutas reducen volumen de residuo y aprovechan poder calorífico, no regeneran monómeros y exigen control estricto de emisiones como material particulado, metales traza, y cumplimiento regulatorio, por lo que se consideran complementarias y enfocadas a fracciones no reciclables.

1.1.5.2 Biodegradación del PET

En vista de las limitaciones de las rutas de reciclaje convencionales, ya que imponen altas demandas energéticas y conllevan desafíos en el control de emisiones y en el manejo de feedstock contaminado, se ha impulsado la búsqueda de métodos para degradar el PET de forma amigable con el medio ambiente. Este enfoque se centra en el uso de microorganismos, bacterias, hongos o algas, que producen enzimas capaces de escindir los enlaces éster del PET, ofreciendo ventajas cruciales, como una alta eficiencia, bajo consumo de energía y la potencial formación de subproductos no tóxicos, alineándose con los principios de la economía circular **(Kushwaha et al., 2023)**.

La biodegradación del PET se fundamenta en la hidrólisis enzimática de la cadena polimérica hasta generar TPA y EG, o productos intermedios como el MHET y el BHET. Este es un proceso multifacético que depende tanto de los factores bióticos que son el tipo de enzima y microorganismo, asimismo del efecto de factores abióticos, como la temperatura, el pH y, fundamentalmente, la cristalinidad del polímero **(Carr et al., 2020)**. Las enzimas implicadas en la descomposición del PET son hidrolasas de tipo lipasa, carboxilesterasa, cutinasa y PET hidrolasa. Su actividad debe ocurrir sobre la interfaz sólido-liquido, bajo condiciones sustrato limitantes que disminuyen la capacidad de degradación enzimática *in situ.* Por lo general, estas enzimas alcanzan altos niveles de eficiencia únicamente bajo condiciones controladas de laboratorio **(Furukawa et al., 2019; Sui et al., 2023)**.

Se han identificado dos clases funcionales de enzimas que facilitan la degradación de películas de PET. La primera incluye enzimas que modifican la superficie del polímero para mejorar su hidrofilicidad y las PET hidrolasas que catalizan la escisión de la cadena polimérica. La actividad de las PET hidrolasas incrementa cuando las cadenas del polímero son más flexibles

y accesibles, condiciones que se logran alcanzar al elevar la temperatura de reacción cerca de la T_g del PET (~ 70 ºC). Sin embargo, se ha demostrado que las PET hidrolasas más eficientes tienen una baja termoestabilidad, por lo que actualmente se busca incrementar su resistencia térmica mediante ingeniería enzimática **(Tournier et al., 2020)**.

1.1.6 PETasa de *Ideonella sakaiensis*

El punto de inflexión en el biodegradado enzimático del PET llegó en el 2016 con el hallazgo de *I. sakaiensis*, una bacteria capaz de crecer usando PET como fuente principal de carbono y energía, gracias a la acción de dos hidrolasas extracelulares, PETasa, que escinde enlaces éster del polímero para generar principalmente MHET/BHET, y MHETasa, que convierte el MHET en TPA y EG, cerrando el ciclo hasta monómeros reutilizables **(Yoshida et al., 2016)**. Este hallazgo estableció un marco conceptual y experimental de la biodespolimerizaciòn selectiva del PET bajo condiciones moderadas y con productos de alto valor, controlando variables como la cristalinidad y el pretratamiento del PET.

Con base a estos antecedentes, se han desarrollado dos frentes complementarios para el estudio de *Is*PETasa, partiendo con la clarificación de la ruta PETasa a MHETasa, abordando aspectos de cribado, caracterización enzimática y el control de variables físicas del polímero **(Yoshida et al., 2021)**. Por otro lado, se desarrolló la optimización biotecnológica, centrando en la expresión de la *Is*PETasa en hospedadores heterólogos, por ejemplo, en *Escherichia coli*, y el diseño de variantes mejoradas mediante ingeniería de proteínas con el objetivo de aumentar la productividad y facilitar las aplicaciones de bioprocesos para la estandarización de métricas para el escalado **(Shi et al., 2021; Zhang et al., 2022)**.

1.1.6.1 Estructura y clasificación

La *Is*PETasa exhibe el plegamiento canónico de las α/β-hidrolasas serina-dependientes, cuya actividad se basa en una triada catalítica formada por los residuos serina 160, ácido aspártico 206 e histidina 237 (Figura 1) **(Han et al., 2017)**. Junto a la triada se encuentra la región conocida como el agujero oxianión, cuya función es crucial, pues emplea enlaces de hidrogeno para estabilizar la carga negativa temporal que se forma en el oxígeno carbonilo del sustrato, facilitando la escisión del enlace éster **(Joo et al., 2018)**. El sitio activo se dispone como una hendidura abierta (cleft), con una morfología similar a la de las cutinasas, flanqueada por microambientes que regulan la accesibilidad y el alineamiento del sustrato. Además, *Is*PETasa posee, elementos de estabilización local únicos, como puentes disulfuro próximos al centro

catalítico que coadyuvan a la operatividad de la enzima en el rango de temperatura templado donde usualmente se evalúa **(Graf et al., 2021)**.

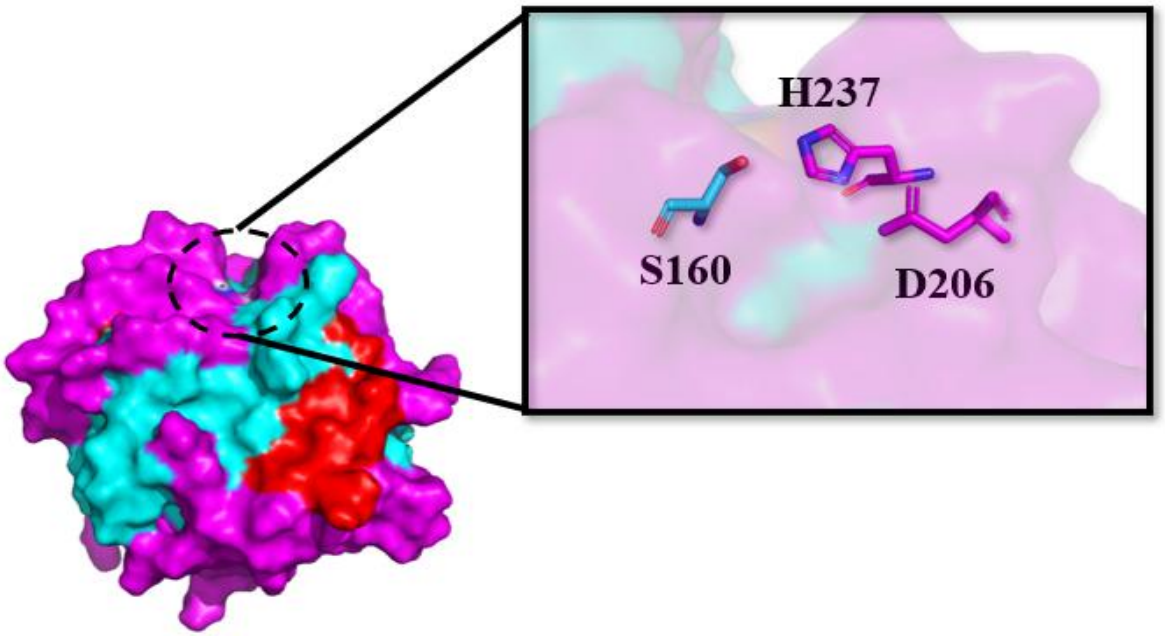


Figura 1. Representación de superficie de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*, con su triada catalítica expuesta en el centro catalítico.

El reconocimiento molecular del PET está gobernando por residuos aromáticos clave, dominantemente el Triptófano 159 y 185, que funcionan como un anclaje aromático (clamp) que posibilita una interacción de apilamiento π-π, que es una fuerza de cohesión entre los anillos aromáticos de la enzima y los anillos tereftalato del sustrato. Esta interacción no covalente es la que orienta de manera precisa al BHET, MHET u oligómeros dentro de la hendidura catalítica, explicando así la afinidad preferente por dominios amorfos y la sensibilidad a la cristalinidad y orientación del polímero, así como la conveniencia de operar en torno a la Tg del PET para incrementar la movilidad segmentaria y, con ello, la accesibilidad de los enlaces susceptibles de hidrólisis **(Graf et al., 2021; Joo et al., 2018)**.

En el sistema enzimático de *I. sakaiensis*, la complementariedad estructural con la MHETasa, cuya cavidad de unión está adaptada a ésteres aromáticos de bajo peso molecular, sustenta la conversión secuencial PET a (B/M)HET, TPA más EG **(Palm et al., 2019)**. Desde una perspectiva taxonómica y funcional, la *Is*PETasa se inscribe en la superfamilia α/β-hidrolasas y en el grupo de PET-hidrolasas similares a cutinasas, que junto con la clasificación que combinan filogenia, rasgos geométricos de la hendidura y determinantes de especificidad hacia ésteres aromáticos-alifáticos, la posicionan dentro de las PET-hidrolasas tipo II **(Maity et al.,**

2021; Wei et al., 2025). Este subgrupo se diferencia por la notable apertura de la hendidura y la topología del entorno aromático, que en conjunto posibilitan la hidrólisis en condiciones moderadas y sobre sustratos parcialmente amorfos **(Duan et al., 2023)**.

