



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA**

**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

---

Expresión y purificación de una enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción  
ancestral

---

Informe final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Este estudio forma parte del Proyecto de Investigación “Degradación de polímeros orgánicos mediante el uso de enzimas recombinantes” CEDIA-CEPRAXVI,2022, reconocido mediante Resolución 1324-CU-P-2021 por el Honorable Consejo Universitario de la Universidad Técnica de Ambato.

**Autor:** Melanie Dayana Quispe Gudiño

**Tutora:** PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

**Ambato – Ecuador**

**Marzo - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

Liliana Alexandra Cerda Mejía, PhD.

### **CERTIFICA**

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

Ambato, 13 de Febrero de 2023

---

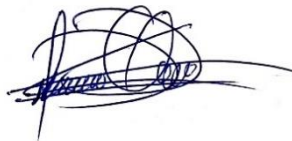
PhD. Liliana Alexandra Cerda Mejía

C.I. 1804148086

**TUTOR**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Melanie Dayana Quispe Gudiño, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Informe Final de Integración Curricular, modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



---

Quispe Gudiño Melanie Dayana

C.I. 1851009991

**AUTORA**

## **APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe final de Integración Curricular, modalidad proyecto de investigación, mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:

---

Presidente del Tribunal

---

PhD. Helena Maritza De La Torre Olvera

C.I. 1309651998

---

PhD. Lorena De Los Ángeles Núñez Villacis


C.I. 1804256905

Ambato, 6 de marzo de 2023.

## **DERECHOS DE AUTOR**

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

Cedemos los Derechos en línea patrimoniales de mi Informe final de Integración Curricular, con fines de difusión pública, además aprobamos 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.



---

Quispe Gudiño Melanie Dayana

C.I. 1851009991

**AUTORA**

## **DEDICATORIA**

*A mis padres, mi gran apoyo y motivación,  
quienes me enseñaron el valor de la  
perseverancia.*

*A todas las personas que buscan constantemente  
cuidar y proteger la naturaleza.*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer primeramente a la vida, por permitirme disfrutar cada paso académico con personas llenas de conocimiento, sabiduría y de buen corazón.*

*Agradezco infinitamente a mis queridos padres, Pilar Gudiño y Darwin Quispe, quienes a través de su cariño y comprensión me han permitido alcanzar un objetivo más en mi vida.*

*A mis tutores, Liliana Cerda y Mario García, muchas gracias por ser buenos mentores, su guía y paciencia ha sido fundamental en el transcurso de esta investigación.*

*A mis amigos más cercanos quienes han estado para mí en todo momento; Sebastián, Duda, Gaby, Ana, Daniel. Gracias por ser buenos compañeros en lo académico y en lo personal, su apoyo siempre estará presente en mí.*

*A mi mejor amigo Stiven quién me ha acompañado en cada etapa de mi camino universitario con mucho entusiasmo, brindándome una mano siempre que lo eh necesitado y festejando cada pequeña victoria que conllevo a este increíble momento, ¡muchas gracias por ser ese amigo incondicional con el cual siempre puedo contar!*

*A la Universidad Técnica de Ambato y a la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología por permitirme adquirir valiosos recuerdos que perduraran siempre en mi memoria.*

## ÍNDICE GENERAL

APROBACIÓN DEL TUTOR .....	i
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	ii
APROBACIÓN DE LOS MIEMBROS DE TRIBUNAL DE GRADO .....	iii
ÍNDICE GENERAL.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xii
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPITULO I .....	1
1. Marco teórico .....	1
1.1. Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.1. Plástico .....	1
1.1.2. Tipos de polímeros .....	1
1.1.2.1. Tereftalato de polietileno (PET) .....	2
1.1.2.2. Polietileno de alta densidad (HDPE).....	3
1.1.2.3. Polietileno de baja densidad (LDPE) .....	3
1.1.2.4. Cloruro de polivinilo (PVC) .....	4
1.1.2.5. Polipropileno (PP) .....	4
1.1.2.6. Poliestireno (PS).....	5
1.1.3. Repercusiones ambientales causadas por el consumo del plástico .....	5
1.1.4. Degradación de residuos plásticos .....	6



