



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Diseño de la variante mutante S188D de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

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

Autor: Génesis Aurora Robalino Sánchez

Tutor: Dr. Mario Daniel García Solís

Ambato – Ecuador

Julio – 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. Mario Daniel García Solís

CERTIFICA:

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

Ambato, 05 de junio de 2026.



Validar únicamente en FirmaEC.
Firmado electrónicamente por:
**MARIO DANIEL GARCIA
SOLIS**

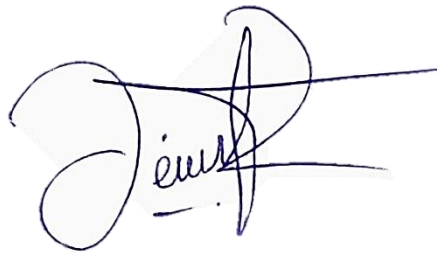
Dr. Mario Daniel García Solís

11XXXXXXX71

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Génesis Aurora Robalino Sánchez, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Génesis', with a large, stylized flourish extending to the right. The signature is positioned above a horizontal line.

Génesis Aurora Robalino Sánchez

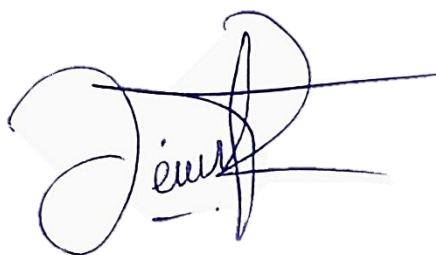
06XXXXXX81

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

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

Cedo los Derechos en línea patrimoniales de mi 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 los derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Génesis', with a large, stylized flourish extending to the right.

Génesis Aurora Robalino Sánchez

06XXXXXX81

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:



Presidente del Tribunal



Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

18XXXXXX61



Dra. Liliana Alexandra Cerda Mejía

18XXXXXX86

Ambato, 19 de junio de 2026

DEDICATORIA

*A Dios, por guiarme y seguir bendiciéndome a través de este sendero
hermosamente inexplicable de la vida.*

*A Marcela, mi luz, por su amor y apoyo incondicional para perseguir
mis sueños y cultivar en mí el don de la resiliencia para alcanzarlos.*

*A Mathias, cuya existencia me impulsa a seguir buscando mi mejor
versión, hoy y siempre, para ti.*

*A mis abuelitos, síganme brindando ese amor acogedor y
acompañenme en muchos logros más.*

*A mis tíos y primas, quienes con su apoyo, gestos y palabras de aliento
me motivaron a recorrer y culminar con orgullo y gratitud este
desafiante viaje.*

*A mis amigos, que con paciencia y cariño me sostuvieron en la
tempestad y celebraron conmigo cada pequeño gran logro.*

*A todos ellos, que ocupan un lugar en mi mente y corazón, este triunfo
les pertenece, porque la gloria de la cima solo tiene sentido cuando se
comparte.*

AGRADECIMIENTO

“Todo progreso requiere pérdida: Pérdida de tus viejos valores, de tus viejos hábitos, de tus viejos amores, de tu vieja identidad. Mejorar tu vida requiere destruir una parte de ti para reemplazarla por una versión mejor” - Mario Benedetti.

Agradezco a mi madre y hermano, Marcela y Mathias, por demostrarme su apoyo y amor incondicional incluso en las adversidades, siempre serán mi motor para mantenerme de pie. Quiero agradecerte especialmente a ti, madre, por ser mi ejemplo de fortaleza y resiliencia para seguir luchando por las personas que se ama y que hacen que todo ese sacrificio valga la pena. Gracias por confiar en mí, permitirme volar y estar ahí cuando llego a estrellarme, pendiente, para curarme e impulsarme otra vez a los cielos. No me alcanzará la vida para agradecer a Dios por bendecirme con una gran madre y confidente como tú. Los amo.

A mi querida familia, por ayudarme y guiarme durante este recorrido. Llevo en mi corazón con gratitud cada charla, cada consejo, incluso el apoyo económico brindado en aquellos días difíciles. Por eso y por mucho más, me siento bendecida de tenerlos y soy afortunada de alcanzar un logro más rodeada de unión y amor familiar.

A mi tutor, Dr Mario García, y a la Dra. Liliana Cerda, excelentes docentes que admiro, gracias infinitas por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por su inmensa paciencia para guiarme y brindarme sus conocimientos durante esta etapa final. A todos los docentes que sembraron en mí su conocimiento y sabiduría.

A Adriana, mi mejor amiga, gracias por tu amistad incondicional durante estos años, gracias por convertirme en mi hogar al cual recurrir rápidamente en los buenos y malos momentos, te amo. A Majo, Ali, Eve y Estefa, gracias por llegar a mi vida y llenarla de risas, llantos, y muchas aventuras, cada una con su esencia ha hecho más llevadero este último año. A Darwin y Alex, que con paciencia me acompañaron y aconsejaron este semestre, muchas gracias por no dejarme sola, espero que las pocas experiencias vividas sean solo el comienzo de una larga y amena amistad. A todos los compañeros que formaron parte de esta bonita trayectoria.

A aquella persona, por más efímera que haya sido su presencia en mi vida, gracias por convencerme de que la magia si existe y dejar una huella inolvidable en mi historia.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecerme a mí, por completar hasta el final esta carrera a pesar de los desafíos que surgieron en el camino. Recuerda que eres más valiente que todos tus miedos.

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
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN EJECUTIVO	xiv
ABSTRACT	xv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Justificación	1
1.1.2. Impacto ambiental del plástico	2
1.1.2.1. Recalcitrancia del PET y sus implicaciones sobre la salud humana y ecosistemas	2
1.1.3. Gestión de residuos plásticos.....	4
1.1.3.1. Tratamientos convencionales.....	4
1.1.3.2. Biodegradación enzimática del PET	5
1.1.4. PETasa de <i>Ideonella sakaiensis</i>	5
1.1.4.1. Mecanismo de acción de IsPETasa sobre el PET	6
1.1.4.2. Limitaciones de la biodegradación enzimática a escala industrial	9
1.1.5. Ingeniería de enzimas para la optimización de IsPETasa.....	10

1.1.5.1.	Desarrollo de la variante DuraPETasa e identificación de residuos clave para el incremento de termoestabilidad en IsPETasa	11
1.1.5.2.	Análisis comparativo de IsPETasa y la cutinasa LCC	11
1.1.5.3.	Diseño de la mutación S188D: Relevancia Estructural y funcional	12
1.2.	Objetivos	13
1.2.1.	Objetivo general.....	13
1.2.2.	Objetivos Específicos.....	13
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA		14
2.1.	Materiales.....	14
2.2.	Métodos.....	15
2.2.1.	Construcción de la variante mutante S188D de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i> 15	
2.2.1.1.	Secuencia del gen de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	15
2.2.1.2.	Obtención de la variante S188D	15
2.2.1.3.	Transformación de las células competentes <i>E. coli</i> DH5 α	16
2.2.1.4.	Extracción del ADN plasmídico	17
2.2.1.5.	Transformación de las células competentes de <i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta	17
2.2.1.6.	Expresión de la variante S188D de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i>	17
2.2.2.	Aislamiento de la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad.	18
2.2.2.1.	Lisis Celular.....	18
2.2.2.2.	Purificación de la proteína.....	18
2.2.3.	Evaluación de la eficiencia de degradación de la variante S188D de la enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i> sobre el PET.....	19
2.2.3.1.	Ensayo de degradación del PET	19
CAPÍTULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		20
3.1.	Análisis y discusión de los resultados.....	20
3.1.1.	Diseño de la variante IsPETaSA S188D	20

3.1.1.1.	Criterio para la selección de los codones	24
3.1.1.2.	Expresión y rendimiento de biomasa de la mutante S188D.....	24
3.1.2.	Purificación de la variante <i>IsPETasaS188D....</i> ¡Error! Marcador no definido.	
3.1.3.	Degradación del PET por variante <i>IsPETasaS188D</i>	32
CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....		36
4.1.	Conclusiones	36
4.2.	Recomendaciones	36
BIBLIOGRAFÍA		37
ANEXOS.....		49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Lista de reactivos, material fungible y equipos empleados.....	14
Tabla 2. Medios de cultivo empleados	16
Tabla 3. Valores obtenidos tras la purificación de IsPETasa S188D.....	28
Tabla 4. Rendimientos obtenidos de las fracciones de IsPETasa S188D.....	30
Tabla 5. Principales mutantes de IsPETasa y su desempeño en la degradación de PET.....	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura cristalina y representación del sitio activo de <i>IsPETasa</i> con sustrato de estudio 2-HE(MHET)4 que imita al PET.....	6
Figura 2. Mecanismo catalítico de reacción por acilación y desacilación de <i>IsPETasa</i>	8
Figura 3. Relación de la actividad catalítica de la enzima frente la temperatura y comportamiento del PET.....	9
Figura 4. Comparación estructural de las enzimas <i>IsPETasa</i> , <i>DuraPETasa</i> y LCC	12
Figura 5. Plásmido pET-30 ^a (+) con variante mutante <i>IsPETasa</i> S188D	23
Figura 6. Perfil cromatográfico del proceso IMAC-Ni-NTA de la variante <i>IsPETasa</i> S188D	26
Figura 7. Concentración de fracciones post-filtración	29
Figura 8. SDS-PAGE de la variante <i>IsPETasa</i> S188D	31
Figura 9. Comparación de b-factor entre la <i>IsPETasa</i> silvestre y la mutación S188D	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 2. Análisis estadístico del ensayo de degradación	49
Anexo 1. Datos del ensayo de degradación.....	49

RESUMEN EJECUTIVO

El polietileno tereftalato (PET) se acumula en ecosistemas a tasas que los métodos convencionales de reciclaje no logran compensar. La PETasa de *Ideonella sakaiensis* (*IsPETasa*) degrada el PET, pero su termoestabilidad por debajo de 40 grados centígrados limitan su aplicación industrial. La comparación estructural con la cutinasa termofílica LCC, cuyo residuo D193 participa en redes de puentes salinos que sostienen la actividad hasta 70 grados centígrados, motivó la variación S188D que sustituye los codones TCC por GAC, sobre la arquitectura mutante antecesora M8 de *IsPETasa*. La variante se clonó en el vector pET-30a(+) y se expresó en *E. coli* (DE3) Rosetta bajo inducción con IPTG 0,1 milimolar a 20 grados centígrados. La purificación por IMAC Ni-NTA produjo 1,5 miligramos por mililitro de proteína soluble, registrando a las fracciones 4 y 5 con mayor concentración proteica activa una vez filtrada en gel PD10, y se confirmó, por SDS-PAGE, la presencia de la proteína entre la banda de 26 a 34 kilodalton. El ensayo de degradación mostró que la actividad de 1,5 miligramos de enzima por gramo de PET post-consumo micronizado y sin amorfización previa, a 50 grados centígrados durante 72 horas, redujo el polímero un 13,22 por ciento a comparación de la muestra control. Este rendimiento es aceptable pero no tiene significancia a comparación de variantes mutantes antecesoras, por lo que es necesario integrar a S188D con otras mutaciones acumulativas que refuercen la estabilidad funcional de *IsPETasa* y la consoliden como una estrategia viable para la biodegradación del plástico a escala industrial.

Palabras clave: PETasa, *Ideonella sakaiensis*, ingeniería de enzimas, termoestabilidad, degradación enzimática del PET.

ABSTRACT

Polyethylene terephthalate PET accumulates in ecosystems at rates that conventional recycling methods cannot compensate for. The PETase from *Ideonella sakaiensis*, IsPETase, degrades PET, but its thermostability below 40 degrees Celsius limits its use in industrial applications. The structural comparison with the thermophilic cutinase LCC, whose D193 residue participates in salt bridge networks that sustain activity up to 70 degrees Celsius, motivated the S188D variation, which replaces the TCC codons with GAC, based on the ancestral mutant M8 architecture of IsPETase. The variant was cloned into the pET-30a(+) vector and expressed in *E. coli* (DE3) Rosetta under induction with IPTG 0.1 millimolar at 20 degrees Celsius. Purification by IMAC Ni-NTA produced 1,5 milligrams per milliliter of soluble protein, with fractions four and five showing the highest active protein concentration, following PD10 gel filtration, and the presence of the protein between the 26 to 34 kilodalton band was confirmed by SDS PAGE. The degradation assay showed that the activity of 1.5 milligrams of enzyme per grams of micronized post-consumer PET, without prior amorphization, at 50 degrees Celsius for 72 hours, reduced PET by an unspecified percentage compared with the control sample. This performance is acceptable, but it does not show significance compared with ancestral mutant variants. Therefore, it is necessary to integrate S188D with other cumulative mutations that strengthen the functional stability of IsPETase and consolidate it as a viable strategy for plastic biodegradation at an industrial scale.

Keywords: PETase, *Ideonella sakaiensis*, enzyme engineering, thermostability, enzymatic PET degradation.

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Justificación

La imperante producción y consumo del plástico de un solo uso, cuyo mercado global se valoró en aproximadamente 707.47 billones de dólares en 2025, contribuye significativamente a la acumulación de residuos poliméricos en ecosistemas terrestres y acuáticos (**Fecker et al., 2018; Research Nester, 2025**). El polietileno tereftalato (PET) es un polímero sintético hidrofóbico y altamente resistente empleado en los empaques desechables y fibras textiles (**Ahituv et al., 2025; Groseclose & Nguyen, 2025**). Estas características fisicoquímicas y resistencia a la degradación natural favorecen su acumulación. Más allá del impacto ecológico visible, estudios recientes exponen la bioacumulación de partículas plásticas en tejidos humanos y su relación directa con alteraciones en el sistema endocrino (**Hoang et al., 2025; Tavakolpournegari et al., 2024**). Aunque, métodos como el reciclaje mecánico y la degradación química han sido empleados para gestionar plásticos post-consumo, sus limitaciones energéticas y ambientales han impulsado el desarrollo de alternativas amigables y más eficientes basadas en la degradación enzimática.

En 2016, **Yoshida et al. (2016)** aislaron una bacteria gran negativa denominada *Ideonella sakaiensis* 201-F6, capaz de utilizar el PET como fuente de carbono. Este microorganismo secreta la enzima PETasa (*IsPETasa*) que hidroliza los enlaces éster del PET liberando los intermediarios monos (2-hidroxietil) tereftalato (MHET) junto a bis (2-hidroxietil) tereftalato (BHET), para finalmente degradar el MHET en los oligómeros ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) por acción de la MHETasa. Esta actividad ocurre a una temperatura óptima de 30 °C. No obstante, la actividad de la *IsPETasa* se ve comprometida a temperaturas cercanas de 40 °C (*T_m*) (**Joo et al., 2018**), valor cercano al rango requerido para incrementar la flexibilidad y accesibilidad superficial de las cadenas poliméricas del PET. Adicionalmente, la enzima presenta una baja eficiencia cinética frente a sustratos con índices de cristalinidad superiores al 15%, lo que restringe su desempeño sobre la mayoría del PET post-consumo que suelen presentar una cristalinidad mayor al 30% (**Austin et al., 2018; Wei et al., 2025**).

Para superar estas limitaciones, diversos estudios han enfocado en optimizar la *IsPETasa* mediante ingeniería de enzimas, empleando análisis comparativos con enzimas homólogas termoestables y herramientas computacionales para identificar y rediseñar estructuras

estabilizantes. **Cui et al. (2021)** diseñaron la variante termoestable *DuraPETasa* e identificaron al residuo S188 como un sitio crítico para regular la estabilidad conformacional de la enzima. En particular, la sustitución S188Q aumentó 1.5 veces la T_m aparente y, en presencia de otras mutaciones acumulativas puntuales (S214H-I168R-W159H-S188Q-R280A-A180I-G165A-Q119Y-L117F-T140D), contribuyó a la formación de puentes salinos y redes de puentes de hidrógeno que disminuyen la flexibilidad conformacional de la enzima silvestre. Como resultado, la variante *DuraPETasa* logró degradar PET con índices de cristalinidad de 34%, e incrementó la T_m a 77°C. Complementariamente, en un análisis comparativo de las secuencias de *IsPETasa* y de la enzima termofílica Leaf-branch Compost Cutinase (LCC), descubierta por **Sulaiman et al. (2012)**, mostró que LCC presenta naturalmente un aspartato en la posición D193, cuya carga negativa participa en la formación de una red de puentes salinos con R173 y T192, interacciones que posiblemente le confieren la capacidad de degradar 1.45 mg de PET a 50°C tras 24 horas de incubación. Por consiguiente, la introducción de la sustitución S188D en *IsPETasa* podría favorecer la estabilización electrostática de regiones proximales al centro catalítico sin afectar su conformación funcional y mejorando su termoestabilidad.

