



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA



Prospección de la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis*

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Bioquímica, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autor: Ruth Abigail Manzano Rivera

Tutor: PhD. Mario Daniel García Solís

Ambato - Ecuador

Septiembre 2022

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Mario Daniel García Solís

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, Modalidad: Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad.

Ambato, 22 de Julio del 2022

PhD. Mario Daniel García Solís

C.I. 110360547-1

TUTOR

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Manzano Rivera Ruth Abigail, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Bioquímica, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Ruth Abigail Manzano Rivera

C.I. 094134391-5

AUTORA

APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Trabajo de Titulación, modalidad 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 de Tribunal de Grado

Lic. MSc. Danae Fernández Rivero
C.I: 175718120-9

Dr. Santiago Casado Rojo
C.I: 1759126954

Ambato, 1 de septiembre de 2022

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, como 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 mis derechos de autor.



Ruth Abigail Manzano Rivera

C.I. 094134391-5

AUTORA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo en primer lugar a Dios, él ha sido y será mi soporte en tiempos de angustia y me ha dado la sabiduría para poder acabar este trabajo.

A mis padres, Eduardo Manzano y María Rivera, quienes han sido mi ejemplo y apoyo en toda mi vida, y en especial en mi vida académica.

A mi hermana menor, Nathaly Manzano, quien con su alegría me ha inspirado a llenarme de amor y felicidad.

A mi querido esposo, Andrés Aldas, quien me anima a ser mejor tanto en la vida normal en la académica, con su amor me ha llenado de paz.

A mi familia López Manzano, mi hermana, Tatiana Manzano, mi cuñado Fabricio López y a mi hermosa sobrina, Esly López, quienes con sus palabras de aliento me han aconsejado.

A mis hermanos, Gabriela y David, quienes con su amor han sabido ayudarme a perseverar en el camino de la vida.

A mi sobrino, Andy David Torres, que me brindó la alegría al momento de su nacimiento para seguir adelante.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por todo su amor y sabiduría que ha me ha otorgado a lo largo de mi carrera, sin su existencia mi vida no sería igual, ha sido y será mi refugio en todo momento, el que levanta mi cabeza y me cubre con su presencia.

A mis padres Eduardo Manzano y María Rivera, por ser el pilar de mi vida y educarme de la mejor manera, con valores y amor. Por impulsar y apoyar mi carrera universitaria sin poner ninguna condición. Por todos los días estar pendiente de que este bien en cada ámbito de mi vida, por todo y mucha más es mi agradecimiento a mis seres más queridos. A mi hermana Nathaly Manzano por brindarme siempre su apoyo incondicional.

A mi esposo Andrés Aldas por siempre estar cuando más lo necesitaba, por apoyarme en mi carrera universitaria y no dejar que me rinda a mitad de la carrera, si no animarme a que prosiga a la meta, con su amor y comprensión me ha inspirado a querer salir adelante.

A mi amiga Adriana Aguirre que ha sido y será una persona que no se detuvo en brindarme siempre una palabra de ciencia y sabiduría, ayudándome también en mi formación de la carrera y apoyándome en todo este transcurso de mi trabajo de titulación.

A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por abrirme las puertas a la enseñanza, a mi tutor agradecida por brindarme su confianza en todo el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|------|
| APROBACIÓN DEL TUTOR..... | ii |
| DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD..... | iii |
| APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE GRADO..... | iv |
| DERECHOS DE AUTOR | v |
| DEDICATORIA | vi |
| AGRADECIMIENTO | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | x |
| RESUMEN EJECUTIVO | xii |
| ABSTRACT..... | xiii |
| CAPITULO I..... | 1 |
| MARCO TEÓRICO..... | 1 |
| 1.1 Antecedentes investigativos..... | 1 |
| 1.1.1 La contaminación por plástico..... | 1 |
| 1.1.2 El polietileno tereftalato (PET)..... | 3 |
| 1.1.3 Métodos de degradación del PET | 5 |
| 1.1.3.1 Degradación química | 5 |
| 1.1.3.2 Degradación Físicoquímica..... | 6 |
| 1.1.4 Fuentes microbianas de enzimas hidrolizante..... | 9 |
| 1.1.4.1 Enzimas de Ideonella sakaiensis | 9 |
| 1.1.4.2 Enzimas actinobacterianas | 9 |
| 1.1.4.3 Enzimas fúngicas | 10 |
| 1.1.5 Enzimas modificadas para la degradación de PET | 10 |
| 1.1.5.1 Enzimas cutinasas | 11 |
| 1.1.5.2 Enzimas lipasas..... | 11 |
| 1.1.5.3 Enzimas esterases..... | 12 |
| 1.1.5.4 Enzima PETasa | 12 |
| 1.1.5.1 Enzima MHETasa | 13 |
| 1.2 Objetivos..... | 15 |
| CAPITULO II | 16 |
| METODOLOGÍA | 16 |
| 2.1 Métodos..... | 16 |
| 2.2.1 Primera etapa | 16 |
| 2.2.2 Segunda Etapa..... | 17 |

| | |
|--|----|
| 2.2.3 Tercera Etapa | 19 |
| CAPITULO III | 23 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 23 |
| 3.1 Análisis y discusión de los resultados | 23 |
| 3.1.1. Identificación de las mutaciones efectuadas en la enzima <i>PETasa</i> de <i>I. sakaiensis</i> .23 | |
| 3.1.1.1. Descubrimiento de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 23 |
| 3.1.1.2 Características únicas de la estructura de la <i>IsPETasa</i> | 24 |
| 3.1.1.2.1 Bamboleo W185 | 24 |
| 3.1.2 Recopilación de estructuras tridimensionales de la enzima <i>PETasa</i> de <i>I. sakaiensis</i> y sus variantes mutantes..... | 39 |
| 3.1.2.1 Estructura cristalina de la <i>IsPETasa</i> | 39 |
| 3.1.2.2 Estructura cristalina del mutante <i>IsPETasa</i> W159F de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 40 |
| 3.1.2.3 Estructura cristalina del mutante <i>IsPETasa</i> P181A, S121D/D186H, S121E/D186H y S121E/D186H/R280A de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 43 |
| 3.1.2.4 Estructura cristalina del mutante <i>PETasa</i> N246D y la variante S121E/D186H/S242T/N246D de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 48 |
| 3.1.3 Adyuvantes que incrementan la actividad de la enzima <i>PETasa</i> de <i>I. sakaiensis</i> | 53 |
| 3.1.3.1 Adición de surfactantes aniónicos para el incremento de la acción enzimática de la <i>IsPETasa</i> | 53 |
| 3.1.3.2 El uso de p-nitrofenil-butirato como sustrato para aumento de secreción de la <i>IsPETasa</i> | 56 |
| CAPITULO IV | 58 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES..... | 58 |
| 4.1. Conclusiones | 58 |
| 4.2. Recomendaciones | 60 |
| MATERIALES DE REFERENCIA | 61 |
| Referencias bibliográficas..... | 61 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Selección de variables para la pregunta de investigación..... | 17 |
| Tabla 2. Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para los avances de la <i>IsPETasa</i> | 20 |
| Tabla 3. Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para las estructuras tridimensionales de la <i>IsPETasa</i> | 21 |

| | |
|---|----|
| Tabla 4. Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para los adyuvantes de la <i>IsPETasa</i> | 22 |
| Tabla 5. Efecto de las mutaciones específicas de un sitio de mutación en la actividad de la enzima <i>PETasa</i> | 34 |
| Tabla 6. Resumen de varias mutaciones de la enzima <i>IsPETasa</i> y su efecto. | 35 |
| Tabla 7. Estructuras cristalinas diseñadas en Pymol de las mutantes de <i>IsPETasa</i> | 50 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Proyección de los desechos de plástico desde el año 1950 hasta 2050 | 3 |
| Figura 2. Estructura de PET | 4 |
| Figura 3. Degradación de PET. | 13 |
| Figura 4. Degradación de PET por la enzima <i>MHETasa</i> | 14 |
| Figura 5. Estructura de la <i>IsPETasa</i> | 24 |
| Figura 6. Representación de las tres conformaciones del wobbling W185 | 25 |
| Figura 7. DM en HEMT y pNP | 28 |
| Figura 8. Cinética enzimática WT vs TS- <i>PETasa</i> a 30 °C | 30 |
| Figura 9. Velocidades cinéticas de TS- <i>PETasa</i> a diferente temperaturas | 31 |
| Figura 10. Determinación de la termoestabilidad de variantes de <i>IsPETasa</i> y WT.. | 38 |
| Figura 11. Estructura tridimensional de <i>IsPETasa</i> | 39 |
| Figura 12. Sitio activo de la <i>IsPETasa</i> con su tríada catalítica. | 40 |
| Figura 13. Estructura cristalina de la enzima <i>IsPETasa</i> W159F | 41 |
| Figura 14. Estructuras de los centros catalíticos del <i>IsPETasa</i> y <i>EaEST</i> | 43 |
| Figura 15. Comparación estructural de la <i>IsPETasa</i> vs variante <i>IsPETasa</i> P181A... | 45 |
| Figura 16. Bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$ | 47 |
| Figura 17. Actividad enzimática de las diferentes mutaciones a 25 y 37 °C | 49 |
| Figura 18. Mutación W159F | 50 |
| Figura 19. Mutación P181A | 50 |
| Figura 20. Mutación N246D | 50 |
| Figura 21. Mutación R280A..... | 51 |
| Figura 22. Mutación W185H | 51 |
| Figura 23. Mutación A248D, R280K..... | 51 |

| | |
|---|----|
| Figura 24. Mutación S121E, D186H..... | 51 |
| Figura 25. Mutación S121E, D186H, R280A | 52 |
| Figura 26. Esquema de la unión del tensioactivo en acción con la superficie del PET..... | 54 |
| Figura 27. Velocidad de degradación de PET vs concentración de surfactante. | 55 |

RESUMEN

El plástico es uno de los materiales más utilizados a nivel mundial, su uso se ha dado desde hace mucho tiempo debido a que su composición es muy resistente y maleable para poder desarrollar muchas herramientas y productos necesarios. Uno de los plásticos más conocidos es el PET, el cual tiende a ser muy resistente al querer degradarlo. Se han utilizado muchos tipos de degradación como la química, fisicoquímica y biológica. Sin embargo, presenta grandes limitaciones al recurrir a reactivos contaminantes, a temperaturas exageradas y a un mal manejo del desecho causante de la degradación. Unas de las enzimas que degradan PET es la PETasa de la bacteria *Ideonella sakaiensis*. Se describió la acción de diferentes mutantes y variantes que aumentaron desde 1.4 a 120 veces la actividad de la enzima, también se mostraron las estructuras cristalinas de sus mutantes con una resolución de imágenes que van desde 1.4 a 2.00 ángstrom, las estructuras cristalina fueron halladas en el PDB, cada residuo presentó una polaridad conveniente a la degradación de la superficie de PET. Las doble mutante con más alto valor de Tm fue la W159H, F229Y con una tasa de degradación equivalente a 23.4 mg de PET por hora, por miligramo de enzima. Los adyuvantes encontrados fueron adecuados para medir la velocidad cinética de formación de producto y la unión del sustrato al sitio activo, la unión de SDS y dodeciltrimetilamonio ayudaron a que el sustrato ingrese con mayor facilidad dentro del sitio activo de la enzima.

Palabras clave: Revisión bibliográfica, actividad enzimática, gestión de residuos, residuos plásticos, biodegradación, PETasa, *Ideonella sakaiensis*

ABSTRACT

Plastic is one of the most used materials worldwide, its use has been around for a long time because its composition is very resistant and malleable to be able to develop many necessary tools and products. One of the best-known plastics is PET, which tends to be very resistant when wanting to degrade it. Many types of degradation have been used such as chemical, physicochemical, and biological. However, it has great limitations by resorting to polluting reagents, exaggerated temperatures and poor handling of the waste that causes degradation. One of the enzymes that degrade PET is PETase from the bacterium *Ideonella sakaiensis*. The action of different mutants and variants that increased from 1.4 to 120 times the activity of the enzyme was described, the crystal structures of their mutants were also shown with an image resolution ranging from 1.4 to 2.00 angstrom, the crystal structures were found in the PDB, each residue presented a suitable polarity to the degradation of the PET surface. The double mutant with the highest T_m value was W159H, F229Y with a degradation rate equivalent to 23.4 mg of PET per hour, per milligram of enzyme. The adjuvants found were adequate to measure the kinetic rate of product formation and the binding of the substrate to the active site, the binding of SDS and dodecyl trimethylammonium helped the substrate to enter more easily into the active site of the enzyme.

Keywords: Literature review, enzyme activity, waste management, plastic waste, biodegradation, PETase, *Ideonella sakaiensis*

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes investigativos

1.1.1 La contaminación por plástico

En la actualidad, los polímeros sintéticos (plásticos) se encuentran en todas partes del mundo, lo cual ha provocado una gran problemática ambiental. Su alta producción se debe a que existe una inmensa demanda de productos elaborados a partir de los siguientes materiales: el policloruro de vinilo (PVC), poliestireno (PS), polietileno (PE), polimetilmetacrilato (PMMA), polipropileno (PP), poliuretano (PU) y el polietileno tereftalato (PET), los cuales presentan propiedades de impermeabilidad gracias a su alta hidrofobicidad, así como resistencia y baja densidad, lo que los hace útiles para las diferentes industrias, en especial el PET (**Fotopoulou & Karapanagioti, 2017**). Una de las principales industrias que utilizan PET, es la industria de alimentos, ya que requieren una presentación final en empaque, y, así mismo, necesitan que el producto empaquetado sea colocado en un envase nuevo y virgen, por lo que la industria no acepta la utilización de empaques reciclados. Esto ha ocasionado una acumulación de materiales de un solo uso, convirtiéndolos en desechos los cuales no cuentan con métodos adecuados para su degradación y reciclaje.

Las múltiples utilidades del plástico han revolucionado dentro de las industrias comerciales. Éstos productos por su alto peso molecular, sus diferentes estructuras lineales o ramificadas, su estado cristalino, semicristalino o amorfo, lo han hecho ideal para la producción de botellas, fundas, empaques, etc. (**Krueger et al., 2015**). Sin embargo, la demanda de materia prima de plástico aumentó de 2 a 400 millones desde el año 1950 al 2018 (**Yang et al., 2019**). A pesar de todos sus diferentes usos, este ha generado una gran problemática en cuanto a la contaminación ambiental que causa el plástico al ecosistema, siendo cuestionada su producción. Las propiedades del plástico que son tan importantes dentro de la industria textil, ganadera, alimenticia, entre otras, son las mismas que lo convierten en un compuesto recalcitrante o de mucha

durabilidad, es decir, difícil de degradar, lo que provoca su acumulación prolongada en vertederos, basureros, en ecosistemas terrestres y acuáticos **(Yang et al., 2019)**.

Los plásticos en su mayoría después de su fabricación tienen una duración aproximada de un año en el mercado para posteriormente ser descartados o desechados. El 14% son llevados a recolección, el otro 14% se incinera provocando grandes emisiones de CO₂, el 40% es vertido en basureros y el 32% se encuentra desechado en los ecosistemas ambientales **(Nazareth et al., 2018)**. Dentro de las soluciones que se han buscado, se ha introducido el reciclaje, lo cual proyecta una sociedad en donde los artículos de plásticos son reutilizados en diferentes áreas, sin embargo, no ha tenido una alta eficiencia este método debido a que las personas e industrias buscan, por lo general, un producto nuevo que provenga de materia prima virgen no reciclada **(Yang et al., 2019)**.

Anualmente se acumulan 150 millones de toneladas de plástico y 8 millones de estos ingresan al océano causando daños irreversibles como la muerte a la flora y fauna ambiental. Con la alta producción de plástico, se debe considerar su vida útil y su desecho a largo plazo. Su utilización ha generado la formación de un ciclo de producción, consumo y eliminación de plástico, el cual no termina en un adecuado reciclaje, simplemente se desecha. Solo el 17% de plástico es reciclado en todo el mundo, y el 20% del plástico reciclado se utiliza en la nueva fabricación de materiales. Uno de los plásticos que más resistencia presenta a la degradación es el PET **(Crawford & Quinn, 2017)**.

Como se nombra anteriormente, el porcentaje de crecimiento de la producción y desecho de plástico es incontrolable. Los métodos convencionales como el reciclaje no están funcionando correctamente, y su acumulación conforma el 20% de los desechos totales del planeta **(Luo et al., 2015)**. Es por esta razón, que se busca nuevas alternativas de desecho, degradación y uso de los plásticos, ya que, si no se logra disminuir este porcentaje, en una proyección al 2050 (Figura 1), se tendrá 26 mil millones de toneladas de desechos plásticos **(Geyer et al., 2017)**. Éstos provocarán efectos negativos sobre el medio ambiente causando daños e incluso la muerte de muchos seres vivos, tal es el caso de las especies marinas que sufren al toparse con

macro y micro residuos de plástico en todo el océano, éstos residuos en muchas ocasiones provocan su inmovilidad, incapacidad de respirar e incluso la muerte (Luo et al., 2015).

Generación y eliminación acumulada de residuos plásticos

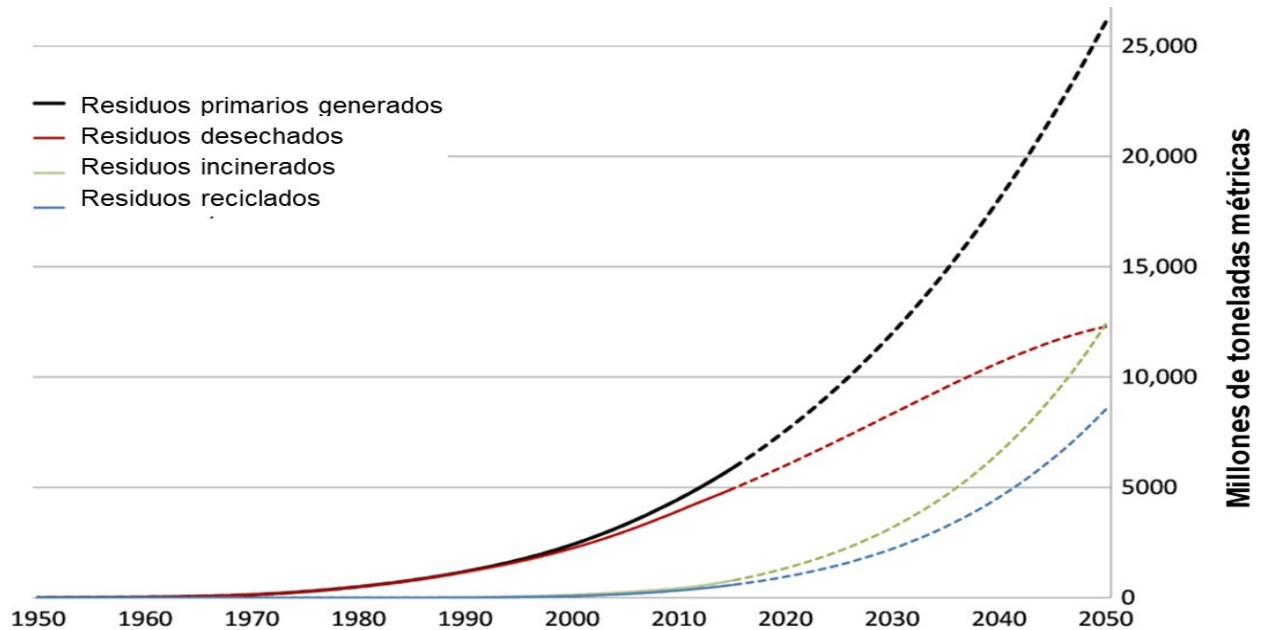


Figura 1. Proyección de los desechos de plástico desde el año 1950 hasta 2050. Las líneas continuas muestran información de datos históricos desde 1950 hasta el 2015. Las líneas discontinuas muestran las posibles proyecciones basadas en los datos históricos hasta el 2050. Los residuos primarios generados son aquellos que por primera vez son desechados, es decir, no provienen de plástico reciclado.