1.1.4.1.	Tratamientos mecánicos .....	7
1.1.4.2.	Tratamientos Químicos.....	8
1.1.5.	Biodegradación.....	8
1.1.6.	Enzima PETasa de Ideonella sakaiensis .....	9
1.1.7.	Reconstrucción de secuencias ancestrales de enzimas .....	11
1.1.8.	Procedimiento general de reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR) .....	12
1.1.8.1.	Métodos aplicados en reconstrucción de secuencias ancestrales.....	13
1.1.8.2.	Proteínas obtenidas a partir de ASR.....	14
1.2.	Objetivos .....	15
1.2.1.	Objetivo General .....	15
1.2.2.	Objetivos Específicos .....	15
CAPITULO II .....		16
2.	METODOLOGÍA .....	16
2.1.	Materiales y Reactivos.....	16
2.1.1.	Materiales .....	16
2.1.2.	Reactivos .....	16
2.1.3.	Líneas celulares .....	1
2.1.4.	Equipos.....	1
2.1.5.	Recursos tecnológicos .....	2
2.2.	Métodos.....	2
2.2.1.	Diseño de un plásmido de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral 2	
2.2.1.1.	Secuencia de PETasa ancestral .....	2

2.2.2.	Transformación de células competentes de Escherichia coli.....	2
2.2.3.	Expresión de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral ...	4
2.2.4.	Purificación de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral	4
2.2.4.1.	Lisis celular .....	4
2.2.4.2.	Purificación de la proteína .....	5
2.2.5.	Pruebas de actividad sobre polímeros orgánicos.....	5
CAPÍTULO III.....		6
3.	RESULTADOS Y DISCUSION .....	6
3.1.	Diseño de una enzima PETasa ancestral.....	6
3.2.	Ensayo de expresión de la enzima PETasa N1 .....	6
3.3.	Expresión y purificación de la enzima PETasa N1 .....	8
3.4.	Determinación de buffer para pruebas sobre polímeros orgánicos.....	11
3.5.	Rugosidad de los diferentes polímeros con la enzima N1 .....	14
3.6.	Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).....	15
3.6.1.	Tereftalato de polietileno (PET) .....	15
3.6.2.	Polipropileno (PP) .....	16
3.6.3.	Polietileno de baja densidad (LDPE) .....	17
3.6.4.	Polietileno de alta densidad (HDPE) .....	18
3.6.5.	Poliestireno (PS).....	19
3.6.6.	Cloruro de polivinilo (PVC) .....	21
CAPÍTULO IV.....		23
4.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	23
4.1.	Conclusiones .....	23

3.2. Recomendaciones .....	24
MATERIAL DE REFERENCIA .....	25
ANEXOS .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Códigos de identificación de plásticos comerciales.....	2
Figura 2. Degradación microbiana de PET.....	10
Figura 3. Protocolo de una reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR). ....	13
Figura 4. Ensayo de expresión de la enzima PETasa ancestral N1 en TF2.....	7
Figura 5. Purificación de la enzima ancestral PETasa N1 obtenida a partir de la técnica de cromatografía de afinidad (FPLC).....	9
Figura 6. Purificación de la enzima ancestral PETasa N1 obtenida a partir de la técnica de cromatografía de afinidad (FPLC).....	10
Figura 7. Análisis de diferentes soluciones buffer, expuestas a plástico PET en conjunto a la enzima N1 para la elección correcta de tratamiento. ....	13
Figura 8. Rugosidad de los diferentes polímeros tratados con la enzima N1.....	14
Figura 9. Imágenes del polímero PET obtenidas mediante la técnica SEM.....	15
Figura 10. Imágenes del polímero PP obtenidas mediante la técnica SEM .....	16
Figura 11. Imágenes del polímero LDPE obtenidas mediante la técnica SEM.....	17
Figura 12. Imágenes del polímero HDPE obtenidas mediante la técnica SEM .....	18
Figura 13. Imágenes del polímero PS obtenidas mediante la técnica SEM .....	20
Figura 14. Imágenes del polímero PS obtenidas mediante la técnica SEM .....	21

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Objetos de los que se obtuvo los films de cada polímero .....	42
Anexo 2. Determinación del porcentaje de proteína presente en las bandas de gel de electroforesis SDS page a través del programa ImageJ .....	42