Con base a estos antecedentes, el presente proyecto evaluó el efecto de la variante S188D sobre la arquitectura del mutante M8 de *IsPETasa*, desarrollada en la Universidad Técnica de Ambato. La variante propuesta contribuye al fortalecimiento de estrategias de biorremediación eficaces para la conversión de residuos de PET en unidades monoméricas de valor añadido, validando soluciones tecnológicas de baja huella de carbono.

1.1.2. Impacto Global de los residuos plásticos

1.1.2.1. Recalcitrancia del PET y efectos en los ecosistemas

El polietileno tereftalato (PET) es un termoplástico semicristalino sintetizado por la condensación de dos monómeros, ácido tereftálico (TPA) y el etilenglicol (EG), unidos por enlaces éster (**Ahituv et al., 2025; Austin et al., 2025**), disposición que le confiere una temperatura de fusión cercana a los 260 °C y un elevado grado de cristalinidad (20-40% en materiales comerciales) gracias a que sus cadenas poliméricas estabilizadas por interacciones de Van der Waals y fuerzas hidrofóbicas, restringen la accesibilidad de agentes físicos, químicos y biológicos (**Han et al., 2025; Lu et al., 2022; Tamburini et al., 2025**). Estas propiedades, determinantes para su amplia utilización en las industrias de envases, fibras textiles y películas de embalaje, son al mismo tiempo la causa fundamental de su recalcitrancia

ambiental que puede prolongarse entre 58 – 1200 años hasta su degradación natural parcial (Chamas et al., 2020).

De los más de 460 millones de toneladas de plástico producidas anualmente (**Plastics Europe, 2023**), aproximadamente el 45% del PET de un solo uso generado, se deposita en rellenos sanitarios o en el ambiente durante el primer año (**Geyer, 2020; Swamy et al., 2024**). La exposición a la radiación UV, el calor y estrés mecánico, provocan la ruptura progresiva de las cadenas poliméricas, induciendo fragilidad del material hasta fragmentarse en microplásticos (<5mm) y nanoplásticos (<1µm) que se bioacumulan en todos los niveles tróficos (**Toussaint et al., 2019**).

En el ambiente, la contaminación de residuos plásticos en el ecosistema terrestre es 4 – 23 veces mayor que los sistemas acuáticos, siendo el suelo el principal receptor debido a la actividad antropogénica, acumulando entre 19 y 23 millones de toneladas de plástico anualmente (**UNEP, 2026**). Los residuos PET alteran la diversidad microbiana, la fertilidad y biodisponibilidad del suelo, comprometiendo procesos biogeoquímicos como la descomposición de materia orgánica y el ciclo del nitrógeno (**Wang et al., 2025**). Consecuentemente, la toxicidad del suelo llega a inhibir el crecimiento y productividad de las plantas, y de estas hacia herbívoros, aves y mamíferos disminuyendo su capacidad reproductiva (**Shi et al., 2024; Yao et al., 2022**). Esta convergencia de rutas de diseminación convierte a los plásticos en contaminantes capaces de alcanzar al ser humano a través de vectores difícilmente controlables.

En el ambiente, la contaminación de residuos plásticos en el ecosistema terrestre es 4 – 23 veces mayor que los sistemas acuáticos, siendo el suelo el principal receptor debido a la actividad antropogénica, acumulando entre 19 y 23 millones de toneladas de plástico anualmente (**UNEP, 2026**). Los residuos PET alteran la diversidad microbiana, la fertilidad y biodisponibilidad del suelo, comprometiendo procesos biogeoquímicos como la descomposición de materia orgánica y el ciclo del nitrógeno (Wang et al., 2025). Consecuentemente, la toxicidad del suelo llega a inhibir el crecimiento y productividad de las plantas, y de estas hacia herbívoros, aves y mamíferos disminuyendo su capacidad reproductiva (**Shi et al., 2024; Yao et al., 2022**). Esta convergencia de rutas de diseminación convierte a los plásticos en contaminantes capaces de alcanzar al ser humano a través de vectores difícilmente controlables. (Habumugisha et al., 2024; Tuuri & Leterme, 2023)El ecosistema acuático es el receptor final de residuos plásticos y se estima que cada año acaban depositándose 11 millones

de toneladas en lagos, ríos y mares (Pires et al., 2025). Todos los niveles alimentarios marinos se ven obstaculizados debido a la disminución acumulativa de las poblaciones por la ingesta directa e indirecta (transferencia trófica) de los fragmentos de polímeros y sus aditivos, provocando elevados índices de muerte por la obstrucción en el tracto digestivo, intoxicación, y desnutrición (Habumugisha et al., 2024; Tuuri & Leterme, 2023).

1.1.2.2. Toxicidad de los plásticos sobre la salud humana

En la fragmentación del PET, también se diseminan compuestos químicos como plastificantes, antioxidantes, pigmentos y estabilizadores térmicos, que se emplean en su síntesis para mejorar las características finales del material (Y. Li et al., 2024). Estos aditivos industriales, al estar enlazados superficialmente a la matriz polimérica, se liberan fácilmente en medios acuosos bajo condiciones fisiológicas de temperatura y pH; presentando un elevado riesgo ecotóxico (Luo et al., 2022). Análisis en diferentes animales han reportado que, en la degradación del PET, el bisfenol A y ftalatos son los principales compuestos en diseminarse y bioacumularse en tejidos vitales debido a la afinidad por las membranas celulares que otorgan sus cargas superficiales, interfiriendo en diferentes procesos biológicos en el sistema reproductivo, endócrino e inmunológico (Lear et al., 2021; Tyc et al., 2025). Tanto las partículas plásticas como los aditivos que liberan generan toxicidad por estrés oxidativo. Al integrarse a las células, se generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que alteran la función mitocondrial, activando vías inflamatorias y de muerte celular, incluido daño en el ADN (Subramanian et al., 2024). En humanos, se estima que una persona ingiere e inhala hasta $1,26 \times 10^5$ y $8,38 \times 10^4$ de partículas por día, respectivamente (K. Liu et al., 2024). La exposición crónica a estos compuestos ha llevado a registrar su presencia en sangre, pulmones e incluso en la placenta (Hoang et al., 2025; Tavakolpournegari et al., 2024; Vethaak & Legler, 2021).

1.1.3. Gestión de residuos plásticos

1.1.3.1. Tratamientos convencionales

Las proyecciones del OECD (2022) señalan que el volumen global de residuos plásticos mal gestionados podrá triplicarse para 2060 en ausencia de políticas de circularidad efectivas, convirtiendo la gestión sostenible del PET en un imperativo ambiental, sanitario y económico sin retorno. Por un lado, el reciclaje mecánico, que procesa alrededor del 90% del plástico circular disponible a nivel mundial (Chan & Zinchenko, 2023), degrada las propiedades del polímero en cada ciclo térmico mediante hidrólisis parcial y oxidación con la desventaja que disminuye la calidad de la materia prima resultante. En cambio, el reciclaje químico abarca

tecnologías como glicólisis e hidrólisis ácida-alcalina que descomponen el PET en sus monómeros constituyentes para su posterior re – polimerización. No obstante, esta estrategia a escala industrial resulta insostenible por sus elevados insumos energéticos, el uso de reactivos corrosivos y tóxicos, aumentando sus costos operativos sin reducir la huella ambiental (**Ellis et al., 2021**). En conjunto, ambas estrategias logran procesar apenas el 10% del plástico producido anualmente, lo que sugiere que la búsqueda de alternativas más eficientes y con menor impacto ambiental.

1.1.3.2. Biodegradación enzimática del PET

La biodegradación enzimática del PET aprovecha la maquinaria metabólica de microorganismos extremófilos y mesófilos capaces de secretar hidrolasas (cutinasas, lipasas y esterases) que rompen los enlaces éster del polímero, liberando los monómeros TPA y EG, tras la despolimerización (**Kawai, 2021**). Estas moléculas pueden ser empleadas para la resíntesis de plástico o para la producción de metabolitos con valor agregado como ácido mucónico, catecol o polihidroxialcanoatos (**Urbanek et al., 2021**). A diferencia de la degradación abiótica, la ruta enzimática opera bajo condiciones de reacción suaves, bajo consumo energético y de reactivos, y no genera subproductos tóxicos, facilitando la integración de procesos de biorremediación y reciclaje (**Kushwaha et al., 2023**).

1.1.4. PETasa de *Ideonella sakaiensis*

Ideonella sakaiensis 201-F6 es una bacteria gramnegativa aislada de residuos plásticos de una planta de reciclaje en Sakai (Japón) (**Yoshida et al. 2016**). Los resultados expuestos mostraron que este microorganismo fue capaz de degradar completamente el film PET después de la sexta semana a 30 °C. Tras un ensayo de comparación de actividad degradativa sobre diferentes matrices poliméricas, la *IsPETasa* mostró mayor preferencia y capacidad de hidrolizar el PET frente a sus enzimas homologas (*TfH*, LCC y FsC). Este microorganismo evolucionó para utilizar el PET como fuente primaria de carbono y energía mediante el sistema enzimático que combina la acción sinérgica de dos enzimas, *IsPETasa* y *MHETasa*. La primera cataliza la hidrólisis de los enlaces éster del polímero generando el monómero MHET como principal producto de la reacción. La segunda, hidroliza el MHET en TPA y EG, completando la conversión del polímero en sus monómeros constituyentes (**Brott et al., 2022**).

1.1.4.1. Estructura y Mecanismo de acción de IsPETasa sobre el PET

IsPETasa es una serina hidrolasa con una arquitectura proteica altamente conservada que adopta el plegamiento canónico $\alpha\beta$ hidrolasa, caracterizada por una lámina β central rodeada de ocho hebras β mixtas (β 1- β 9) y rodeadas por siete hélices α en ambos lados (α 1- α 7) sobre el que se organiza la tríada catalítica S160-D206-H237 (**Figura 1 A, D**) (Joo et al., 2018). El análisis cristalográfico de la enzima (PDB: 5XH3) mostró dos características clave de la enzima: el sitio activo se ubica en una hendidura superficial de 25 – 29 Å de longitud, mucho más flexible que las cutinasas homologas gracias al residuo W185 que promueve interacciones $\pi - \pi$ con el anillo bencénico del sustrato para estabilizarlo a una distancia de 3,6 Å (**Figura 1C,E**) (Han et al. 2017; Joo et al. 2018); IsPETasa contiene dos puentes disulfuro cerca del sitio activo (C203-C239 y C237-C289) que ayudan a mantener la integridad de la triada catalítica, reforzando su actividad sobre las matrices cristalinas superficiales del PET (**Figura 1D**) (Liu et al., 2023)

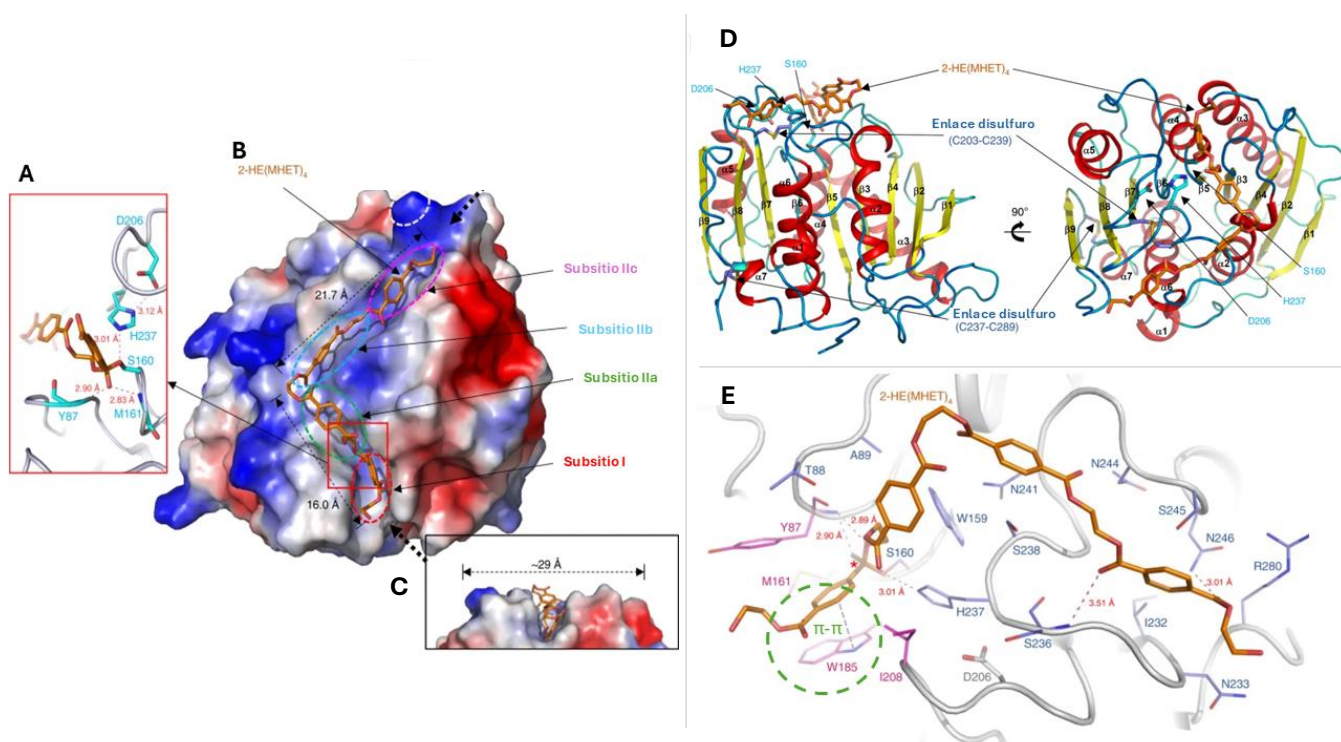


Figura 1. Estructura cristalina y representación del sitio activo de IsPETasa con sustrato de estudio 2-HE(MHET)₄ que imita al PET.

Nota. **A)** Residuos de la Tríada catalítica (cian: S160, H237 y D206) y parte del sustrato 2-HE(MHET)₄ acoplándose (naranja); en líneas entrecortadas se muestran las distancias involucradas en la interacción del agujero oxianión (Y87 y M161) y los residuos de la tríada.

B) Modelo de superficie de potencial electrostático de la enzima con los respectivos sitios de unión con el sustrato (subsitio I, rojo; subsitio IIa, verde; subsitio IIb, celeste; subsitio IIc, morado) flanqueados en círculos entrecortados; el sitio de escisión se resalta en un cuadro rojo. **C)** Vista lateral de la hendidura a la que se acopla el sustrato al sitio activo. **D)** Estructura monomérica representada en cintas por la parte de frontal (derecha) y se gira horizontalmente 90° hacia el lado izquierdo. Se muestran los residuos de la tríada (sticks cian), enlaces disulfuros (stick azul claro) y el sustrato (sticks naranja). **E)** Estructura cartoon de la enzima (gris) y los residuos que participan en la unión del sustrato (sticks naranja) en el subsitio I (magenta) y II (a, b, c: azul claro). Los enlaces de hidrógeno generados entre los residuos y el sustrato se muestran como líneas entrecortadas de color rojo. La interacción π - π entre el residuo W185 y el anillo bencénico del sustrato inicial del subsitio I se encuentra señalada con un anillo entrecortado de color verde. Adaptado de **Joo et al. (2018)**.