Fuente: modificado de Geyer et al., (2017)

1.1.2 El polietileno tereftalato (PET)

Uno de los plásticos más conocidos es el polietileno tereftalato (PET), el cual es a base de ácido tereftálico (TPA) derivado del petróleo y etilenglicol (EG). Su proceso se da mediante una reacción de policondensación, el cual es un proceso en donde reaccionan sustancias, en este caso el TPA y EG, para crear monómeros que posteriormente se convertirán en un polímero (Figura 2). El PET es utilizado por lo general, en el envasado de líquidos, alimentos y dentro del desarrollo de fibras

sintéticas de textil, es también producido por petróleo crudo. A pesar de su versatilidad y su intensivo uso presenta una alta resistencia a la degradación de forma natural y son químicamente inactivos, lo cual ocasiona un alto riesgo y daño a las especies naturales dentro del ecosistema, lo que lleva a un desequilibrio de los seres vivos, sin embargo, existen en la actualidad diferentes métodos para su degradación (Austin et al., 2018).

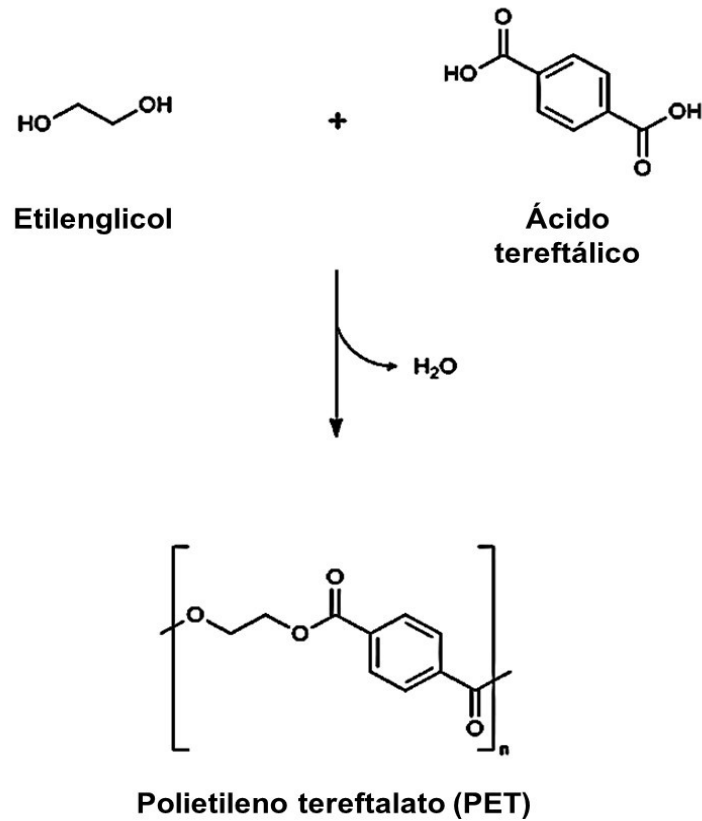


Figura 2. Estructura de PET

Reacción de policondensación de monómeros de EG y TPA da como resultado PET, con agua de subproducto.

Fuente: (Carr et al., 2020)

1.1.3 Métodos de degradación del PET

La degradación del PET se ha denotado por ciertas limitaciones como su descomposición a altas temperaturas ($> 200^{\circ}\text{C}$), su disolución o hinchazón en fluidos orgánicos calientes, su alta emisión de CO_2 y su alta durabilidad al aplicar métodos físicos y mecánicos (Nazareth et al., 2018). Los métodos de degradación depende de factores químicos, fisicoquímicos (degradación térmica o mecánica), y por procesos biológicos (Fotopoulou & Karapanagioti, 2017).

Existe un método de degradación que no se considera en la actualidad, y es la degradación por radiación. Aquí interfieren radiaciones de alta energía que producen cambios químicos, como la formación de enlaces químicos entre moléculas diferentes, fragmentación de la molécula, la formación y desaparición de grupos no saturados. También se encuentra la fotodegradación, la cual es inducida por luz en el plástico, ya sea luz visible o ultravioleta, estos tipos de luces son capaces de absorber las impurezas del plástico, lo que ocasiona que éste se torne más frágil y provoque su decoloración. Por último, la degradación fotolítica que se da tanto en ausencia o presencia de oxígeno con la ayuda de la radiación solar, el polímero se expone a esta radiación y produce un daño por las reacciones de oxidación que interfiere en la estructura del plástico deformándolo (Posada, 1994).

1.1.3.1 Degradación química

La degradación química es el efecto que producen las sustancias químicas a la composición química del polímero provocando cambios físicos como en su color, resistencia, solubilidad y flexibilidad. Este tipo de degradación es inducida por reactivos químicos, en donde se da énfasis en las reacciones espontáneas cuando entran en contacto con sustancias químicas, lo que ocasiona una ruptura, deformación, y por ende, la hinchazón y disolución del plástico (Min et al., 2020). Existen macromoléculas que forman cristales muy resistentes frente a la interacción con solventes, y solo se disuelven a temperaturas altas, mayores a 100°C tal es el caso del PET; sin embargo, los polímeros no siempre permanecen intactos en la disolución, así

que se necesita que el líquido solvente tenga un bajo peso molecular lo que permite la descomposición en fragmentos, pero no en su totalidad **(Nazareth et al., 2018)**.

La degradación química conlleva la transformación de la cadena del polímero, ésta se degrada en monómeros (despolimerización) o rupturas fuertes, lo cual se asocia a la formación de gases **(Min et al., 2020)**. También este tipo de degradación es llevado a cabo por pirólisis (degradación térmica en ausencia de oxígeno) a través de la degradación con solventes. Las desventajas de este proceso es el uso de altas temperaturas de 200 a 250 °C, con una presión que oscila de 1.4 a 2 MPa, y el tiempo largo que se requiere para completar la despolimerización **(Sabagh et al., 2016)**. Por otro lado, la descomposición de PET por ácido sulfúrico concentrado produce alta corrosividad del sistema de reacción y la generación de grandes cantidades de sales inorgánicas y desechos acuosos. A pesar de que el proceso químico de degradación se ajusta a la síntesis de la materia prima en poliésteres saturados e insaturados o en materiales de revestimiento, no se opta por este proceso debido a su alto costo y la utilización de reactivos perjudiciales al medio ambiente **(Min et al., 2020)**.

1.1.3.2 Degradación Físicoquímica

1.1.3.2.1 Degradación térmica

La degradación térmica es un cambio producido en la estructura física del plástico por causa de las altas temperaturas como las vítreas, donde el polímero es frágil y rígido al enfriarse y por la temperatura de fusión. Cuando el PET es sometido a una temperatura vítrea (80°C) toma una consistencia entre un estado líquido y sólido que aparentemente no llega al equilibrio termodinámico, provocando una inestabilidad en el material en donde se puede descartar el uso del plástico. A su vez, si al PET se lo somete a la temperatura de fusión (260°C), provoca cambios en las propiedades del polímero como su fragilización, pérdida de grupos laterales en su estructura y, por ende, se acomoda en estructuras con una menor estabilidad que la original dando un aspecto de un PET más frágil, es decir, el estado sólido y líquido del PET, con esta temperatura se llega a un equilibrio termodinámico. La principal desventaja de este

método es la fragilidad del material, ya que no se sabe si puede ser reutilizable (Chamas et al., 2020).

1.1.3.2.2 Degradación mecánica

La degradación mecánica es inducida automáticamente mediante la separación de sus contaminantes para posteriormente ser reprocesado en pequeños fragmentos en forma de gránulos, esto se da por la inducción de esfuerzos mecánicos y el resultado es la reducción de tamaño, fusión y reformación del plástico. Uno de los problemas que presenta este método es el resultado final, el cual, al reutilizar el plástico puede causar daños en alimentos, por lo que no se mantiene un control adecuado en el plástico tratado, ya que puede darse la emisión de gases y sustancias tóxicas no aptos para el uso (Khoonkari et al., 2015). Otra desventaja, es en el reprocesamiento de PET por reducción de la viscosidad, que es causada por la degradación hidrolítica y térmica, en donde se pueden generar oligómeros lineales y cíclicos, que afectan las propiedades del producto final como imprimibilidad o su color. La desventaja más grande dentro del reciclaje de PET tratado después de procesos mecánicos es su color amarillo. Este color amarillo es la consecuencia del entrecruzamiento intramolecular y reacciones de oxidación. Esto conlleva una problemática significativa para el PET que es reusado en la producción de botellas (Sabagh et al., 2016).

1.1.3.3 Biodegradación de PET

La biodegradación es la descomposición del PET en sustancias más simples mediante un proceso enzimático o metabólico en donde participan diferentes microorganismos ya sean bacterias, hongos, entre otros. En el proceso de descomposición del PET, los microorganismos se unen a la superficie de las láminas o películas de PET secretando hidrolasas de PET extracelulares, y en conjunto inician el proceso de biodegradación rompiendo las estructuras **moleculares** (Jaiswal et al., 2019; Kawai et al., 2019). Las hidrolasas actúan en el enlace éster del PET, y lo hidrolizan a TPA y EG lo que origina productos de hidrólisis incompleta como: mono-2-hidroxiethyl ácido tereftálico (MHET) y tereftalato de bis-(2-hidroxiethyl) (BHET)

(Yoshida et al., 2016). Para comprobar el potencial de degradación de los microorganismos, se utiliza el método de zona clara en una placa de agar. El plástico se aplica en la placa de agar y se inocula los microbios, estos liberan una enzima extracelular que se difunde en el agar y van degradando los polímeros en componentes solubles en agua y se forma una zona clara lo que indica que ha cumplido el proceso de degradación.

En la actualidad, existen chasis microbianos los cuales son un soporte que constan de sistemas biológicos diseñados en biología sintética en donde se puede programar información genética y expresar genes de codificación, como soporte de almacenamiento biológico, se utilizan las bacterias, hongos y microalgas marinas. Éstos chasis microbianos se pueden emplear para la expresión de hidrolasas de PET que son aptos para su degradación, es por eso que se han diseñado biocatalizadores con estos chasis para una facilidad de degradación de PET, estos procesos evitan la larga purificación de las enzimas y también permiten la reutilización de este sistema para diferentes reacciones, lo cual es mucho mejor a comparación de solo enzimas libres (Qi et al., 2022; Serra & De Simeis, 2018). La generación de chasis microbianos en biocatalizadores ha resuelto la baja actividad de las enzimas y su inactivación por factores ambientales, sin embargo, presenta una gran desventaja al llevarlo a escala industrial.

A través del tiempo para la degradación de PET, la mayor carga la tiene la degradación biológica, ya que existen diferentes fuentes de microorganismos aptos para este proceso debido a su producción de enzimas que hidrolizan al PET, en donde la actividad de degradación ha sido eficiente y menos contaminante a comparación con los métodos químicos o físicos químicos.

1.1.4 Fuentes microbianas de enzimas hidrolizante

1.1.4.1 Enzimas de *Ideonella sakaiensis*

La enzima *Ideonella sakaiensis* fue descubierta por un grupo de investigadores de Japón. Realizaron estrategias de biorremediación y bioreciclaje de los desechos de PET, en donde se podía dar diferentes aplicaciones a los desechos, con su experimentación se dieron cuenta que en botellas de reciclaje crecía una bacteria que degradaba el plástico la cual era la *I. sakaiensis* (Taniguchi et al., 2019; Yoshida et al., 2016). La bacteria ha demostrado que puede crecer en un medio que contiene como sustrato el PET, a su vez las enzimas encargadas de este proceso son la PETasa o también llamada IsPETasa y MHETasa, en donde la primera enzima tiene alta afinidad por el PET de mayor cristalinidad a temperatura ambiente y lo convierte en MHET, TPA y BHET, y la otra es la que degrada el producto intermedio que se forma de MHET a TPA y EG (Palm et al., 2019). Estas enzimas presentan una mayor preferencia catalítica por el PET a comparación con otras enzimas hidrolíticas como la de las cutinasas (Taniguchi et al., 2019).

1.1.4.2 Enzimas actinobacterianas

Las enzimas actinobacterianas son encontradas por lo general en el suelo, y son las encargadas de descomponer materia orgánica, también han sido utilizadas para la degradación de PET. Una de las cepas de actinobacterias es la *Thermobifida fusca*, la cual es un actinomiceto termófilo capaz de producir enzimas para hidrólisis de PET. La cepa *T. fusca* DSM43793 produce hidrolasas BTA-1 y BTA-2 y la *T. fusca* KW3 produce cutinasas TfCut1 y TfCut2 (Welzel et al., 2002). Una enzima cutinasa TfH (BTA-1) aislada por Müller et al., (2005) fue utilizada para degradar botellas de PET prensadas durante 3 semanas a 55 °C con una reducción de pesos al 50%, la cual mostró que esta enzima requiere de altas temperaturas para poder degradar por completo el plástico y también de un tiempo largo.

Dentro de este grupo de enzimas no solo se encuentran las derivadas de actinomicetos, sino que también se incluyen a las esterasas como la de *Bacillus subtilis*, cutinasa de *Pseudomonas mendocina* y lipasa de *Burkholderia* spp (Carr et al., 2020). Aunque exista una variedad de enzimas de este tipo no son las más

utilizadas debido a que requieren en su crecimiento altas temperaturas, la cual es una limitación muy grande.

1.1.4.3 Enzimas fúngicas

Las enzimas fúngicas son las derivadas de hongos, en este grupo de enzimas se consideran a las cutinasas de hongos como las de *Fusarium* y *Humicola*, sus actividades se han evaluado en películas de PET de baja cristalinidad del 7 al 35% respectivamente (**Ronkvist et al., 2009**). Como se puede denotar la actividad enzimática es muy baja para obtener un buen resultado, y, es por eso que tampoco se las utiliza con mucha frecuencia para este proceso.

1.1.5 Enzimas modificadas para la degradación de PET

Actualmente se han desarrollado enzimas hidrolíticas modificadas para la degradación de PET como: lipasas, cutinasas, esterasas, PETasa y MHETasa. Las lipasas son las que presentan más bajo rendimiento de hidrólisis de PET debido a que sus centros catalíticos son cubiertos por estructuras tipo tapa (estructura que cubre el sitio de unión del sustrato) que limitan el contacto y catálisis con el sustrato PET. Por otro lado, las cutinasas son más fuertes en cuanto a su capacidad de hidrólisis, y esto se debe a sus grandes bolsillos de unión al sustrato (sin estructuras tapa), lo cual ayuda a la fácil combinación del PET con sus centros activos, sin embargo, las cutinasas necesitan de altas temperaturas entre 50 y 70 °C para la degradación al igual que las esterasas (**Yoshida et al., 2016**). El descubrimiento de las enzimas PETasa y MHETasa, ha tenido una mayor eficiencia al degradar PET a 30 °C, es decir, son más propensas a degradarlo a la temperatura ambiente. Aún se sigue estudiando sus comportamientos por la aparición de variantes. Estas enzimas, como se dijo fueron descubiertas por **Yoshida et al., (2016)**, quienes aislaron la bacteria *I. sakaiensis* 201-F6, que es capaz de degradar el PET y emplearlo como única fuente de carbono y energía. A continuación, se redacta las enzimas utilizadas para la degradación de PET.

1.1.5.1 Enzimas cutinasas

Las enzimas cutinasas son producidas por microorganismos saprofitos, estas utilizan la cutina como fuente de carbono en donde se rompe la barrera de la cutina y entra a las plantas directamente como hospedantes. La cutinasa posee ciertas propiedades catalíticas para la degradación del PET, por lo tanto, ha llamado la atención de muchos investigadores en los últimos años. Es un sustituto bien estudiado de los productos químicos agresivos que generalmente se practican durante la hidrólisis y reciclaje de plásticos con base química (Tournier et al., 2020).

1.1.5.2 Enzimas lipasas

Las enzimas lipasas se las puede encontrar en la naturaleza y también dentro de procesos metabólicos de algunos animales y plantas, son utilizadas por su alto rango de actividad en ciertos sustratos como el PET, se utilizan en especial la *Candida cylindracea* y *Pseudomonas sp.* También se han realizado lipasas inducidas por BHET/TPA de *Aspergillus oryzae* (Maurya et al., 2020). Según Bollinger et al., (2020) la combinación de las enzimas *Candida antarctica* (1B CALB) y la cutinasa Hlc permite una hidrólisis eficaz de PET a TPA. Sin embargo, Hlc presenta una limitación al convertir MHET (intermedio de la hidrólisis del PET) en TPA, en cambio la enzima CALB lo convierte con facilidad, pero tiene una menor eficiencia al utilizarlo solo (Maurya et al., 2020).

Por lo tanto, la degradación de PET utilizando cutinasas y lipasas se ha convertido en un importante foco de investigación; sin embargo, estas enzimas están limitadas por su capacidad de degradación de PET que no es tan alta, y el requerimiento de una temperatura considerablemente alta de aproximadamente 70 °C para llevar a cabo su actividad (Chen et al., 2018).

1.1.5.3 Enzimas esterasas

Las enzimas esterasas son utilizadas para romper los enlaces ésteres de los monómeros de PET, se las pueden encontrar en la mayoría de los organismos vivos. Se ha utilizado la nitrobencilesterasa de *Bacillus subtilis* y se ha aplicado para hidrolizar el PET en TPA y MHET (Austin et al., 2018). Existe una poliesterasa recombinante termoestabilizada de *Saccharomonospora viridis* AHK190 capaz de hidrolizar PET, con esta enzima se observó que la actividad de hidrolización de PET aumentaba en presencia de iones de Ca^+ . A pesar de los estudios y avances que se han realizado, se ha considerado que presenta las mismas limitaciones de las lipasas y cutinasas (Kawai et al., 2014).

1.1.5.4 Enzima PETasa

La enzima PETasa fue aislada de la bacteria *I. sakaiensis* 201-F6, de ahí se denota el nombre *Is*PETasa, la cual utiliza el PET como fuente de energía y carbono, fue encontrada en una fábrica de reciclaje de botellas de plástico en Japón (Yoshida et al., 2016). Se ha establecido que la *Is*PETasa destaca en su estructura cristalina por el sitio activo, que a comparación con las cutinasas es más ancho, por lo que se debe su alta especificidad hacia el PET (Chen et al., 2018; Kawai et al., 2019). Consta de una excelente actividad hidrolítica para hidrolizar PET a BHET, de MHET en TPA como se muestra en la figura 3. Esta enzima degrada a 30 °C con pH 7, tiene un rango que va de 5.5 a 120 veces de eficiencia a comparación con las otras enzimas (Samak et al., 2020).