## RESUMEN

Existe una gran variedad de polímeros orgánicos que han llegado a representar un problema de contaminación ambiental. El campo científico se ha visto en la necesidad de diseñar alternativas apropiadas para facilitar el reciclaje de materiales plásticos de una manera ecológica. La biodegradación mediante enzimas ha adquirido gran relevancia en los últimos años por la buena descomposición polimérica. La presente investigación tuvo como objetivo expresar y purificar una enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral (ASR), la cual se esperaba que posea características superiores a la PETasa de *Ideonella sakaiensis* con respecto a su actividad frente al PET y otros polímeros orgánicos. La enzima PETasa ancestral N1, fue expresada en células de *Escherichia coli* TF2 bajo condiciones estables de 1,0 mM de concentración de IPTG a temperatura ambiente durante 16 horas. La purificación de la enzima expresada se realizó mediante la técnica de cromatografía de afinidad (FPLC) y fue comprobada con Electroforesis SDS-PAGE, en la que se verificó la presencia de la enzima PETasa ancestral N1 según el peso molecular calculado, adicionalmente, en la purificación se utilizó el inhibidor extra de serinproteasas (PMSF), junto al inhibidor de metaloproteasas EDTA. Se evaluó la actividad de la enzima ancestral PETasa N1 a través de ensayos de degradación en seis polímeros de alto valor comercial mediante SEM. Las imágenes obtenidas permitieron observar rasgos de degradación en los polímeros LDPE, PS, PP y PET, mientras que en los polímeros HDPE y PVC, las imágenes obtenidas en SEM no fueron conclusivas.

**Palabras clave:** Biodegradación; enzima PETasa; FPLC; polímeros; ASR; SEM

## ABSTRACT

In the world, there are a wide variety of organic polymers that have come to represent a significant problem of environmental contamination. Currently, the scientific field began to design appropriate and efficient alternatives to facilitate the recycling of plastic materials ecologically. Biodegradation by enzymes has become highly relevant in recent years due to its good capacity for plastic degradation. The present investigation aimed to express and purify an PETase enzyme obtained from an ancestral reconstruction (ASR); the ancestral enzyme was expected to have superior characteristics to *I. sakaiensis* PETase respect to its activity against PET and other organic polymers. The ancestral PETase N1 enzyme was expressed in *E.coli* TF2 cells under stable conditions of 1,0 mM IPTG at room temperature, over 16 hours. The enzyme purification was carried out through affinity chromatography (FPLC) complemented with an SDS-PAGE electrophoresis to verify the presence of the ancestral PETase N1 enzyme according to its molecular weight. Over more, the purification used an extra serine protease inhibitor (PMSF) together with EDTA metalloprotease inhibitor. The activity of the ancestral PETase N1 enzyme was evaluated through degradation assays in six high-value polymers by SEM. The images obtained showed degradation features in LDPE, PS, PP and PET polymers, while HDPE and PVC polymers experienced a not conclusive activity of the enzyme N1.

**Keywords:** Biodegradation; PETase enzyme; FPLC; polymers; ASR; SEM

# CAPITULO I

## 1. Marco teórico

### 1.1. Antecedentes Investigativos

#### 1.1.1. Plástico

Los materiales plásticos pertenecen a una familia química denominada polímeros de peso molecular elevado. El término polímero está ampliamente relacionado con una definición particular “numerosas unidades”, las cuales son conocidas como monómeros **(Edmondson & Gilbert, 2017)**. Gran parte de los polímeros provienen de composiciones sintéticas y son ampliamente usados por sus características físicas únicas. Además están presentes en casi todos los productos comerciales e industriales de uso común de los seres humanos **(Evode, Qamar, Bilal, Barceló, & Iqbal, 2021)**. La composición de cada polímero parte de reacciones de polimerización en cadena **(Nuyken & Pask, 2013)**; por lo tanto existen diferentes tipos de plástico en el mundo, que han sido caracterizados por las propiedades de las moléculas de cadena de cada polímero **(Siddiqui, Gondal, & Redhwi, 2008)**.

#### 1.1.2. Tipos de polímeros

En base a los materiales macromoleculares, propiedades físicas y químicas se pueden distinguir tres categorías de polímeros; los termoplásticos, los termoestables y los elastómeros sintéticos **(Markl & Lackner, 2020)**. Los termoplásticos son sistemas no reticulados, que fluyen a temperaturas elevadas y que al enfriarse vuelven al estado sólido, además son mayormente usados por sus propiedades reciclables **(Van Der Vegt, 2006)**. Por otro lado, los elastómeros sintéticos son similares a los termoplásticos, pero están en una forma blanda **(Ji, Li, Weng, & Ren, 2019)**. Mientras que los termoestables son mayormente formados en altas temperaturas para poder moldear su composición química, lo que los vuelve menos frecuentes **(Zhao et al., 2019)**.

Los termoplásticos son los más utilizados en diferentes industrias debido a sus buenas propiedades químicas y físicas. Entre algunos de ellos se destaca el Polietileno (PE), Polipropileno (PP), Cloruro de polivinilo (PVC), Poliestireno (PS), Poliamida (PA), Polimetilmetacrilato (PMMA), Policarbonato (PC), Tereftalato de polietileno (PET), etc.