La catálisis transcurre mediante un mecanismo de adición-eliminación nucleofílica de dos etapas. En la acilación, H237 extrae el protón de S160 generando el oxianión de la serina, el cual ataca el carbonilo del enlace éster formando un primer intermediario tetraédrico cuya carga negativa es estabilizada por el agujero oxianión (M159 y Y87) (**Burgin et al., 2024; Lu et al., 2022**). El colapso de este libera el primer producto alcohólico y genera el intermediario acil-enzima covalente. En la deacilación, una molécula de agua activada por His237 ataca el carbonilo del intermediario acil-enzima, formando el segundo intermediario tetraédrico cuyo colapso libera el producto ácido carboxílico (TPA o MHET) y regenera S160 (**Burgin et al., 2024; Fecker et al., 2018**)

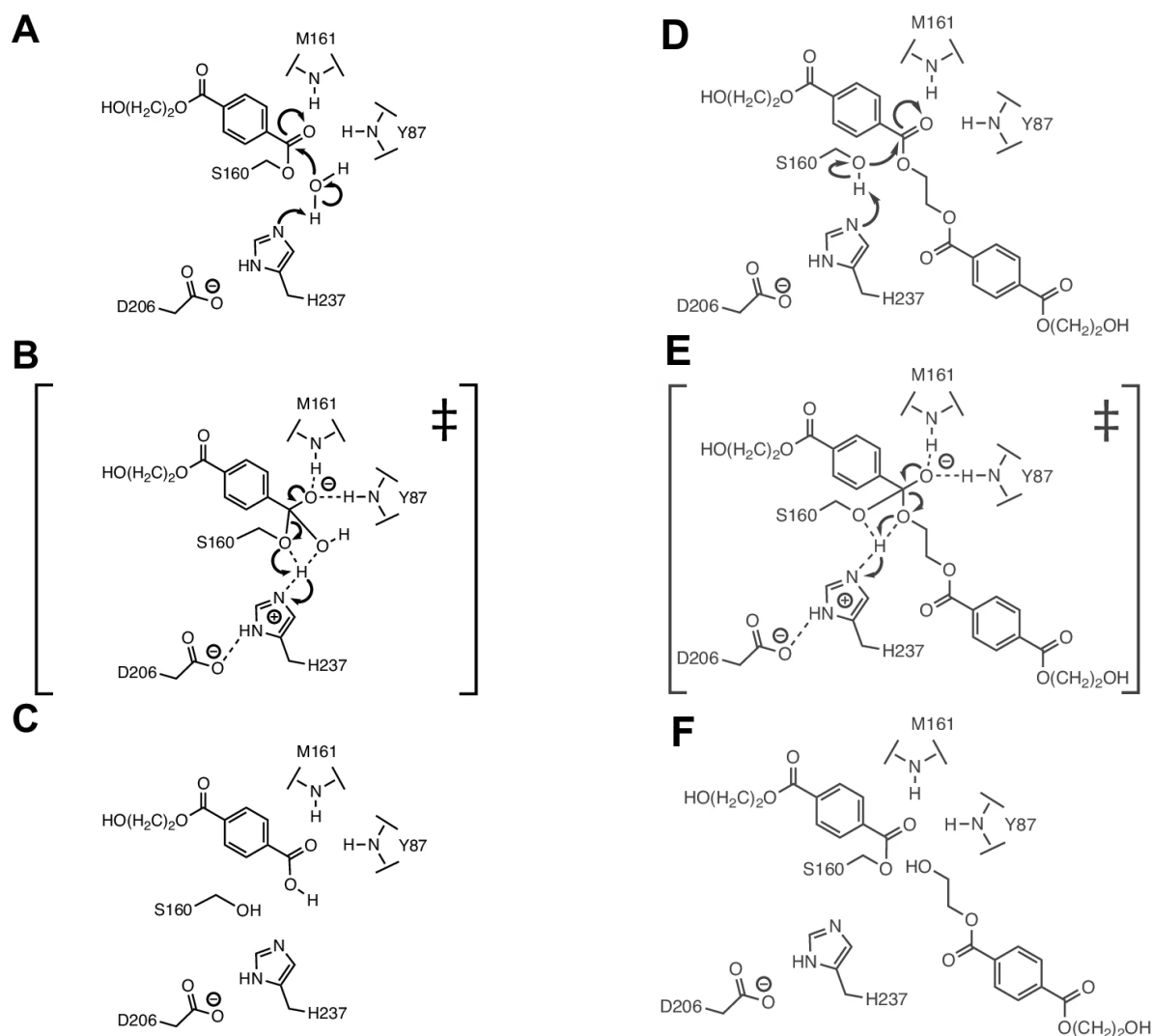


Figura 2. *Mecanismo catalítico de reacción por acilación y desacilación de IsPETasa*

Nota. **A – C)** Mecanismo químico de la reacción de acilación de *IsPETasa*. **A)** Complejo de Michaelis de un dímero PET, donde S160 es activado por H237 y D206 y orientado para atacar uno de los carbonos carboxílicos centrales de los anillos aromáticos del dímero PET. **B)** El carbono carboxílico del dímero adopta una configuración Ts tetraédrica con H237, extrayendo un protón de S160. **C)** El Ts colapsa y escinde el enlace éster con el grupo saliente BHET aceptando el protón de H237 mientras MHET se mantiene unido a la enzima a través de S160 (estado acil-enzima “AEI”). **D – F)** Mecanismo químico de la reacción de desacilación de *IsPETasa*. **D)** Desde el estado AEI, el agua catalítica transfiere un protón a H237 y ataca al carbono carboxilo del fragmento PET acilado. **E)** se adopta una configuración Ts tetraédrica entre el carbono carboxilo y H237. **F)** El Ts colapsa y escinde el enlace acilo entre MHET y S160, regenerando al residuo para regresar a la tríada catalítica tras aceptar un protón de H237, y formar MHET como producto final. Adaptado de **Burgin et al. (2024)**.

1.1.4.2. Limitaciones de la biodegradación enzimática a escala industrial

La principal restricción a escala industrial es la limitada accesibilidad de las enzimas a las diferentes estructuras complejas del sustrato polimérico. La acción enzimática está directamente influenciada por la capacidad de la enzima para acceder a las cadenas poliméricas del PET, característica típica de un mecanismo sustrato limitante (Akram et al., 2024). La temperatura de transición vítrea (T_g) del PET se ubica entre los 65 – 81 °C, punto en el que las cadenas adquieren movilidad suficiente en su capa superficial para el ataque enzimático y consecuentemente la hidrólisis de sus enlaces éster (Thomsen et al., 2022; Wei et al., 2022). Favorablemente, estudios reportan que, en condiciones acuosas, disminuye la T_g superficial hasta 40 – 48 °C debido al efecto plastificante del agua, reduciendo la ordenación molecular en sus cadenas poliméricas, lo que explica la capacidad de enzimas mesófilas como IsPETasa para hidrolizar el PET de cristalinidad <15% a temperatura ambiente bajo estas condiciones de reacción (Ramnath et al., 2026; Tarazona et al., 2022). En este contexto, los biocatalizadores empleados para el reciclaje enzimático del PET deben mostrar un balance óptimo entre termoestabilidad y eficiencia catalítica (Figura 3).

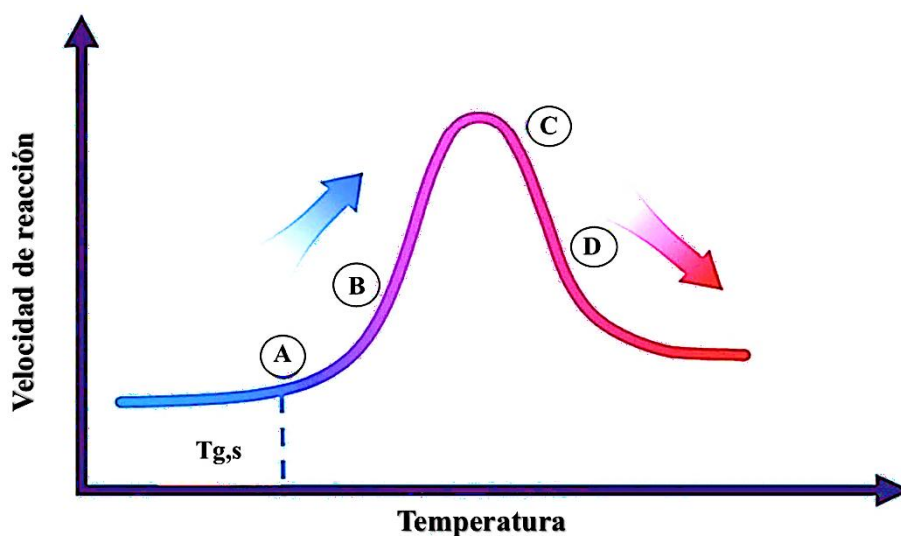


Figura 3. Relación de la actividad catalítica de la enzima frente la temperatura y comportamiento del PET

Nota. La temperatura modula la degradación enzimática del PET mediante el balance entre la transición vítrea superficial y la recristalización del polímero, y la activación e inactivación térmica de la enzima. **A)** Transición de la superficie del PET. **B)** activación de la enzima. **C)** inactivación de la enzima. **D)** Amorfización del PET. Adaptado de Akram et al. (2024).

En la aplicación industrial, es necesario incluir etapas previas de amorfización y micronización del sustrato, sin embargo, estos procesos elevan los costos operativos y el consumo energético. A este problema se añade que la acumulación de intermediarios de reacción, principalmente MHET y BHET, inhibe a la enzima y reduce la velocidad de despolimerización, lo que obliga a incorporar una segunda enzima (MHETasa) para hidrolizar este intermediario en sus monómeros constituyentes (TPA y EG) (Groseclose & Nguyen, 20225).

1.1.5. Ingeniería de enzimas para la optimización de *IsPETasa*

La actividad de *IsPETasa* ocurre a una temperatura óptima de operación entre 20 – 30 °C y se desnaturaliza por debajo de 40 °C, umbral incompatible con las condiciones que maximizan la degradación del PET (Burgin et al., 2024; Chen et al., 2021). A esta fragilidad térmica se suma la baja eficiencia de *IsPETasa* frente al PET post-consumo (>25 %) (Lu et al. 2022,) sin procedimientos de amorfización previos, mecánicos o térmicos, que reduzcan estos índices y hacer del PET enzimáticamente más accesible.

Pese a ello, *IsPETasa* se mantiene como una estrategia potencial en estudios de optimización gracias a su característica particular de presentar un sitio activo altamente flexible, como se mencionó en la sección 1.1.4.1., otorgándole una eficiencia enzimática superior a la de otras enzimas PET hidrolasa termoestables como LCC (Yoshida et al. 2016). Por lo tanto, para aprovechar la excelente capacidad de *IsPETasa* para degradar el PET, con miras a su aplicación a escala industrial, es necesario rediseñar la estructura de la enzima para generar interacciones electrostáticas más fuertes que favorezcan su estabilidad térmica y evitar así su desnaturalización temprana.

El análisis de la estructura cristalina de *IsPETasa* realizado por Son et al. (2019) demostró que la enzima presenta varias regiones con valores de factor térmico (*b*-factor) superiores al promedio, lo cual sugiere que son segmentos con mayor flexibilidad, susceptibles de adoptar diferentes estados conformacionales que contribuyen negativamente a la estabilidad y actividad catalítica a temperaturas elevadas. Esta flexibilidad conformacional, aunque útil para la plasticidad del sitio activo, no se observa en la estructura cristalina de *TfCut* (PETasa termófila), y resulta contraproducente para mantener la integridad global de la proteína en condiciones industriales. Producto de este análisis Cui et al. (2021) se determinó que los segmentos comprendidos por Q119-S121 y S187-T189, localizados en las inmediaciones del sitio activo, son altamente flexibles. Particularmente, S121, S187 y S188 mostraron varios estados conformacionales en sus cadenas laterales probablemente debido a la escasa formación

de puentes de hidrógeno con D186 y otros residuos adyacentes (**Figura 4A**). Por lo tanto, este microambiente es un excelente punto de partida para estabilizar la arquitectura de *IsPETasa* mediante estrategias de evolución dirigida.

1.1.5.1. Desarrollo de la variante DuraPETasa e identificación de residuos clave para el incremento de termoestabilidad en IsPETasa

Cui et al. (2021) desarrollaron *DuraPETasa* mediante una red neuronal convolucional 3D (MutantCNA) que predijo diez mutaciones puntuales en regiones distales al sitio activo para incrementar la estabilidad global de la proteína sin comprometer su actividad catalítica. El resultado fue una variante con una T_m de ~ 77 °C, 31 °C mayor que la enzima silvestre, y capacidad de degradar PET con índices de cristalinidad de hasta 34%. Entre las substituciones introducidas, S188Q e I168R se ubican precisamente en los bucles de alta flexibilidad Q119-S121 y S187-T189 descritos por **Son et al. (2019)**. El análisis de la estructura cristalina de *DuraPETasa* (PDB:6KY5) revela que S188Q establece una red de puentes de hidrógeno con I168R, S121, S187 y el carbonilo del esqueleto de N190, mientras que I168R forma un puente salino con D186, reduciendo colectivamente la flexibilidad conformacional exclusivamente del bucle S187 – T189 (**Figura 4B**) (**Cui et al., 2021**). No obstante, los puentes de hidrógeno, cuya contribución energética individual ($\sim 0,5 - 1,5$ kcal/mol) (**Newberry & Raines, 2016**) es inferior a la de los puentes salinos ($1 - 5$ kcal/mol) (**Nayek et al. 2014**), dejan margen para explorar substituciones que incorporen interacciones iónicas más energéticas en la misma posición.

1.1.5.2. Análisis comparativo de IsPETasa y la cutinasa LCC

La Leaf-branch Compost Cutinase (LCC), caracterizada por **Sulaiman et al. (2012)** a partir de ADN metagenómico de compost, mantiene actividad hidrolítica sobre el PET a temperaturas de hasta 70°C y constituye el referente estructural más relevante para la ingeniería de termoestabilidad en *IsPETasa*. Aunque LCC comparte con *IsPETasa* el plegamiento α/β -hidrolasa y la tríada catalítica (**Figura 4D**), difiere sustancialmente en la arquitectura de los bucles adyacentes al sitio activo. El alineamiento de secuencias reveló que, en las posiciones equivalente a los segmentos Q119-S121 y S187-T189 de *IsPETasa*, LCC presenta las substituciones S188→D193, I168→R173, S121→D129 y, D186→H191 (**Cui et al., 2021; Sulaiman et al., 2012**). Estos residuos conforman una red de puentes salinos entre D193-R173-D129, complementada por puentes de hidrógeno mediados por H191 (**Figura 4C**), que ancla y rigidiza los bucles correspondientes con una cohesión electrostática cualitativamente superior

a la observada en *IsPETasa* silvestre, donde la estabilización de estos segmentos depende únicamente de interacciones hidrofóbicas débiles e interacciones polares de baja energía (Sevilla et al., 2023; Son et al., 2019). Esta comparación establece que la termoestabilidad entre ambas enzimas no reside en el núcleo hidrofóbico ni en el sitio activo, sino en redes electrostáticas específicas de bucles periféricos, ofreciendo una guía estructural precisa para la ingeniería racional de *IsPETasa*.