1.1.6.2 Procesos de degradación mediado por *Is*PETasa

El ciclo catalítico de *Is*PETasa responde al paradigma de las serina-hidrolasa y se inicia con la adsorción del polímero y la preorganización dinámica del sitio activo, por la triada catalítica S160-D206-H237 y el agujero oxianión. Y87 y M161, que estabiliza los intermedios tetraédricos, la hendidura abierta y el clamp aromático (W159/W185) orientan subunidades tereftalo-alquil del PET hacia el carbonilo éster reactivo **(Chen et al., 2018; Fecker et al., 2018)**. La flexibilidad local del sitio favorece la formación del complejo de Michaelis y condiciona la eficiencia del ataque nucleofílico (Burgin et al., 2024; Joo et al., 2018b).

El mecanismo químico comprende dos etapas acopladas. En la acilación, S160 ataca el carbonilo del éster superficial para generar el intermedio tetraédrico, estabilizado por el agujero oxianión, que colapsa a un acil-enzima con liberación del extremo HE-terminal. Posteriormente, en la desacilación, una molécula de agua activada por H237 hidroliza el acil-enzima y libera el éster hidrolizado, por ejemplo, MHET/BHET o fragmentos TPA-terminal, restituyendo la serina libre **(Burgin et al., 2024; García-Meseguer et al., 2023)**. Análisis de las trayectorias de reacción proponen que la desacilación constituye la etapa limitante en condiciones típicas, señalando la movilidad funcional de H237 durante la transferencia protónica, representado en la Figura 2.

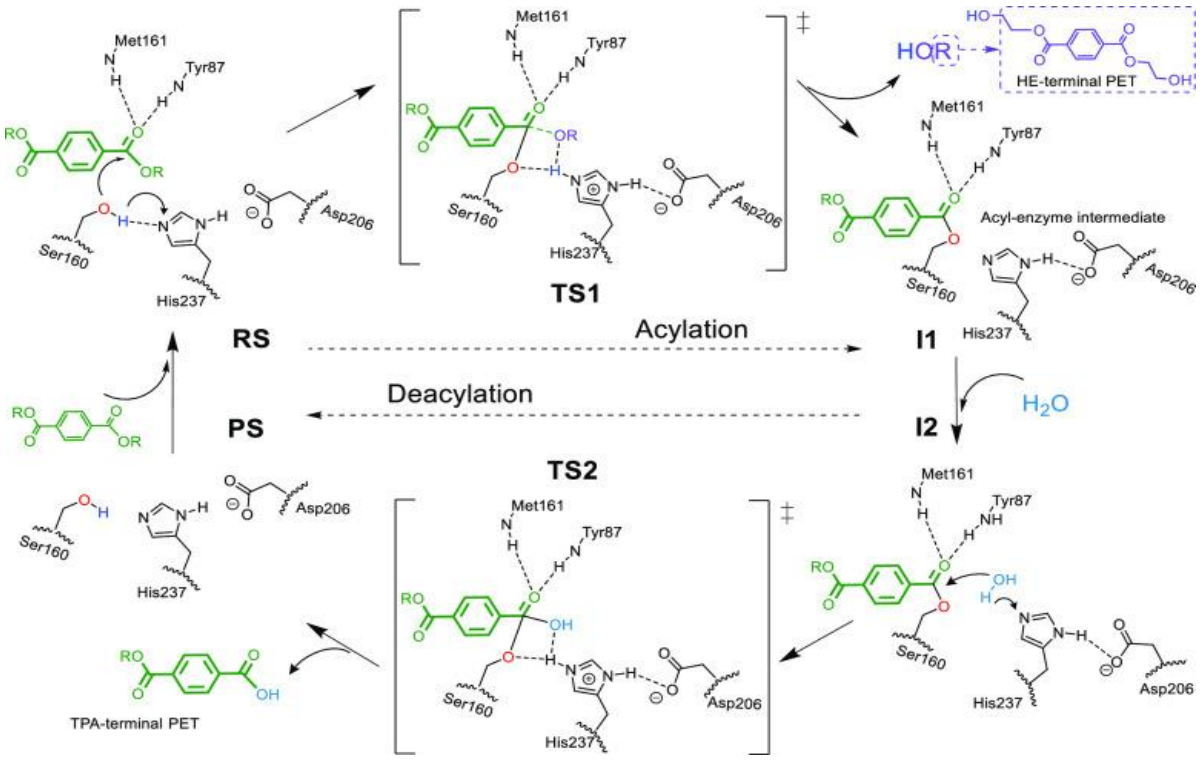


Figura 2 Mecanismo catalítico propuesto para PETasa.

La acilación del carbonilo éster del PET por Ser160 avanza desde el estado reactante (RS) hacia el primer estado de transición (TS1) y el primer intermedio (I1). Posteriormente, la activación de una molécula de agua por His237 se asocia con la formación del segundo intermedio (I2), seguida del segundo estado de transición (TS2) y del estado producto (PS), dando lugar a un extremo terminal de TPA en el oligómero de PET. El agujero oxianión formado por Tyr87/Met161 estabiliza los intermedios tetraédricos. **Fuente: García-Meseguer et al., (2023).**

El ritmo global del proceso *in situ* depende tanto de la cinética intrínseca como de la accesibilidad del sustrato. La cristalinidad y la orientación reducen la movilidad segmentaria y dificultan el acceso de la enzima; por ello, operar en torno a la Tg del PET amorfo o aplicar pretratamientos físicos incrementan la conversión, mientras que la acumulación de MHET puede ejercer inhibición por producto si no se acopla la reacción con MHETasa **(Fecker et al., 2018)**. En la práctica, la evaluación del proceso se realiza mediante HPLC de TPA/MHET/EG, pérdida de masa y microscopía SEM o AFM para cuantificar erosión superficial bajo condiciones controladas.

1.1.6.3 Ingeniería de proteínas aplicada a PETasa

La ingeniería de PETasa se orienta a superar limitaciones que restringen su escalabilidad a la industria, como lo es la baja robustez térmica cerca de la Tg del PET, eficiencia reducida frente

a fracciones altamente cristalinas e inhibición por producto, principalmente por MHET. Bajo una perspectiva industrial, las prioridades se basan en acelerar la hidrolisis y ganar estabilidad operativa sobre residuos posconsumo, modulando primero (i) el reconocimiento del sustrato, mediante la geometría del cleft, *clamp* aromático W159/W185, y organización del oxyanion hole, (ii) la estabilidad térmica sin perder la flexibilidad local, y (iii) la tolerancia a pH/iones/mezclas posconsumo **(Joo et al., 2018a; Kawai et al., 2024)**. A un nivel mecanico, un modelo serín-hidrolasa en dos etapas (aciliación → acil-enzima → desacilación) sugiere que reducir la barrera de desacilación y optimizar la preorganización del sitio activo son palancas directas de mejora **(Burgin et al., 2024)**.

El diseño se implementa mediante mutagénesis dirigida, ya sea al sitio, refiriéndose a sustitucionales puntuales informadas por estructura o mecánica, o por saturación localizada, pequeñas bibliotecas en posiciones catalíticas o de reconocimiento. La mutagénesis dirigida también permite combinar cambios dobles o múltiples para explorar epistasis y consolidar mejores de actividad y robustez, constituyendo el eslabón operativo entre el diseño *in silico* con datos clave, y la validación experimental **(Kawai et al., 2024; Lu et al., 2022)**.

1.1.6.4 Mutaciones reportadas y sus efectos comparativos

En sistemas con PET de cristalinidad media a alta, la mejora de *Is*PETasa ha seguido dos rutas complementarias. La primera ruta se centra en la optimización de actividad enzimática mediante la ingeniería del sitio activo. En este sentido, se han ensayado varias substituciones en residuos clave para la asociación enzima-sustrato que han permitido incrementar significativamente la actividad de *Is*PETasa. Por ejemplo,, **Sevilla et al., (2023)** demostraron que las substituciones S238Y y N212A resultaron en un incremento de 3,3 y 1.2 veces, respectivamente, en la actividad relativa frente a la enzima nativa WT (Tabla 1). En contraste, la substitución I128Y demostró ser perjudicial para la actividad de la enzima. Estos resultados se obtuvieron al al trabajar con PET de botellas posconsumo, con un índice de cristalinidad del 31%. Estas modificaciones responden a una optimización de la aromaticidad y el volumen local que favorece la orientación del sustrato, facilitando la formación del complejo ES sin penalizar la accesibilidad del polímero a la hendidura. Similar a lo reportado por **Austin et al., (2018)** que introdujeron la doble sustitución W159H/S238F, que remodela el clamp y ordena la hendidura, estableciendo un arquetipo que luego serviría de base para combinatorias orientadas a maximizar el posicionamiento del carbonilo y la adsorción sobre la superficie del PET.