(Rhodes, 2018). Adicionalmente, acorde a **Othman, Hasan, Muhamad, Ismail, & Abdullah (2021)**, dentro del grupo del polietileno (PE), se pueden clasificar otros dos grandes grupos en función de su densidad: polietileno de alta densidad (HDPE) y polietileno de baja densidad polietileno (LDPE).

Según **Vadera & Khan (2021)**, los principales polímeros de uso comercial están presentes mayormente en industrias alimentarias, cosméticas, constructoras, médicas, electrónicas, agrícolas, etc. En la Figura 1 se observan a los 6 polímeros de alto valor industrial con sus respectivos códigos de identificación.



**Figura 1.** Códigos de identificación de plásticos comerciales.  
**Fuente:** García (2020)

#### 1.1.2.1. Tereftalato de polietileno (PET)

El PET es un poliéster semicristalino que posee como monómeros a un enlace éster-ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG), que otorga características sumamente resistentes a los procesos de degradación natural (**C. Chen, Han, Ko, Liu, & Guo, 2018**). Es ampliamente usado en las industrias en forma de fibras, láminas y películas. La producción asciende en la actualidad a más de 70 millones de toneladas anuales (**Tournier et al., 2020**). Entre las principales aplicaciones de este polímero se destaca a la industria del empaquetamiento debido a la amplia fabricación de envases de alimentos y bebidas (**Siracusa & Blanco, 2020**).

La alta producción de este polímero está relacionada con las buenas características de resistencia mecánica junto a una buena apariencia estética (**Hiraga, Taniguchi, Yoshida, Kimura, & Oda, 2019**). Sin embargo, la gestión de sus residuos ha sido desfavorable en los últimos años, ya que grandes cantidades de desechos de PET están ingresando a vertederos, lo que ha generado la búsqueda de nuevas contramedidas para prevenir su liberación al medio ambiente, estrategias que incluyen tratamientos biológicos, químicos y físicos (**Kawai, Kawabata, & Oda, 2019**).

### **1.1.2.2. Polietileno de alta densidad (HDPE)**

El polímero HDPE es un material blanco opaco con una estructura lineal semejante al polietileno crudo. Se compone principalmente de moléculas no ramificadas con un alto grado de cristalinidad, además, sus resinas suelen tener densidades entre 0,94 y 0,97 g/cm<sup>3</sup>, lo que le otorga al polímero propiedades mecánicas de resistencia y durabilidad **(El-Rafey, Walid, Syala, Ezzat, & Ali, 2022)**. A diferencia de otros polímeros, el HDPE mantiene generalmente una ramificación de bajo grado, ya que se produce a alta presión (10–80 bar) y temperatura (70-300 °C). Los usos comunes del HDPE incluyen envases de jabón o soluciones de limpieza, bolsas para congelar, bolsas de compras, tabloncillos de imitación de madera, empaquetamientos de alimentos y bebidas, tuberías, cascos protectores, tapas de botellas, vehículos, tanques de combustible, etc. **(Evode et al., 2021)**.

Los residuos de HDPE tienen tasas lentas de degradación en el medio ambiente, ya que su descomposición tarda alrededor de 530 a 5000 años dependiendo de las condiciones a las que este sometido el material polimérico **(Chamas et al., 2020)**. Por tanto, han surgido tratamientos termoquímicos, como la pirólisis y procesos catalíticos o de vapor para inducir descomposiciones parciales donde se obtienen como resultados hidrocarburos de cadena más corta y monómeros **(Byrne et al., 2022)**.

### **1.1.2.3. Polietileno de baja densidad (LDPE)**

El LDPE es un polímero que tiene en su estructura la presencia de ramificaciones, las mismas que son las responsables de la característica de baja densidad. Químicamente, el LDPE es inerte a temperatura ambiente, sin embargo, puede ser atacado gradualmente por agentes oxidantes fuertes y algunos solventes **(Ghatge, Yang, Ahn, & Hur, 2020)**. Por otro lado, se destaca el hecho de que es un polímero muy versátil, ya que solamente puede mantener su composición intacta por un corto período de tiempo y por una temperatura estándar de hasta 95 °C, fuera de esos rangos su composición tiende a ser frágil **(Ravichandran, Vengatesan, & Ramakrishnan, 2020)**.