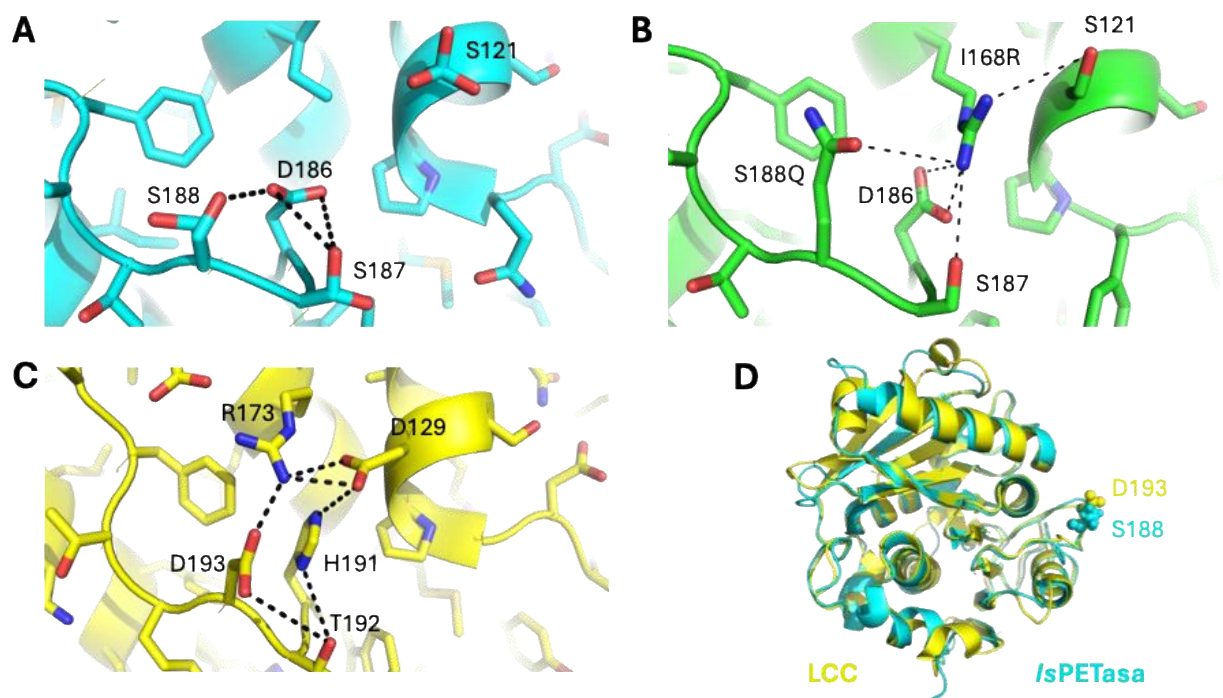


Figura 4. Comparación estructural de las enzimas *IsPETasa*, *DuraPETase* y *LCC*

Nota. **A)** Estructura de la *IsPETasa* silvestre (WT), donde la Serina 188 presenta interacciones hidrofóbicas débiles e inestabilidad térmica. **B)** Variante *DuraPETase* (S188Q), estabilizada mediante una red de puentes de hidrógeno. **C)** Cutinasa *LCC* forma una red de puentes salinos entre D193-R173-D129 y H191. **D)** Enzima *LCC* (amarillo) e *IsPETasa* (turquesa) sobrepuestas. Los residuos D193(amarillo); S188 (turquesa) están representados en modelo de esferas.

1.1.5.3. Diseño de la mutación S188D: Relevancia Estructural y funcional

La sustitución S188D pretende introducir la cadena lateral cargada negativamente del aspartato (CH_2COO^-) en una posición en que la enzima silvestre solo alberga la cadena polar no ionizable de la serina ($-\text{CH}_2\text{OH}$), incorporando así carga iónica en un microambiente que carece de interacciones electrostáticas significativas (Hofer et al., 2020; Zhou & Pang, 2018).

El diseño de esta variante se sustenta en el análisis comparativo con LCC, donde el residuo D193, equivalente a S188 (**Figura 4D**), participa en redes que disminuyen la flexibilidad conformacional de los bucles, brindando mayor eficiencia energética en conjunto con las sustituciones acumuladas de M8 en *IsPETasa*, considerando la dinámica molecular del aspartato dentro de este microambiente para contribuir al anclaje de los segmentos Q119-S121 y S187-T189 y la reducción del *b*-factor (**Burgin et al., 2024; Cui et al., 2021; Sulaiman et al., 2012**).

Con base a estos fundamentos, el presente trabajo evalúa el efecto de S188D sobre la arquitectura del mutante M8 de *IsPETasa*, desarrollado en la Universidad Técnica de Ambato. Se postula que las interacciones iónicas adicionales aportadas por esta sustitución generarán efectos sinérgicos de estabilización con las mutaciones preexistentes en M8, permitiendo a la variante mantener su conformación funcional en el intervalo de temperatura próximo a la *T_g* del PET y, con ello, lograr una degradación eficiente de PET de alta cristalinidad bajo condiciones compatibles con la escala industrial.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Diseñar la variante mutante S188D de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

1.2.2. Objetivos Específicos

- Construir la variante mutante S188D de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*.
- Aislar la variante mutante obtenida utilizando cromatografía de afinidad.
- Evaluar la eficiencia de degradación de la variante S188D de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* sobre el PET.

CAPÍTULO 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. La **Tabla 1** enlista los reactivos, material fungible, las líneas celulares y los equipos empleados en la presente investigación.

Tabla 1.

Lista de reactivos, material fungible y equipos empleados

Reactivos	
Glucosa	Hidróxido de sodio (NaOH)
Acrilamida	Imidazol
Agua desionizada	Kit para la extracción de ADN
Agua destilada	plasmídico
Alcohol etílico	Reactivo de Biuret
Cloranfenicol	SDS
Kanamicina	Tryptona
Agar – Agar	Tris HCl
EDTA	Glicerol
Extracto de levadura	Lisozima
Cloruro de sodio (NaCl)	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido
Fosfato dipotásico (K_2HPO_4)	(IPTG)
Líneas celulares	
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> BL21(DE3) Rosetta
Material fungible	
Cajas Petri de vidrio	Mechero
Columna Ni-NTA	Papel aluminio
Espátulas estériles	Papel film
Frascos de tapa azul	Papel filtro
Gradillas	Pipetas serológicas
Guantes de nitrilo	Probetas

Hisopos	Puntas para micropipetas (2-20 uL, 20-200 uL, 10-1000 uL)
Papel absorbente	
Tubos PCR	Tubos falcon (50 mL y 15 mL)
Matraz Erlenmeyer	Tubos eppendorf
Equipos	
Balanza analítica	Incubadora
Agitador incubador orbital	Incubadora con agitación
Baño termostático	Micropipetas (2-20 uL, 20-200 uL, 10-1000 uL)
Vortex	
Centrífuga	Nanodrop
Autoclave	Potenciómetro
Cámara de electroforesis	Plancha de calentamiento
Cámara de flujo laminar	FPLC
Ultra congelador	Refrigerador
Disruptor celular (Benchmarck Pulse 150)	Termociclador

2.2. Métodos

2.2.1. Construcción de la variante mutante S188D de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*

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

Para el presente proyecto se empleó la secuencia de la variante M8 de la enzima *IsPETasa* 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 S188D

La variante S188D se obtuvo mediante un servicio externo de síntesis, clonación y secuenciación. La sustitución S188D se introdujo en la secuencia del gen *IsPETasa* por mutación *in silico*, considerando la frecuencia de uso en *Escherichia coli* B. El gen sintetizado fue clonado en el vector pET30a (+) a través de los sitios de restricción NdeI y XhoI. Una vez recibido el plásmido generado mediante el servicio, se lo almacenó a -20 °C para análisis posteriores.

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

El plásmido que contiene la secuencia que codifica para la variante S188D 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 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 minutos. Seguidamente, se incorporó 100 ng de vector y se continuó con una incubación en hielo por 30 minutos 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 2**) y se incubó la suspensión a 37 °C durante 90 minutos bajo agitación constante a 220 rpm. Posteriormente, se sembró en placas de agar LB (Luria-Bertani) suplementadas con kanamicina, y se incubó 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, a fin de iniciar el cultivo líquido para su posterior conservación y verificación de la mutación mediante secuenciación.

Tabla 2.

Medios de cultivo empleados

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
Triptona	20 g	10 g
Cloruro de potasio (KCl)	0.186 g	-
Sulfato de magnesio (MgSO ₄)	2.4 g	-
Agar	-	20 g

Nota. Se ajustó el pH a 7.0 con Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M. Para la elaboración de medios líquidos se omitió la adición de Agar. Adaptado de **Agilent Technologies (2015)** y **Sigma-Aldrich (2013)**.

2.2.1.4. Extracción del ADN plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se desarrolló con el kit GenElute Plasmid Miniprep, siguiendo la metodología descrita por el fabricante (**Sigma-Aldrich, 2013**). Los cultivos fueron sometidos a centrifugación ($12000 \times g$) durante un minuto. Seguidamente, se descartó el sobrenadante, mientras que el pellet se resuspendió mediante la adición de 200 μ L de solución de suspensión y agitación en vórtex.

Posteriormente, se incorporó 200 μ L de solución de lisis y se realizó una mezcla por inversión de 6 a 8 veces, hasta observar una solución clara y viscosa. Para precipitar los restos celulares, se adicionó 350 μ L de solución de neutralización, realizando nuevamente una mezcla por inversión de 4 a 6 veces, seguida de una centrifugación a una fuerza de $12000 \times g$ durante 2 minutos. A continuación, se insertó una columna GenElute Miniprep en un tubo de microcentrífuga y se equilibró con 500 μ L de solución de preparación y se centrifugó a $12000 \times g$ durante un minuto para luego desechar 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.

Se adicionó 750 μ L de la solución de lavado a la columna y se centrifugó a $12000 \times g$ 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 se transfirió a un tubo de recolección estéril, al que se adicionó 100 μ L de solución de elución (o agua estéril grado biología molecular) para llevarla a una última centrifugación de $12000 \times g$ por un minuto para la recuperación del ADN plasmídico, cuya concentración y pureza se determinó mediante Nanodrop 2000.

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

La metodología de transformación de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, para la expresión de las variantes mutantes, fue la misma descrita en la sección 6.1.3. mediante choque térmico, con la única diferencia que también se añadió cloranfenicol al medio de cultivo.

2.2.1.6. Expresión de la variante S188D 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 (2022)**. En primera instancia, se tomó una colonia de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta previamente transformada con el plásmido que porta la variante mutante y se inoculó en 25 mL de caldo LB suplementado con kanamicina (50 μ g/mL) y cloranfenicol (34 μ g/mL).

Este cultivo se incubó 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 LB con los mismos antibióticos, continuando la incubación a 37 °C con agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,6 y 0,8 (aproximadamente 4 horas). Al alcanzar la densidad óptica requerida, se indujo la expresión génica mediante la adición de IPTG (isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 0.1 mM, y se mantuvo la incubación a 20 °C durante 18 a 24 horas adicionales. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 4000 rpm y 4 °C por un periodo de 20 minutos 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, 5 mM de imidazol 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 (Dermitt & Mardakheh, 2021).

2.2.2.2. Purificación de la proteína

Obtenido el lisado, se procedió con una centrifugación a 2100 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 se cargó en la columna, se aplicó un lavado utilizando de cinco a diez volúmenes del mismo tampón, para remover proteínas unidas de forma inespecífica. La elución de la enzima PETasa recombinante se realizó mediante la aplicación de un tampón que contenga 250 mM de imidazol, recolectando las fracciones eluidas en alícuotas de 0,5 mL en tubos estériles. Posteriormente, las fracciones que contenían 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 eficiencia de degradación de la variante S188D 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 peso constante. Una vez completado este proceso, el PET se incubó con 500 µL de tampón 1 M fosfato de potasio pH 8.0, tanto en presencia como en ausencia de la enzima mutante (en una relación 1.5 mg de enzima por gramo 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 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. Diseño de la variante *IsPETasa* S188D

3.1.1.1. Criterio de frecuencia de codones para la sustitución S188D

La elección del codón para introducir la sustitución S188D sobre el gen de *IsPETasa* en *E. coli* no es una decisión trivial de diseño, sino que refleja la tensión entre dos criterios técnicos con consecuencias prácticas directas sobre el rendimiento de la expresión y la calidad de la proteína recombinante. El ácido aspártico dispone de dos codones sinónimos para el sistema *E. coli*: GAU y GAC, cuyas frecuencias de uso relativo en *E. coli* son del 33,7% y 17,9%, respectivamente (**Nakamura, s.f.**). Seleccionar codones sinónimos de alta frecuencia en el genoma del huésped mejora la eficiencia de traducción y el rendimiento de la proteína expresada, de modo que la optimización de codones es un factor central en la producción de proteínas recombinantes. Sin embargo, la maximización del índice de adaptación de codones (CAI) no garantiza por sí sola la obtención de una proteína funcional (**Baddam et al., 2025**). La sobreutilización de codones de alta frecuencia puede inducir desequilibrios en los grupos de ARNt y estrés metabólico que comprometen la solubilidad y la estabilidad de la proteína expresada (**Hiraga et al., 2021**). Desde este punto de vista, el codón GAC ofrece una frecuencia suficiente y práctica para sostener una traducción eficiente en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta sin saturar los posibles grupos de ARNt correspondientes, lo que la hace preferible en contextos donde la calidad del plegamiento es tan crítica como el rendimiento de expresión (**Li et al., 2025**).

El segundo argumento a favor de GAC proviene del diseño de los oligonucleótidos de mutagénesis. En mutagénesis dirigida por PCR, el número de desapareamientos entre el cebador mutagénico y el molde determina la estabilidad del dúplex formado y, por tanto, la eficiencia de amplificación del producto mutante (**Varela-Castillo et al., 2026**). Los métodos basados en cebadores mutagénicos se apoyan en el apareamiento del oligonucleótido a la secuencia complementaria del molde, y los desapareamientos en posiciones designadas facilitan las sustituciones de codones; minimizar estos desapareamientos reduce el costo energético de la hibridación (**Watts et al., 2021**). Si el codón original de la S188 en el gen de *IsPETasa* optimizado para *E. coli* es AGC o TCC, el cambio hacia GAC requiere menos sustituciones de bases nitrogenadas que el cambio hacia GAT, lo que se traduce en una temperatura de fusión del dúplex cebador-molde optimizada y en una mayor probabilidad de

éxito en el ciclo de amplificación (Y. Wang et al., 2016). El diseño de cebadores para mutagénesis dirigida busca minimizar la energía libre del dúplex con desapareamientos para reducir el costo energético de la mutación y maximizar el rendimiento del producto mutante. La elección de GAC mantiene una frecuencia de codón aceptable para la maquinaria ribosomal de *E. coli* y reduce la complejidad técnica del oligonucleótido de mutagénesis (Baddam et al., 2025; Jiang et al., 2024).

Esta decisión adquiere mayor relevancia cuando se considera la sensibilidad conformacional de IsPETasa. La sustitución S188D se introduce en el bucle S187-T189, adyacente al bolsillo de unión al sustrato, una región que los análisis de *b*-factor de Son et al. (2019) identificaron como de alta flexibilidad y que participa directamente en la estabilidad global de la enzima. Tanto los codones de alta como baja frecuencia contribuyen positivamente a la solubilidad de las proteínas recombinantes, y la sustitución sistemática de codones poco frecuentes por los preferentes del huésped puede derivar en la formación de agregados insolubles por plegamiento incorrecto (Baddam et al., 2025). Traducir a velocidad máxima una región estructuralmente sensible puede desincronizar el avance del ribosoma de la cinética de plegamiento co-traducciona de los bucles circundantes al sitio activo, un riesgo que la elección de GAC puede llegar a atenuar al no alcanzar la frecuencia máxima de uso (Jiang et al., 2024; Watts et al., 2021). En el contexto del mutante M8, que ya porta sustituciones acumulativas en estas regiones, preservar las condiciones que favorecen un plegamiento correcto es tan importante como asegurar un nivel de expresión adecuado para los ensayos de degradación de PET. No obstante, este criterio puede ser reafirmado o refutado después de los procesos de purificación en la sección 3.1.2.1. que demuestren la viabilidad proteica de la variante propuesta en unidades de concentración.

3.1.1.2. Criterios de clonación *in silico* de la variante IsPETasa S188D

La construcción del plásmido recombinante se planteó a partir de un diseño *in silico* orientado a generar un sistema de expresión eficiente y controlado para la variante mutante S188D de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. Para ello, se optó por la síntesis del vector mediante un servicio externo especializado que permitiera obtener un constructo altamente preciso, lo que garantizó la fidelidad del ensamblaje desde el inicio del proceso experimental, minimizando los riesgos asociados a metodologías de clonación, como digestión y ligadura (Ramírez et al. 2024), reduciendo significativamente el tiempo experimental, un factor limitante en la naturaleza de este proyecto.