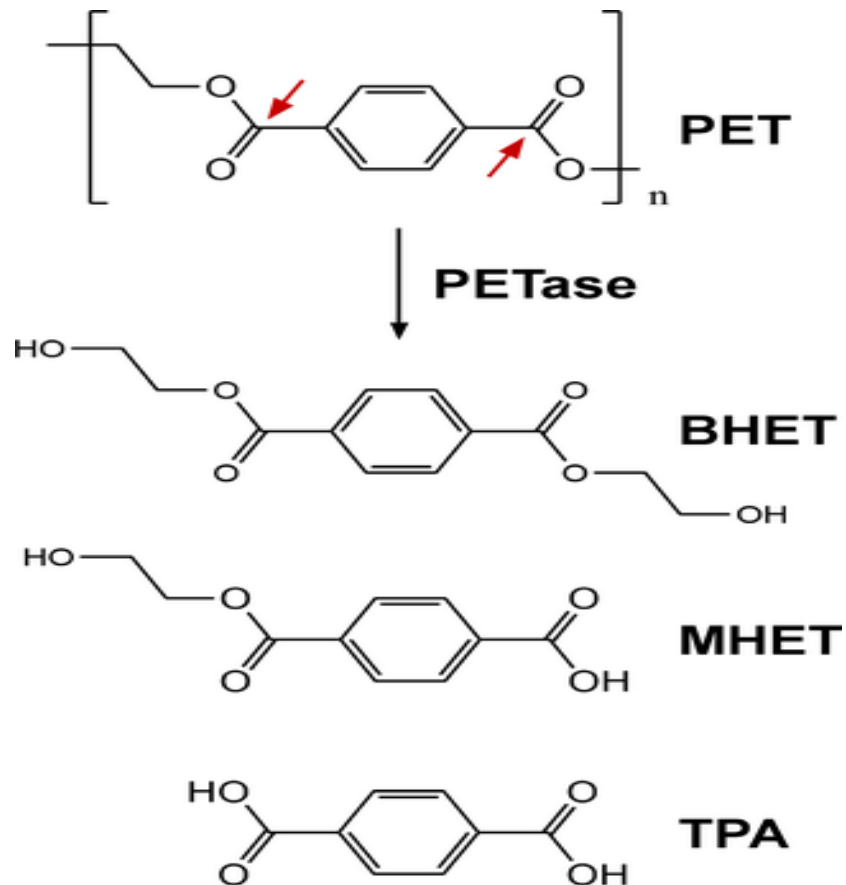


Figura 3. Degradación de PET.

La enzima PETasa cataliza la escisión hidrolítica de PET para producir BHET, MHET y TPA. Los sitios de escisión potenciales de PET se indican mediante flechas rojas.

Fuente: (Chen et al., 2018)

1.1.5.1 Enzima MHETasa

La enzima MHETasa 201-F6 de *I. sakaiensis* es la encargada de degradar el MHET del PET hasta reducirlo a TPA y EG, a una temperatura ambiente como se muestra en la figura 4, lo que le permite convertirlo en la materia prima inicial para la producción del PET (Pinto et al., 2021).

Cadena polimérica de PET

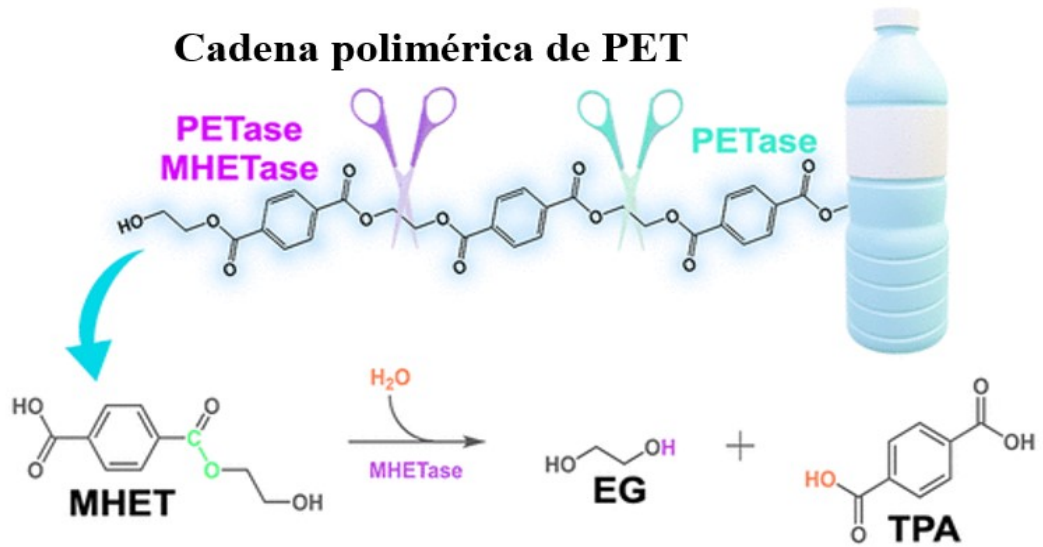


Figura 4. Degradación de PET por la enzima MHETasa.
La MHETasa convierte el MHET en los monómeros TPA y EG

Fuente: modificado de Pinto et al., (2021)

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Explorar los avances realizados en la enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis* con el fin de mejorar su actividad catalítica.

1.2.2 Objetivos específicos

- Identificar bibliográficamente al menos 10 mutaciones efectuadas en la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.
- Recopilar estructuras tridimensionales de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* y sus variantes mutantes, determinadas por cristalografía de rayos X, con el fin de evaluar los cambios en la polaridad, hidrofobicidad y volumen que se producen por la substitución de residuos.
- Identificar al menos 2 adyuvantes que incrementan la actividad de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.

CAPITULO II METODOLOGÍA

2.1 Métodos

Esta investigación bibliográfica consta de la recopilación y revisión de información experimental contemporánea sobre la enzima PETasa de *I. sakaiensis*. La información identificada se analizó de acuerdo con su naturaleza y se evaluó con el fin de identificar brechas en el conocimiento que permitan establecer la necesidad de crear y abordar nuevas líneas de investigación. El principal propósito de este proyecto fue analizar la información con mayor relevancia, seleccionar e identificar tanto la información como la metodología empleada y sobre todo responder las interrogantes acerca de la temática de investigación para poder acaparar los vacíos investigativos en múltiples áreas (**Baker, 2016**).

2.2.1 Primera etapa

2.2.1.1 Pregunta de investigación

En la primera etapa se generó la pregunta de investigación, se planteó mediante los lineamientos establecidos dentro del manual Cochrane, en donde se define las características, tipo de personas que van a participar, las intervenciones, comparaciones que se deben hacer, los criterios de valoración más importantes o resultados, también llamado PICO por su terminología en inglés (**Sobre et al., 2011**).

Tabla 1. Selección de variables para la pregunta de investigación

| Parámetros PICO | Características del tema de investigación |
|--------------------------------|---|
| Participantes/Población | Enzima PETasa de <i>I. sakaiensis</i> |
| Intervención | Métodos de investigación, tesis, artículos o libros. |
| Comparación | Identificación de la información actual acerca de los avances, mutaciones, estructuras y adyuvantes en cuanto a las variantes desarrolladas de la enzima <i>I. sakaiensis</i> . |
| Resultados | Mutaciones encontradas, estructuras y adyuvantes. |

- Pregunta de investigación

¿Cuáles son los avances actuales en mutaciones, estructuras y adyuvantes de la enzima *IsPETasa* para una mayor eficiencia en cuanto a la degradación del PET?

2.2.2 Segunda Etapa

2.2.2.1 Bases de datos digitales

Las bases digitales utilizadas dentro de la investigaciones fueron:

- Springer Link
- ProQuest
- PubMed
- Science Direct
- ResearchGate
- Scielo

- Web of Science
- Latindex

2.2.2.2 Programas digitales para las estructuras

Se utilizaron para encontrar y desarrollar las estructuras de las variantes mutantes de la enzima *IsPETasa*.

- WinCoot
- PyMOL

2.2.2.3 Equipos

- Computadora personal
- Router de internet

2.2.2.4 Criterios de elegibilidad

Dentro de una revisión sistemática de una investigación narrativa se debe considerar criterios de inclusión y exclusión de estudios o también conocido como criterios de elegibilidad.

2.2.2.5 Criterios de inclusión

Para esta revisión se tomó a consideración que la información que se describirá dentro de los resultados será a partir del 2020 en adelante, sin embargo, en los antecedentes investigativos se tomaron en cuenta estudios publicados desde el 2016 en un 80%. Como prioridad en idioma inglés y español enfatizando la información dada en el título y resumen, además se analizó completamente el texto de acuerdo a:

- Artículos, tesis, revisiones o libros, en donde se encuentre información acerca de los avances realizados en las mutaciones y variantes de los residuos encontrados en la enzima *IsPETasa* con respecto al incremento de la actividad enzimática a favor de la degradación del PET.
- Artículos, tesis, revisiones o libros, en donde se encuentre información acerca de las estructuras tridimensionales de las mutaciones encontradas en la enzima *IsPETasa* con respecto al incremento de la actividad enzimática a favor de la degradación del PET.

- Artículos, tesis, revisiones o libros, en donde se encuentre información acerca de los avances en adyuvantes que incrementen la actividad enzimática de la enzima *IsPETasa* con respecto a la degradación del PET.

Criterios de exclusión

La información y documentación de estudios científicos para exclusión fueron los que cumplieron con los criterios de inclusión, basándose en cada objetivo propuesto.

2.2.3 Tercera Etapa

2.2.3.1 Búsqueda de información

La búsqueda de información se basó en los términos y criterios descritos con anterioridad y también basados en las estrategias de búsqueda para agilizar el proceso.

2.2.3.2 Estructura de estrategia de búsqueda científica

En las diferentes bibliotecas informáticas para la identificación, filtración y selección de la información, se utilizó términos de sintaxis de búsqueda (operadores booleanos, de campo, proximidad y truncamiento) o búsqueda booleana que ayuda a optimizar los resultados e identificar los artículos más relevantes, siguiendo los criterios antes mencionados para incluir en la revisión de **literatura (Baker, 2016; Sobre et al., 2011)**.

Tabla 2. *Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para los avances de la IsPETasa*

| | Simplificaciones de búsqueda en bases de datos |
|---|--|
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para Google académico, Scopus, Springer y Science | <ul style="list-style-type: none"> - “Variant” + “PETase” - “Mutation” + “PETase” - “Catalisys” + “PETase” - “Structure three dimensional” + “mutation PETase” - “Adjuvant” + “PETase” |
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para PubMed | <ul style="list-style-type: none"> - PETase mutation AND “Ideonella sakaiensis” AND (“last 2 years (PDat)) |

Tabla 3. *Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para las estructuras tridimensionales de la IsPETasa*

| | Simplificaciones de búsqueda en bases de datos |
|---|--|
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para Google académico, Scopus, Springer y Science | <ul style="list-style-type: none"> - “Structure” + “PETase” - “Mutation” + “PETase” - “Crystal” + “PETase” - “Structure three dimensional” + “mutation PETase” - “Tridimensional” + “PETase” |
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para PubMed | <ul style="list-style-type: none"> - PETase mutation AND “Ideonella sakaiensis” AND (“last 2 years (PDat)) |

Tabla 4. *Simplificaciones y fórmulas de búsqueda para los adyuvantes de la IsPETasa*

| | Simplificaciones de búsqueda en bases de datos |
|---|---|
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para Google académico, Scopus, Springer y Science | <ul style="list-style-type: none"> - “Adjuvant mutation” + “PETase” - “Substances” + “PETase” - “Catalisys” + “PETase” - “Substance enhancements” + “mutation PETase” - “Adjuvant” + “PETase” |
| Búsqueda con sinónimos y operadores lógicos para PubMed | <ul style="list-style-type: none"> - PETase mutation adjuvants AND “Ideonella sakaiensis” AND (“last 2 years (PDat)) |

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Identificación de las mutaciones efectuadas en la enzima *PETasa* de *I. sakaiensis*.

3.1.1.1. Descubrimiento de *Ideonella sakaiensis*

La bacteria *I. sakaiensis* 201-F6 o *IsPETasa* fue descubierta por un grupo de investigadores que realizaban un análisis de aguas residuales, lodos activados, suelo y de sedimentos alrededor de una planta de reciclaje de botellas de PET, en donde descubrieron que un microorganismo lo degradaba. Realizaron un análisis en 250 sitios contaminados y en el consorcio 46 se encontraban bacterias que se adherían a la película de PET con una cristalinidad del 1.9% que se considera baja (**Yoshida et al., 2016**).

La cepa encontrada en el consorcio 46 pertenecía al género *Ideonella* correspondiente a la bacteria *I. sakaiensis* 201-F6 de la familia *Comamonadaceae*, la cual se adhería a la película de PET lo que ocasionaba cambios en la morfología (deterioro de la película y blanqueamiento de la superficie) (**Yoshida et al., 2016**), todo estos cambios se daban a temperatura ambiente a una tasa de deterioro de 0,13 mg/cm² por día y se catabolizó el 75 % del carbono, esta bacteria se encargaba de degradar el PET utilizándolo como sustrato, se identificó la participación de dos enzimas: PET hidrolasa (*PETasa*) y mono (2-hidroxietil) ácido tereftálico hidrolasa (*MHETasa*) las cuales tienen una alta actividad de degradación de PET (**Joo et al., 2018**). Mediante un análisis filogenético se detectó que la *IsPETasa* pertenece a las cutinasas y tiene similitud con otras cutinasas homólogas de hasta un 47% de la familia *Thermobifida* (**Han et al., 2017**).

3.1.1.2 Características únicas de la estructura de la *IsPETasa*

La enzima presenta un pliegue tipo α/β -hidrolasa que contiene una lámina β central retorcida que constituye nueve hebras β que están interpuestas por seis hélices α . Su triada catalítica comprende S160, D206 y H237 (Figura 5) en donde el bolsillo de unión se encuentra en la serina lo cual permite la fácil unión del sustrato. El sitio activo de la PETasa es mucho más ancho en comparación de las enzimas cutinasas, su espacio de unión al sustrato es más amplio y es un factor importante para que se pueda acomodar el PET como sustrato (Han et al., 2017).

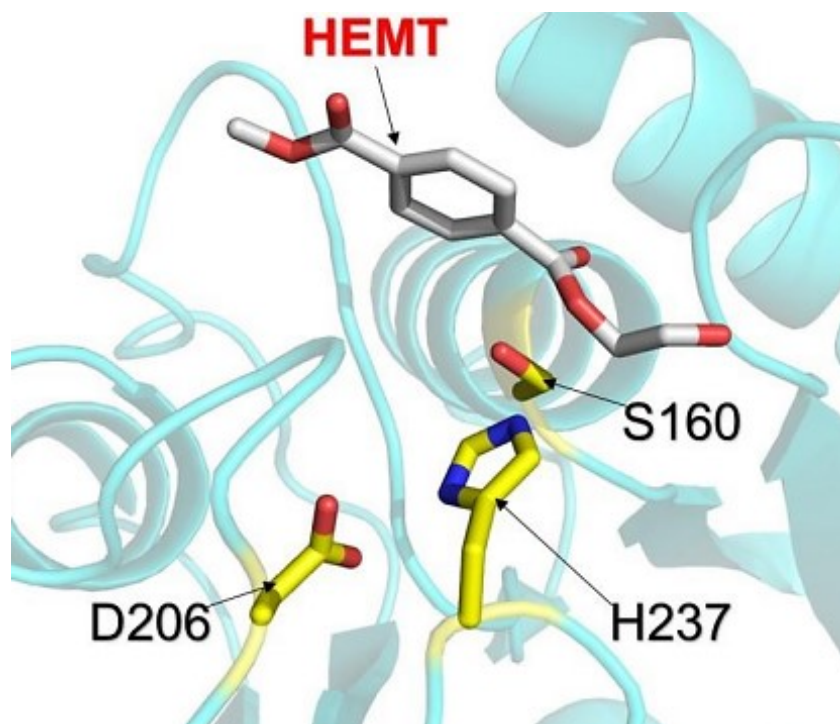


Figura 5. Estructura de la *IsPETasa*

Fuente: modificado de Aguirre, (2022)

3.1.1.2.1 Bamboleo W185

El bamboleo W185 o wobbling 185, se da por el residuo W185 adyacente al centro catalítico con conformaciones variables en sus estructuras cristalinas, y algo importante es que existe un Trp similar en cada enzima hidrolizante de PET, pero con diferente posición es así el caso del Trp en las cutinasas (W155) (Figura 6), sin

embargo, no se había observado un balanceo del residuo W185, el Trp de *IsPETasa* se encuentra en 3 conformaciones diferentes etiquetadas como "A", "B" y "C" como se muestra en la Figura 6. Su conformación se encuentra oscilándose en la enzima, lo que ayuda a la fácil unión del sustrato y a la salida del producto. Las orientaciones de la cadena lateral de la sustitución antes mencionada probablemente contribuyen a modificar el sitio activo entorno a la hendidura, proporcionando una cavidad más amplia y flexible, adecuada para el alojamiento del sustrato (Berselli et al., 2021). El aminoácido S214 es también diferente en la estructura de la *IsPETasa* debido a su reemplazo por una His en las enzimas homólogas, estudios posterior indicarán que una cadena lateral de His se encontrará demasiado cerca para que se dé el conformero "A" o "B" de W185 lo cual permite que no adopte otras conformaciones alternativas, pero un residuo de Ser puede provocar un espacio adecuado para el conformero "C", es decir el movimiento de W185 se da por el residuo S214 o en pocas palabras el bamboleo de W185 está acoplado a S214 (Han et al., 2017). Lo que permite un mejor acople del sustrato en el sitio activo.

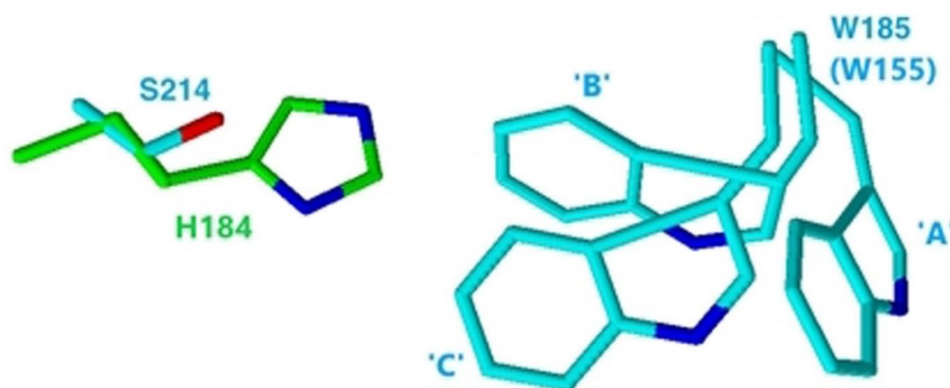


Figura 6. Representación de las tres conformaciones del wobbling W185

W155 solo cuando se trata de una cutinasa. El residuo S214 está representado de color celeste y H184 de color verde.