Generalmente el LDPE, se encuentra ampliamente en una gran variedad de productos de uso común como: contenedores, botellas de bebidas, cubos de basura, superficies de trabajo, porta bebidas, bolsas de lavandería, tapas, accesorios para parques infantiles,

carcasas protectoras, computadoras, alambres, bandejas, bolsas de basura, etc., (**Jain, Bhadauria, & Kushwah, 2022**). Esto a su vez, provoca que la alta demanda de LDPE genere un gran impacto ambiental, ya que los residuos terminan en vertederos, especialmente en países de bajos recursos, debido a que no cuentan con una adecuada gestión de residuos (**Streit et al., 2022**), lo que ha llevado a la implementación de otras técnicas como los tratamientos mecánicos (**Duque, Martins, Debenest, & Orlando, 2020**).

#### **1.1.2.4. Cloruro de polivinilo (PVC)**

**Peng et al. (2020)**, menciona que la producción mundial de PVC se ha visto proyectada en un aumento anual de aproximadamente 3,2% hasta el 2021. El PVC normalmente es descrito como un sólido blanco quebradizo que contiene 56,77 % (p/p) del elemento cloro. Es insoluble en agua y alcohol, pero soluble en tetrahidrofurano (THF) (**Temporiti, Nicola, Nielsen, & Tosi, 2022**).

**Kumar (2019)**, señala que el PVC cuenta con diversas aplicaciones comerciales, ya que posee diferentes formas, ya sea flexible o rígida. La forma rígida por ejemplo se usa en la construcción de tuberías y perfiles de puertas y ventanas, láminas para cobertura de alimentos y tarjetas (bancarias o de membresía), mientras que la forma flexible cuenta en su polimerización con una adición de plastificantes y se usa mayormente en plomería, piel sintética, reemplazo de caucho y lona, etc. No obstante, en lo que respecta a la gestión de sus residuos no existen métodos prácticos únicamente se desecha en vertederos y la incineración (**Y. Chen et al., 2018**)

#### **1.1.2.5. Polipropileno (PP)**

Según, **Habib et al. (2020)**, el polipropileno cuenta con una cadena continua de unidades repetitivas de metileno ( $CH_2$ ), que confieren una estructura altamente hidrofóbica resistente a la degradación. Adicionalmente pertenece al grupo de las poliolefinas, las cuales, otorgan al polímero una menor densidad a comparación de otros compuestos polimerizados (**Bronchud Molina, 2021**). El polipropileno, posee varias características de alto valor comercial como: propiedades físicas relacionadas con la resistencia a altas temperaturas, buenas propiedades mecánicas y resistencia química e inercia (**Spoerk, Holzer, & Gonzalez-Gutierrez, 2020**). En las industrias se usa mayormente para la

fabricación de diferentes artículos para el hogar, frascos usados en entornos clínicos, embudos, bandejas y botellas, además al ser un material incoloro el polipropileno, también se usa comúnmente en cintas de embalaje, fiambreras, pajitas, recipientes para alimentos, tapas de botellas, cepillos, cajas de batería, escobas, rastrillos y suministros de cirugía (**Bomhard, 2019**).

Según **Jeon et al. (2021)**, el polipropileno es similar al polietileno, sin embargo el polipropileno, posee una resistencia superior al agrietamiento por tensión, lo que le confiere una estabilidad a su estructura mejorada. En lo que respecta a su gestión de residuos es muy ambiguo, ya que la gran mayoría de sus residuos sólidos plásticos se ven como contaminantes de microplásticos y nanoplásticos en diversos entornos (marinos, suelo, lixiviados de vertederos, etc.). (**Yang et al., 2021**).

#### **1.1.2.6. Poliestireno (PS)**

El poliestireno es considerado como un polímero aromático artificial, que es sintetizado a partir del monómero de estireno a través de la reacción de polimerización. Debido al bajo costo, peso ligero, fácil producción, dureza, rigidez y transparencia de este polímero y el sin número de aplicaciones, se produce en grandes cantidades (**Chaudhary & Vijayakumar, 2020**). El poliestireno es ampliamente utilizado en plásticos de un solo uso (vasos, platos, contenedores, cubiertos), envases de alimentos, platos, tazones, recipientes rígidos para alimentos como el yogur, etc., (**Ugoeze, Amogu, Oluigbo, & Nwachukwu, 2021**). Cabe recalcar no cuenta con adecuada degradación, por lo cual se han implementado nuevas técnicas para la gestión del poliestireno, como la pirólisis, combustión y vertedero (**Z. Wang, Xin, Shi, & Zhang, 2020**).

#### **1.1.3. Repercusiones ambientales causadas por el consumo del plástico**

A pesar de que los plásticos han traído muchos beneficios, su industrialización actualmente se ve como fuente de varios problemas, ya que la mayoría de los plásticos son difíciles de degradar y tienden a acumularse en el medio ambiente después de su uso, causando perturbación ambiental denominada “contaminación plástica”(**Taniguchi et al., 2019**).