La segunda ruta se centra en elevar la termoestabilidad sin necesariamente alterar la dinámica catalítica que necesita el sitio activo para transitar entre estados de unión y de reacción **Qu et al., (2024)** ubicaron en D186 un nodo clave para modular estabilidad y desempeño de *Is*PETasa. La substitución D186N elevó la Tm en aproximadamente +8,9 ºC y aumentó la liberación de productos a 30-40 ºC. Por otra parte, D186V incremento la Tm hasta +12,9 ºC, manteniendo un rendimiento competitivo en el mismo margen térmico. Mecanicamente, ambas sustituciones estabilizan el Loop 10 y su acoplamiento con elementos helicoidales adyacentes, reduciendo la penalización conformacional de los estados de transición y extendiendo la ventana operativa cerca de la Tg del PET amorfo y en ensayos con películas.

La convergencia de ambas estrategias ha permitido diseñar variantes multipropósito y, a la vez, soluciones específicas para matrices submicrométricas. Desde el arquetipo W159H/S238F, **Pirillo et al., (2021)** generaron W159H/F238A-Δ*Is*PET al añadir las substituciones S121E y D186H. Esta variante de *Is*PETasa combina una hendidura más flexible con refuerzo electrostático del microentorno catalítico capaz de despolimerizar >80 % de nanopartículas de PET en 1.5 horas con cargas enzimáticas bajas. Además, fue capaz de degradar el 26 % de microparticulas de PET en 48 horas a una temperatura 40-45 ºC y la temperatura de melting (Tm) de la enzima incrementó +4.9 ºC. Esta variante de *Is*PETasa es relevante para su aplicación en en la descomposición de nano/micro-PET en ventanas de proceso cortas.

La integración epistática sistemática de múltiples posiciones propuesta por **Cui et al., (2021)** permitió diseñar *Dura*PETasa (M10), una variante de *Is*PETasa que combina el clamp aromático con contactos estabilizantes distribuidos en la estructura de la enzima. Por ejemplo, se demostró que I168R, S188Q, T140D, mejoran la adsorción y orientación del polímero y reducen el costo energético para alcanzar estados activados. *Dura*PETasa elevó la Tm en + 31 ºC y superó ampliamente a la enzima WT y a otras PET-hidrolasas a 37 ºC, con >300x de productos acumulados en 10 días y degradación rápida de nanoplásticos. Sin embargo, la epistasis negativa con ciertas adiciones estabilizantes como S166T, P181A, I208V, N212R, S238F, sobre un fondo ya optimizado aumentaron modestamente la Tm, pero perjudicaron el rendimiento, subrayando que la compatibilidad local de cada cambio con la dinámica del sitio activo es determinante. Como principio transferible de estabilización global, en homólogos se han validado puentes disulfuro, N364/D418C en *Bb*PETasa, con ganancias de Tm del orden +14.8ºC-.

Tabla 1. *Mutaciones de PETasa, afines y efectos clave.*

Mutación	Enzima base	Mecanismo principal	Condición (sustrato; temperatura)	Métrica clave	Referencia
S238Y	*Is*PETasa	Afinamiento del cleft/clamp aromático	PET bot. (31% de cristalinidad); ≤ Tg	Actividad 3,3x vs WT	(Sevilla et al., 2023)
N212A		Afinamiento del cleft	PET bot. (31%); ≤ Tg	Actividad 1,4x vs WT	
D186N		Estabilización conformacional selectiva de bucle (Loop 10)	PET film; 30-40 ºC	ΔTm +8,89 ºC; 1,86-3,69x productos	(Qu et al., 2024)
D186V		Estabilización conformacional local	PET film; 30-40 ºC	ΔTm +12,91 ºC; mayor estabilidad	
W159H /S238F		Remodelado clamp + cleft	Películas/partículas de PET; 30-40 ºC	Mejor variable según protocolo	(Austin et al., 2018a)
TS-Δ*Is*PET W159H/F238A/S121E/D186H		Cleft más flexible + puente salino	Nano-PET (1,5 h) / Micro-PET (48 h); 40-45 ºC	>80% (nano, 1,5h; 20µg/mL); 26% (micro, 48h; 0,1 mg/mL); ΔTm + 4,9 ºC	(Pirillo et al., 2021)
*Dura*PETasa (M10) S214H/I168R/W159H/S188Q/R280A/A180I/G165A/Q119Y/L117F/T140D		Clamp aromático + estabilización distribuida	PET film (30%); 37-60 ºC	ΔTm +31ºC (77 ºC); >300x productos (37 ºC/10 d); nano completos 1 h	(Cui et al., 2021a)
N364 /D418C	*Bb*PETasa homóloga	Puente disulfuro para la estabilización global	PET 40 ºC	ΔTm + 14.8 ºC	(Huang et al., 2023)

Nota: PET bot.: PET de Botella; ≤Tg: ensayo a temperatura en o por debajo de la Tg del PET amorfo; ΔTm (ºC): incremento de la temperatura de fusión/estabilidad térmica; Actividad vs WT (fold) se expresa como factor relativo sin unidades (mutantes/WT). En Ts-Δ*Is*PET, los porcentajes corresponden a conversión de nano/micro-PET bajo cargas y condiciones indicadas.

1.1.6.5 Mutación W159H: Relevancia estructural y funcional

Dentro del paisaje mutaciones de *Is*PETasa, la substitución W159H (Figura 2) se perfila como un cambio puntual con impacto directo sobre el clamp aromático y la geometría de la hendidura catalítica, El reemplazo de triptófano 159 por histidina 159 introduce un anillo imidazol con capacidad donadora/receptora de puentes de hidrogeno y diferente polarizabilidad, lo que modifica el apilamiento π y el microentorno del sitio activo, estabilizando la región próxima a la triada catalítica y afinan la orientación del carbonilo éster hacia el agujero oxianión, favoreciendo una trayectoria de ataque nucleofílico más productiva **(Joo et al., 2018)**.

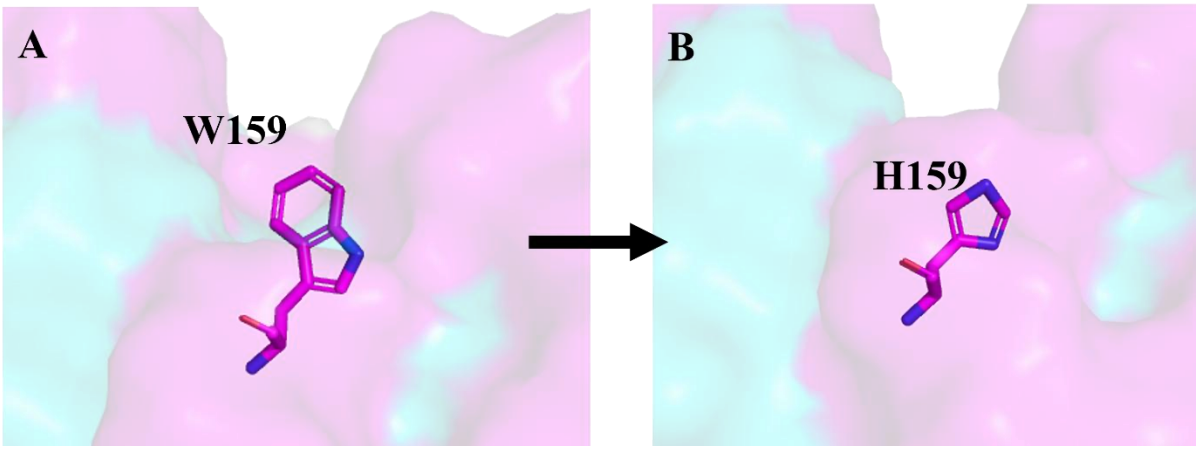


Figura 3. Comparación estructural local de IsPETasa entre WT vs W159H.
A. Estado nativo, W159 en varillas magenta, empacando en el borde del cleft. B. Mutante H159 con la cadena lateral reorientada hacia la cavidad. Observando leves reacomodos de lazos (magenta) y cambios en el contorno/accesibilidad del bolsillo en la superficie semitransparente.

Funcionalmente, W159H ha probado ser eficaz como núcleo dentro de dos líneas de mejora: (i) diseño racional del clamp+*cleft,* ejemplificado por el doble W159H/S238F, que ordena/estrecha la hendidura y potencia el posicionamiento del sustrato (Austin et al., 2018a)**,** y (ii) arquitecturas multipunto donde W159H se integra a un túnel aromático junto con contactos estabilizantes distribuidos, elevando la ΔTm y sosteniendo mayor liberación de productos a temperaturas moderadas; tal es el caso de *Dura*PETasa (M10) **(Cui et al., 2021).** De forma complementaria, el andamiaje W159H/F238A sirvió para construir TS-Δ*Is*PET mediante S121E/D186H, logrando conversiones sobresalientes en nano/micro-PET en ventanas temporales cortas, sin perder estabilidad operativa **(Pirillo et al., 2021).**

1.2 Objetivos

1.2.2 Objetivo general

Diseñar la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

1.2.3 Objetivos específicos

- Construir la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.