Fuente: (Berselli et al., 2021)

La *IsPETasa* es una de las enzimas que muestra mayor capacidad de degradación de PET por tener una temperatura moderada al ambiente y ésta a su vez es su limitante por la baja capacidad de degradar polímeros de alta cristalinidad (Yoshida et al.,

2016). El mecanismo de *IsPETasa* ha sido definido en una estructura cristalina con un mecanismo catalítico, posterior a la adherencia del PET al sitio activo de la enzima con una cavidad hidrofóbica plana éste se degrada en monómeros de MHET por medio de rupturas y digestión (**Joo et al., 2018**). Para aumento de la actividad enzimática se han diseñado varias mutaciones, las cuales han modificado tanto en su estructura como en aumento significativo en la actividad a través de su termoestabilidad, disminución o aumento de las distancias entre residuos.

3.1.3 Mutaciones y variantes desarrolladas para la mejora de la enzima *IsPETasa*

A partir del descubrimiento de las hidrolasas de PET, en ingeniería de proteínas han desarrollado la mejora de las propiedades catalíticas, los datos biológicos junto con algunos métodos informáticos han dado apertura al diseño de proteínas con el único fin de mejorar la estabilidad de las proteínas (**Erickson et al., 2021**). Las mutaciones en términos generales se pueden considerar al cambio en el código genético o también al cambio de aminoácidos que al momento de ser copiado se produce estos pequeños o grandes errores de transcripción. A su vez, las variantes son la agrupación de distintas mutaciones donde también pueden ser llamadas ramas o linajes (**Gamero & Gamero, 2021**). A continuación, se muestra algunas mutaciones y variantes que han desarrollado científicos a lo largo del descubrimiento de *IsPETasa* para lograr la mejora de la actividad catalítica para la degradación de PET (Tabla 5 y 6).

A través de intentos de obtención de estructuras complejas por medio del remojo de los cristales de la enzima PETasa de tipo salvaje o nativa (WT) en varios ligandos, **Han et al., (2017)**, consideraron que no existía ningún cambio entre la densidad de los electrones añadidos correspondientes al ligando, por lo que utilizaron la variante S131A inactiva para evitar la hidrólisis del ligando, en donde se observó que su actividad era muy baja en comparación con la WT. Sin embargo, sus intentos de obtención de estructuras complejas con la variante S131A en cristalización fallaron. Al cristalizar la cadena R103 y S131 penetraban en la proteína en una hendidura de la superficie lo que ocasionaba que la R103 ocupara la cavidad adoptada de la unión del

sustrato, es decir, evitaba que el sustrato se una, lo que conlleva a una deficiencia de degradación del PET. Las proteína WT y S131A tampoco se podían cristalizar en una célula unitaria diferente a diversas condiciones de cristalización.

Por esta razón crearon y cristalizaron el doble mutante R103G/S131A o (DM) para formaciones complejas. En comparación las estructuras cristalinas de WT, S131A y la nueva doble mutante DM propone que estas mutaciones no modificaron significativamente el pliegue de la proteína, es decir el pliegue presentó una desviación cuadrática media de la raíz de $C\alpha = 0.144-0.2 \text{ \AA}$. Al remojar los cristales de DM en tereftalato de 1-(2-hidroxietil) 4-metil (HEMT), el cual es un semejante de la proteína que se enlaza en el sitio activo, y en p-nitrofenol (pNP) como se muestra en la Figura 6, se desarrolló densidades claras para ambos ligandos, y los compuestos se modelaron en una cavidad o hendidura no tan profunda en la superficie de la proteína (**Han et al., 2017**). Lo que permite una mejor adaptación del sustrato en la cavidad del sitio activo.

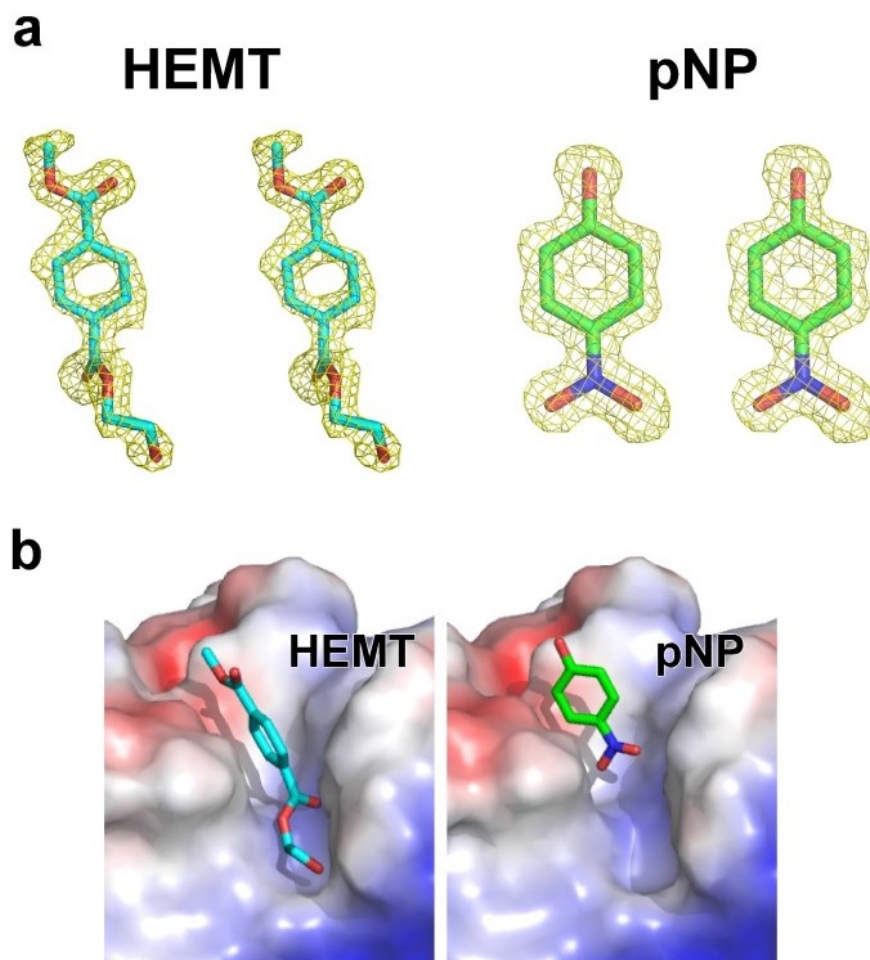


Figura 7. DM en HEMT y pNP

a. Representación de mapas OMIT F_o-F_c de los electrones de los ligandos unidos a la estructuras complejas de PETasa con un contorno de 3.0σ y vista estéreo, b. los ligandos en DM-HEMT (celeste-rojo) y DM-pNP (verde-azul) y se muestran en la superficie de la hendidura de la proteína cubierta con superficies electroestáticas (rojo-azul)

Fuente: (Han et al., 2017)

(Han et al., 2017), desarrolló una mutante a partir del bamboleo W185 ya que se determinó que ese efecto se producía por el residuo S214 nombrado anteriormente, por lo tanto, construyeron la variante S214H con una actividad de producción resultante de $43.87 \pm 0,30$ % de MHET y $9.73 \pm 0,77$ % de TPA, lo que mostró que S214 juega un papel importante en la catálisis de la *Is*PETasa y con el reemplazo de la

His mejora igualmente la actividad de modo que la unión del sustrato sea facilitada e incluso la salida del producto.

La mutación S121E/D186H/R280A fue diseñada para tener un bucle de conexión estabilizado $\beta 6$ - $\beta 7$ y un subsitio extendido IIc, tuvo un valor de temperatura de fusión o T_m que se incrementó en 8.81 °C y la actividad de degradación de PET se mejoró en 14 veces a 40°C en comparación con la *IsPETasa* WT. Las modificaciones estructurales diseñadas se verificaron a través de la determinación de la estructura de las variantes, y la alta estabilidad térmica se condujo aún más mediante un experimento de inactivación por calor. La estrategia propuesta y las variantes desarrolladas representan un avance importante para lograr la biodegradación completa del PET en condiciones controladas (Son et al., 2020; Yoshida et al., 2021).

Una variante termoestable diseñada de *IsPETasa* es también la R280A/S121E/D186H N233C/S282C o TS-PETasa, cuenta con una temperatura de desnaturalización de $69.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$. Según Zhong et al., (2021), se realizó un ensayo de absorbancia para medir a lo largo del tiempo las velocidades cinéticas a concentraciones diferentes (Figura 8A). Al inicio del experimento pudieron observar que los cambios de las velocidades iniciales tanto de la TS-PETasa y la WT se mantienen lineales lo que produce una desaceleración de la reacción (Figura 8B) y depende de las concentraciones y la variante, es decir la tendencia de la tasa de formación de producto disminuye al aumentar la concentración de enzima. La variante mutante TS-PETasa mostró una diferencia de velocidades iniciales de 1.6 a 2 veces altas a menor concentración de enzima a 20 y 40 nM y también al incremento en 300 y 400 nM, por lo tanto, la velocidad máxima inicial que alcanzó la variante fue 20% mayor a la WT (Figura 8A). Con la variable tiempo se observó una evolución del producto y se denotó que esta variante alcanza 6.8 veces a las 72 horas y 4.9 veces a lo largo de los 6 días frente a la WT a una temperatura de 30 °C en concentración de 400 nM. Se realizó experimentos con un mayor aumento de temperatura de 48 °C y 58 °C, en donde la velocidad catalítica de la variante fue de 6.6 y 14.3 veces a 48 °C y 58°C respectivamente (Figura 9). Con el cambio considerable de velocidades a través del tiempo y temperaturas entre la TS-PETasa y WT, concluyen que se debe a una

estabilidad mejorada de la variante y no de una mejora en la velocidad catalítica, para añadir, este estudio mostró que es importante conocer la cinética de degradación de PET de a una variante diseñada frente a la *IsPETasa*.

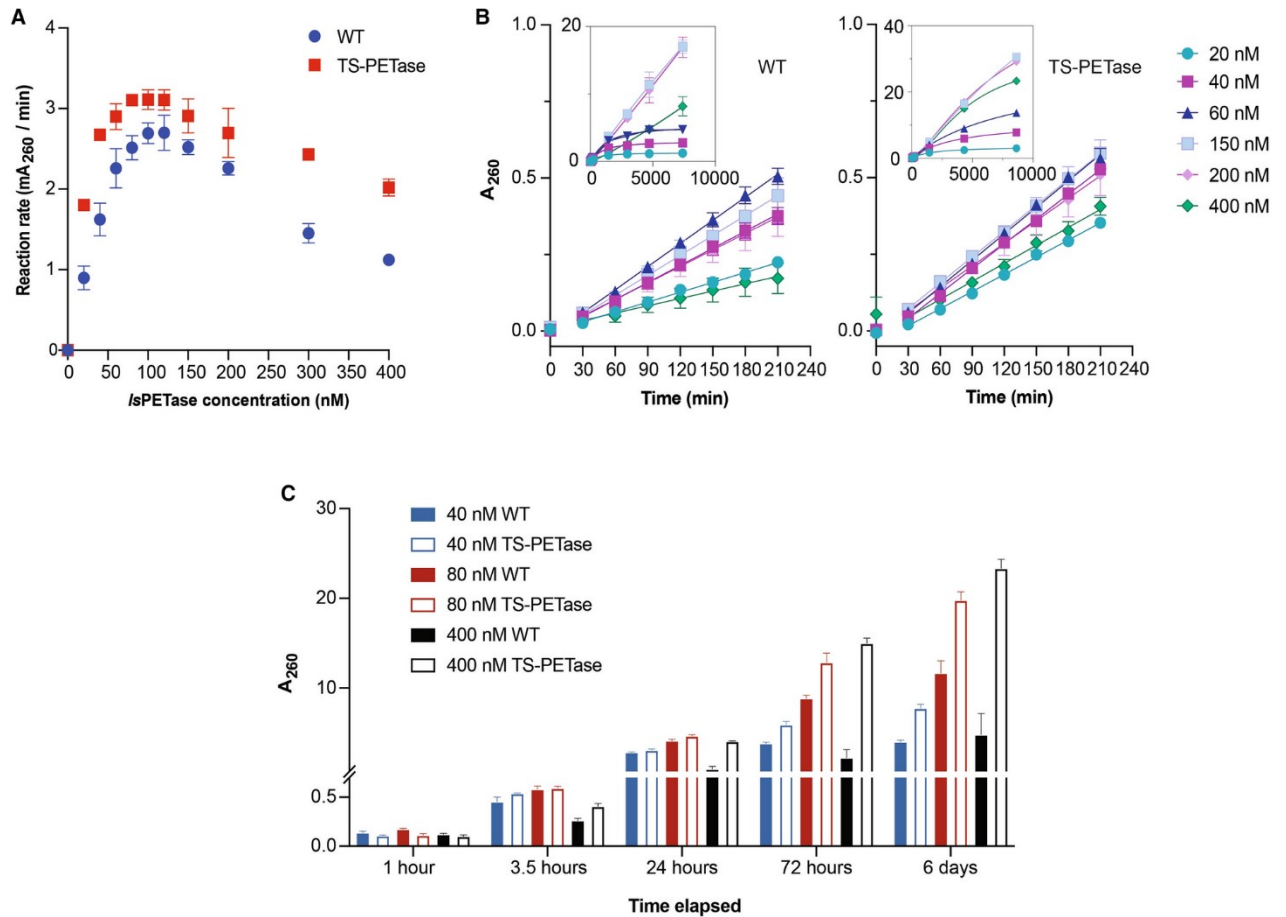


Figura 8. Cinética enzimática WT vs TS-PETasa a 30 °C

A. Velocidades iniciales A_{260} vs concentración de las enzimas. Color azul WT- Color naranja TS-PETasa, B. Tasas iniciales de velocidad, absorbancia vs tiempo a concentraciones diferentes representadas en diferentes colores, C. Comparación del perfil de evolución del producto durante 6 días de WT frente a TS-PETasa. Las barras de color completo o solidas es WT y las barras solo con bordes de color es TS-PETasa

Fuente: (Zhong et al., 2021)

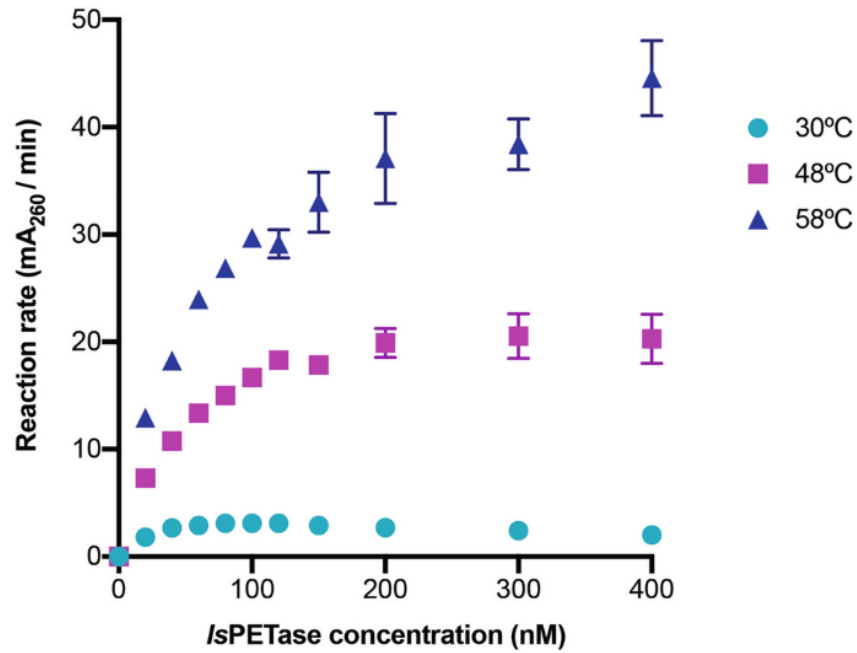


Figura 9. Velocidades cinéticas de TS-PETasa a diferente temperaturas

Representación gráfica de las velocidades iniciales en función de mA₂₆₀/min frente a diferentes concentraciones de enzima, con una aumento de temperatura desde 30 hasta 58 °C.

Fuente: (Zhong et al., 2021)

Cui et al., (2019), diseñaron computacionalmente la enzima *IsPETasa* para poder desarrollar un mutante termoestable S214H/I168R/W159H/S188Q/R280A/A180I/G165A/Q119Y/L117F/T140D o DuraPETasa, esta mutante mostró un aumento de T_m de 31°C y una actividad de degradación de PET que aumenta hasta 38 veces por 24 horas en comparación con la WT en películas de PET semicristalino (23%), la disminución de la energía de activación por DuraPETasa fue igual a la de la *IsPETasa*, es decir que presenta pérdida rápida de su actividad por la inestabilidad aunque permanezca a 37°C, la enzima mostró también un aumento en la tolerancia al metanol (MeOH) y al EG, en donde la degradación ascendió 1.6 y 1.1 veces con MeOH 5 % y 10 % v/v respectivamente. Cuando se incubó con disolvente EG, DuraPETasa mantuvo la mayor parte de su actividad al 5 %, 20 % y 50 % (v/v) de EG y aumentó su actividad de degradación hasta 1.5 veces al incubarla al 10 % (v/v) de EG. Este

rendimiento mejorado de DuraPETasa en cosolventes mejora el potencial de esta enzima para la biodegradación auxiliar en aplicaciones de glucólisis y alcoholisis.

Para ampliar las aplicaciones potenciales de DuraPETasa también se examinó el uso de esta enzima para la degradación de otros poliésteres semiaromáticos, como el polietileno naftalato o PEN y el tereftalato de polibutileno o PBT. El PEN consta de una estructura química muy parecida al PET, la diferencia es que contiene anillos de naftilo, los cuales producen cadenas moleculares mucho más fuertes que los anillos de fenilo del PET. Por consiguiente, el PEN presenta una alta temperatura vítrea (T_g) de 120 °C y excelentes propiedades de tracción y barrera (Kim et al., 1998). A su vez, el PBT muestra una mayor resistencia a la tracción, y características de manejo más rápidas y económicas que muchos termoplásticos. Aunque el producto de degradación de PBT es TPA, la cadena alifática más larga en butanodiol que en EG otorga a PBT de una mejorada resistencia a una amplia gama de productos químicos a temperatura ambiente con una T_g de 50 °C (Androsch et al., 2015). Al analizar la actividad de degradación de la DuraPETasa con PBT, hubo un resultado de degradación lenta, sin embargo, se observó una mejora significativa de la degradación de PEN por DuraPETasa. En el transcurso de los 10 días de incubación, la enzima produjo una concentración máxima de producto de 48 μ M con película PEN, lo que mostró una alta especificidad de hidrólisis de DuraPETasa hacia los poliésteres semiaromáticos por la hendidura activa hidrofóbica rediseñada, aunque la actividad de degradación aún era menor que la del PET (Cui et al., 2019).