La **ONU (2022)** menciona que la producción mundial de plásticos en el mundo es de 348 millones de toneladas por año con una gran posibilidad de duplicar su cifra para el año 2040, lo cual representa una sobreproducción, que repercutirá notablemente en problemas ambientales nocivos relacionados a procesos de polimerización y mal tratamiento de residuos (**Chauhan, Kärki, & Varis, 2019**).

Según **Evode et al., (2021)**, el plástico es considerado como uno de los factores más perjudiciales para el planeta, su producción aporta grandes impactos al cambio climático mientras que los tratamientos convencionales de residuos como la incineración y los vertederos no son muy viables. La incineración requiere una gran cantidad de energía y descarga subproductos peligrosos como el CO<sub>2</sub>, gases ácidos (óxido de azufre), compuestos orgánicos persistentes (dioxinas y furanos), metales pesados, etc., que pueden contribuir con el calentamiento global y afectar la salud humana (**Xue & Liu; 2021**). Por otro lado, los vertederos almacenan plásticos que difícilmente se degradan y ocupan una gran cantidad de espacio terrestre. Además la interacción de los plásticos con aguas subterráneas y las sustancias tóxicas presentes en agua de los vertederos pueden generar lixiviados capaces de producir un deterioro de la tierra circundante (**Zhang et al., 2021**).

La gestión ambiental de los plásticos no solo afecta gravemente a los medios terrestres sino también los acuáticos (**Thiele, Hudson, Russell, Saluveer, & Sidaoui-Haddad, 2021**). De hecho, **Millican & Agarwal (2021)**, explican que los residuos plásticos son una molestia especialmente para los organismos marinos, debido a afecciones relacionadas con intervenciones en las cadenas alimenticias o especies enredadas en desechos plásticos de embalaje.

#### **1.1.4. Degradación de residuos plásticos**

La alta demanda de residuos plásticos en el mundo ha generado la formulación de varias estrategias para minimizar la contaminación ambiental. Según **Rhodes (2018)** entre 1950 y 2015 se han generado un total de 6.300 millones de toneladas de residuos plásticos primarios y secundarios, de los cuales alrededor del 9% ha sido reciclado, el 12% incinerado y el 79% restante ha terminado en vertederos o se ha liberado directamente en el medio ambiente.

A pesar de que existe la descomposición de polímeros por mecanismos como la fotodegradación, degradación termooxidativa, hidrólisis y degradación por microorganismos, lamentablemente dichos procesos tardan una gran cantidad de tiempo en obtener resultados favorables (**Sazali et al., 2020**). Por lo cual como solución alternativa, a los tratamientos naturales se proponen nuevas perspectivas de reciclaje basadas en tratamientos mecánicos y químicos (**Sathe et al., 2021**).

#### **1.1.4.1. Tratamientos mecánicos**

Los tratamientos mecánicos se definen como la reutilización directa de polímeros desechados no contaminados (**Ugarte et al., 2018**). En la gran mayoría de residuos poliméricos, este tratamiento es otorgado por las mismas industrias de fabricación como parte de su proceso de tratamiento de residuos postindustriales. Sin embargo, debido a la alta demanda de producción plástica estas técnicas han empezado a surgir en residuos de posconsumo (**Briassoulis, Pikasi, & Hiskakis, 2021**).

Sus fundamentos abarcan métodos tales como el moldeo por inyección, extrusión, moldeo rotacional, y termoprensado (**Uzosike, Yee, & Padilla, 2023**). Por lo cual los tratamientos mecánicos están mayormente enfocados en termoplásticos relacionados con usos comunes de envases (PP, PE, PS y PET), ya que estos poseen capacidades más flexibles con tendencias de moldeamiento cuando son expuestos a altas temperaturas (**Ignatyev, Thielemans, & Vander Beke, 2014**).

Sin embargo, los métodos de degradación mecánica no funcionan en polímeros convencionales reticulados covalentemente, como los termoestables y elastómeros (gomas) (**Gao et al., 2021**). Según **Briassoulis et al. (2021)**, el tratamiento mecánico de plásticos posconsumo, cuenta con algunas limitaciones en su proceso, tales como: la separación de residuos de todos los polímeros, el tipo de polímero, la presencia de diversos aditivos y degradación estructural (deterioro de propiedades mecánicas), por tal razón sus métodos no son populares al momento de seleccionar tratamientos de degradación de polímeros de una manera sostenible.