Para el sistema de expresión, se seleccionó el vector pET-30a (+), que constituye una de las plataformas predominantes para la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (**Dvorak et al., 2015**). Su elección se fundamenta en las características estructurales que presenta (**Figura 5**) pues la presencia del promotor T7 en combinación con el operador Lac (*lacO*) permite una regulación estricta de la transcripción en ausencia del inductor IPTG, minimizando la expresión basal que podría resultar tóxica para el huésped o generar presión selectiva sobre el constructo (**Du et al., 2021; Zhao et al., 2018**); el gen regulador *lacI* incorporado en el vector asegura, en cambio, la represión en condiciones no inductoras; el origen de replicación ColE1 mantiene un alto número de copias por células garantizando elevados niveles de transcripción de ARNm; y el marcador de resistencia a kanamicina (KanR) proporciona una estable selectividad y compatibilidad con el sistema de expresión *E. coli* BL21(DE3) Rosetta (**Khananisho et al., 2023**). Esta arquitectura ha demostrado ser particularmente eficaz para la producción de mutantes y otras enzimas homólogas de *IsPETasa*, como documenta **Carter et al. (2024)** y **Ke et al. (2012)** en la expresión de variantes cutinasas e hidrolasas, respectivamente.

La inserción del gen codificante se diseñó entre los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* del Sitio de Clonación Múltiple (MCS) del vector, una combinación ampliamente adoptada en la aplicación de ingeniería de proteínas (**Goulas et al., 2014**). Según **Danaher Life Sciences (2022)** esta elección favorece una inserción direccional, disminuye la probabilidad de eventos de autoligación y asegura la correcta orientación del inserto. *NdeI* genera extremos cohesivos de 4 nucleótidos e incorpora el codón de inicio ATG dentro de su secuencia de reconocimiento, lo que permite preservar el inicio de la traducción del gen sin necesidad de introducir nucleótidos adicionales que podrían generar aminoácidos no deseados en el extremo N-terminal de la proteína expresada. *XhoI*, por su parte, actúa en el extremo 3' de la secuencia codificante, asegurando la integridad de la región final del gen y su fusión con la etiqueta de purificación de histidinas (6xHis) incorporada en el extremo C-terminal del vector, la cual desempeña un papel fundamental en el proceso de purificación (**Hayat et al., 2018; Ramos et al., 2004**).

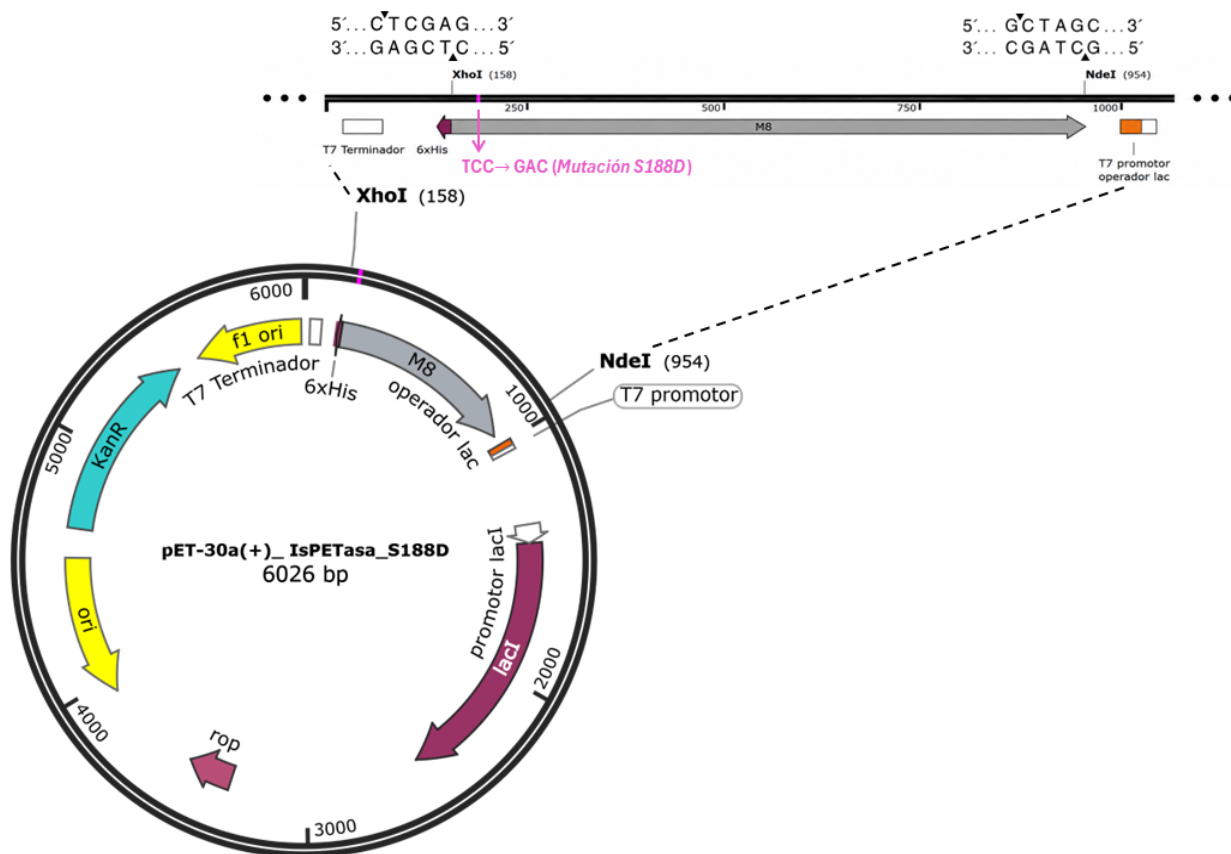


Figura 5. Plásmido pET-30^a(+) con variante mutante IsPETasa S188D

Nota. El constructo IsPETasa S188D presenta un gen de resistencia a kanamicina (KanR), un promotor T7 inducible por IPTG, un operón *lac* y una secuencia codificadora de etiqueta 6xHis C-Terminal. En color gris se encuentra flanqueada de manera lineal la enzima M8 sobre la cual se genera la mutación S188D; en color rosado se señala el sitio estimado de mutación y la sustitución realizada de dos nucleótidos. Se resalta los sitios de corte del MCS *NheI* (G/CTAGC) y *XhoI* (C/TCGAG).

La variación S188D se generó dentro de la arquitectura de M8 la cual presenta mutaciones acumulativas. Aunque, las cadenas hidrofóbicas se encuentran internamente durante el plegamiento de la proteína, el microentorno estructural superficial de la proteína cercana al sitio de sustitución es hidrofílica, ya que los residuos, tanto el aspartato como la serina, son polares y ofrecen especificidad (Zhou & Pang, 2018), con la variación de que el primero ofrece una carga negativa gracias a la pérdida de los protones de sus grupos carboxilo ($-COOH \rightarrow -COO^-$) mientras que el segundo posee carga neutra al no perder protones (Hofer et al. 2020),

y allí yace la diferencia entre la formación de interacciones electrostáticas relativamente fuertes y rígidas, y la solubilidad de la proteína (Quiao et al., 2019).

3.1.1.3. Expresión y rendimiento de biomasa de variante mutante S188D en *E. coli* BL21 (D3)

Para la expresión heteróloga se empleó el sistema *E. coli*, que partió con la multiplicación del plásmido en *E. coli* DH5 α y, posteriormente, la expresión de la enzima fue mediada por *E. coli* BL21 (DE3) Rosetta. La ventaja de este último hospedador es su plásmido provisional. pRARE, que provee ARNt adicionales que mejoran la traducción de codones poco frecuentes en *E. coli* y disminuye la síntesis de productos incompletos o terminaciones prematuras (Pouresmaeil & Azizi, 2023; Tegel et al., 2010). Además, este hospedador promueve la sobreexpresión y la solubilidad de la proteína en la fase inductora, una vez acumulada la biomasa en la fase no inductora (Du et al., 2021). Todas estas consideraciones permitieron una adecuada síntesis y plegamiento de la IsPETasa gracias a que el diseño adoptó eficazmente el sistema de expresión T7, ampliamente utilizado en proteínas recombinantes, donde el promotor T7-lacO es reprimido por *lacI* en ausencia del inductor IPTG, reduciendo la expresión basal del gen clonado. Una vez añadido el inductor, este se une a *lacI*, baja su afinidad por el *lacO* y permite iniciar la transcripción de los genes por la ARN polimerasa T7, bajo condiciones específicas que promueven una inducción eficiente de la proteína en el huésped (Studier, 2018).

Se garantizó la expresión selectiva en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta, gracias a las consideraciones mencionadas anteriormente y el marcador de resistencia a kanamicina (KanR), logrando cribar aquellas células con el sistema plasmídico establecido y, se corroboró gracias a la obtención de colonias, que no hubo una inducción fuerte que genere toxicidad en el sistema bacteriano ni se vieron afectadas rutas metabólicas relevantes, indicando viabilidad celular (Dvorak et al., 2015). Los clones recombinantes obtenidos tras la transformación fueron seleccionados en función de su capacidad de crecimiento en medio LB suplementado con kanamicina y cloranfenicol, lo que permitió asegurar la incorporación y mantenimiento del constructo plasmídico en *E. coli*. Posteriormente, las células transformadas se emplearon para la expresión de la variante mutante S188D mediante inducción con IPTG a una concentración final de 0,1 mM, una vez alcanzada una densidad óptica de $OD_{600} = 1,187$. Tras la incubación, centrifugación y recuperación del pellet, se obtuvo un peso de biomasa húmeda final de 2,035 g de células en 550 mL de LB, con un rendimiento de 3,7 g/L, un valor que varía entre estudios

de resultados consistente con los rangos reportados para cultivos de *E. coli* BL21(DE3) Rosetta en LB a temperaturas óptimas (Bell et al., 2022).

Estudios destacan que inducir tempranamente las células ($OD_{600} \approx 0,1$) a bajas temperaturas pueden priorizar eficazmente la solubilidad de la proteína, la inducción a una densidad $OD_{600} \approx 0,4 - 0,6$ (log medio), resulta más productivo (Rajacharya et al., 2024; San-Miguel et al., 2013). En este sentido, se ha demostrado que el punto óptimo de inducción puede generar densidades celulares más elevadas en función del medio de cultivo, la cepa hospedadora, la carga metabólica asociada a la sobreexpresión y, de manera crítica, las características estructurales de la proteína recombinante, incluidas sus mutaciones específicas (Mühlmann et al., 2017).

3.1.2. Aislamiento de la variante mutante *IsPETasa* S188D por cromatografía de afinidad

3.1.2.1. Evaluación de la eficiencia de purificación de la mutante *IsPETasa* S188D

El extracto celular correspondiente a la variante mutante *IsPETasa* S188D fue sometido a un proceso de purificación mediante cromatografía de afinidad (IMAC) utilizando una columna de Ni-NTA. Esta estrategia es ampliamente utilizada para la recuperación selectiva y cuantificación de proteínas recombinantes con etiquetas de histidina (His-tag) pues el principio se basa en generar sitios de unión coordinados por el ácido nitrilotriacético (NTA), ligando quelante que inmoviliza el Ni^{2+} , y este último coordina con las colas de histidinas permitiendo retener de manera específica la proteína de interés (Jiang et al., 2025; Völzke et al., 2023). Finalmente, la adición de imidazol a la columna compete con la enzima para coordinarse con el metal, bloqueando la unión previa y liberando la proteína en la etapa de elusión (Hajihassan et al. 2024; Loughran et al., 2023).

Como se evidencia en el perfil cromatográfico de la variante enzimática *IsPETasa*S188D (Figura 6) se distinguen claramente dos señales del proceso de purificación. En la fase de carga y lavado se observa una señal sostenida hasta los primeros 39 mL, representando el paso de las proteínas y restos celulares sin afinidad a la resina Ni-NTA hasta desechar todos los contaminantes de la columna con un descenso y estabilización de la señal, sugiriendo efectividad en el proceso de purificación. La segunda señal, muestra la fase de elusión con un único pico definido y simétrico, que confirma un adecuado grado de pureza de la proteína, aunque con una absorbancia máxima de 894 mAU, relativamente menor a comparación de otros estudios que superaban los 1500 mAU en variantes mutantes de *IsPETasa* a 280 nm (Chancusig, 2026; Dután, 2026; Molina, 2026). La probabilidad de que esta disminución se

deba a la baja expresión de la proteína soluble que produce *E. coli* (Carter et al. 2024; Lizhu et al. 2022) es baja al comparar las variantes mutantes previas que expresaron efectivamente en el sistema bacteriano. Así que, la generación de cuerpos de inclusión o agregados insolubles de la proteína que se perdieron en el proceso de lisis celular se puede deber a un posible colapso hidrofóbico por la repulsión electrostática local del aspartato con otros ácidos circundantes al carecer de mutaciones compensatorias de carga positiva (I168R o I168K), desplegando el bucle $\beta 6$ - $\beta 7$ y exponiendo el núcleo hidrofóbico interno, y finalmente obtener los agregados insolubles (Cui et al., 2021).

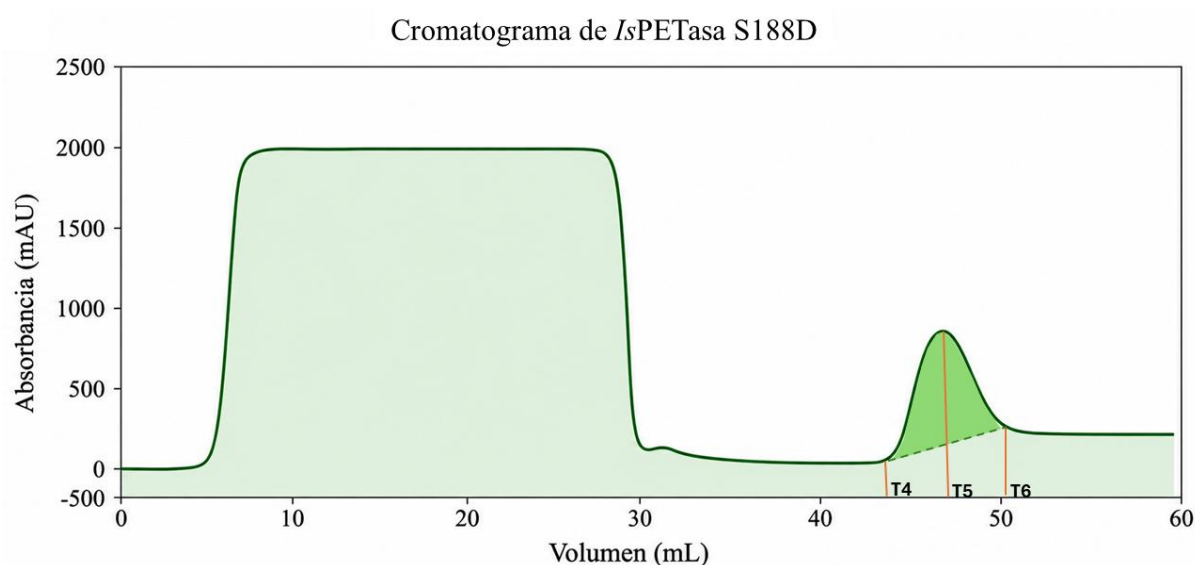


Figura 6. Perfil cromatográfico del proceso IMAC-Ni-NTA de la variante *IsPETasa* S188D

Nota. El perfil cromatográfico muestra el proceso de purificación de la proteína de interés en unidades de absorbancia mAU a 280 nm y en volumen (mL). El área del cromatograma (verde claro) se evidencia el pico simétrico resaltado (área verde intenso), limitado por el hombro inicial, el punto de absorbancia máximo y el final del hombro donde se registra las fracciones T4, T5 y T6 (líneas rojas), respectivamente, que fueron recolectadas cada 1 mL por el equipo ÄKTA Start.