La variante *IsPETasa* S121E/D186H/S242T/N246D fue creada mediante la integración de las mutaciones S242T y N246D en la variante *IsPETasa* S121E/D186H/R208A diseñada con anterioridad. Son et al., (2020) y sus colaboradores utilizaron el método de homología de secuencias para el diseño de esta nueva mutante, la variante cuádruple en incubación a 37 °C mantuvo su actividad de degradación de PET durante 20 días, a diferencia de *IsPETasa* WT que perdió su actividad en un día. En consecuencia, este estudio mostró un aumento de 58 veces en la actividad en comparación con *IsPETasa* WT, sin embargo, también se analizó que en polímeros cristalinos de mayor densidad su efecto de degradación es bajo, lo que quiere decir que

el polímero más compacto impide el acceso de la proteína a los grupos químicos libres (Leitão & Enguita, 2021; Son et al., 2020).

Una serie de mutantes diseñadas por Liu et al., (2018) como se muestra en la tabla 5, fueron escogidos los residuos de la tríada catalítica S160, D206 y H237, los bolsillos de unión del sustrato W130, M132, W156, I180, Q90, S185, S209, y también los residuos de estabilización de la rigidez del sitio activo W68, Q153, R94, N212, estos fueron los seleccionados (Han et al., 2017; Joo et al., 2018). El pH y la temperatura óptima para el experimento fue de 30 °C y 7.5 y se utilizó en la medición de las actividades enzimáticas relativas de las diferentes mutantes. La mayoría de las mutantes presentaron una actividad baja a excepción de la W130H y S209F que muestran que juegan un papel importante en la función de degradación de la PETasa. En el ensayo BHET las mutaciones W68, Q153, R94 y N212 bajan la actividad de hidrólisis lo que indica que estos residuos no son puntos viables para la mejora de la proteína. Por otra parte, la cadena lateral Q90, M132 y W156 son alineadas en el mismo lado del bolsillo lo que permite el reconocimiento de partículas de PET y BEHT, ya que se mostró una disminución de la actividad de hidrólisis. Por lo tanto, las mutaciones que permiten dar más espacio en el centro de unión fueron Y58A, W130A, W130H, A180I y una mayor aromaticidad en el borde del bolsillo de unión con el residuo S185H produjeron una actividad más alta que la de la enzima WT. El residuo S209F no genera ningún efecto evidente en el ensayo BHET que disminuye de golpe la hidrólisis de las partículas de PET. Cabe destacar que las mutaciones en los bolsillos de unión producen diversos efectos en las partículas de BHET y PET, lo que propone que el sustrato PET agregado en cantidades altas es más susceptible al acceso del bolsillo de unión que el de BHET.

Tabla 5. Efecto de las mutaciones específicas de un sitio de mutación en la actividad de la enzima PETasa

| Sitios de mutación | BHET | Botellas de PET | Mecanismo | |
|--|-------|-----------------|-----------|---|
| Sitio activo | S160 | < | ND | Interrumpe o paran el proceso de catálisis |
| | D206 | < | ND | |
| | H237 | < | ND | |
| Bolsillos de union del sustrato | W130A | < | > | Influencia en la facilidad de la union del sustrato |
| | W130H | > | > | |
| | M132A | < | < | |
| | W156A | < | < | |
| | A180I | < | </> | |
| | Q90A | < | < | |
| | S185H | < | > | |
| | S209F | < | < | |
| Otras | W68L | < | < | Cambiar la propiedad hidrofóbica |
| | Q153L | < | </> | |
| | R94A | < | < | |
| | N212A | < | < | |

Nota: “>” o “<” significa incrementar o disminuir la actividad enzimática, “</>” indica no hubo cambio significativo y “ND” no detectado.

Fuente: modificado de: Liu et al., (2018)

Tabla 6. Resumen de varias mutaciones de la enzima IsPETasa y su efecto.

| Mutaciones /variantes | Efecto sobre la enzima | Referencia |
|--|--|----------------------------------|
| S131A | Evitar la hidrólisis del ligando en la enzima. | (Han et al., 2017) |
| S131A/R103G | No alteran significativamente el pliegue de la proteína ($C\alpha=0.144-0.2$ Å) para una adaptación mejor del sustrato. | (Han et al., 2017) |
| S214H | Mejorar su actividad de producción en $43.87 \pm 0.30\%$ de MHET y $9.73 \pm 0.77\%$ de TPA y un mejor acople del sustrato. | (Han et al., 2017) |
| S238F/W159H | S238 proporciona nuevas interacciones hidrofóbicas y de apilamiento π a los restos de tereftalato adyacentes. | Austin et al., (2018) |
| | His159 del Trp más voluminoso permite que el polímero PET que se asiente en el sitio activo, | (Joo et al., 2018) |
| S214H/I168R/W159H/ /S188Q/R280A/A180I/ G165A/Q119Y/L117F /T140D | Aumento de la T_m en 31°C y con una actividad de degradación hasta 38 veces mejorada a 37°C por 24 horas en comparación con la WT. | (Cui et al., 2019) |

| | | |
|---|---|--|
| S121E/D186H/R280A | Mayor T _m de 8.8°C y la actividad mejorada de 4,3 veces a 30°C y 9,1 veces a 40°C. | (Son et al., 2020) (Yoshida et al., 2021) |
| S121E/D186H/S242T /N246D | Mayor actividad enzimática de hasta 20 días a 37°C. Aumenta 58 veces en la actividad. | (Son et al., 2020) (Leitão & Enguita, 2021) |
| R280A/S121E/D186H /N233C/S282C | Medir la actividad enzimática a través de una T _m =69.4 ±0.3°C. | (Zhong et al., 2021) |
| S136E | Aumento en la T _m con 43.6 °C, aumento de 2.4 veces en el tiempo de vida media a una temperatura de 45 °C. | Rennison et al., (2021) |
| W159H/F229Y | Cataliza el PET en 24 y 72 h aumento de la T _m en 10.4 °C. El t _{1/2} se triplica a una tasa media de degradación de 23.4 mg PET/h/mg enzima. | Meng et al., (2021) |

Fuente: Elaboración propia

Esta doble mutante S238F/W159H diseñada por **Austin et al., (2018)**, presenta una mayor actividad que la *IsPETasa* descubierta por primera vez. Lo determinaron a través de las concentraciones medidas de MHET y TPA después de 96 horas de reacción con la *IsPETasa* modificada o doble mutante *IsPETasa* S238F/W159H, la WT con 150 mg/L y la doble mutante con 60 mg/L. Es decir, por cada 1.5 ml de reacción de la mutante en el tubo eppendorf la reacción necesitará 50 nM de *IsPETasa* S238F/W159H, para que se obtenga como resultado una despolimerización máxima de 0.35 mg de sustrato. A través de las mediciones hechas por los investigadores denotaron que el cambio del porcentaje de cristalinidad con esta nueva enzima fue de

5.7 % con una concentración de producto MHET de 175 mg/L, con los residuos de Trp159 y Ser238 se recubre el canal del sitio activo y adoptan una interacción más productiva con PET (**Joo et al., 2018**). La mutación S238 proporciona nuevas interacciones hidrofóbicas y de apilamiento π (interacciones de alta atracción no covalentes entre anillos aromáticos) a los restos de tereftalato adyacentes, mientras que la conversión a His159 del Trp más voluminoso permite que el polímero PET se asiente más profundamente dentro del canal del sitio activo (Tabla 6).

Rennison et al., (2021), crearon tres nuevas variantes *IsPETasa* S125R, S136E y T270Q para una mejora en la termoestabilidad, en donde utilizaron dos ensayos: el primero de inactivación por calor en base a la estructura y el segundo a través de la determinación de la vida media de la actividad catalítica. Para la determinación de actividad de las variantes tomaron muestras después de la incubación a 45 °C tanto de las variantes como de la WT, utilizaron el sustrato acetato de paranitrofenol (pNPA). Como se observa en el Figura 10, la T_m de la variante S136E con 43.6 °C (Figura 10a) es la mayor con un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la actividad enzimática de 10.5 min, a comparación de la WT con 42.5 °C, la diferencia no es tan significativa, ya que en otros estudios se han encontrado mutaciones con una T_m de hasta 57.6 °C (**Meng et al., 2021**). La vida media de actividad, $t_{1/2}$, de la variante S136E mostró un aumento de 2,4 veces cuando se mide a 45 °C (Figura 10b), lo que sugiere que esta variante en realidad mejora en términos de termoestabilidad en comparación con *IsPETasa*. También mostró un aumento significativo den la formación de productos en comparación con la WT, su aumento fue de 3.3 veces mayores a una temperatura óptima de 34 °C.

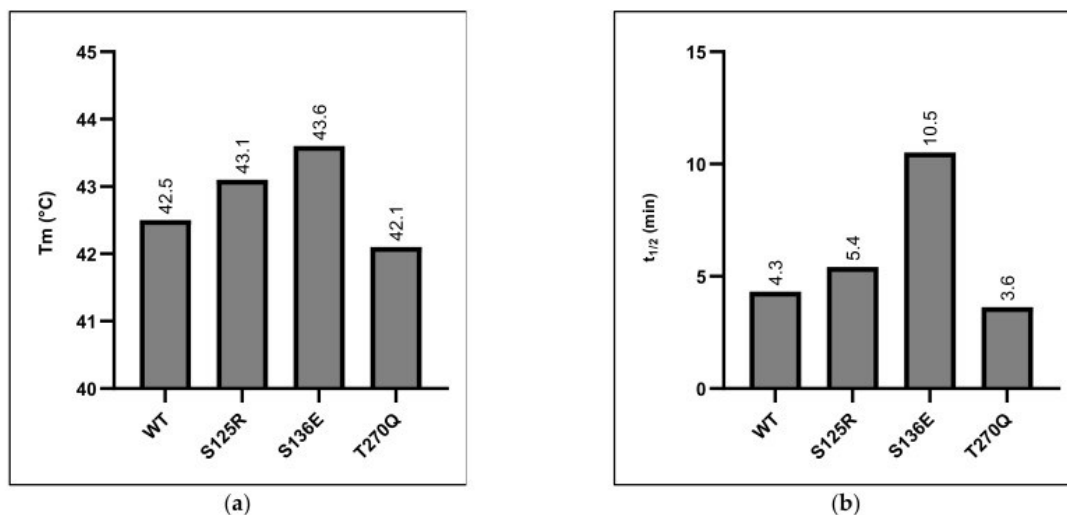


Figura 10. Determinación de la termoestabilidad de variantes de *IsPETasa* y WT.

(a) Histograma de las Tm de las variantes y WT. (b) Vidas medias de la actividad enzimática en el sustrato del modelo pNPA después de la incubación a 45 °C.

Fuente: (Rennison et al., 2021)

Mediante un análisis de criterios y evaluación de la enzima *IsPETasa*, **Meng et al., (2021)** denotaron que la W159H/F229Y exhibió excelentes propiedades enzimáticas, con una Tm que aumentó en 10.4 °C y la vida media fue el triple que la WT. Como resultado se obtuvo, que la variante podría catalizar la biodegradación de la botella de PET en 24 a 72 h, a una tasa media de 23,4 mg PET/h/mg enzima, y superó a la mayoría de las otras variantes de *IsPETasa* reportadas con anterioridad, que solo podían despolimerizar formas amorfas, o PET poco cristalino. W159H/F229Y se proyectó entre solo diez variantes alternativas en el programa Premuse. La excelente tasa de éxito se debió a que la estrategia aprovechó al máximo la información evolutiva contenida en las secuencias de proteínas homólogas (**Porebski & Buckle, 2016**). La Tm de W159H y F229Y fueron de 57.6 y 54.4 °C respectivamente.

3.1.2 Recopilación de estructuras tridimensionales de la enzima PETasa de *I. sakaiensis* y sus variantes mutantes.

3.1.2.1 Estructura cristalina de la *IsPETasa*

La enzima *IsPETasa* consta de un pliegue común de α/β -hidrolasa con un núcleo de nueve hebras β y siete hélices α (Figura 11) y de una tríada catalítica mostrada en la figura 12. Tiene dos puentes disulfuro intramoleculares DS1 y DS2, a diferencia de otras enzimas homólogas que presentan uno solo (DS2). El puente DS2 enlaza la hélice C-terminal con el bucle final y a su vez el DS1 admite la unión de los bucles $\beta7$ - $\alpha5$ y $\beta7$ - $\alpha5$, que alojan, correspondientemente, al ácido catalítico (D206) y la base catalítica (H237) (Han et al., 2017; Pérez, 2020). Diferentes estudios proponen que el daño del puente disulfuro DS1, específico de la *IsPETasa*, conlleva a una disminución de la actividad catalítica de la enzima, lo que involucra que dicho enlace es importante y fundamental en su capacidad para hidrolizar PET (Chen et al., 2018). El bucle $\beta8$ - $\alpha6$ de la *IsPETasa* contiene tres aminoácidos más que el de otras enzimas homólogas. Se ha planteado que este bucle extenso facilita un espacio más amplio que permite la unión del PET a la enzima. De igual manera, es posible que el puente disulfuro DS1 sea preciso para conservar el bucle y los residuos de la tríada catalítica en sus posiciones funcionales (Chen et al., 2018; Joo et al., 2018).



Figura 11. Estructura tridimensional de *IsPETasa*

La tríada se encuentra de diferentes colores: fucsia S160, celeste H237 y amarillo D206, resolución de 0.92 Å con código PDB 6EQE

Fuente: Elaboración propia

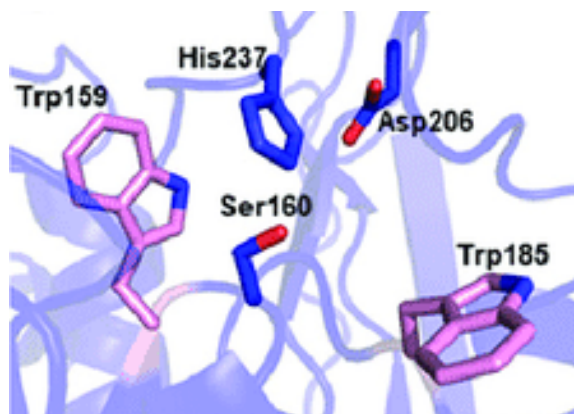


Figura 12. Sitio activo de la *IsPETasa* con su tríada catalítica.

Fuente: modificado de: (Austin et al., 2018)

3.1.2.2 Estructura cristalina del mutante *IsPETasa* W159F de *Ideonella sakaiensis*

La estructura cristalina del mutante PETasa W159F (Figura 13) se pudo encontrar con el código 6ILK en la base de datos de proteínas o como sus siglas en inglés Protein Data Bank (PDB) como se muestra en la tabla 7. En primer lugar fue recolectada en monocristales que luego los transfirieron a glicerol para crioprotección, la información obtenida según Liu et al., (2019), fue de 180 imágenes con resoluciones de 1.60 Å para la enzima *IsPETasa* y 1.45 Å para la *IsPETasa* W159, la enzima mutante se encuentra en el rango de 0.5-1.5 Å en resolución, significa que su estructura a nivel general no consta de errores en su resolución de imágenes, los átomos individuales son resueltos y en este nivel se puede realizar estudios de geometría y bibliotecas Rotamer, en cambio la *IsPETasa* se encuentra en el rango de valores de 1.5-2.00 en donde el número de residuos es menor con poco rotámero incorrecto, por lo general, aquí se detectan pequeños errores y los pliegues incorrectos son muy escasos (Huang-Yu, Huang, & Oyang 2007).

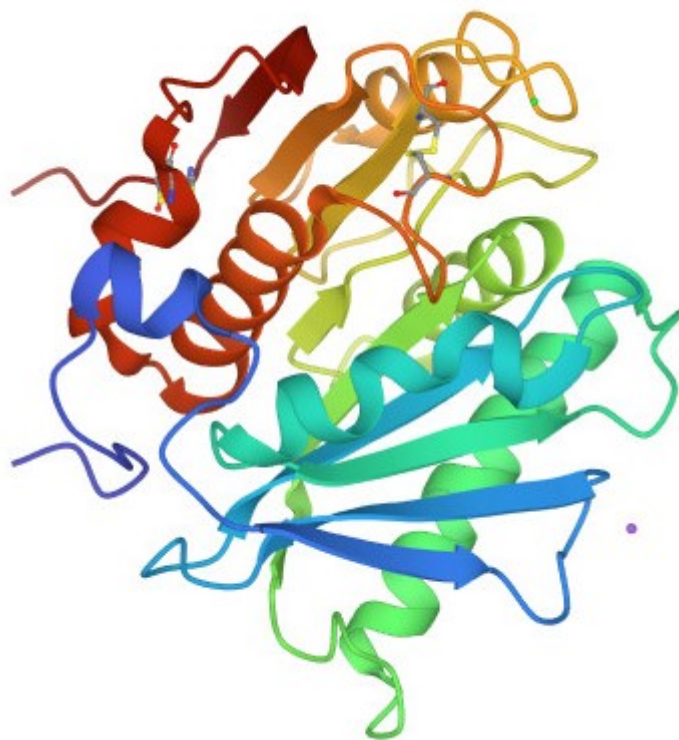


Figura 13. Estructura cristalina de la enzima *IsPETasa* W159F

Fuente: (Liu et al., 2019)

Se realizó una sobreposición de las estructuras cristalinas de la enzima *IsPETasa* e *IsPETasa* W159F bajo el programa Pymol (Pymol, 2022). El PDB de la enzima nativa 6EQE se sobrepuso en 6ILK. La estructura de *IsPETasa* se determinó por reemplazo molecular utilizando Phaser MR. Las coordenadas de la cutinasa de *Thermobifida fusca* (PDB: 4CG1) (Adams et al., 2010), con un 51.7 % de identidad con *IsPETasa*, sirvieron como modelo para el reemplazo molecular. Para poder llegar a la estructura de la mutante *IsPETasa* W159F los investigadores realizaron una observación acerca de la actividad de la enzima nativa al hidrolizar ésteres de naftilo, lo cual era muy baja. Compararon la secuencia de la estructura de la *IsPETasa* con la esterasa de *Exiguobacterium antarcticum* o EaEST, la cual puede hidrolizar ésteres de naftilo (Lee et al., 2017), al compararlos estructuralmente se denotaron dos diferencias significativas, la primera que el centro catalítico de *IsPETasa* está rodeado de residuos hidrofílicos Thr88, Ser93, Thr113, Thr116, Arg123, Gln182, Asp186, Ser214, Ser236, Ser238, Cys239 y Asn24. En cambio, el centro catalítico de EaEST consta de residuos hidrofóbicos Pro31, Met36, Tyr56, Tyr59, Ile101, Ala120, Ala124, Phe227, Gly247,

Gly249, Met250 y Phe251. En segundo lugar, entre los residuos 158 – 162 que son los conservadores del codo nucleofílico, el residuo 159 fue Phe en EaEST y Trp en *IsPETasa*, lo que denotaba que se debía realizar una mutación para cambiar su polaridad y tamaño en los residuos (**Liu et al., 2019**).