- Aislar la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad.

- Evaluar la eficiencia de degradación de la variante W159H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* sobre el PET.

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 2**, se enlistan los reactivos, material fungible y equipos que se utilizaron durante la investigación.

Tabla 2. *Reactivos, material fungible y equipos utilizados para la investigación*

Reactivos	
- Lisozima	- Tris HCl
- Agua destilada	- EDTA
- Agua desionizada	- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Extracto de levadura	- SDS
- Cloruro de sodio (NaCl)	- Cloranfenicol
- Triptona	- Glicerol
- Agar - Agar	- Imidazol
- Alcohol etílico	- Acrilamida
- Glucosa	- *E. coli* Rosetta (DE3)
Material Fungible	
- Guantes de nitrilo	- Micropipetas
- 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 micropipeta
- Hisopos	- Tubos Falcon
- Matraz Erlenmeyer	- Tubos Eppendorf
- Mechero	- Tubos PCR
Equipos	
- Agitador incubador orbital	- FPLC
- Autoclave	- Incubadora

- Balanza analítica	- Nanodrop
- Baño termostático con agitación	- Plancha de agitación
- Cámara de electroforesis	- Plancha de calentamiento
- Centrifuga	- Potenciómetro
- Disruptor celular (Benchmarck Pulse 150)	- Refrigerador
- Espectrofotómetro	- Termociclador
- Estufa	- Ultra congelador
	- Vortex

2.2 Métodos

2.2.1 Construcción de la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

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

Se emplearon, como punto de partida, la secuencia de la variante M3 de la enzima *Is*PETasa la cual fue previamente diseñada por la Dra. Liliana Cerda Mejía 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 W159H

La variante W159H fue obtenida mediante un servicio externo de síntesis, clonación y secuenciación. Para ello, la substitución W159H se introdujo en la secuencia del gen que codifica para la variante M4 de la enzima *Is*PETasa mediante mutación *in silico*. Para la mutación, se consi,,0deró la frecuencia de uso de codones en *E. coli* B. El producto de la substitución fue sintetizado y clonado en el vector pET30a(+) empleando los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI*. Una vez recibido el plásmido generado mediante el servicio externo, se lo almacenó a -20 ºC para futuros análisis.

2.2.1.3 Transformación de las células competentes *E. coli* DH5α

El plásmido que contenía la secuencia que codificaba para la variante W159H se transformó en *E. coli* DH5α para su multiplicación y almacenamiento. La transformación de las células de *E. coli* DH5α se llevó a cabo mediante el método de choque térmico, conforme al protocolo descrito por **(Cohen et al., 1972)**. Para ello, se generaron alícuotas de 100 µL de células competentes, previamente almacenadas a –80 °C, las cuales fueron descongeladas en hielo durante 30 min. Seguidamente, se incorporaron 100 ng de vector y se continuó con una incubación 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 min. A continuación, se añadió 900 µL de medio de recuperación SOC (Tabla 3) y se incubó la suspensión a 37 °C durante 90 min bajo agitación constante a 220 rpm. Posteriormente, se realizó la siembra en placas de agar LB suplementadas con kanamicina, y se incubaron a 37 °C durante 24–48 horas. Por último, se seleccionaron entre dos y cinco colonias para su inoculación en tubos que contenían 5 mL de caldo LB (Tabla 2) también suplementado con antibiótico, con el fin de iniciar el cultivo líquido para su posterior conservación y verificación de la mutación mediante secuenciación.

Tabla 3. *Medios de cultivo*

Reactivo	**Cantidad por L de medio de cultivo**	
	SOC	Luria Bertani (LB)
Solución de glucosa 20 %	20 mL	-
Extracto de levadura	5 g	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0.584 g	10 g
Kanamicina	-	50 µg/mL
Triptona	20 g	10 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.186 g	-
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	2.4 g	-
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 adicción de Agar.

2.2.1.4 Extracción de ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico para su almacenamiento y uso posterior se desarrolló con el 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 la mezcla se realizó por inversión de 6 a 8 veces, hasta obtener una solución clara y viscosa. Para precipitar los restos celulares, se adicionaron 350 µL de solución de neutralización, mezclando nuevamente por inversión de

4 a 6 veces, seguida de una centrifugación a 12000 x g durante 2 min. A continuación, se insertó una columna GenElute Miniprep en un tubo de microcentrífuga, se equilibró con 500 µL de solución de preparación y se centrifugó a 12000 x g durante un minuto, desechando posteriormente el flujo. 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 min para la eliminación de residuos remanentes. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo de recolección estéril, se adicionaron 100 µL de solución de elución (o agua estéril grado biología molecular) y se realizó una última centrifugación a 12000 x g por un minuto para la recuperación del ADN plasmídico, cuya concentración y pureza se determinaron mediante Nanodrop.

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 las variantes mutantes, fue la misma descrita en la sección 2.2.1.3 mediante choque térmico, con la única diferencia de que también se añadió cloranfenicol al medio de cultivo.

2.2.1.6 Expresión de la variante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

La expresión de la proteína recombinante se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por **Sevilla & Cerda, (2022)**. En primera instancia, se tomó una colonia de *E. coli* Rosetta (DE3) previamente transformada con el plásmido que portaba 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 se incubó durante 16 horas a 37 °C bajo agitación constante a 200 rpm. Finalizado este tiempo, el cultivo se transfirió a un matraz que contenía 500 mL de medio LB 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 ocurrió 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, manteniéndose la incubación a 37 °C durante 3 horas adicionales. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm y 4 °C por un periodo de 20 min para recolectar la biomasa celular. Finalmente, el pellet obtenido se resuspendió utilizando 6 mL de tampón Tris 50 mM, pH 8,

con 150 mM de NaCl por cada gramo de pasta celular, y la muestra se almacenó a –80 °C para su posterior procesamiento.

2.2.2 Aislamiento de la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad

2.2.2.1 Lisis celular

Para llevar a cabo la lisis celular, se empleó una concentración de lisozima equivalente a 10 mg por cada gramo de células, seguida de un proceso de sonicación utilizando un equipo disruptor, conforme al protocolo descrito por **(Dermit & Mardakheh, 2021)**

2.2.2.2 Purificación de la proteína

Una vez obtenido el lisado, se procedió con una centrifugación a 15000 rpm durante 45 min a 4 °C con el fin de eliminar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió cuidadosamente a una columna de afinidad Ni-NTA, previamente equilibrada con diez volúmenes de tampón Tris 50 mM, pH 8, 150 mM NaCl.

Una vez que la muestra estuvo cargada en la columna, se aplicó un lavado con cinco a diez volúmenes del mismo tampón, suplementado con 5 mM de imidazol, para remover proteínas unidas de forma inespecífica. La elución de la enzima PETasa recombinante se llevó a cabo mediante la aplicación de un tampón que contenía 250 mM de imidazol, recolectándose las fracciones eluídas en alícuotas de 0,5 mL en tubos estériles. Posteriormente, las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon para evaluar su pureza mediante electroforesis SDS-PAGE. Finalmente, la concentración proteica se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000.

2.2.3 Evaluación de la eficiencia de degradación de la variante W159H de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* sobre el PET

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 alcanzar un peso constante. Una vez completado este proceso, el PET se incubó con 15 mL de tampón fosfato-K_2HPO_4 1M, pH 8, tanto en presencia como en ausencia de la enzima mutante (en una relación de 1 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, y DMSO al 12 %. La muestra de PET resultante se lavó tres veces con agua

desionizada y una vez con etanol, dejándose secar a temperatura ambiente hasta alcanzar un peso constante. Posteriormente, la actividad de la variante mutante se determinó por diferencia de peso entre la muestra inicial y la final. La actividad enzimática se expresó en función de la eficiencia de degradación del PET. Cada medición se realizó por triplicado.

CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Construcción de la variante mutante

Se empleo el vector pET-30a(+) como plataforma de expresión de la variante *Is*PETasa W159H. El gen que codifica la enzima fue clonado entre los sitios NdeI y XhoI bajo control del promotor T7-lacO y con etiqueta 6xHis en el extremo N- terminal. Este arreglo es típico de la familia pET-30a(+) e incluye (i) región promotora T7 con operador lac para inducción por IPTG, (ii) gen regulador lacI, (iii) marcador de resistencia a kanamicina (KanR) y (iv) un Sitio de Clonación Múltiple (MCS) flanqueado por NdeI y XhoI que preserva el marco de la lectura desde el codón de inicio ATG aportado por el sitio de restricción NdeI, hasta el codón de paro ubicado en el extremo C-terminal, junto a la cola de 6xHis, lo que facilita expresión y purificación por IMAC (Ni-NTA) **(Carter et al., 2024; Jew et al., 2022; Ke et al., 2012)**. La variante W159H (M5) surgió de la sustitución puntual de codón TGG → CAC en la posición 159 dentro del inserto M4 (Figura 4).