Pese a la consideración anterior, la presencia de este pico de la proteína eluida, registrado entre la elución 42,75 – 50,75 mL que ubica las fracciones T4, T5 y T6 (**Figura 6**), se puede comprobar más adelante para determinar la cantidad y el rendimiento de la purificación de la proteína propuesta. Además, se evidencia el desplazamiento adecuado de la proteína purificada de la columna cargada con iones de níquel (Ni^{2+}) al añadir imidazol para liberación y recolección. En este contexto, Yu et al. (2021) han reportado perfiles similares con picos simétricos durante la purificación de variantes mutantes, asociando este patrón a un

plegamiento estructural estable y a una buena homogeneidad conformacional para coordinar eficientemente la 6xHis-tag con la resina.

El proceso de purificación permite estimar la concentración de la proteína soluble eluída sin interferencia del tampón de intercambio. Primeramente, para determinar el valor aproximado de masa se aplicó la ley de Beer – Lambert aplicada directamente para celdas de flujo continuo, mediante la detección UV-vis obtenida:

$$A = \epsilon \times l \times C$$

$$C = \frac{\text{área}_{\text{pico}} \times 10^{-3}}{\epsilon \times l} \times PM \times 1000$$

Ecuación 1

El área bajo la curva ($AUC = AU \times mL$) representa el área entre la señal del detector UV-Vis y la línea base a lo largo del volumen de elución, el pico donde se detecta la proteína. El área del triángulo del pico (base: 6.5 mL; altura del triángulo: 864 – 93=771 mAU) es igual a un área de $2\,505,75 \times 10^{-3} mAU \cdot mL$ o a su vez $AUC = 2,506 AU \cdot mL$. El área del pico resultante equivalente a la absorbancia $\text{área}_{\text{pico}} = 0,386 AU$. Se definió el coeficiente de extinción (ϵ) de IsPETasa S188D es de $37\,150 M^{-1} \cdot cm^{-1}$ con un peso molecular (PM) de 28835.01 g/mol. La longitud del camino óptico (l) de la celda ÄKTA Start es de 0.2 cm, según especificaciones del fabricante (**Cytiva Life Sciences, 2020**). Reemplazando cada valor expuesto en la **Ecuación 1** se obtuvo una concentración total de 1,50 g/L.

3.1.2.2. Eficiencia de las fracciones purificadas post filtración

Una vez recolectadas las fracciones, se transfirieron a una columna de filtración en gel por gravedad para el desalado e intercambio de tampón, para la cuantificación de cada fracción por NanoDrop 2000. Los valores registrados por el equipo (**Tabla 3**) a 280 nm, aplicaron la misma ley de Beer – Lambert para cuantificar la concentración específica de las fracciones con mayor presencia proteica de la variante S188D. Se consideró una longitud del paso óptico 1.0 cm y los mismos valores de ϵ y peso molecular de la mutante propuesta.

Tabla 3.

Valores obtenidos de las fracciones recuperadas y filtradas en gel

Fracción	Absorbancia	Concentración mg/mL
1	0,061	0,047
2	0,073	0,057
3	0,97	0,753
4	1,725	1,343
5	1,480	1,149
6	1,0	0,776
TOTAL		5,662
FG	1,978	1,537

Nota. La fracción FG comprende la mezcla de la fracción 4 y 5 que presentaron mayor presencia de proteína soluble de manera preliminar en el perfil cromatográfico po IMAN-Ni-NTA. El total de la cantidad de enzima neta es de 5,662 mg en 6 mL.

La **Tabla 3** evidencia los valores de concentración que permitieron establecer criterios para escoger la fracción con mayor concentración proteica para los ensayos de degradación posteriores. Las concentraciones de cada fracción muestran que la mayor recuperación de proteína se presentó en las fracciones T4 y T5 con una concentración de 1,343 y 1,149 mg/mL, respectivamente. Estos valores coinciden con la región central del pico en el perfil cromatográfico, confirmando que la mayor parte de la proteína recombinante fue eluída en dicho intervalo. En consecuencia, ambas fracciones se combinaron con el fin de aumentar la concentración a 1,537 mg/mL, similar a la obtenida en la concentración total del pico obtenido en el cromatograma, demostrando que se mantuvo la estabilidad operativa de la proteína pues no existió una pérdida significativa de la misma en el proceso de filtración en gel (**Rosano & Ceccacerelli, 2024**).

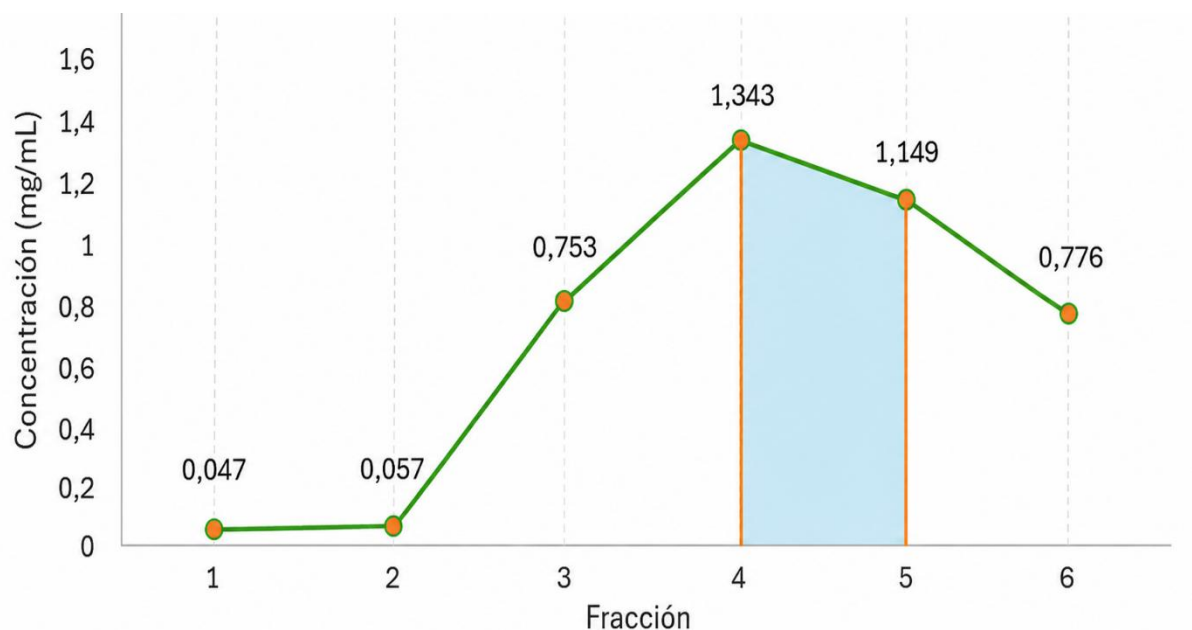


Figura 7. *Concentración de fracciones post-filtración*

Nota. La línea verde continua representa el ajuste por interpolación polinómica cúbica de Hermite (PCHIP) de las concentraciones reales obtenidas mediante la ley de Beer-Lambert, con el coeficiente de extinción de masa específico corregido de la variante. Los marcadores circulares naranjas señalan la concentración en mg/mL de cada alícuota de 1,0 mL. La región sombreada en celeste corresponde al pool central purificado, integrado por las Fracciones 4 y 5, con una masa neta combinada de 2,492 mg de enzima soluble en un volumen total 2.0 mL.

Elaboración propia (2026).

Tabla 4.*Rendimientos obtenidos tras la purificación de la variante IsPETasa S188D*

Parámetro Operacional	Volumen / Masa
Biomasa húmeda total	2,035 g
Medio de cultivo LB usado	0,550 L
Fracción de elución 4	1,343 mg/mL
Fracción de elución 5	1,149 mg/mL
Pool enzimático homogenizado	2,492 mg
Rendimiento / Biomasa	1,22 mg E/g
Rendimiento / Volumen	4,53 mg E/L medio LB

Los resultados obtenidos sugieren un rendimiento menor al esperado en estudios previos de mutantes *IsPETasa*, posiblemente se vió comprometido por el sistema de expresión de *E.coli* para recombinar la enzima lo que disminuyó el rendimiento de la proteína pese a que se obtuvieron resultados aceptables y discutibles en los procesos de purificación (Bell et al., 2022; Son et al., 2020).

3.1.2.3. Análisis de la pureza de *IsPETasa S188D* por SDS-PAGE

Por otra parte, el análisis SDS-PAGE permitió corroborar la pureza y estimar el peso molecular de la variante *IsPETasaS188D* posterior a la purificación (**Figura 7**). El gel mostró una banda predominante, en la columna 5, 6 y 4-5, cercana a la banda 30 kDa del ladder (28.8 kDa) que concuerda con el peso molecular reportado para la PETasa nativa y sus variantes recombinantes por mutagénesis (**Bell et al., 2022; Yoshida et al., 2016**). La presencia de una banda definida respalda la eficacia del proceso de purificación y confirma que las fracciones seleccionadas por separado y el pool de la fracción T4+T5 contienen la proteína de interés, aunque no se evidenció esta banda en la muestra 4, lo que sugiere un error de ejecución durante la carga del gel, pues previamente se confirmó la presencia de enzima en esta fracción en el FPLC.

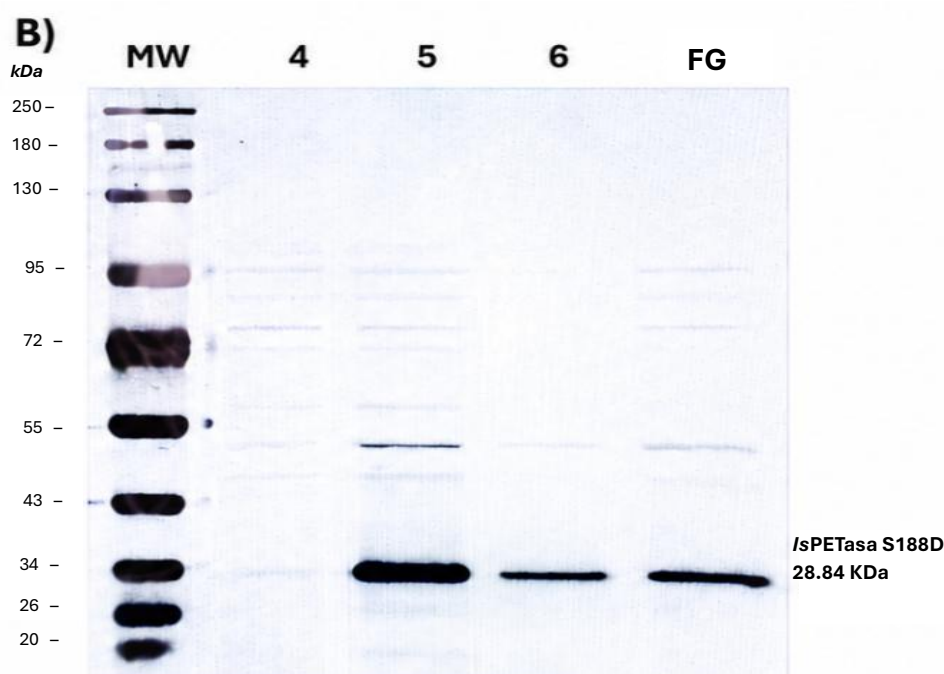


Figura 8. SDS-PAGE de la variante *IsPETasaS188D*

Nota. MW: marcador de peso molecular; 4, 5, 6: fracciones que conforman el pico de elución de *IsPETasaS188D* mediante durante la cromatografía de afinidad; FG: mezcla de las fracciones con mayor concentración (4 y 5) tras la purificación en la columna PD10.

El SDS-PAGE también muestra ligeramente otras bandas de mayor peso molecular, lo que sugiere la presencia de productos parcialmente degradados pero activos de la enzima denominados homodímeros funcionales o proteínas propias del huésped que se co-purificaron por afinidad residual con la IMAC-Ni-NTA (**Robichon et al., 2011; Zhang et al., 2019**). En

conjunto, los resultados de la purificación respaldan la eficacia de la estrategia utilizada para la obtención de proteínas recombinantes de alta pureza.

3.1.3. Degradación del PET por variante *IsPETasa* S188D

Una vez confirmada la pureza de la enzima mutante S188D, se procedió a evaluar la capacidad de degradación de PET para comprobar si la variante propuesta presentaba actividad catalítica sobre el sustrato de estudio. El PET no se sometió a ningún pretratamiento de amorfización térmico para reducir su cristalinidad. Únicamente, se recolectó botellas PET post-consumo, las cuales se lavaron, se secaron y pasaron por un proceso de molienda hasta obtener un PET <1mm. **Wei et al. (2025)** mencionan que este proceso de micronización puede inducir cambios en el orden molecular, lo que denominan como fenómeno de “*cristalización inducida por deformación*” (**Jabarin, 1992**), donde el PET sufre un estrés mecánico, sometiendo a que las cadenas poliméricas con menor ordenamiento originalmente, se alineen y se empaqueten en estructuras altamente ordenadas (más cristalinas) a comparación de partículas más grandes. Aunque resulta una contradicción técnica la relación inversa entre el tamaño de partícula y su cristalinidad, es necesario considerar esta observación en el ensayo de degradación pues triturar el PET. Sin embargo, incrementando el área superficial para que las enzimas tengan más puntos de ataque, aumenta la velocidad inicial de reacción (**Brizendine et al., 2022**), los resultados del rendimiento de degradación se pueden ver comprometidos por la falta de accesibilidad al sustrato al someterse exclusivamente a este tratamiento. En condiciones industriales es necesario considerar el pretratamiento térmico (fusión ~260 °C y enfriamiento rápido) para disminuir estos niveles de cristalinidad y permitan a las enzimas acceder fácilmente a las cadenas poliméricas e hidrolizarlas (**Groseclose & Nguyen, 2025**).

Para el ensayo se optó por una metodología simple y directa como es la cuantificación por pérdida de masa que permite comprobar y estimar el grado de degradación del PET, puesto que la tasa de pérdida de masa es intrínsecamente proporcional al área superficial del plástico (**Chamas et al., 2020**). Sin embargo, estos estudios requieren de análisis más robustos con enfoques múltiples que analicen a profundidad si se produce una erosión superficial o parcial de sus monómeros (**Tarazona et al., 2022**) Los resultados obtenidos en el estudio, empleando esta metodología directa contemplando replicabilidad y reproducibilidad, demuestran que existe una actividad catalítica por parte de la enzima mutante *IsPETasa*S188D a 50 °C, pues se partió con un promedio de 125.3 mg de PET previamente procesado y la reacción se finalizó a las 72 horas con lavados de DMSO y alcohol 96%, respectivamente, se dejó secar hasta

eliminar toda la humedad, obteniendo un promedio de materia residual de 108,77 mg (**Anexo 1**). La degradación de PET fue de 13,22% con una desviación estándar de 2.15 (**Anexo 2**).

Estos valores, comprueban que la sustitución S188D en la arquitectura M8 si favoreció a la estabilidad conformacional y funcional de la proteína en condiciones industriales, incluso frente al elevado índice de cristalinidad del sustrato empleado al no someterse a un proceso de amorfización previo. Aunque la variante *IsPETasa* S188D presenta un rendimiento menor al de otras variantes con sustituciones puntuales (**Tabla 5**), la enzima propuesta si presenta un rendimiento significativamente mayor a temperaturas elevadas (50 °C) que la enzima silvestre la cual tuvo un rendimiento de degradación de PET amorfo de 1.74% a 30 °C las primeras 24 h (**Yoshida et al., 2016**). A comparación de enzimas con más de 10 mutaciones acumulativas (*DuraPETasa* y *HotPETasa*) o aquellas sustituciones en bucles puntuales directamente relacionados con el sitio activo (*ThermoPETasa* y *FastPETasa*) (**Tabla 5**), la variante S188D tiene un desempeño ligeramente bajo debido al diseño parcial de las mutaciones introducidas hasta la arquitectura M8, no obstante, el estudio abre paso para promover la formación de nuevas interacciones electrostáticas que resulten en un aumento de la *T_m* y la capacidad de la enzima para hidrolizar de manera eficiente y eficaz el PET a temperaturas que oscilen los 70 °C, favoreciendo la accesibilidad al polímero para el ataque enzimático sin necesidad de someter el sustrato a pretratamientos costosos.