Con base en el análisis estructural y de secuencia, **Liu et al., (2019)** plantearon la hipótesis de que los efectos hidrofóbicos y estéricos son responsables de las diferencias anteriores en la especificidad del sustrato, se debe modificar la hidrofobicidad y el volumen de los residuos involucrados alrededor del centro catalítico lo que puede cambiar la especificidad del sustrato. Para comprobar esta hipótesis, prepararon tres mutantes, *IsPETasa* S93M, *IsPETasa* W159F e *IsPETasa* N241F, midieron las actividades enzimáticas de la hidrólisis de ésteres de naftilo (Figura 14C) y determinaron que la estructura cristalina de *IsPETasa* W159F fue el de mayor efecto. Entre la *IsPETasa* W159F y la *IsPETasa* de tipo salvaje o nativa se descubrió una nueva estructura, cuando se dé la reacción enzimática, el sustrato tiene que unirse a la hendidura catalítica para acercarse a la tríada catalítica (**Joo et al., 2018; Liu et al., 2018**). En la *IsPETasa* nativa, el Trp159 voluminoso formó una prominencia (Figura 14D) para evitar que los ésteres de naftilo de gran tamaño ingresen a la hendidura catalítica, el reemplazar el Trp de gran volumen con un residuo pequeño de Phe puede cambiar el efecto, lo que concede la entrada del sustrato naftilo voluminoso a la hendidura catalítica.

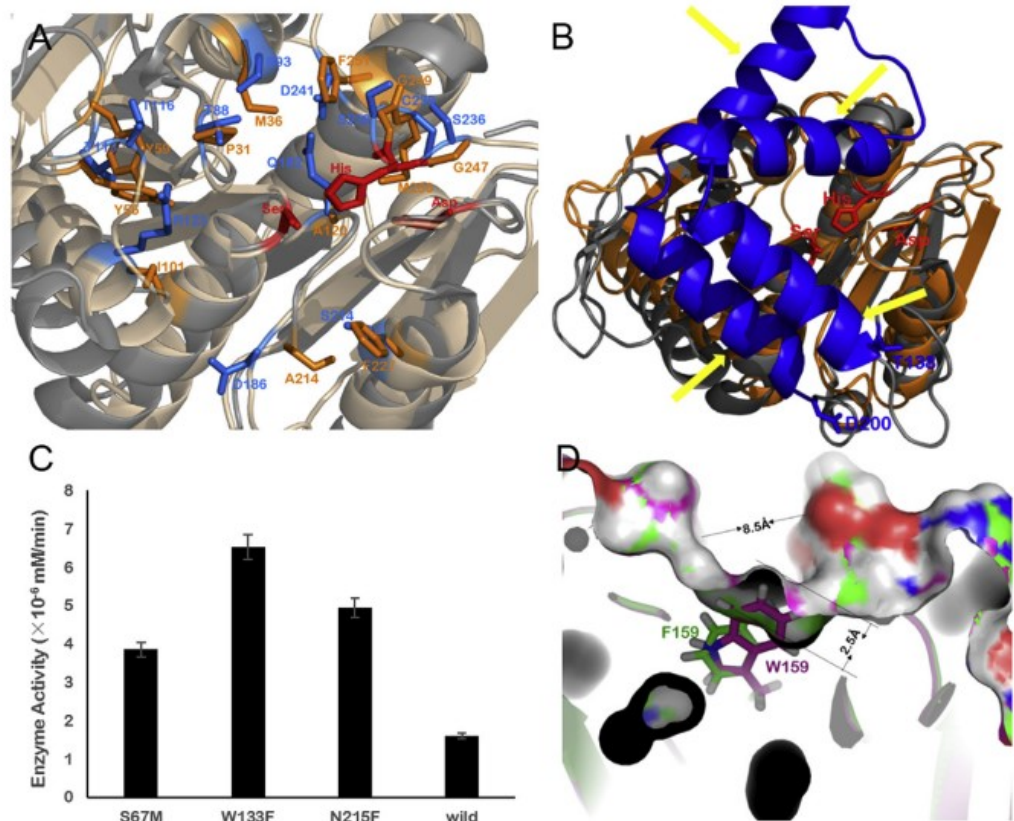


Figura 14. Estructuras de los centros catalíticos del *IsPETasa* y *EaEST*

(A) Bolsillos de unión al sustrato de *IsPETasa* (rodeados de residuos hidrofílicos, color cian) y *EaEST* rodeado de residuos hidrofóbicos, color mostaza. (B) Tapa hidrofóbica, señaladas con flechas amarillas, solo presente en *EaEST*. (C) Actividades enzimáticas de las mutaciones y la WT. (D) Entrada del catalizador hendido, residuo 159 Phe en *EaEST* y reemplazado por el Trp en *IsPETasa*.

Fuente: (Liu et al., 2019)

3.1.2.3 Estructura cristalina del mutante *IsPETasa* P181A, S121D/D186H, S121E/D186H y S121E/D186H/R280A de *Ideonella sakaiensis*

Las estructuras de los mutantes *IsPETasa* S121D/D186H, *IsPETasa* S121E/D186H, *IsPETasa* P181A e *IsPETasa* S121E/D186H/R280A se depositaron en el Protein Data Bank con códigos PDB de 6IJ3, 6IJ4, 6IJ5 y 6IJ6, respectivamente

como se muestra en la tabla 7. Las resoluciones que tuvieron sus imágenes fueron de 1.40, 1.85, 1.72, 1.95 Å respectivamente, en donde la que presentó menos errores en sus estructura cristalina según su resolución fue la *IsPETasa* S121D/D186H con 1.40 Å (Son et al., 2019).

Son et al., (2019), tomaron en cuenta un punto importante acerca de la enzima *IsPETasa*, el defecto su acción degradadora solo a una temperatura moderada o de ambiente, por lo que no cuenta una estabilidad térmica, lo cual es de suma importancia para la degradación efectiva del PET. Para incrementar la estabilidad térmica, intentaron identificar las características estructurales claves que ocasionan la baja estabilidad de la enzima, se enfocaron en las alrededores del sitio activo y encontraron dos residuos que pueden ser modificados. Primero, la *IsPETasa* corresponde a la superfamilia de hidrolasas α/β , y la hoja β retorcida central está formada por nueve hebras β mixtas ($\beta 1-\beta 9$) rodeadas por siete hélices α ($\alpha 1-\alpha 7$). La lámina β central de la *IsPETasa* es interrumpida por a una conformación anormal de la hebra $\beta 6$ (Figura 15A). En la parte central de la hebra $\beta 6$ se encuentra el residuo Pro181 el cual bloquea la continuidad de la hoja β evitando la formación de enlaces de hidrógeno alrededor de las cadenas principales del aminoácido. La distancia entre el nitrógeno de la cadena principal de Pro181 y el oxígeno de la cadena principal de Leu199 es de 3.6 Å, y la distancia entre el nitrógeno de la cadena principal de Gly158 y el oxígeno de la cadena principal de Ala180 es de 4.2 Å, lo que ocasiona el rompimiento de la estructura secundaria, es decir, esta interrupción de la hebra β lo consideraron como el causante de la baja estabilidad térmica, por lo que desarrollaron la variante *IsPETasa* P181A con PDB: 6IJ5 (Tabla 7) para que la hebra no se interrumpida.

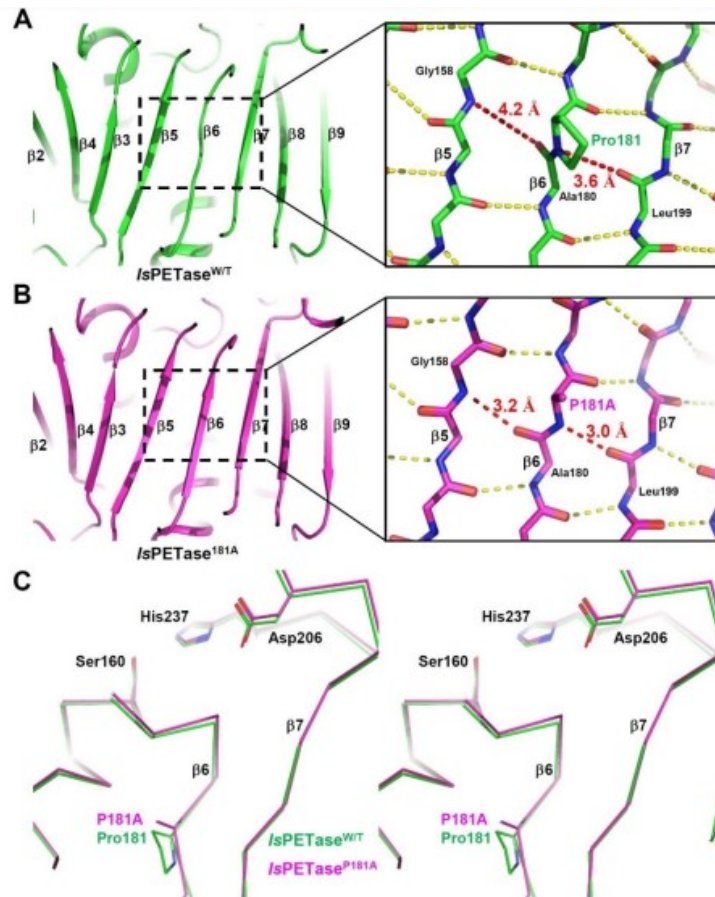


Figura 15. Comparación estructural de la IsPETasa vs variante IsPETasa P181A

(A) Las hebras β mixtas centrales de IsPETasa WT. (B) Las hebras β mixtas centrales de IsPETasa P181A. (C) Vista estéreo de las estructuras sobrepuestas.

Fuente: (Son et al., 2019)

En segundo lugar, en IsPETasa, el bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$ (Asp186-Phe191) mostró un valor de factor b más alto 22.2 en comparación con el valor de factor b general de 16.1 y este bucle es una de las regiones más flexibles de la estructura (Figura 15A). De hecho, la región está ubicada en la superficie de la proteína y no interactúa con las regiones vecinas (Figura 15A). Después compararon la región de IsPETasa con la región correspondiente de cutinasa2 de *Thermobifida fusca* DSM43793 (*TfCUT2*), la cual tiene una estabilidad térmica mucho mayor que IsPETasa. En comparación con la IsPETasa, el bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$ (His156-Trp161) forma una estructura bastante estable en *TfCUT2*, con un valor de factor b similar en la región a diferencia

del valor del factor b general (Figura 15B). El residuo His156 ubicado en el bucle conforma un enlace de hidrógeno con el residuo Asp94 en la hélice α_2 , lo que ayuda a la alta estabilidad del bucle (Figura 15B). Entonces, generaron la variante *IsPETasa* S121/D186H (PDB:6IJ3) reemplazando los residuos de Ser121 y Asp186 con aspartato e histidina, respectivamente, para aumentar la estabilidad del bucle de conexión β_6 - β_7 mediante la introducción de un enlace de hidrógeno.

La estructura de *IsPETasa* P181A vs *IsPETasa* S121/D186H, mostraron una T_m de 49.25 y 54.85 °C con una diferencia de 0.5 y 0.6 °C con respecto a la WT, la estructura de la variante *IsPETasa* P181A mostró la recuperación de la hoja β central interrumpida (Figura 15B). El nitrógeno de la cadena principal del P181A reemplazado formó un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de Leu199, y el nitrógeno de la cadena principal de Gly158 formó un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de Ala180 (Figura 15B), aunque no aumentó significativamente la T_m . A su vez, la estructura de *IsPETasa* S121D/D186H mostró un valor de factor b mucho más bajo (18.5) para el bucle de conexión β_6 - β_7 (Asp186-Phe191) que el de *IsPETasa* WT (Figura 15C), lo que muestra que la región del bucle de *IsPETasa* S121D/D186H tiene una conformación mucho más estable que la región correspondiente de *IsPETasa* WT, lo que es acorde a su mayor valor de T_m , sin embargo no se observó un enlace de hidrógeno entre los residuos Asp121 e His186 ya mutados (Figura 16C), la distancia entre Asp121 e His186 fue 3.9 Å, lo que no es apto para formar un enlace de hidrógeno.

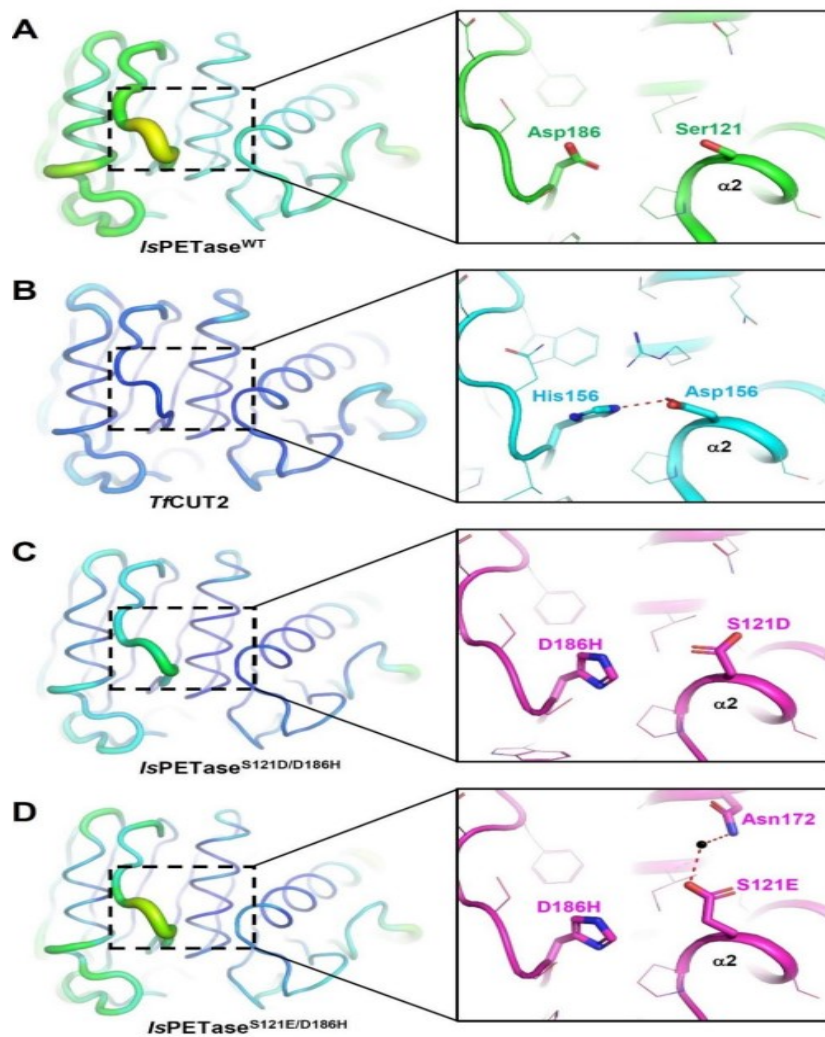


Figura 16. Bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$

(A) Bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$ de *IsPETasa* WT. (B) *TfCUT2*. (C) *IsPETasa* S121D/D186H. (D) S121E/D186H. El factor b de las estructuras (izquierda) y los residuos en relación con la estabilización del bucle de conexión $\beta 6$ - $\beta 7$ (derecha).

Fuente: (Son et al., 2019)

Posteriormente los investigadores reemplazaron Ser121 con glutamato, un residuo ácido un poco más largo que el aspartato, para facilitar una distancia óptima para la formación de enlaces de hidrógeno con el His186 mutado. La variante *IsPETasa* S121E/D186H mostró un valor de T_m de 56.02 °C, es el 7.21 °C mayor que el de *IsPETasa* WT y 1.17 °C más que el de la variante *IsPETasa* S121D/D186H. El Glu121 que se mutó formó un enlace de hidrógeno mediado por agua con el residuo Asn172 adyacente (Figura 16D). Sospecharon que la formación del enlace de hidrógeno mediado por agua podría contribuir a una estabilidad térmica mucho mayor de *IsPETasa* S121E/D186H que la de la variante *IsPETasa* S121D/D186H. Las variantes *IsPETasa* S121D e *IsPETasa* S121E mostraron una capacidad de degradación de PET ligeramente mayor a 30 °C, pero sus valores de T_m disminuyeron bastante en comparación con *IsPETasa* WT, lo que conduce a una actividad enzimática más baja a 40 °C. Los resultados obtenidos muestran que el residuo His en la posición Asp186 contribuye más a aumentar la estabilidad térmica, y el enlace de hidrógeno mediado por agua de *IsPETasa* S121D, e *IsPETasa* S121E también parece estar precedido por el residuo His186 mutado (Joo et al., 2018).

3.1.2.4 Estructura cristalina del mutante PETasa N246D y la variante S121E/D186H/S242T/N246D de *Ideonella sakaiensis*

La estructura cristalina de la mutación N246D tuvo una resolución de 1.9 Å, con código PDB:6KUO. A su vez, (Son et al., 2020) evaluaron diferentes variantes mutantes en donde se determinó que la variante que presentó un incremento significativo en la actividad de la enzima fue la variante N246D, como se visualiza en la figura 17, esta mutación a comparación de la enzima nativa mostro una actividad aumentada de 1,2 y 1,7 veces a 25 °C y de 2,6 y 2,4 a 37°C, demostrándose que esta mutante presento una mayor estabilidad térmica. En el mismo estudio se evaluó la variante S242T la cual incrementa potencialmente la actividad enzimática, esto se da debido a que al sustituir a la serina por treonina genera un aumento en la hidrofobicidad del sitio de unión al sustrato, por lo tanto, incrementa la actividad de degradación del PET en la enzima.