#### **1.1.4.2. Tratamientos Químicos**

Según **Ahmad, Abnisa, & Daud (2016)**, la degradación química permite resultados favorables de descomposición de materiales poliméricos a través del uso de químicos como: ácidos, bases y solventes. La base de este método consiste en varias reacciones químicas, las que son encargadas de producir la ruptura de los dobles enlaces de los polímeros. Las reacciones que están involucradas en la degradación del polímero son la solvólisis (bajo la acción de solventes), ozonólisis (bajo la acción del ozono) y oxidación (bajo la acción de oxígeno) (**Salam, Devi Salam, Varma, Prashar, & Choudhary, 2021**).

Según **Meys et al. (2020)**, mencionan que a pesar de que en este proceso de reciclado químico se evita el uso de materias primas fósiles, los resultados se han visto mayormente relacionados con la obtención de productos químicamente idénticos a los productos sustituidos, lo que representa una desventaja en los manejos de gestión de residuos, los mismos que terminan siendo expuestos finalmente a incineración o vertederos después de ciclos de uso más cortos. De manera general el uso de los tratamientos químicos representa un desajuste entre los beneficios y resultados de prevenciones de contaminación, por lo que han sido cuestionados en los últimos años (**Geyer, Jambeck, & Law, 2017**).

#### **1.1.5. Biodegradación**

Acorde a **Yang et al. (2018)**, los métodos de biodegradación, son tratamientos diseñados para degradar sustancias de una manera amigable con el ambiente, ya que no generan subproductos perjudiciales para la naturaleza o los seres vivos. La biodegradación de plásticos se ha empezado a llevar a cabo varios años atrás y consiste en la descomposición de los polímeros a través de organismos vivos o microorganismos tales como bacterias, hongos, invertebrados e incluso algunas algas.

Recientemente han sido publicadas nuevas investigaciones alternativas para la fragmentación de polímeros plásticos, en las que se menciona el uso de enzimas extracelulares. **Soares et al. (2019)** menciona que las enzimas al ser consideradas como catalizadores biológicos participan en reacciones importantes, de acción sobre sustratos para acelerar procesos de conversión y obtener de esa manera productos de valor

agregado. Entre los principales productos de la degradación enzimática se obtiene: dióxido de carbono ( $CO_2$ ), agua ( $H_2O$ ), metano ( $CH_4$ ), dinitrógeno ( $N_2$ ) y otros productos metabólicos, que podrían ser de gran utilidad en la eliminación de plásticos nocivos (Kaushal, Khatri, & Arya, 2021).

Generalmente, se consideran a las hidrolasas en la degradación de residuos de material polimérico, ya que estas enzimas se caracterizan por estar involucradas en la división del enlace químico en presencia de agua para dar como resultado la ruptura de una molécula grande en pequeños fragmentos (Magnin et al., 2019).

Wilkes, Aristilde, Ludmilla Aristilde, & Hall (2017), mencionan que casi todos los plásticos presentes en la naturaleza adquieren características hidrofóbicas, lo que permite una mejor adhesión de las enzimas a las estructuras del polímero. Una gran variedad de enzimas hidrolasas tienen una hendidura hidrofóbica cerca de su sitio activo, que les permite una interacción factible con los grupos hidrofóbicos presentes en el polímero (Kaushal et al., 2021). Esto aumenta notablemente la accesibilidad de la enzima hacia el polímero mediante interacciones hidrofóbicas que facilitan la ruptura hidrolítica de las largas cadenas poliméricas en monómeros más pequeños o dímeros, que son posteriormente acumulados por el organismo microbiano y consumido como fuente de carbono (Maity, Maity, Bera, & Roy, 2021).

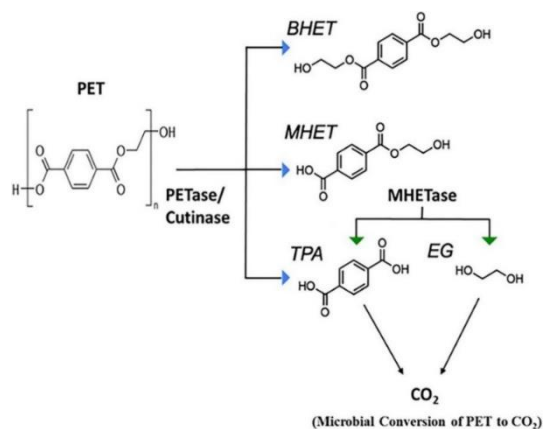
No obstante, la eficiencia de estos tratamientos puede verse mayormente influenciada si los polímeros son previamente manipulados con otros métodos de tratamiento como químicos o mecánicos (Ghatge et al., 2020). Aunque el proceso de biodegradación es semejante en todos los polímeros, se debe considerar que la reacción enzimática estará limitada por las características específicas del tipo de enzima que se use para biodegradación al igual que la complejidad de la estructura química y cristalinidad de los polímeros (Shen et al., 2020).