Tabla 5. Principales mutantes de *IsPETasa* y su desempeño en la degradación de PET

Enzima	Mutación	Condiciones (sustrato/T°)	Desempeño	Referencia
<i>IsPETasa</i> WT	-	PET amorfo; (30°C)	100% en 6 semanas	Yoshida et al. (2016)
ThermoPETasa	S121E, D186H, R280A	PET film amorfo; 40°C	70% en 24 h	Son et al. (2019)
DuraPETasa	S118Q, W159H, I168R, S214H, R280A, A180I, G165A, Q119Y, L117F, T140D	PET de ata cristalinidad (37 – 40°C)	100% en 96 h	Cui et al. (2021)

Fast-PETasa	S121E, D186H, R224Q, N233K, R280A	PET post- consumo; 50°C	15% en 24 h	Lu et al. (2022)
HotPETasa	21 mutaciones (incluye S121E, N233C, S282C, P181V)	PET semicristalino (29.8%);(65 – 70°C)	48.1% en 24 h	Bell et al. (2022)
IsPETasa	W159H		44,9% en 72 h	Dután, (2026)
IsPETasa	S214H	PET micronizado (50°C)	24,78% en 72 h	Chancusig, (2026)
IsPETasa	Q119Y-L117F		14,70% en 72 h	Molina, (2026)
IsPETasa	S188D		13,22% en 72 h	Variante de estudio

La **Tabla 5** muestra que el rendimiento de la degradación de PET entre variantes de *IsPETasa* con muchas mutaciones acumulativas. Sin embargo, se evidencia que la enzima S188D presentó un menor rendimiento para hidrolizar los enlaces éster del PET micronizado a 50 °C a diferencia de mutaciones previas realizadas por **Dutan, (2026)** y **Chancusig, (2026)** que participan en la estabilidad del sitio de unión del sustrato por interacción con residuos contiguos, mientras que la mutación Q119Y-L117F expuso un rendimiento similar a de la variante S188D (**Molina, 2026**) el cual se encarga de favorecer interacciones π - π . Pese a las diferencias de rendimiento, si existe una optimización de degradación por la variante propuesta que se puede corroborar con el estudio de **Cui et al. (2021)**, si bien los autores identificaron la S188 como sitio crucial de termoestabilidad la sustitución acumulativa con S188Q (M4) que realizaron resultó con un desempeño mayor que la sustitución previa D186H (M3), pues desde el punto de vista estructural se confirma que existe una tendencia predominante hacia interacciones epistáticas negativas que brindan los residuos ácidos (glutamina y aspartato). En este contexto, **Son et al. (2019)** demuestra que las interacciones generadas (enlaces de hidrógeno) por la adición de residuos cargados negativamente, específicamente la sustitución S121D, disminuye notablemente el *b*-factor, siempre se encuentre en presencia de otras

sustituciones clave con cargas positivas para evitar desplegamiento del bucle $\beta 6 - \beta 7$, que disminuyan la estabilidad conformacional debido a la repulsión electrostática que llega a

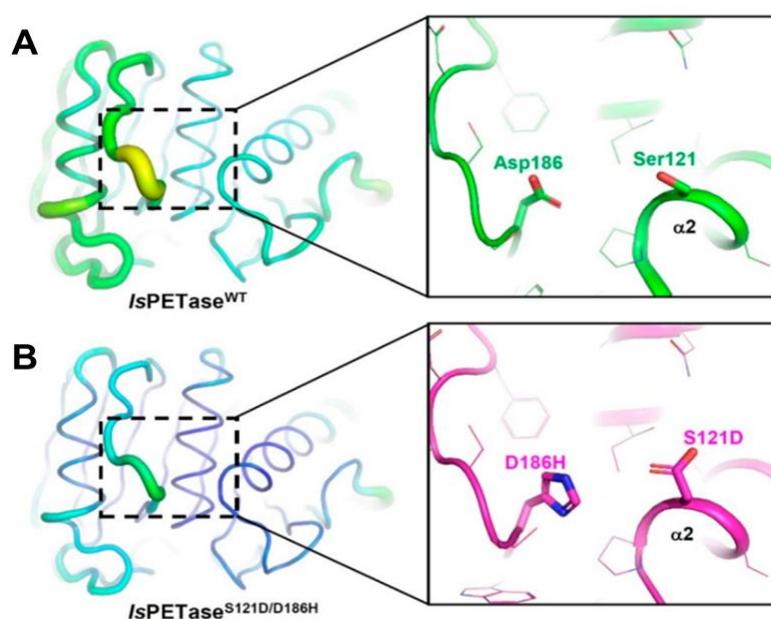


Figura 9. Comparación de *b*-factor entre la *IsPETasa* silvestre y la mutación *S188D*

generar la integración de residuos con cargas negativa como es el aspartato (**Figura 9**).

Nota. **A)** Estructura del bucle $\beta 6 - \beta 7$ de la enzima *IsPETasa* silvestre. **B)** estructura de la mutante *IsPETasa* S121D/D186H sustituida en el bucle $\beta 6 - \beta 7$. A la izquierda se representa el *b*-factor de cada estructura y a la derecha se flanquea los residuos que participan en estabilidad conformacional del bucle. Adaptada de **Son et al. (2021)**.

Complementariamente, el análisis comparativo con la enzima termófila LCC y su potencial estabilidad térmica que le confiere el sitio D193, equivalente a S188 en *IsPETasa*, gracias a la formación de puentes salinos directos con R173 y T192, contribuye a mantener su eficiencia hidrolítica a 70 °C, siendo energéticamente más eficiente que los puentes de hidrógeno que forma la mutante S188Q (**Cui et al. 2021**), pues las interacciones que genera naturalmente el aspartato en esta posición aporta entre 1 – 5 kcal/mol por interacción (Nayek et al. 2014), frente a los 0.5 – 1.5 kcal/mol de los puentes de hidrógeno que genera directamente la glutamina y consecuentemente forman redes salinas (**Newberry & Raines, 2016**).

En este marco, la introducción de la sustitución S188D sobre el mutante M8 responde al diseño racional que LCC aplica de forma natural en D193 para generar interacciones electrostáticas de mayor entalpía. El entorno de mutaciones acumuladas en M8 podría potenciar este efecto si

provee contracargas en las proximidades del bucle S187 – T189, y esta mutación ser un punto crítico para aumentar la estabilidad térmica y la actividad catalítica sobre el sustrato, bajo parámetros industriales, en mutaciones futuras.

CAPÍTULO IV.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La variante S188D se construyó exitosamente sobre la arquitectura del mutante M8 de *IsPETasa* mediante diseño *in silico*, síntesis externa y clonación en pET-30 a(+). La expresión heteróloga en *E. coli* BL21(DE3) Rosetta con inducción IPTG produjo un rendimiento de biomasa de 3,7 g/L y colonias viables en medio selectivo, lo que confirma que el sistema de expresión T7/*lacO* es compatible con la producción de esta variante y que la sustitución no comprometió la viabilidad celular.
- La purificación por IMAC-Ni-NTA bajo gradiente de imidazol recuperó 5,662 mg de proteína total soluble con un perfil cromatográfico de pico único y simétrico con una concentración de 1,5 mg/mL, confirmado por la cuantificación de cada fracción recuperada y filtrada. El análisis SDS-PAGE confirmó una banda predominante de 28,8 kDa, validando tanto la integridad de la proteína como la eficacia del protocolo de purificación empleado.
- La variante *IsPETasa*S188D degradó el 13,22 % ($\pm 2,15$) del PET post-consumo micronizado a 50 °C en 72 h, sin requerir amorfización previa del sustrato. Este valor supera más de siete veces la eficiencia de la enzima silvestre a su temperatura óptima de 30 °C, lo que indica que la sustitución S188D mejora la estabilidad conformacional y la actividad catalítica de la enzima en el rango de temperatura requerido para la degradación industrial del PET, aunque no tuvo mucha significancia frente a mutantes predecesoras.

4.2. Recomendaciones

- Ajustar condiciones de inducción como temperatura, concentración del inductor IPTG y tiempo para promover el rendimiento de la enzima y su calidad.
- Ensayar la actividad de *IsPETasa* S188D sobre muestras de PET con diferentes índices de cristalinidad del PET

- Para próximos estudios, es necesario profundizar en los ensayos de degradación mediante técnicas robustas que evalúen diferentes enfoques de la biodegradación del PET como la actividad cinética de la enzima sobre el PET y la degradación superficial de películas de PET.

BIBLIOGRAFÍA

- Agilent Technologies. (2015). *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual*. www.agilent.com/en/contact-us/page.
- Ahituv, N., Freund, D., Mireles, R., & Noda-García, L. (2025). The diversity of PET degrading enzymes: A systematic review of sequence, structure, and function. *Protein Science*, 34(10), e70282. <https://doi.org/10.1002/PRO.70282;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Akram, E., Cao, Y., Xing, H., Ding, Y., Luo, Y., Wei, R., & Zhang, Y. (2024). On the temperature dependence of enzymatic degradation of poly (ethylene terephthalate). *Chinese Journal of Catalysis*, 60, 284–293. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(23\)64628-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(23)64628-5)
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., Pollard, B. C., Dominick, G., Duman, R., Omari, K. El, Mykhaylyk, V., Wagner, A., Michener, W. E., Amore, A., Skaf, M. S., Crowley, M. F., Thorne, A. W., Johnson, C. W., Lee Woodcock, H., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4350–E4357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115;ISSUE:ISSUE:DOI>
- Baddam, S., Emam, O., Elfikky, A., Cavarretta, F., Luka, G., Farag, I., & Sanad, Y. (2025). ColiFormer: A Transformer-Based Codon Optimization Model Balancing Multiple Objectives for Enhanced *E. coli* Gene Expression. *BioRxiv*, 2025.11.26.690826. <https://doi.org/10.1101/2025.11.26.690826>
- Bell, E. L., Smithson, R., Kilbride, S., Foster, J., Hardy, F. J., Ramachandran, S., Tedstone, A. A., Haigh, S. J., Garforth, A. A., Day, P. J. R., Levy, C., Shaver, M. P., & Green, A. P.

- (2022). Directed evolution of an efficient and thermostable PET depolymerase. *Nature Catalysis*, 5(8), 673–681. <https://doi.org/10.1038/s41929-022-00821-3>
- Brizendine, R. K., Erickson, E., Haugen, S. J., Ramirez, K. J., Miscall, J., Salvachúa, D., Pickford, A. R., Sobkowicz, M. J., Mcgeehan, J. E., & Beckham, G. T. (2022). Particle Size Reduction of Poly (ethylene terephthalate) Increases the Rate of Enzymatic Depolymerization But Does Not Increase the Overall Conversion Extent. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 10(28), 9131–9140. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.2C01961>
- Brott, S., Pfaff, L., & Jäger, K.-E. (2022). Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation. *Engineering in Life Sciences*, 22(3-4), 192–203 <https://doi.org/10.1002/elsc.202100105>
- 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 Check for updates. *Communications Chemistry*, 7(65). <https://doi.org/10.1038/s42004-024-01154-x>
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06635>
- Chancusig Chicaiza, Z. N., & Cerda Mejía, L. A. (2026). Diseño de la variante mutante S214H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/items/78e57bb6-e2ed-4c7b-9309-12fc95c07112>
- Chen, C. C., Han, X., Li, X., Jiang, P., Niu, D., Ma, L., Liu, W., Li, S., Qu, Y., Hu, H., Min, J., Yang, Y., Zhang, L., Zeng, W., Huang, J. W., Dai, L., & Guo, R. T. (2021). General features to enhance enzymatic activity of poly (ethylene terephthalate) hydrolysis. *Nature Catalysis*, 4(5), 425–430. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00616-y>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>

- 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., ... & Feng, Y. (2021). Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation under ambient conditions by the GRAPE strategy. *ACS Catalysis*, 11(3), 1340–1350. <https://doi.org/10.1021/acscatal.0c05126>
- Dermitt, 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>
- Dutan Atancuri, J. A., & García Solís, M. D. (2026). Diseño de la variante mutante W159H de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*. [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/items/db98f571-fc61-4527-8db6-1aaa61ab2c58>
- Dvorak, P., Chrast, L., Nikel, P. I., Fedr, R., Soucek, K., Sedlackova, M., Chaloupkova, R., de Lorenzo, V., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2015). Exacerbation of substrate toxicity by IPTG in *Escherichia coli* BL21(DE3) carrying a synthetic metabolic pathway. *Microbial cell factories*, 14, 201. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0393-3>
- Ellis, L. D., Rorrer, N. A., Sullivan, K. P., Otto, M., McGeehan, J. E., Román-Leshkov, Y., Wierckx, N., & Beckham, G. T. (2021). Chemical and biological catalysis for plastics recycling and upcycling. *Nature Catalysis*, 4(7), 539–556. <https://doi.org/10.1038/s41929-021-00648-4>
- Europe Plastics. (2023). Plastics – the fast Facts 2023. *Plastics Europe AISBL*, 1
- 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. *Biophysical Journal*, 114(6), 1302–1312. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.005>
- Fortune Business Insights. (2024). Polyethylene Terephthalate (PET) Market Size, Share & Industry Analysis, 2024-2032. *Fortune Business Insights*. <https://www.fortunebusinessinsights.com/industry-reports/polyethylene-terephthalate-pet-market-101743>

- García-Meseguer, R., Ortí, E., Tuñón, I., Ruiz-Pernía, J. J., & Aragón, J. (2023). Insights into the enhancement of the poly (ethylene terephthalate) degradation by FAST-PETase from computational modeling. *Journal of the American Chemical Society*, 145(35), 19243–19255. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c04427>
- Goulas, T., Cuppari, A., Garcia-Castellanos, R., Snipas, S., Glockshuber, R., Arolas, J. L., & Gomis-Rü Th, F. X. (2014). The pCri System: A Vector Collection for Recombinant Protein Expression and Purification. *PLOS ONE*, 9(11), e112643. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112643>
- Groseclose, T. M., & Nguyen, H. B. (2025). Recent advances in enzyme engineering for improved deconstruction of poly (ethylene terephthalate) (PET) plastics. *Communications Materials* 2025 6:1, 6(1), 190-. <https://doi.org/10.1038/s43246-025-00919-8>
- Habumugisha, T., Zhang, Z., Uwizewe, C., Yan, C., Ndayishimiye, J. C., Rehman, A., & Zhang, X. (2024). Toxicological review of micro- and nano-plastics in aquatic environments: Risks to ecosystems, food web dynamics and human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 278, 116426. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2024.116426>
- Hajihassan, Z., Ghaee, A., Bazargannia, P., & Salmani Shahrivar, E. (2024b). Affinity purification/immobilization of poly histidine-tagged proteins by nickel-functionalized porous chitosan membranes. *Journal of Chromatography A*, 1722, 464902. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2024.464902>
- Han, J., Zuo, J., Zillante, G., Chang, R., & Du, L. (2025). Resources, Conservation & Recycling A systematic review of PET circularity technologies and management strategies: Challenges and future directions. *Conservation y Recycling*, 219(January), 1–19.
- Han, X., Liu, W., Huang, J.-W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T.-P., Xu, L., Cheng, Y.-S., Chen, C.-C., & Guo, R.-T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8, 2106. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- Hayat, S. M. G., Farahani, N., Golichenari, B., & Sahebkar, A. (2018). Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli* (*E.coli*): What We Need to Know. *Current Pharmaceutical Design*, 24(6), 718–725. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180131121940/CITE/REFWORKS>