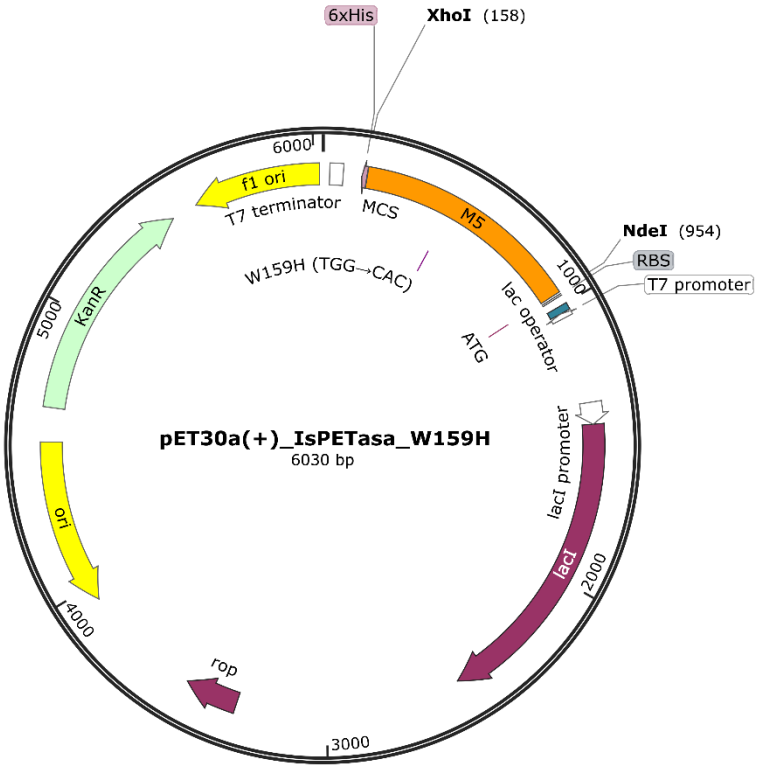


Figura 4 Mapa circular de pET-30a_*Is*PETasa_W159H.

Se observa T7 prometer/lacO, lacI, 6 x His-tag, KanR, MCS NdeI/XhoI y la ubicación de la sustitución W159H en le ORF M4.

El mantenimiento del constructo en el sistema de expresión heteróloga se aseguró mediante selección en kanamicina, práctica estándar en *E. coli* para aislar exclusivamente células transformadas y mantener la estabilidad del plásmido durante el cultivo. En sistemas plasmídicos, los marcadores de resistencia son el enfoque predominante para garantizar retención en poblaciones mixtas, evitando la proliferación de células que pierden o no expresan el plásmido y obtiene ventaja de crecimiento, y las consiguientes pérdidas de plásmido **(Schmidt et al., 2012)**. La expresión heteróloga se basó en el eje T7/lac, donde el producto de lacI reprime el promotor T7-lacO en ausencia de inductor. Tras la adicción de IPTG, se libera el operador permitiendo que la ARN polimerasa T7, codificada líneas de *E. coli* DE3, inicie transcripción de la *Is*PETasa mutante **(Liu et al., 2024)**. Este esquema de inducción es ampliamente adoptado por su elevada productividad, aunque su fuga basal exige calibrar dosis, tiempo de IPTG para balancear rendimeinto y solubilidad de la proteína **(Du et al., 2021)**.

La elección del hospedador se basó en el flujo clásico *E. coli* DH5α para amplificación y Rosetta para la expresión de proteína. Esta última aporta tRNAs para codones raros mediante un plásmido auxiliar, selección con cloranfenicol, y alojan la T7 RNAP bajo lacUV5, mitigando atascos de traducción y terminaciones prematuras típicas de proteínas heterólogas. En el caso de enzimas tipo PETasa, con requisitos de plegamiento específicos, esta provisión de tRNAs y el control T7/lac respaldan la elección del hospedador **(Carter et al., 2024; Du et al., 2021)**. Durante el cultivo en LB con Kan, la inducción se realizó al alcanzar una densidad óptica de 1,2, agregando IPTG 0.1 mM, recuperando 4.1132 g de biomasa húmeda, cantidad suficiente para la fase purificación por Ni-NTA habilitada por la 6xHis del cassette de pET-30a(+) y coherente para el sistema T7/lac.

3.2 Purificación de la variante mutante mediante cromatografía de afinidad

La variante mutante W159H de *Is*PETasa se purificó mediante cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), empleando una columna de Ni-NTA acoplada a la etiqueta de histidinas presente en el extremo de la proteína. En este tipo de sistemas, el níquel se coordina con el ácido nitrilotriacético (NTA) fijando a la matriz cromatográfica, generando sitios de unión específicos para residuos de histidina, mientras que el imidazol actúa como competidor en la fase móvil durante las etapas de lavado y elusión **(Spriestersbach et al., 2015)**.

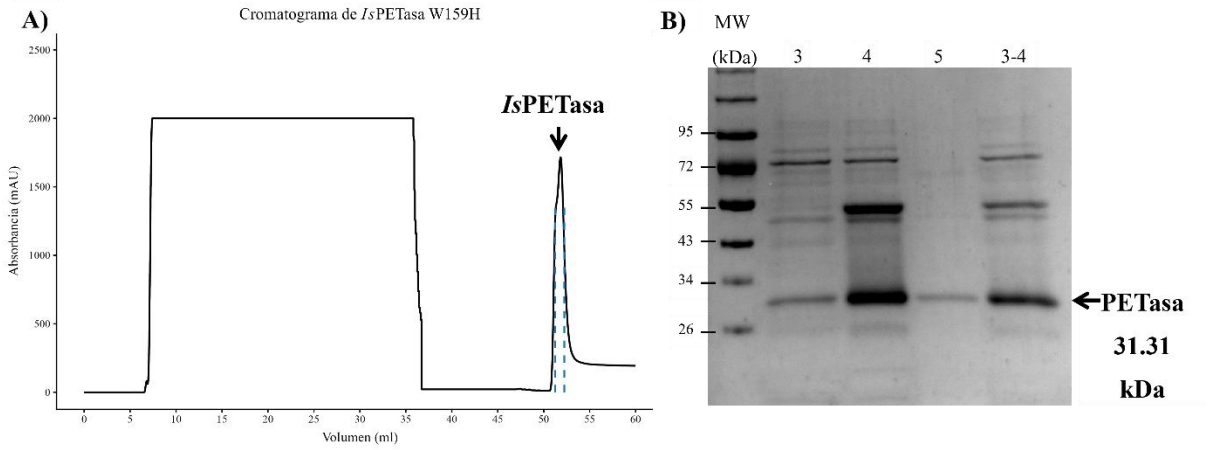


Figura 5. Purificación de la variante W159H de la enzima *Is*PETasa.
A) Cromatograma de la purificación de la variante W159H, B) SDS-PAGE de la variante W159H. En el cromatograma, el pico de elución de la *Is*PETasa se encuentra marcado con una flecha. Para el SDS-PAGE MW: marcador de peso molecular, 3,4 y 5: fracciones de colección de la proteína purificada y 3-4: unión de fracciones.

El cromatograma de elución correspondiente a la variante W159H (Figura 6A) mostró un pico único y bien definido, sin hombros evidentes, lo cual sugiere la presencia predominante de una especie proteica mayoritaria con afinidad especifica por la columna Ni-NTA. El máximo del pico se localizó en el intervalo comprendido entre 51.24 y 52.24 mL, correpondiendo a las fracciones T3, T4 y T5, siendo seleccionadas por el criterio clásico en cromatografía preparativa, según en cual la región media del pico concentra la mayor pureza, mientras que los hombros tienden a acumular proteínas co-purificadas o especies parcialmente retenidas **(Angelo et al., 2016)**. Considerando que el área bajo la curva y la altura del pico se correlación directamente con la masa de proteína eluida **(Kunz & Lönnerdal, 1990)**, la obtención de un solo pico bien resuelto para W159H indica que la interacción entre la columna Ni-NTA y la PETasa mutante fue altamente especifica bajo las condiciones establecidas.

La identidad y el grado de enriquencimiento de la proteína purificada se confirmaron mediante SDS-PAGE (Figura 6B). En las fracciones 3, 4, 5 y en la mezcla 3-4 se observó una banda predominante con un tamaño molecular aparente de 31.31 KDa. Este valor es muy cercano al peso teórico estimado para *Is*PETasa, reportado por **Austin et al., (2018)** para la enzima silvestre y variantes obtenidas por mutagénesis de sitio dirigida también purificadas mediante columnas Ni-NTA. La detección de algunas bandas tenues adicionales, de mayor peso molecular y, en menor medida, de peso inferior, se presumen que están asociadas a proteínas nativas de *E. coli* inducidas por la sobreexpresión de la proteína recombinante y que presentan

cierta afinidad residual por el níquel **(Parsy et al., 2007)**, o bien a formas parcialmente degradadas o poco desnaturalizadas de la enzima, que migran como productos de menor tamaña **(Zhang et al., 2019)**.