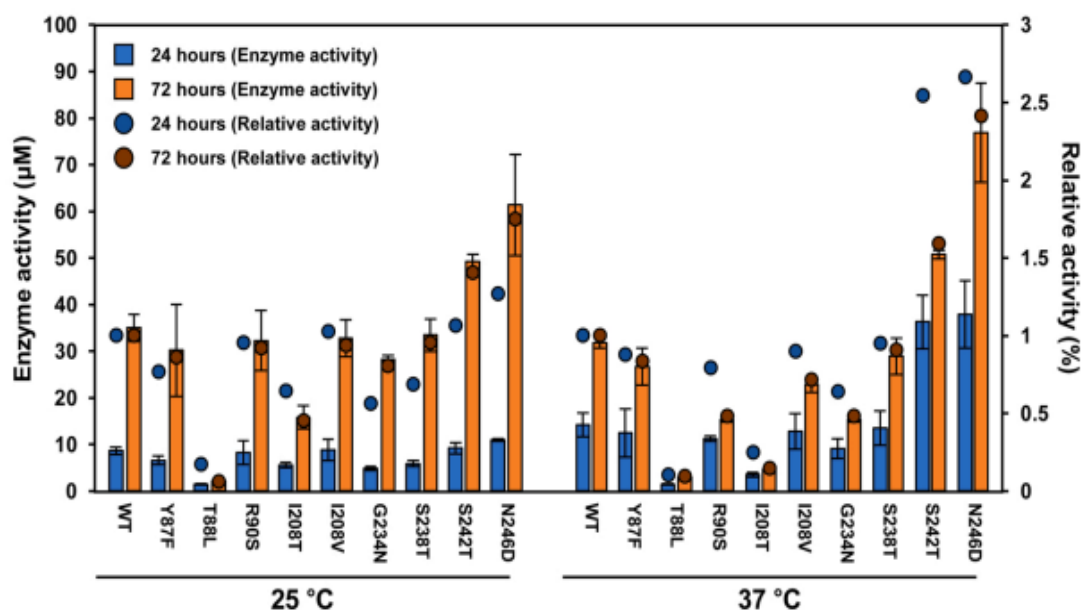
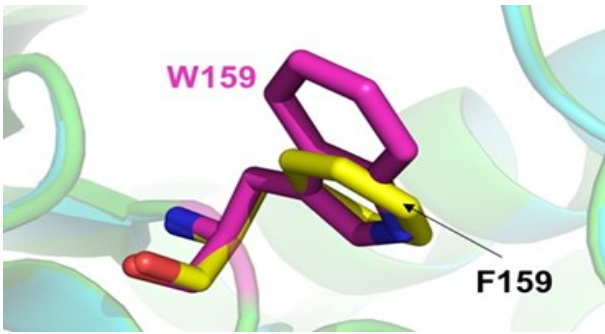
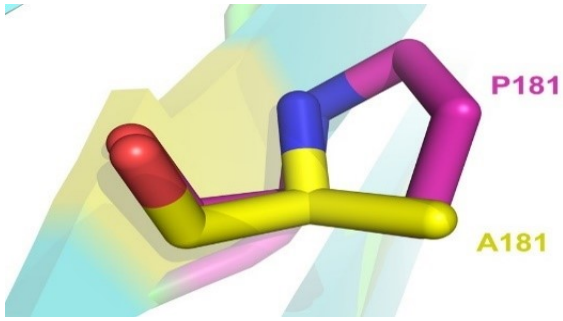
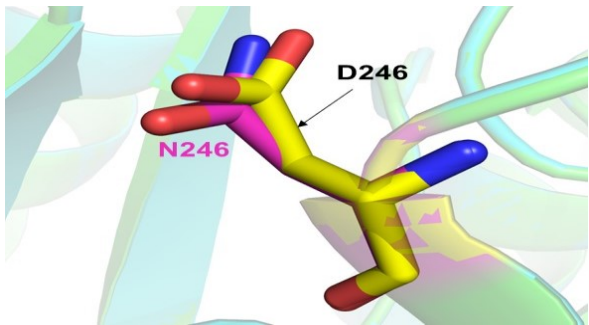


Figura 17. Actividad enzimática de las diferentes mutaciones a 25 y 37 °C

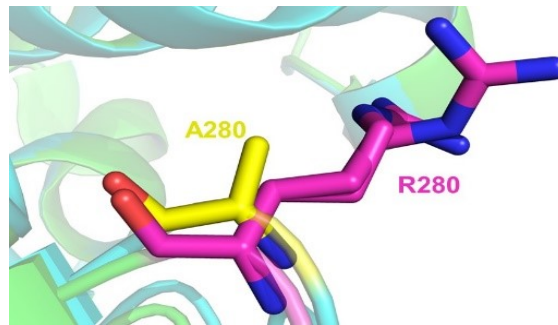
Fuente: (Son et al., 2020)

Tabla 7. Estructuras cristalinas diseñadas en Pymol de las mutantes de IsPETasa

| Nombre | Código PDB | Estructuras | Polaridad |
|---|------------|---|-----------|
| Estructura cristalina del mutante PETasa W159F de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 6ILX |  <p data-bbox="754 792 1134 882">Figura 18. Mutación W159F W- lila, F-amarillo</p> | Hidrófobo |
| Estructura cristalina del mutante PETasa P181A de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 6IJ5 |  <p data-bbox="759 1249 1129 1339">Figura 19. Mutación P181A P- lila, A-amarillo</p> | Hidrófobo |
| Estructura cristalina del mutante PETasa N246D de <i>Ideonella sakaiensis</i> | 6KUO |  <p data-bbox="756 1706 1133 1796">Figura 20. Mutación N246D N- lila, D-amarillo</p> | Hidrófilo |

Estructura cristalina del mutante PETasa R280A de Ideonella sakaiensis

5YNS



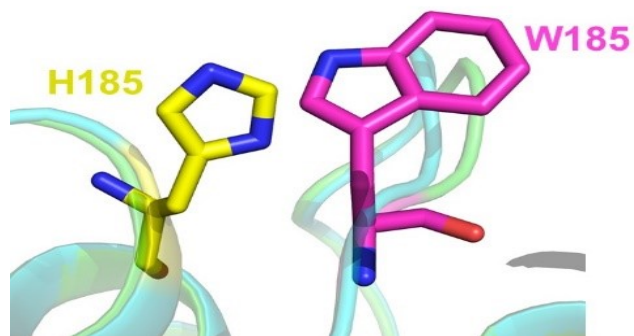
Hidrófobo

Figura 21. Mutación R280A

R- lila, A-amarillo

Estructura cristalina del mutante PETasa W185H de Ideonella sakaiensis

7CY0



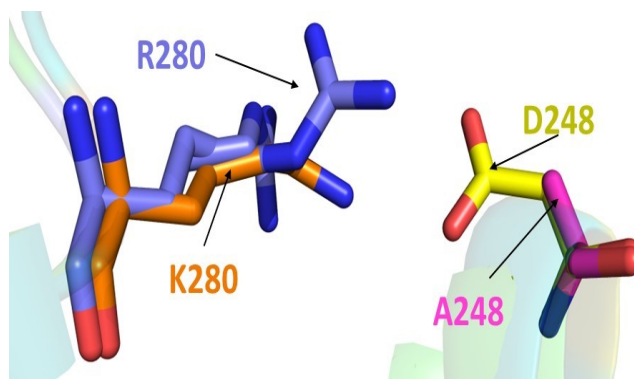
Hidrófilo

Figura 22. Mutación W185H

W-lila, H-amarillo

Estructura cristalina de PETasa A248D, R280K de mutante de Ideonella sakaiensis

6KUQ



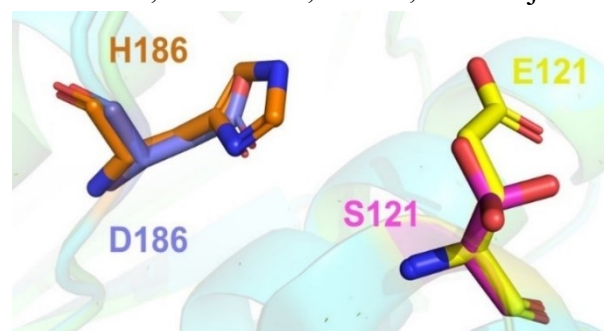
Hidrófilos

Figura 23. Mutación A248D, R280K

A-lila, D-amarillo; R-azul, K-naranja

Estructura cristalina del mutante PETasa S121E, D186H de Ideonella sakaiensis

6IJ4



Hidrófilos

Figura 24. Mutación S121E, D186H

S-lila, E-amarillo; D-azul, H-naranja

Estructura
cristalina del
mutante del
PETasa S121E,
D186H, R280A
de Ideonella
sakaiensis

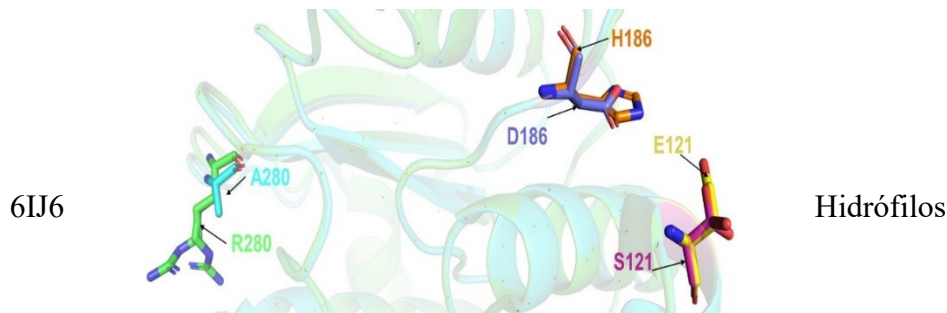


Figura 25. Mutación S121E, D186H,
R280A

S-lila, E-amarillo; D-azul, H-naranja; R-verde,
A-celeste

Nota: los oxígenos se encuentran de color rojo y los nitrógenos color azul.

Fuente: Elaboración propia

Es importante recalcar, como se muestra en la tabla 8, los residuos mutados en la enzima nativa ayudan a que cambie la polaridad de la superficie de PET, es decir la hidrofiliación de la superficie de PET es un proceso significativo requerido para la degradación enzimática de PET. La mejora de la tasa de degradación rápida, la humectabilidad y la capacidad de teñido podría realizarse mediante la modificación de la superficie de PET (Samak et al., 2020). La polaridad de las mutaciones efectuadas están definidas entre hidrófobos e hidrófilos, tres de las estructuras cristalinas son hidrófobas (Código PDB:6ILX, 6IJ5 y 5YNS) y las demás son hidrofílicas que son las que mayor capacidad de degradación tiene por su polaridad, ya que, la superficie del PET es hidrófoba, lo que sugiere que para cualquier mutación o cambio de los residuos cercanos al sitio activo se debe considerar el hecho de que a la *IsPETasa* se la debe convertir en una enzima hidrofílica que al momento de unirse al PET puede degradarlo con facilidad, debido a que este tipo de degradación es más rápida y eficiente para que se acople el sustrato en el sitio activo (Shah & Alshehrei, 2017).

3.1.3 Adyuvantes que incrementan la actividad de la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.

La enzima *IsPETasa* tiene una gran capacidad de degradar PET como se ha dado a conocer en este estudio, sin embargo, la adición de adyuvantes puede mejorar su actividad catalítica. Los adyuvantes son sustancias que al añadirse a la enzima mejora o potencia su función de degradación. Entre estos tensioactivos, se utilizan tensioactivos aniónicos tales como sulfato de alquilo y sulfonato de alcano, o tensioactivos alquilofenólicos que son tensioactivos no iónicos (**Keio et al., 2018**).

3.1.3.1 Adición de surfactantes aniónicos para el incremento de la acción enzimática de la *IsPETasa*

Los surfactantes de alquilo aniónicos son las posibles moléculas de mediación de la interacción entre el PET y PETasa debido a que interactúan con la superficie del PET lo que es semejante a la interacción de las proteínas anfifílicas, los grupos de cabeza de carga negativa se orientarán hacia la fase acuosa para transformar la superficie del PET en la superficie de carga como se muestra en la figura 26 (**Ward et al., 1994**). Para escoger un tensioactivo correcto se debe considerar que la PETasa es una enzima cargada positivamente, punto isoeléctrico= 9.4, existen múltiples moléculas de tensioactivos que se comercializa, pero se debe tomar en cuenta a los que son de tamaño molecular pequeño para que se pueden acerca como tipo micelas a la superficie de la enzima (**Furukawa et al., 2018**).

El añadir tensioactivos o surfactantes aniónicos produjo una mejora de 120 veces en la actividad catalítica de la *IsPETasa*, y esto se da por la atracción entre la enzima cargada positiva y la superficie del PET que es negativo, al momento que se recubre con los tensoactivos aniónicos genera una aceleración brusca de la reacción de hidrólisis (**Furukawa et al., 2018**). Esta investigación se dio a cabo mediante la incubación de una película de PET de cristalinidad baja (3-5 %) con el tensioactivo aniónico dodecilsulfato de sodio o SDS por 1 hora, posterior a esto le añadieron la enzima para comenzar el proceso de la reacción enzimática, realizaron una

preincubación de una hora y un proceso fue sin preincubación (Figura 27 a y b). La preincubación de una hora jugó un papel importante a una concentración óptima de 0.025 % p/v de SDS ya que aumentó la actividad catalítica inicial de 3h, 0.07 a 3.2 $\text{nmol min}^{-1}\text{cm}^{-2}$.

También se utilizó como surfactante catiónico al dodeciltrimetilamonio, con éste la actividad catalítica disminuyó drásticamente como se muestra en la Figura 27c, esto dependió del tiempo de preincubación mostrado en la figura 27d. En anteriores estudios, **Gao et al., (2017)** y **Lee & Song, (2010)** informaron que los efectos de los tensioactivos catiónicos en la degradación de PET con lipasas y cutinasas, solamente mejoró en 1.5 veces la actividad, esta gran diferencia de entre 120 y 1.5 veces de mejora en la actividad catalítica, se debe a que en éstos estudios previos no se consideró la superficie de PET, solamente se hidrofilizó con surfactantes en donde no se tomó en cuenta las interacciones electrostáticas entre las enzimas utilizadas y los grupos de cabeza de los surfactantes (**Furukawa et al., 2018**).

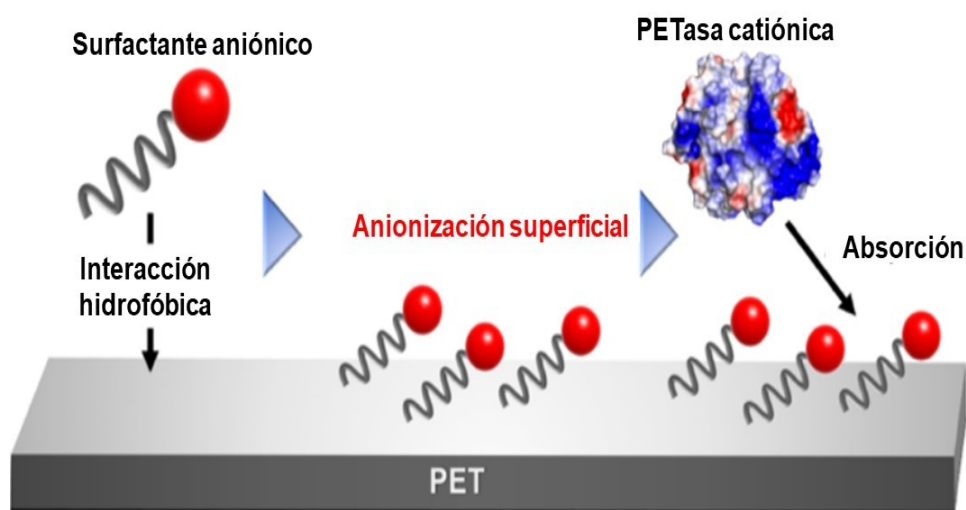


Figura 26. Esquema de la unión del tensioactivo en acción con la superficie del PET.

Fuente: modificado de: **Furukawa et al., (2018)**

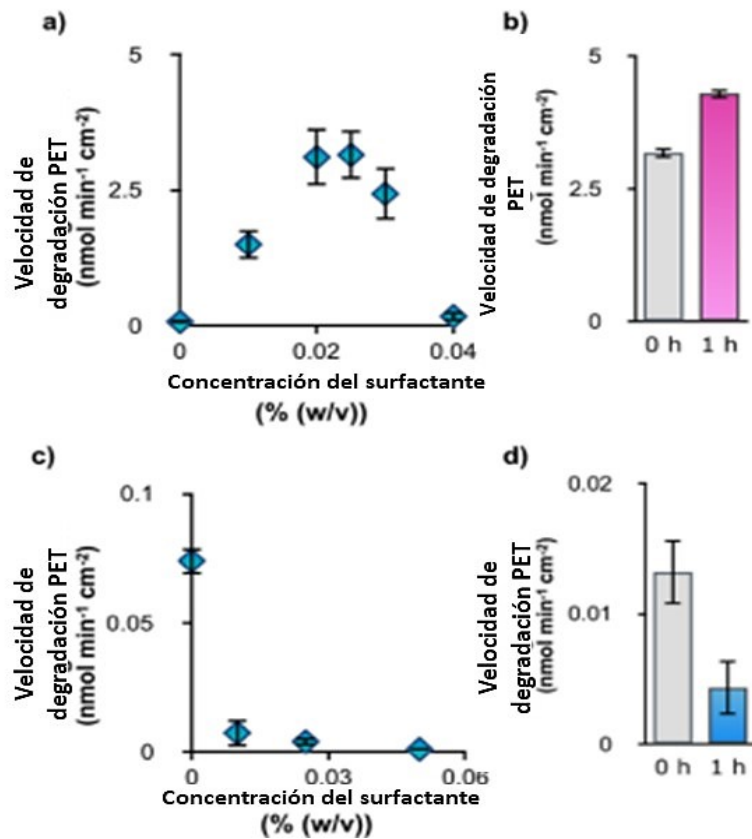


Figura 27. Velocidad de degradación de PET vs concentración de surfactante.

a. Concentración de SDS sobre la actividad de hidrólisis de la enzima *IsPETasa*
 b. concentración de SDS sobre la actividad de 1 hora de la *PETasa* a 500 nM
 c. Concentración de dodeciltrimetilamonio sobre la actividad de hidrólisis de la enzima *IsPETasa* a 1.2 cm² mL⁻¹ por 3 h en concentración de *PETasa* a 500 nM, d. concentración de dodeciltrimetilamonio sobre la actividad de 1 hora de la *PETasa* a 500 nM. Color celeste forma de rombo= velocidad de degradación de PET, color azul barra= velocidad de degradación de PET en 1 hora, color lila= velocidad de degradación de PET con una incubación previa de 1 hora, color plomo barra= barras de error mostrando la desviación estándar de tres experimentos diferentes.

Fuente: modificado de: **Furukawa et al., (2018).**

3.1.3.2 El uso de p-nitrofenil-butilato como sustrato para aumento de secreción de la IsPETasa

La actividad de IsPETasa (actividad hidrolizante de PET) se midió usando, como indicadores, la cantidad de un producto de degradación y la actividad hidrolizante de pNPB (p-nitrofenil-butilato). **Keio et al., (2018)** describe un método para medir la actividad hidrolizante utilizando pNPB (p-nitrofenil-butilato). El pNPB utilizado como sustrato artificial en la medición de la actividad, se hidroliza en ácido 1-butanoico y p-nitrofenol (pNP). En este momento, dado que pNP presenta un color amarillo, su concentración puede medirse usando un espectrómetro de absorción. Midieron la actividad hidrolizante de pNPB inmediatamente después de la purificación de la enzima. El pNPB se disolvió en sulfóxido de dimetilo (DMSO). La enzima se mezcló con un tampón y luego la mezcla obtenida se incubó a 30 °C durante 30 minutos. Seguido a esto añadieron el sustrato a la mezcla de reacción y se midió tres veces el cambio en la absorbancia a 425 nm durante 1 minuto. Como resultado dio un aumento en la secreción de la IsPETasa de 1.4 a 1.7 veces.

Como dato adicional también se encontró que para una mayor secreción de la enzima puede expresarse en *Bacillus subtilis*, y un estudio realizado por **Wang et al., (2020)** se demostró esta mejora, en donde se usó el gen codificante de la enzima PETasa aislado de *I. sakaiensis* para sintetizarlo y expresarlo en *Bacillus subtilis* la cual es una cepa utilizada, por lo general, en manipulación genética por lo que secreta proteínas directo del sobrenadante del cultivo. La utilización de esta cepa es debido a que mediante sus péptidos de señales y su expresión ayudan a mejorar la biodegradación del PET (**Shi et al., 2021**). En este estudio, el gen codificante de PETasa, que se aisló de *Ideonella sakaiensis*, se sintetizó y expresó en *B. subtilis*. Luego, evaluaron la capacidad de cinco péptidos señal de *Bacillus* para mejorar la secreción de IsPETasa por *B. subtilis* (Shi et al., 2021) Los resultados indicaron que la secreción de PETasa inducida por SP amy fue la más alta, y su actividad contra el palmitato de p-nitrofenilo fue aproximadamente cuatro veces mayor que la del péptido señal natural SP de PETasa. El promotor débil P43 proporcionó tiempo suficiente para la traducción y plegamiento de IsPETasa, lo que resultó en una mayor expresión extracelular. El uso de P43 y SP amy en combinación produjo la mayor degradación

de tereftalato de bis-(2-hidroxietilo) y actividad de grabado de película PET debido a la secreción maximizada de PETasa por *B. subtilis* (**Wang et al., 2020**).