- Hiraga, K., Mejzlik, P., Marcisin, M., Vostrosablin, N., Gromek, A., Arnold, J., Wiewiora, S., Svarba, R., Prihoda, D., Claro, K., Klempir, O., Navratil, J., Tupa, O., Vazquez-Otero, A., Walas, M. W., Holy, L., Spale, M., Kotowski, J., Dzamba, D., ... Bitton, D. A. (2021). Mutation Maker, An Open Source Oligo Design Platform for Protein Engineering. *ACS Synthetic Biology*, 10(2), 357–370. <https://doi.org/10.1021/ACSSYNBIO.0C00542>
- Hofer, F., Kraml, J., Kahler, U., Kamenik, A. S., & Liedl, K. R. (2020). Catalytic Site pKa Values of Aspartic, Cysteine, and Serine Proteases: Constant pH MD Simulations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 60(6), 3030–3042. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.0c00190>
- Jabarin, S. A. (1992). Strain-induced crystallization of poly (ethylene terephthalate). *Polymer Engineering & Science*, 32(18), 1341–1349. <https://doi.org/10.1002/PEN.760321802;JOURNAL:JOURNAL:15482634;WGROU:STRING:PUBLICATION>
- Jiang, X., Qin, R., Ma, T., Xu, K., & Lv, F. (2025). Optimization of immobilized metal affinity chromatography for a recombinant protein expressed in CHO cells. *Journal of Chromatography Open*, 8, 100230. <https://doi.org/10.1016/J.JCOA.2025.100230>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly (ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 382-. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Kawai, F. (2021). The Current State of Research on PET Hydrolyzing Enzymes Available for Biorecycling. *Catalysts*, 11(2), 206. <https://doi.org/10.3390/CATAL11020206>
- Khasanshina, Z. R., Kornakov, I. A., Buslaeva, E. A., & Draai, R. V. (2025). The response surface method enables efficient optimization of induction parameters for the production of bioactive peptides in fed-batch bioreactors using *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica* 2025 71:1, 71(1), 167–179. <https://doi.org/10.1007/S12223-025-01265-5>
- 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>

- Lear, G., Kingsbury, J. M., Franchini, S., Gambarini, V., Maday, S. D. M., Wallbank, J. A., Weaver, L., & Pantos, O. (2021). Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environmental Microbiome*, 16(1), 2. <https://doi.org/10.1186/S40793-020-00371-W>
- Li, J., Dong, X., & Liu, J. (2025). High-Codon: A Deep Learning-Based Codon Optimization Tool for Enhanced Heterologous Protein Expression in *Escherichia coli*. *BioRxiv*, 2025.05.30.656984. <https://doi.org/10.1101/2025.05.30.656984>
- Li, Y., Liu, C., Yang, H., He, W., Li, B., Zhu, X., Liu, S., Jia, S., Li, R., & Tang, K. H. D. (2024). Leaching of chemicals from microplastics: A review of chemical types, leaching mechanisms and influencing factors. *Science of The Total Environment*, 906, 167666. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.167666>
- Liu, F., Wang, T., Yang, W., Zhang, Y., Gong, Y., Fan, X., Wang, G., Lu, Z., & Wang, J. (2023). Current advances in the structural biology and molecular engineering of PETase. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 11, 1263996. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2023.1263996/FULL>
- Liu, K., Li, Q., Andrady, A. L., Wang, X., He, Y., & Li, D. (2024). Underestimated activity-based microplastic intake under scenario-specific exposures. *Environmental Science and Ecotechnology*, 18, 100316. <https://doi.org/10.1016/J.ESE.2023.100316>
- Loughran, S. T., Bree, R. T., & Walls, D. (2023). Poly-Histidine-Tagged Protein Purification Using Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC). *Methods in Molecular Biology*, 2699, 193–223. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3362-5_11/SAVE-RESEARCH
- 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>
- Marbach, A., & Bettenbrock, K. (2012). lac operon induction in Escherichia coli: Systematic comparison of IPTG and TMG induction and influence of the transacetylase LacA. *Journal of biotechnology*, 157(1), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.10.009>
- Molina Molina, M. U., & García Solís, M. D. (2026). Diseño de la variante mutante Q119Y-L117F de la enzima PETasa de Ideonella sakaiensis. [Tesis de grado, Universidad Técnica

- de Ambato]. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/items/b757dafd-acc9-408b-b191-4963166201bd>
- Mühlmann, M., Forsten, E., Noack, S., & Büchs, J. (2017). Optimizing recombinant protein 34 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>
- Nakamura, Y. (s.f.). *Codon usage table*. Kazusa. Retrieved June 6, 2026, from <https://www.kazusa.or.jp/codon/cgi-bin/showcodon.cgi?species=37762&aa=1&style=N>
- OECD. (2022). Global Plastics Outlook: Economic Drivers, Environmental Impacts and Policy Options. *OECD Publishing*. <https://doi.org/10.1787/de747aef-en>
- Pires, E., Kutz, M. C. S., Mendes, A. B., Riegel-Vidotti, I. C., & Mafrá, L. L. (2025). Toxic plastisphere: How the characteristics of plastic particles can affect colonization of harmful microalgae and adsorption of phycotoxins. *Journal of Hazardous Materials*, 486, 137019. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2024.137019>
- Pouresmaeil, M., & Azizi-Dargahlou, S. (2023). Factors involved in heterologous expression of proteins in *E. coli* host. *Archives of Microbiology* 205(5), 212-. <https://doi.org/10.1007/S00203-023-03541-9>
- Qiao, B., Jiménez-Ángeles, F., Nguyen, T. D., & De La Cruz, M. O. (2019). Water follows polar and nonpolar protein surface domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(39), 19274–19281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1910225116>
- 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/S1>
- Ramnath, K. G., Pierce, C. T., Casadevall, G., Osuna, S., Ide-Pech, J., Zeng, B., Iyer, V., Kazlauskas, R. J., & Gross, R. A. (2026). Engineered Leaf-Branch Compost Cutinase with Enhanced PET Degradation Across a Broad Temperature Range. *ChemSusChem*, 19(1), e202501789. <https://doi.org/10.1002/CSSC.202501789;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- Richter, P. K., Blázquez-Sánchez, P., Zhao, Z., Engelberger, F., Wiebeler, C., Künze, G., Frank, R., Krinke, D., Frezzotti, E., Lihanova, Y., Falkenstein, P., Matysik, J.,

- Zimmermann, W., Sträter, N., & Sonnendecker, C. (2023). Structure and function of the metagenomic plastic-degrading polyester hydrolase PHL7 bound to its product. *Nature Communications*, 14(1), 1905. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37415-x>
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., & Samuelson, J. C. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21 (DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Applied and environmental microbiology*, 77(13), 4634-4646. <https://doi.org/10.1128/AEM.00119-11>
- San-Miguel, T., Pérez-Bermúdez, P., & Gavidia, I. (2013). Production of soluble eukaryotic recombinant proteins in *E. coli* is favoured in early log-phase cultures induced at low temperature. *SpringerPlus*, 2, 89. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-89>
- Sevilla Cevallos, M. E., & Cerda Mejía, L. A. (2022). Construcción de variantes mutantes de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* [Tesis de grado, Universidad Técnica de Ambato]. Repositorio Institucional de la Universidad Técnica de Ambato. <https://repositorio.uta.edu.ec/jspui/handle/123456789/36572>
- Sevilla, M. E., Garcia, M. D., Perez-Castillo, Y., Armijos-Jaramillo, V., Casado, S., Vizuite, K., Debut, A., & Cerda-Mejía, L. (2023). Degradation of PET Bottles by an Engineered *Ideonella sakaiensis* PETase. *Polymers* 2023, 15(7). <https://doi.org/10.3390/POLYM15071779>
- Sigma-Aldrich. (2013). *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit User Guide*.
- Shi, W., Wu, N., Zhang, Z., Liu, Y., Chen, J., & Li, J. (2024). A global review on the abundance and threats of microplastics in soils to terrestrial ecosystem and human health. *Science of The Total Environment*, 912, 169469. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.169469>
- Son, H. F., Cho, I. J., Joo, S., Seo, H., Sagong, H. Y., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2019). Rational Protein Engineering of Thermo-Stable PETase from *Ideonella sakaiensis* for Highly Efficient PET Degradation. *ACS Catalysis*, 9(4), 3519–3526. <https://doi.org/10.1021/acscatal.9b00568>
- 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>

- 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>
- Studier, F. W. (2018). T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in *E. coli*. *Current Protocols in Molecular Biology*, 124(1), e63. <https://doi.org/10.1002/CPMB.63;SUBPAGE:STRING:ACCESS>
- Subramanian, D., Ponnusamy Manogaran, G., & Dharmadurai, D. (2024). A systematic review on the impact of micro-nanoplastics on human health: Potential modulation of epigenetic mechanisms and identification of biomarkers. *Chemosphere*, 363, 142986. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2024.142986>
- Sulaiman, S., Yamato, S., Kanaya, E., Kim, J. J., Koga, Y., Takano, K., & Kanaya, S. (2012). Isolation of a novel cutinase homolog with polyethylene terephthalate-degrading activity from leaf-branch compost by using a metagenomic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1556–1562. <https://doi.org/10.1128/AEM.06725-11>
- 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, 101083. <https://doi.org/10.1016/j.envc.2025.101083>
- Tan, J. Y., Harry, I., & Tan, X. (2021). Engineering of PETase for the sustainable biodegradation of polyethylene terephthalate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 786377. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.786377>
- Tarazona, N. A., Wei, R., Brott, S., Pfaff, L., Bornscheuer, U. T., Lendlein, A., & Machatschek, R. (2022). Rapid depolymerization of poly (ethylene terephthalate) thin films by a dual-enzyme system and its impact on material properties. *Chem Catalysis*, 2(12), 3573–3589. <https://doi.org/10.1016/j.checat.2022.11.004>
- Tavakolpournegari, A., Villacorta, A., Morataya-reyes, M., Marcos, R., Banaei, G., Pastor, S., Vel, A., Velázquez, A., Hernández, A., & Annangi, B. (2024). Harmful effects of true-to-life nanoplastics derived from PET water bottles in human alveolar macrophages. *Environmental Pollution*, 348, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2024.123823>

- Tuuri, E. M., & Leterme, S. C. (2023). How plastic debris and associated chemicals impact the marine food web: A review. *Environmental Pollution*, 321, 121156. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121156>
- Tyc, H. J., Kłodnicka, K., Teresińska, B., Karpiński, R., Flieger, J., & Baj, J. (2025). Micro- and Nanoplastics as Disruptors of the Endocrine System—A Review of the Threats and Consequences Associated with Plastic Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 2025, Vol. 26, Page 6156, 26(13), 6156. <https://doi.org/10.3390/IJMS26136156>
- UNEP. (2026, February 6). *Plastic pollution & marine litter*. UN-Environment Programme. https://www.unep.org/topics/ocean-seas-and-coasts/ecosystem-degradation-pollution/plastic-pollution-marine-litter?utm_source=chatgpt.com
- Urbanek, A. K., Kosiorowska, K. E., & Mirończuk, A. M. (2021). Current knowledge on polyethylene terephthalate degradation by genetically modified microorganisms. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 771133. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.771133>
- Vethaak, A. D., & Legler, J. (2021). Microplastics and human health. *Science*, 371(6530), 672–674. <https://doi.org/10.1126/science.abe5041>
- Varela-Castillo, P., Razavi, A., Mousavi, N., Robinson, N., & Yang, X.-J. (2026). Efficiency and Fidelity of Site-Directed Mutagenesis with Complementary Primer Pairs. *Cells*, 15(2), 138. <https://doi.org/10.3390/CELLS15020138/S1>
- Wang, K., Wang, F., Yu, Y., Yang, S., Han, Y., & Yao, H. (2025). Microplastics and soil microbiomes. *BMC Biology* 2025 23:1, 23(1), 273. <https://doi.org/10.1186/S12915-025-02387-5>
- Wang, Y., Li, C., Khan, M. R. I., Wang, Y., Ruan, Y., Zhao, B., Zhang, B., Ma, X., Zhang, K., Zhao, X., Ye, G., Guo, X., Feng, G., He, L., & Ma, G. (2016). An Engineered Rare Codon Device for Optimization of Metabolic Pathways. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 20608. <https://doi.org/10.1038/srep20608>
- Watts, A., Sankaranarayanan, S., Watts, A., & Raipuria, R. K. (2021). Optimizing protein expression in heterologous system: Strategies and tools. *Meta Gene*, 29, 100899. <https://doi.org/10.1016/J.MGENE.2021.100899>

- 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., 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., & Bornscheuer, U. T. (2025). Standardization guidelines and future trends for PET hydrolase research. *Nature Communications* 2025 16:1, 16(1), 4684-. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-60016-9>
- Yao, Y., Lili, W., Shufen, P., Gang, L., Hongmei, L., Weiming, X., Lingxuan, G., Jianning, Z., Guilong, Z., & Dianlin, Y. (2022). Can microplastics mediate soil properties, plant growth and carbon/nitrogen turnover in the terrestrial ecosystem? *Health and Sustainability Ecosystem*, 8(1). <https://doi.org/10.1080/20964129.2022.2133638>
- Yin, Q., You, S., Zhang, J., Qi, W., & Su, R. (2022). Enhancement of the polyethylene terephthalate and mono-(2-hydroxyethyl) terephthalate degradation activity of *Ideonella sakaiensis* PETase by an electrostatic interaction-based strategy. *Bioresource Technology*, 364, 128026. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2022.128026>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 353(6301), 759. <https://doi.org/10.1126/science.aad6359>
- Yu, H. Y., Gao, D. M., Zhou, W., Xia, B. B., He, Z. Y., Wu, B., Jiang, M. Z., Wang, M. L., & Zhao, J. (2021). Expression, purification, and bioactivity of a soluble recombinant ovine interferon-tau in *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Research*, 65(1), 101–108. <https://doi.org/10.2478/JVETRES-2021-0011>
- 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>

- Zhou, H. X., & Pang, X. (2018a). Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00305>
- Zhou, H. X., & Pang, X. (2018b). Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation. *Chemical Reviews*, 118(4), 1691. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.7B00305>

ANEXOS

Anexo 2. Datos del ensayo de degradación

Replica	Cantidad PET (mg)	Masa inicial Falcon+PET (g)	Masa final Falcon+PET (g)	PET residual	$m_i - m_f$ PET (mg)	Rendimiento (%)
R1	124,6	7,0195	7,0012	106,3	18,3	14,70
R2	124,5	6,9766	6,9632	111,1	13,4	10,76
R3	126,8	6,9540	6,9360	108,9	18,0	14,20
Promedio	125,3	6,9834	6,9668	108,77	16,56	13,22 ± 2,15

Anexo 1. Análisis estadístico del ensayo de degradación

Cantidad PET (mg)		Masa inicial Falcon+PET (g)		Masa final Falcon+PET (g)		(mg)		Rendimiento (%)	
Media	125.3	Media	6.9833667	Media	6.9668	Media	16.566667	Media	13.22
Error típico	0.75055535	Error típico	0.0192085	Error típico	0.0189075	Error típico	1.5857	Error típico	1.2384399
Mediana	124.6	Mediana	6.9766	Mediana	6.9632	Mediana	18	Mediana	14.2
Moda	#N/D	Moda	#N/D	Moda	#N/D	Moda	#N/D	Moda	#N/D
Desviación estándar	1.3	Desviación estándar	0.0332702	Desviación estándar	0.0327487	Desviación estándar	2.7465129	Desviación estándar	2.1450408
Varianza de la muestra	1.69	Varianza de la muestra	0.0011069	Varianza de la muestra	0.0010725	Varianza de la muestra	7.5433333	Varianza de la muestra	4.6012
Curtosis	#DIV/0!	Curtosis	#DIV/0!	Curtosis	#DIV/0!	Curtosis	#DIV/0!	Curtosis	#DIV/0!
Coefficiente de asimetría	1.72052799	Coefficiente de asimetría	0.8773754	Coefficiente de asimetría	0.4886978	Coefficiente de asimetría	-1.708831	Coefficiente de asimetría	-1.62678
Rango	2.3	Rango	0.0655	Rango	0.0652	Rango	4.9	Rango	3.94
Mínimo	124.5	Mínimo	6.954	Mínimo	6.936	Mínimo	13.4	Mínimo	10.76
Máximo	126.8	Máximo	7.0195	Máximo	7.0012	Máximo	18.3	Máximo	14.7
Suma	375.9	Suma	20.9501	Suma	20.9004	Suma	49.7	Suma	39.66
Cuenta	3	Cuenta	3	Cuenta	3	Cuenta	3	Cuenta	3