No obstante, la intensidad relativa de estas bandas fue claramente menos que las de la banda principal de 31.31kDa, lo que indica que la fracción mayoritaria del pool 3-4 corresponde efectivamente a la PETasa W159H, con un grado de pureza elevado para una única etapa de IMAC. En conjunto, la presencia de un cromatograma con un pico, una concentración final de 2.38 mg/mL en el pool de fracciones y la banda dominante de 31.31 kDa respaldan que el protocolo de cromatografía de afinidad empleado presenta una alta eficiencia y especificidad. Este comportamiento es consistente con líneas de investigación de purificación de PETasa expresadas en *E. coli*, donde la combinación de un sistema de expresión tipo pET, se ha consolidan como una estrategia de referencia para obtener preparaciones enzimáticas con niveles de pureza y concentración adecuadas para su posterior caracterización estructural y funcional **(Angelo et al., 2016; Austin et al., 2018; Spriestersbach et al., 2015)**.

3.3 Evaluación de la eficiencia de degradación del PET de la variante mutante W159H

Tras la incubación de los gránulos de PET de botella micronizados con la variante W159H durante 5 días, se registró una disminución de masa del polímero desde 125.2 mg de polímero inicial hasta 86.2 mg de PET remanente. Esta diferencia corresponde a una reducción absoluta de 39.0 mg, equivalente a aproximadamente el 31% del PET degradado bajo las condiciones evaluadas (50ºC). El peso final se determinó tras el secado y la verificación de estabilidad de la masa, de modo que el valor reportado refleja un balance global de degradación al tèrmino del tiempo de reacción. Estos datos permiten la cuantificación directa de la magnitud total de la degradación inducida por la enzima, dado que el resultado refleja únicamente la diferencia neta de masa entre el estado inicial y final, la interpretación se centra en la actividad hidrolítica efectiva de la variante W159H sobre el sustrato, sin que ellos implique la linealidad o el perfil cinetico de la degradación a lo largo del periodo de incubación.

La magnitud de esta degradación es coherente con el papel estructural del residuo W159 en la hendidura catalítica de la *Is*PETasa. EN al doble mutante S238F/W159H, **Austin et al., (2018)** observaron un incremento significativo en la erosión de PET cristalino respecto de la enzima silvestre, atribuido a un ajuste más favorable del clamp aromático y a una mejor orientación del polímero hacia el sitio catalítico. Por otro lado, el estudio de **Yin et al., (2024)** examinó la fijación del residuo W156, ubicado en una región cercana a W159, en la misma cavidad de

unión activa de la PETasa que, junto con la doble mutación S92P/D157A promovió una meyor eficiencia en la biodegradación del PET, mejorando simultáneamente la termoestabilidad y la liberación de productos, sin necesidad de un amplio oscilamiento de la cadena lateral aromática. En comparación con estos sistemas, la sustitución W159H evaluada representa una modificación puntual en la misma región funcional que, con un ~45% de pérdida de masa sobre PET post-consumo, evidencia que un ajuste local del clamp aromático es suficiente para mejorar la interacción enzima-sustrato aun en ausencia de paquetes mutacionales más complejas.

A la par de la visión basada en dinámica conformacional, **Guo et al., (2022)** mostraron que mutaciones individuales logran el desplazamiento del equilibrio entre estados conformacionales productivos y no productivos del sitio activo, modificando de forma apreciable la probabilidad de acilación y des-acilación exitosa sobre la superficie del polímero. Bajo esta óptica, la modificación por Histidina no solo introduciría nuevas capacidades de interacción π o de puentes de hidrógeno en el clamp aromático, sino que también favorece a los estados conformacionales más preorganizados del sitio activo, lo que es consistente con la degradación cercana al 45% obtenida bajo una carga enzimática moderada (~1,5 mg/g PET), alcance una degradación cercana al 45%.

En el contraste de la degradación del 44.9% obtenida con W159H con otras PETasa modificadas, se observa que el desempeño de esta variante se sitúa en un nivel intermedio dentro del paisaje actual. *Dura*PETasa alcanza conversiones muy elevadas sobre películas de PET operando cerca de la temperatura de transición vítrea (Tg) gracias a la acumulación de diez mutaciones. De forma similar, las variantes termoestables descritas por **Brott et al., (2021)** muestran aumentos marcados en la liberación de tereftalato a partir del PET amorfo y semicristalino cuando la temperatura de operación se ajusta cuidadosamente al entorno de Tg del polímero. En el extremo de mayor rendimiento, FAST-PETasa integra cinco sustituciones seleccionadas mediante aprendizaje automático y es capaz de despolimerizar casi por completo PET post-consumo en escalas de pocos días a ≤50 ºC **(Liu et al., 2023)**. Frente a variantes mutantes robustas y fuertemente optimizada, el efecto de la substitución W159H resulta congruente al mostrar una mejora apreciable respecto al enzima WT en condiciones similares, pero manteniéndose claramente por debajo del desempeño de las PETasas de "última generación" diseñadas para alcanzar conversiones casi completas en configuraciones de proceso industrial.

La interpretación de la eficiencia de la variante mutante debe, además, considerar las características del sustrato empleado. Líneas de investigación sobre la influencia de la cristalinidad del PET han demostrado que aumentos moderados en la fracción cristalina del PET se traducen en descensos pronunciados de la velocidad de erosión superficial y de la conversión global, incluso cuando se utilizan hidrolasas altamente optimizadas, debido a la menor accesibilidad de las cadenas poliméricas en dominios ordenados **(Thomsen et al., 2022)**. Paralelamente, en el presente estudio no se consideraron algunas variables claves, como la actividad de la variante W159H sobre películas amorfas, PET pretratado térmica o químicamente, o sistemas donde la relación sólido/líquido y la agitación se ajustan específicamente para maximizar la degradación del polímero **(Liu et al., 2023)**. Ante estas condiciones de operación ideales, los resultados obtenidos al emplear la variante W159H para degradar PET posconsumo micronizado, sin un proceso previo para disminuir su cristalinidad y en condiciones de agitación de escala de laboratorio, son prometedores y susceptibles de optimización.

Desde la perspectiva del diseño de biocatalizadores, la actividad de la variante W159H es consistente con las tendencias descritas en las revisiones recientes sobre hidrólisis enzimática de PET. **Magalhães et al., (2021)** destacan que la consolidación de biocatalizadores para reciclaje requiere equilibrar estabilidad térmica, afinidad por la superficie del polímero y cinética de hidrólisis en un contexto eminentemente interfacial, donde el comportamiento del sustrato es tan determinante como las propiedades intrínsecas de la enzima. A su vez, **Wei et al., (2022)** subrayan que el diseño basado en mecanismo debe integrar mutaciones que optimicen simultáneamente el reconocimiento del polímero, la estabilización del estado de transición y la desorción de productos, idealmente en combinaciones con estrategias de pretratameinto del PET y ajuste dino de las condiciones de proceso. Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que la substitución W159H constituye un punto de partida técnicamente sólido, que puede servir como plataforma para el diseño de variantes mutantes más complejas y eficientes a escala de operación industrial.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- La construcción del plásmido pET-30a_*Is*PETasa_W159H permitió disponer de un cassette de expresión funcional y estructuralmente estable, con la mutación puntual confirmada en la posición 159 y un marco de lectura íntegro bajo el control T7-lacO en *E. coli* Rosetta. Este sistema se consolidó como una plataforma heteróloga confiable para la producción de la variante de *Is*PETasa W159H, garantizando niveles de biomasa y expresión suficientes para las etapas posteriores de purificación y evaluación funcional.
- La aplicación de cromatografía de afinidad por metales inmovilizados (Ni-NTA) generó un perfil de elución caracterizado por un único pico bien definido y una fracción concentrada de 2.38 mg/mL, en la que predominó una banda de 31.31 kDa en el SDS-PAGE, concordante con el peso esperado para *Is*PETasa. La presencia únicamente de bandas tenues adicionales sugiere un nivel de pureza elevado tras una sola etapa de IMAC, lo que valida la pertinencia del esquema de expresión pET-30a(+)/Rosetta y del protocolo de purificación implementado para obtener la variante W159H en condiciones adecuadas para su evaluación.
- En cuanto a la actividad sobre el sustrato, la incubación con PET post-consumo micronizado condujo a una pérdida de masa cercana al 31%. La cinética observada, con una fase inicial de erosión acelerada seguida de una desaceleración asociada a fracciones más cristalinas y resistentes del polímero, es coherente con el comportamiento descrito para hidrolasas de PET y demostró que la sustitución en la posición 159 repercute de manera favorable en la interacción enzima-sustrato. Este desempeño, sitúa a la variante W159H en un rango intermedio dentro del actual paisaje de variantes múltiples de última generación.