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- A través de la revisión bibliográfica que se ha realizado en el presente estudio, se dio a conocer la prospección de la *IsPETasa*, su descubrimiento, estructura, mutaciones y sus adyuvantes con el fin de generar un desarrollo y mejora dentro de la actividad enzimática.

- La enzima después de un año de su aparición, varios investigadores diseñaron múltiples mutaciones y variantes (> 10), que han modificado la estabilidad térmica, su densidad de electrones, la cercanía de sus residuos o su intercambio de aminoácidos, tal fue el caso de la mutación S136E que sobresalió de un grupo de mutaciones por su tiempo de vida media que es equivalente al triple que el de la *IsPETasa*, y, a su vez, con un T_m de 43.6 °C no tuvo un aumento significativo en su temperatura de desnaturalización, solo obtuvo una variación de 1 °C aproximadamente a comparación con la WT con 42.5 °C, sin embargo, al detener el proceso de incubación de la enzima, la temperatura de inactivación aumentó a 45 °C, y se presentó un proceso mayor de degradación. También se encontró una doble mutante con un alto rango de temperatura, con un valor bastante significativo en la T_m , la cual fue la W159H/F229Y, la variación de la temperatura fue de un aumento de hasta 10.4 °C, su tiempo de vida media también se triplicó con una tasa de degradación equivalente a 23.4 mg PET/h mg/enzima, lo que equivalió a una mutante de interés investigativa para futuros diseños de estructuras cristalinas que mejoren la actividad enzimática.

- Mediante el buscador PDB y el programa computacional Pymol, se halló alrededor de 8 estructuras cristalinas con difracción en rayos X, éstas enzimas se superpusieron en la enzima original o WT (6EQE), en donde los residuos fueron reemplazados según la mutación dada, la polaridad y la hidrofobicidad de cada aminoácido fue clave importante para que la enzima al unirse forme un efecto sobre la superficie de PET, un efecto de micela parecido a los

detergentes y el agua, en donde se degrada con mayor facilidad el polímero y su cristalinidad pueda romperse rápido en monómeros pequeños, se tomó en cuenta que los residuos que le dan a la enzima esta capacidad son los que tienen polaridad hidrofílica, como la mutante S121E/D186H, esta sobre mutante demostró su acción al colocar el residuo His en la posición Asp186 lo que contribuyó a un aumento considerable de la estabilidad térmica, y el enlace de hidrógeno mediado por agua de *IsPETasa* S121E que también mostró que es precedido por el residuo His186 mutado. La resolución de las imágenes tomadas del PDB mostraron un rango de resolución de 1.40 a 2.00 Å, en sus estructuras dentro del rango de oscilación encontradas no existieron errores de residuos o en algunas estructuras fueron muy escasos y se pudo apreciar con más facilidad los átomos individuales, lo que fue importante para conocer el efecto de los residuos en la enzima.

- Por último, los adyuvantes contribuyeron en la actividad de la enzima *IsPETasa*, la agregación de surfactantes o tensoactivos aniónicos como el SDS y dodeciltrimetilamonio aumentaron la actividad catalítica a través de experimentos de velocidad cinética lo cual demostró que comparar las velocidades influye en el estado y tiempo de degradación del sustrato. El SDS aumentó la actividad catalítica inicial de 3h, en 0.07 a 3.2 nmol min⁻¹cm⁻² a una concentración de 0.025 % p/v precedido de una incubación de 1 hora de la lámina de PET junto al SDS. Con el dodeciltrimetilamonio la actividad catalítica de la WT disminuyó drásticamente, debido al tiempo de incubación previo. Con este estudio se pudo demostrar que los tensoactivos que constan de cadenas largas de alquilo y grupos de cabeza de carga negativa mejoraron de manera eficiente la actividad de la *IsPETasa*, lo que demuestra que estos tensoactivos al unirse a la película de PET dieron mayor accesibilidad de la enzima a la película. La utilización de p-nitrofenil-butilato como sustrato aumentó la secreción de la *IsPETasa* de 1.4 a 1.4 veces con una temperatura de incubación de 30 °C durante 30 minutos, lo cual no tuvo un efecto significativo para la enzima.

4.2. Recomendaciones

- Utilizar otro tipo de microorganismos para la expresión de la enzima, como el *Bacillus subtilis* en donde se ha demostrado que aumenta la secreción de la enzima y por ende su actividad.
- Desarrollar chasis microbianos como soporte genético para posteriores expresiones a escala industrial de la enzima *IsPETasa*.
- Combinar la doble mutante W159H/F229Y con el mutante S136E para que exista un acoplamiento mejorado del sustrato con una temperatura mayor a 50 °C.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias bibliográficas

- Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., & Zwart, P. H. (2010). PHENIX: A comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, *66*(2), 213–221. <https://doi.org/10.1107/S0907444909052925>
- Androsch, R., Rhoades, A. M., Stolte, I., & Schick, C. (2015). Density of heterogeneous and homogeneous crystal nuclei in poly (butylene terephthalate). *European Polymer Journal*, *66*, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.02.013>
- 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>
- Baker, J. D. (2016). The Purpose, Process, and Methods of Writing a Literature Review. *AORN Journal*, *103*(3), 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.aorn.2016.01.016>
- Berselli, A., Ramos, M. J., & Menziani, M. C. (2021). Novel Pet-Degrading Enzymes: Structure-Function from a Computational Perspective. *ChemBioChem*, *22*(12), 2032–2050. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000841>
- Bollinger, A., Thies, S., Knieps-Grünhagen, E., Gertzen, C., Kobus, S., Höppner, A., Ferrer, M., Gohlke, H., Smits, S. H. J., & Jaeger, K. E. (2020). A Novel Polyester Hydrolase From the Marine Bacterium *Pseudomonas aestusnigri* – Structural and Functional Insights. *Frontiers in Microbiology*, *11*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114>
- Brott, S., Pfaff, L., Schuricht, J., Schwarz, J. N., Böttcher, D., Badenhorst, C. P. S.,

- Wei, R., & Bornscheuer, U. T. (2021). Engineering and evaluation of thermostable IsPETase variants for PET degradation. *Engineering in Life Sciences, August*, 1–12. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100105>
- Carr, C. M., Clarke, D. J., & Dobson, A. D. W. (2020). Microbial Polyethylene Terephthalate Hydrolases: Current and Future Perspectives. *Frontiers in Microbiology, 11*(January). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.571265>
- 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*(3494–3511), 9. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chen, C. C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., & Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *FEBS, 285*(20), 17–23. <https://doi.org/10.1111/febs.14612>
- Chen, S., Tong, X., Woodard, R. W., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2018). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry, 283*(38), 25854–25862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800848200>
- Crawford, C. B., & Quinn, B. (2017). The contemporary history of plastics. *Microplastic Pollutants, 19–37*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809406-8.00002-5>
- Cui, Y., Chen, Y., Liu, X., Dong, S., Tian, Y., Qiao, Y., Mitra, R., Han, J., Li, C., Han, X., Liu, W., Chen, Q., Du, W., Tang, S., Xiang, H., Liu, H., & Wu, B. (2019). Computational redesign of a PETase for plastic biodegradation by the GRAPE strategy. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/787069>
- Erickson, E., Shakespeare, T. J., Bratti, F., Buss, B. L., Graham, R., Hawkins, M. A., König, G., Michener, W. E., Miscall, J., Ramirez, K. J., Rorrer, N. A., Zahn, M., Pickford, A. R., McGeehan, J. E., & Beckham, G. T. (2021). Comparative Performance of PETase as a Function of Reaction Conditions, Substrate Properties, and Product Accumulation. *ChemSusChem, 1002*. <https://doi.org/10.1002/cssc.202101932>
- Fotopoulou, K. N., & Karapanagioti, H. K. (2017). Degradation of Various Plastics in the Environment. In *The Handbook of Environmental Chemistry* (pp. 101–110). <https://doi.org/10.1007/698>
- Furukawa, M., Kawakami, N., Oda, K., & Miyamoto, K. (2018). Acceleration of

- Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate) by Surface Coating with Anionic Surfactants. *ChemSusChem*, 11(23), 4018–4025. <https://doi.org/10.1002/cssc.201802096>
- Gamero, E. J., & Gamero, E. (2021). Mutations, variants and strains of SARS-CoV-2. *Semergen*, 47(3), 208–209. <https://doi.org/10.1016/j.semerg.2021.01.001>
- Gao, A., Shen, H., Zhang, H., Feng, G., & Xie, K. (2017). Hydrophilic modification of polyester fabric by synergetic effect of biological enzymolysis and non-ionic surfactant, and applications in cleaner production. *Journal of Cleaner Production*, 164, 277–287. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.214>
- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made [Producción, uso y destino de todos los plásticos jamás fabricados]. *Science Advances*, 3(7), e1700782. <https://advances.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciadv.1700782>
- Han, X., Liu, W., Huang, J. W., Ma, J., Zheng, Y., Ko, T. P., Xu, L., Cheng, Y. S., Chen, C. C., & Guo, R. T. (2017). Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02255-z>
- Huang-Yu, F., Huang, C.-K., & Oyang, Y.-J. (2007). *Study of Mining Protein Structural Properties and its Application* (Issue 235) [National Taiwan University]. [http://digilib.unila.ac.id/11478/16/16.BAB II.pdf](http://digilib.unila.ac.id/11478/16/16.BAB%20II.pdf)
- Jaiswal, S., Sharma, B., & Shukla, P. (2019). Pr p ro of. *Environmental Technology & Innovation*, 100567. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2019.100567>
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>
- Kawai, F., Kawabata, T., & Oda, M. (2019). Current knowledge on enzymatic PET degradation and its possible application to waste stream management and other fields. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(11), 4253–4268. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09717-y>
- Kawai, F., Oda, M., Tamashiro, T., & Waku, T. (2014). BIOTECHNOLOGICALLY RELEVANT ENZYMES AND PROTEINS A novel Ca²⁺-activated, thermostabilized polyesterase capable of hydrolyzing polyethylene terephthalate

- from *Saccharomonospora viridis* AHK190. *Microbiol Biotechnol*, 1–12. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5860-y>
- Keio, U., Miyamoto, K., Kawakami, N., & Oda, K. (2018). Method for improving activity of pet-degrading enzyme using additive. *Hiraki and Associates*, 24, 33.
- Khoonkari, M., Haghghi, A. H., Sefidbakht, Y., Shekoohi, K., & Ghaderian, A. (2015). Chemical Recycling of PET Wastes with Different Catalysts. *International Journal of Polymer Science*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/124524>
- Kim, J. C., Cakmak, M., & Zhou, X. (1998). Effect of composition on orientation, optical and mechanical properties of bi-axially drawn PEN and PEN/PEI blend films. *Polymer*, 39(18), 4225–4234. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(98\)00004-4](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(98)00004-4)
- Krueger, M. C., Harms, H., & Schlosser, D. (2015). *Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. Eu 2014*. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6879-4>
- Lee, C. W., Kwon, S., Park, S. H., Kim, B. Y., Yoo, W., Ryu, B. H., Kim, H. W., Shin, S. C., Kim, S., Park, H., Kim, T. D., & Lee, J. H. (2017). Crystal structure and functional characterization of an esterase (EaEST) from *exiguobacterium antarcticum*. *PLoS ONE*, 12(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169540>
- Lee, S. H., & Song, W. S. (2010). Surface modification of polyester fabrics by enzyme treatment. *Fibers and Polymers*, 11(1), 54–59. <https://doi.org/10.1007/s12221-010-0054-4>
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2021). Structural insights into carboxylic polyester-degrading enzymes and their functional depolymerizing neighbors. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22052332>
- Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., Liu, H., Luo, Y., & Bao, R. (2018). Protein crystallography and site-direct mutagenesis analysis of the poly(ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 19(14), 1471–1475. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800097>
- Liu, C., Shi, C., Zhu, S., Wei, R., & Yin, C. C. (2019). Structural and functional characterization of polyethylene terephthalate hydrolase from *Ideonella*

- sakaiensis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(1), 289–294. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.148>
- Luo, Z., Martin, T., Carnegie, T., Nat, M., Jambeck, J. R., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., Andrady, A., Narayan, R., & Lavanda, L. K. (2015). *Entradas de desechos plásticos de la tierra*. 347(2004), 889–893.
- Maurya, A., Bhattacharya, A., & Khare, S. K. (2020). Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)–Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes: An Overview. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602325>
- Meng, X., Yang, L., Liu, H., Li, Q., Xu, G., Zhang, Y., Guan, F., Zhang, Y., Zhang, W., Wu, N., & Tian, J. (2021). Protein engineering of stable IsPETase for PET plastic degradation by Premuse. *International Journal of Biological Macromolecules*, 180, 667–676. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.058>
- Min, K., Cuif, J. D., & Mathers, R. T. (2020). Ranking environmental degradation trends of plastic marine debris based on physical properties and molecular structure. *Nat Commun*, 11(727). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14538-z>
- Müller, R. J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W. D. (2005). Enzymatic degradation of poly(ethylene terephthalate): Rapid hydrolyse using a hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular Rapid Communications*, 26(17), 1400–1405. <https://doi.org/10.1002/marc.200500410>
- Nazareth, M., Marques, M. R. C., Leite, M. C. A., & Castro, Í. B. (2018). Commercial plastics claiming biodegradable status: Is this also accurate for marine environments. *Journal of Hazardous Materials*. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.052>
- Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., Walczak, M. C., Berndt, L., Weiss, M. S., Bornscheuer, U. T., & Weber, G. (2019). Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09326-3>
- Pérez, J. (2020). Biodegradation of polyethylene terephthalate: microorganisms, enzymes and future prospects. *Universidad de La Laguna*, 1(1), 1–30. [https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/20671/Biodegradacion de tereftalato de polietileno microorganismos, enzimas y perspectivas futuras.pdf?sequence=1](https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/20671/Biodegradacion%20de%20tereftalato%20de%20polietileno%20microorganismos,%20enzimas%20y%20perspectivas%20futuras.pdf?sequence=1)

- Pinto, A. V., Ferreira, P., Neves, R. P. P., Fernandes, P. A., Ramos, M. J., & Magalhães, A. L. (2021). Reaction Mechanism of MHETase, a PET Degrading Enzyme. *ACS Catalysis*, *11*, 10416–10428. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c02444>
- Porebski, B. T., & Buckle, A. M. (2016). Consensus protein design. *Protein Engineering, Design and Selection*, *29*(7), 245–251. <https://doi.org/10.1093/protein/gzw015>
- Posada, B. (1994). La degradación de los plásticos. In *Revista Universidad EAFIT* (Vol. 30, Issue 94, pp. 67–86).
- Pymol. (2022). *No Title*. <https://pymol.org/2/>
- Qi, X., Yan, W., Cao, Z., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Current Advances in the Biodegradation and Bioconversion of Polyethylene Terephthalate. *Microorganisms*, *10*(39), 1–25. <https://doi.org/doi.org/10.3390/microorganisms10010039>
- Rennison, A., Winther, J. R., & Varrone, C. (2021). Rational protein engineering to increase the activity and stability of ispetase using the pross algorithm. *Polymers*, *13*(22), 1–11. <https://doi.org/10.3390/polym13223884>
- Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A. (2009). Cutinase-Catalyzed hydrolysis of poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, *42*(14), 5128–5138. <https://doi.org/10.1021/ma9005318>
- Sabagh, A. M., Yehia, F. Z., Eshaq, G., Rabie, A. M., & ElMetwally, A. E. (2016). Greener routes for recycling of polyethylene terephthalate. *Egyptian Journal of Petroleum*, *25*(1), 53–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.001>
- Samak, N. A., Jia, Y., Sharshar, M. M., Mu, T., Yang, M., Peh, S., & Xing, J. (2020). Recent advances in biocatalysts engineering for polyethylene terephthalate plastic waste green recycling. *Environment International*, *145*, 106144. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106144>
- Serra, S., & De Simeis, D. (2018). Use of *Lactobacillus rhamnosus* (ATCC 53103) as Whole-Cell Biocatalyst for the Regio- and Stereoselective Hydration of Oleic, Linoleic, and Linolenic Acid. *Catalysts*, *8*(Atcc 53103), 1–14. <https://doi.org/10.3390/catal8030109>
- Shah, A., & Alshehrei, F. (2017). Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, *5*(1), 8–19.

<https://doi.org/10.12691/jaem-5-1-2>

- Shi, L., Liu, H., Gao, S., Weng, Y., & Zhu, L. (2021). Enhanced extracellular production of IsPETase in *Escherichia coli* via engineering of the pelB signal peptide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2245–2252. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07469>
- Sobre, I., Manual, E. L., & Manual, S. (2011). *Manual Cochrane de revisiones sistemáticas de intervenciones* (Issue March, pp. 1–639).
- 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 [Research-article]. *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(August), 109656. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109656>
- Taniguchi, I., Yoshida, S., Hiraga, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of PET: Current Status and Application Aspects. *ACS Catalysis*, 9(5), 4089–4105. <https://doi.org/10.1021/acscatal.8b05171>
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Kamionka, E., Desrousseaux, M., Texier, H., Gavalda, S., Cot, M., Guémard, E., Dalibey, M., Nomme, J., Cioci, G., Barbe, S., Chateau, M., André, I., Duquesne, S., & Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle plastic bottles. *Nature*, 580(April), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>
- Wang, N., Guan, F., Lv, X., Han, D., Zhang, Y., Wu, N., Xia, X., & Tian, J. (2020). Enhancing secretion of polyethylene terephthalate hydrolase PETase in *Bacillus subtilis* WB600 mediated by the SPamy signal peptide. *Letters in Applied Microbiology*, 71(3), 235–241. <https://doi.org/10.1111/lam.13312>
- Ward, R. N., Duffy, D. C., Davies, P. B., & Bain, C. D. (1994). Sum-frequency spectroscopy of surfactants adsorbed at a flat hydrophobic surface. *Journal of Physical Chemistry*®, 98(34), 8536–8542. <https://doi.org/10.1021/j100085a037>
- Welzel, K., Müller, R.-J., & Deckwer, W.-D. (2002). Enzymatischer Abbau von

Polyester-Nanopartikeln. *Chemie Ingenieur Technik*, 74(10), 1496–1500.
[https://doi.org/10.1002/1522-2640\(20021015\)74:10<1496::aid-cite1496>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/1522-2640(20021015)74:10<1496::aid-cite1496>3.0.co;2-p)

Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., Li, Z., & Liu, W. (2019). Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environment International*, 123(1), 79–86.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.061>

Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). Una bacteria que degrada y asimila poli (tereftalato de etileno) Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., Toyohara, K., Miyamoto, K., Kimura, Y., & Oda, K. (2016). Una bacteria que degrada y asimila poli (tereftalato de . *Science*, 353(6301), 759.

Yoshida, S., Hiraga, K., Taniguchi, I., & Oda, K. (2021). Ideonella sakaiensis, PETase, and MHETase: From identification of microbial PET degradation to enzyme characterization. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 648). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/bs.mie.2020.12.007>

Zhong, E. Z. L., Voigt, C. A., & Sinskey, A. J. (2021). An absorbance method for analysis of enzymatic degradation kinetics of poly(ethylene terephthalate) films. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79031-5>