4.2 Recomendaciones

- Profundizar la caracterización de la variante mediante estudios cinéticos comparativos con la enzima silvestre y análisis de productos de hidrolisis a fin de cuantificar con precisión la ventaja funcional sobre PET post-consumo.
- Evaluar condiciones adicionales de expresión en *E. coli* Rosetta, ajustando temperatura de inducción, concentración de IPTG, medio de cultivo y tiempo de expresión, con el

fin de mejorar la solubilidad de la proteína y reducir la posible formación de cuerpos de inclusión.

- Analizar distintas relaciones enzima-sustrato empleando cantidades diferentes de PET y mayores cargas enzimáticas, con el fin de reducir pérdidas por precipitación de la proteína y estudiar si el porcentaje de degradación alcanzado aumenta.
- Emplear sustratos de PET con menores gados de cristalinidad o aplicar pretratamientos físicos o térmicos que mejoren la accesibilidad de las cadenas poliméricas y permitan evaluar de manera más directa el potencial catalítico de la variante.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

Agilent Technologies. (2015). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*. www.agilent.com/en/contact-us/page.

Al-Salem, S. M., Lettieri, P., & Baeyens, J. (2010). The valorization of plastic solid waste (PSW) by primary to quaternary routes: From re-use to energy and chemicals. *Progress in Energy and Combustion Science*, *36*(1), 103-129. https://doi.org/10.1016/j.pecs.2009.09.001

Angelo, J. M., Cvetkovic, A., Gantier, R., & Lenhoff, A. M. (2016). Characterization of cross-linked cellulosic ion-exchange adsorbents: 2. Protein sorption and transport. *Journal of Chromatography A*, *1438*, 100-112. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.019

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., El Omari, K., Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Woodcock, H. L., … Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(19), E4350-E4357. https://doi.org/10.1073/pnas.1718804115

Bashir, M. A., Ji, T., Weidman, J., Soong, Y., Gray, M., Shi, F., & Wang, P. (2025). *Plastic waste gasification for low-carbon hydrogen production: A comprehensive review*. https://doi.org/10.1039/d4ya00292j

Benyathiar, P., Kumar, P., Carpenter, G., Brace, J., & Mishra, D. K. (2022). Polyethylene Terephthalate (PET) Bottle-to-Bottle Recycling for the Beverage Industry: A Review. *Polymers*, *14*(12), 2366. https://doi.org/10.3390/polym14122366

Bodor, A., Feigl, G., Kolossa, B., Mészáros, E., Laczi, K., Kovács, E., Perei, K., & Rákhely, G. (2024). Soils in distress: The impacts and ecological risks of (micro)plastic pollution in the terrestrial environment. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38091673/

Borrelle, S., Ringma, J., Law, K., Monnahan, C., Lebreton, L., McGivern, A., Murphy, E., Jambeck, J., Leonard, G., Hilleary, M., Eriksen, M., Possingham, H., De Frond, H., Gerber, L., Polidoro, B., Tahir, A., Bernard, M., Mallos, N., Barnes, M., & Rochman,

C. (2020). Predicted growth in plastic waste exceeds efforts to mitigate plastic pollution. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32943526/

Brott, S., Pfaff, L., Schuricht, J., Schwarz, J., Böttcher, D., Badenhorst, C. P. S., Wei, R., & Bornscheuer, U. T. (2021). Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation. *Engineering in Life Sciences*, *22*(3-4), 192-203. https://doi.org/10.1002/elsc.202100105

Burgin, T., Pollard, B. C., Knott, B. C., Mayes, H. B., Crowley, M. F., McGeehan, J. E., Beckham, G. T., & Woodcock, H. L. (2024). The reaction mechanism of the *Ideonella sakaiensis* PETase enzyme. *Communications Chemistry*, *7*(1), 65. https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x

Cao, F., Wang, L., Zheng, R., Guo, L., Chen, Y., & Qian, X. (2022). *Research and progress of chemical depolymerization of waste PET and high-value application of its depolymerization products*. https://doi.org/10.1039/D2RA06499E

Carr, C., Clarke, D., & Dobson, A. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33262744/

Carter, L. M., MacFarlane, C. E., Karlock, S. P., Sen, T., Kaar, J. L., Berberich, J. A., & Boock, J. T. (2024). Increased cytoplasmic expression of PETase enzymes in *E. coli*. *Microbial Cell Factories*, *23*(1), 319. https://doi.org/10.1186/s12934-024-02585-w

Chen, C., Han, X., Ko, T., Liu, W., & Guo, R. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *PubMed*, *285(20)*, 3717-3723. https://doi.org/10.1111/febs.14612

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

Cosimbescu, L., Merkel, D. R., Darsell, J., & Petrossian, G. (2021). Simple But Tricky: Investigations of terephthalic acid purity obtained from mixed PET waste. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, *60*(35), 12792-12797. https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c02604

Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., Mitra, R., Han, J., Li, C., Han, X., Liu, W., Chen, Q., Wei, W., Wang, X., Du, W., Tang, S., Xiang, H., Liu, H., Liang, Y., … Wu, B. (2021). Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient condition by the GRAPE strategy. *ACS Catalysis*, *11*(3), 1340-1350. https://doi.org/10.1021/acscatal.0c05126

d'Ambrières, W. (2019). Plastics recycling worldwide: Current overview and desirable changes. *Field Actions Science Reports*, *Special Issue 19*, 12-21.

Dermit, M., & Mardakheh, F. K. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, *2*(2), 100462. https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100462

Dokl, M., Copot, A., Krajnc, D., Fan, Y. V., Vujanović, A., Aviso, K. B., Tan, R. R., Kravanja, Z., & Čuček, L. (2024). Global projections of plastic use, end-of-life fate and potential changes in consumption, reduction, recycling and replacement with bioplastics to 2050. *Sustainable Production and Consumption*, *51*, 498-518. https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.09.025

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), 189. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01680-6

Duan, S., Zhang, N., Chao, T., Wu, Y., & Wang, M. (2023). The structural and molecular mechanisms of type II PETases: A mini review. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37535135/

Dzoh Fonkou, J. P., Beggio, G., Salviulo, G., & Lavagnolo, M. C. (2025). Analytical methods for In-Depth assessment of recycled plastics: A Review. *Environments*, *12*(5), 154. https://doi.org/10.3390/environments12050154

Fecker, T., Galaz-Davison, P., Engelberger, F., Narui, Y., Sotomayor, M., Parra, L. P., & Ramírez-Sarmiento, C. A. (2018). Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase. *114*(6), 1302-1312. https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.005

Flaws, J., Damdimopoulou, P., Patisaul, Heather, B., Gore, A., Raetzman, L., & Vandenberg, Laura, N. (2020). Plastics, edcs & health a guide for public interest organizations and policy-makers on endocrine disrupting chemicals & plastics.

Furukawa, M., Kawakami, N., Tomizawa, A., & Miyamoto, K. (2019). Efficient degradation of Poly(ethylene terephthalate) with *Thermobifida fusca* cutinase exhibiting improved catalytic activity generated using mutagenesis and additive-based approaches. *Scientific Reports*, *9*(1), 16038. https://doi.org/10.1038/s41598-019-52379-z

García-Meseguer, R., Ortí, E., Tuñón, I., Ruiz-Pernía, J. J., & Aragó, J. (2023). Insights into the enhancement of the Poly(ethylene terephthalate) degradation by FAST-PETase from Computational Modeling. *Journal of the American Chemical Society*, *145*(35), 19243-19255. https://doi.org/10.1021/jacs.3c04427

Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, *3*(7), e1700782. https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782

Graf, L. G., Michels, E. A. P., Yew, Y., Liu, W., Palm, G. J., & Weber, G. (2021). Structural analysis of PET-degrading enzymes PETase and MHETase from *Ideonella sakaiensis*. En G. Weber, U. T. Bornscheuer, & R. Wei (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 648, pp. 337-356). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.015

Guo, B., Vanga, S. R., Lopez-Lorenzo, X., Saenz-Mendez, P., Ericsson, S. R., Fang, Y., Ye, X., Schriever, K., Bäckström, E., Biundo, A., Zubarev, R. A., Furó, I., Hakkarainen, M., & Syrén, P.-O. (2022). Conformational selection in biocatalytic plastic degradation by PETase. *ACS Catalysis*, *12*(6), 3397-3409. https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05548

Han, X., Liu, W., Huang, J., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T., Xu, L., Cheng, Y., Chen, C., & Guo, R. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29235460/

Huang, D., Zhang, L., & Sun, Y. (2023). Rational design of disulfide bridges in *Bb*PETaseCD for enhancing the enzymatic performance in PET degradation. *Molecules*, *28*(8), 3528. https://doi.org/10.3390/molecules28083528

International Union for Conservation of Nature. (2024). Plastic Pollution. https://iucn.org/sites/default/files/2024-05/plastic-pollution-issues-brief-may-2024-update.pdf

Jew, K., Smith, P. E. J., So, B., Kasman, J., Oza, J. P., & Black, M. W. (2022). *Frontiers | Characterizing and improving pET vectors for cell-free expression.* https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.895069

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), 382. https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1

Kawai, F., Iizuka, R., & Kawabata, T. (2024). Engineered polyethylene terephthalate hydrolases: Perspectives and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *108*(1), 404. https://doi.org/10.1007/s00253-024-13222-2

Ke, T., Liang, S., Huang, J., Mao, H., Chen, J., Dong, C., Huang, J., Liu, S., Kang, J., Liu, D., & Ma, X. (2012). A novel PCR-based method for high throughput prokaryotic expression of antimicrobial peptide genes. *BMC Biotechnology*, *12*(1), 10. https://doi.org/10.1186/1472-6750-12-10

Kim, N., Lee, S., & Park, H. (2022). Current biotechnologies on depolymerization of polyethylene terephthalate (PET) and repolymerization of reclaimed monomers from PET for bio-upcycling: A critical review. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36100185/

Kunz, C., & Lönnerdal, B. (1990). Human-milk proteins: Analysis of casein and casein subunits by anion-exchange chromatography, gel electrophoresis, and specific staining methods. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *51*(1), 37-46. https://doi.org/10.1093/ajcn/51.1.37

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*, 141230. https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.141230

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. https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1263996

Liu, M., Li, Z., Huang, J., Yan, J., Zhao, G., & Zhang, Y. (2024). OptoLacI: Optogenetically engineered lactose operon repressor LacI responsive to light instead of IPTG. *Nucleic Acids Research*, *52*(13), 8003-8016. https://doi.org/10.1093/nar/gkae479

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

Magalhães, R. P., Cunha, J. M., & Sousa, S. F. (2021). Perspectives on the role of enzymatic biocatalysis for the degradation of plastic PET. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(20), 11257. https://doi.org/10.3390/ijms222011257

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*. https://link.springer.com/article/10.1007/s12010-021-03562-4

Ndagano, U. N., Cahill, L., Smullen, C., Gaughran, J., & Kelleher, S. M. (2025). The current State-of-the-Art of the processes involved in the chemical recycling of textile waste. *Molecules*, *30*(2), 299. https://doi.org/10.3390/molecules30020299

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

Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., Berndt, L., Weiss, M. S., Bornscheuer, U. T., & Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, *10*(1), 1717. https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3

Panowicz, R., Konarzewski, M., Durejko, T., Szala, M., Łazińska, M., Czerwińska, M., & Prasuła, P. (2021). Properties of Polyethylene Terephthalate (PET) after Thermo-Oxidative Aging. *Materials*, *14*(14), 3833. https://doi.org/10.3390/ma14143833

Parsy, C. B., Chapman, C. J., Barnes, A. C., Robertson, J. F., & Murray, A. (2007). Two-step method to isolate target recombinant protein from co-purified bacterial contaminant SlyD after immobilised metal affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, *853*(1), 314-319. https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.03.046

Patel, D., Mamtora, D., Kamath, A., & Shukla, A. (2022). Rogue one: A plastic story. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35290835/

Pirillo, V., Orlando, M., Tessaro, D., Pollegioni, L., & Molla, G. (2021). An efficient protein evolution workflow for the improvement of bacterial PET hydrolyzing enzymes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1), 264. https://doi.org/10.3390/ijms23010264

Plastics Europe. (2024). Plastics – the fast Facts 2024. *Plastics Europe*. https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-fast-facts-2024/

Pottinger, A., Geyer, R., Biyani, N., Martinez, C., Nathan, N., Mr, M., Liu, C., Hu, S., de Bruyn, M., Boettiger, C., Baker, E., & McCauley, D. (2024). Pathways to reduce global plastic waste mismanagement and greenhouse gas emissions by 2050. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39541435/

Qu, Z., Zhang, L., & Sun, Y. (2024). Molecular insights into the enhanced activity and/or thermostability of PET hydrolase by D186 mutations. *Molecules*, *29*(6), 1338. https://doi.org/10.3390/molecules29061338

Raheem, A. B., Noor, Z. Z., Hassan, A., Abd Hamid, M. K., Samsudin, S. A., & Sabeen, A. H. (2019). Current developments in chemical recycling of post-consumer polyethylene terephthalate wastes for new materials production: A review. *Journal of Cleaner Production*, *225*, 1052-1064. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.019

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

Scalenghe, R. (2018). Resource or waste? A perspective of plastics degradation in soil with a focus on end-of-life options. *Heliyon*, *4*(12), e00941. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00941

Schmidt, C. M., Shis, D. L., Nguyen-Huu, T. D., & Bennett, M. R. (2012). Stable maintenance of multiple plasmids in *E. coli* using a single selective marker. *ACS Synthetic Biology*, *1*(10), 445-450. https://doi.org/10.1021/sb3000589

Sevilla Cevallos, M. E., & Cerda Mejia, L. A. (2022). Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Universidad Técnica de Ambato.

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), 1779. https://doi.org/10.3390/polym15071779

Shah, H. H., Amin, M., Iqbal, A., Nadeem, I., Kalin, M., Soomar, A. M., & Galal, A. M. (2023). A review on gasification and pyrolysis of waste plastics. *Frontiers in Chemistry*, *10*, 960894. https://doi.org/10.3389/fchem.2022.960894

Shi, L., Liu, H., Gao, S., Weng, Y., & Zhu, L. (2021). Enhanced extracellular production of *Is* PETase in *Escherichia coli* via engineering of the pelB signal peptide. *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33576230/

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

Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H.-Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K.-J. (2019). Rational protein engineering of thermo-stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for highly efficient PET degradation | *ACS Catalysis*. https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscatal.9b00568

Spriestersbach, A., Kubicek, J., Schäfer, F., Block, H., & Maertens, B. (2015). Purification of His-tagged proteins. *PubMed*. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.003

Statista. (2020). Global thermoplastic production by type 2050. *Statista*. https://www.statista.com/statistics/1192886/thermoplastics-production-volume-by-type-globally/

Stevensen, J., Janatunaim, R. Z., Ratnaputri, A. H., Aldafa, S. H., Rudjito, R. R., Saputro, D. H., Suhandono, S., Putri, R. M., Aditama, R., & Fibriani, A. (2025). Thermostability and activity improvements of PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ACS Omega*, *10*(7), 6385-6395. https://doi.org/10.1021/acsomega.4c05142

Sui, B., Wang, T., Fang, J., Hou, Z., Shu, T., Lu, Z., Liu, F., & Zhu, Y. (2023). *Frontiers* | Recent advances in the biodegradation of polyethylene terephthalate with cutinase-like enzymes. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1265139

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*, 28-35. https://doi.org/10.1016/j.nbt.2022.02.006

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), 216-219. https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4

Wei, R., von Haugwitz, G., Pfaff, L., Mican, J., Badenhorst, C. P. S., Liu, W., Weber, G., Austin, H. P., Bednar, D., Damborsky, J., & Bornscheuer, U. T. (2022). Mechanism-based design of efficient PET hydrolases. *ACS Catalysis*, *12*(6), 3382-3396. https://doi.org/10.1021/acscatal.1c05856

Wei, R., Westh, P., Weber, G., & Blank, L. M. (2025). Standardization guidelines and future trends for PET hydrolase research. *ResearchGate*. https://doi.org/10.1038/s41467-025-60016-9

Yang, S.-S., Wu, W.-M., Pang, J.-W., He, L., Ding, M.-Q., Li, M.-X., Zhao, Y.-L., Sun, H.-J., Xing, D.-F., Ren, N.-Q., Yang, J., Criddle, C. S., & Ding, J. (2023). Bibliometric analysis of publications on biodegradation of plastics: Explosively emerging research over 70 years. *Journal of Cleaner Production*, *428*, 139423. https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2023.139423

Yin, Q., Zhang, J., Ma, S., Gu, T., Wang, M., You, S., Ye, S., Su, R., Wang, Y., & Qi, W. (2024). Efficient polyethylene terephthalate biodegradation by an engineered *Ideonella sakaiensis* PETase with a fixed substrate-binding W156 residue. https://doi.org/10.1039/D3GC03663D

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *PubMed*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26965627/

Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). Chapter Nine—*Ideonella sakaiensis*, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. En G. Weber, U. T. Bornscheuer, & R. Wei (Eds.), *Methods in Enzymology* (Vol. 648, pp. 187-205). Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007

Zhang, X., Wang, Q., Liu, S., Zhang, L., & Wang, G. (2021). Synthesis and characterization of fire-safety PET by Schiff base with nitro group. *European Polymer Journal*, *145*, 110230. https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110230

Zhang, Y., Eser, B. E., & Guo, Z. (2022). Biodegradation of polyethylene and polystyrene: From microbial deterioration to enzyme discovery. *Biotechnology Advances*, *60*, 107991. https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.107991

Zhang, Y., Wang, Y., & Li, Y. (2019). Major cause of antibody artifact bands on non-reducing SDS-PAGE and methods for minimizing artifacts. *Protein Expression and Purification*, *164*, 105459. https://doi.org/10.1016/j.pep.2019.105459