#### **1.1.6. Enzima PETasa de *Ideonella sakaiensis***

El polímero que posee mayor número de enzimas degradadoras altamente caracterizadas e identificadas para estudios es el PET. En el 2016 varios investigadores identificaron a la bacteria *I. sakaiensis*, la misma posee una galería enzimática capaz de hidrolizar el PET, conocidas como *IsPETasa* e *IsMHETasa* (Yoshida et al., 2016). El gran impacto que ha tenido la investigación se debe a la digestión enzimática de PET presentada en la



investigación, ya que la enzima PETasa convierte los residuos del polímero en productos secundarios. En la Figura 2 se observan los productos de degradación que se liberan cuando la enzima hidroliza el polímero PET, estos productos de degradación son tereftalato de bis-(hidroxietilo) (BHET), tereftalato de mono (2-hidroxietilo) (MHET) y ácido tereftálico (TPA).



**Figura 2.** Degradación microbiana de PET.  
Fuente: Mohanan et al. (2020)

En la Figura 2, también se puede notar que la enzima MHETasa (enzima digestiva MHET), hidroliza aún más MHET en monómeros de ácido tereftálico (TPA) y etilenglicol (EG) (Mohanan et al., 2020). Li et al. (2019), explica que dichos compuestos secundarios tienen aplicaciones de valor agregado, ya que el metabolismo de etilenglicol y sus derivados, han tenido como resultado diferentes productos de oxidación como el glicolaldehído, glicoxal, glicolato y glicoxilato, que representan importantes usos en bloques de construcción de reactivos para la producción de agro-productos químicos aromáticos, poliméricos o productos farmacéuticos (Tanaka et al., 2018).

La enzima PETasa ha sido ampliamente estudiada, desde su estructura hasta su actividad (Salam et al., 2021). De manera general la caracterización de *I. sakaiensis* muestra que la enzima PETasa es una serina hidrolasa similar a las cutinasas (Knott et al., 2020). No obstante la actividad de la enzima PETasa generalmente es buena pero no ha podido ser considerada en procesos de reciclaje industrial (Heyde, Arnling Bååth, Westh, Nørholm, & Jensen, 2021).

Adicionalmente, se ha determinado que la enzima PETasa no es particularmente termoestable, ya que tiene una temperatura de fusión de alrededor de 45°C. Por tanto, varios estudios han intentado incrementar la actividad enzimática o la estabilidad térmica de la enzima (**Kawai, Zhang, & Liu, 2021**). El objetivo común de la mayoría de estudios es aumentar el punto de fusión de temperatura de proteína de al menos 72 °C, ya que es la temperatura de transición vítrea del PET (**Benavides Fernández, Guzmán Castillo, Quijano Pérez, & Carvajal Rodríguez, 2022**).

En base a lo evidenciado en los últimos años se ha buscado obtener enzimas más termoestables que mejoren su respectiva actividad catalítica. Acorde a **Harris et al. (2022)**, las reconstrucciones ancestrales podrían ser más termoestables, ya que pueden dar lugar a una gran trayectoria evolutiva de posibles mutaciones, que mejoren la actividad de una enzima. Por tanto, esta técnica es potencialmente considerada para cubrir las necesidades de biodegradación de polímeros.

#### **1.1.7. Reconstrucción de secuencias ancestrales de enzimas**

**Chen & Arnold (2020)**, mencionan que la estabilidad de la mayoría de las enzimas modernas solo es marginal y por tanto algunas de sus funciones son limitadas. En base a dichas limitaciones, surgen nuevas tecnologías capaces de cubrir estas necesidades; tienen como base el postulado de Pauling y Zuckerkandl llamado "paleogenética química", que induce la idea de que las proteínas modernas contienen suficiente información para derivar secuencias de ancestrales comunes (**Pauling, Zuckerkandl, Henriksen, & Lövstad, 1963**).

En los últimos años varios estudios de "resurrección" de proteínas a partir de secuencias ancestrales con altas hipótesis de poseer características superiores (**Aadland, Pugh, & Kolaczowski, 2019**). La reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR), ha permitido realizar una gran variedad de investigaciones experimentales en diferentes ámbitos científicos (**García & Kaçar, 2019**).

Sin embargo, los ejemplos más novedosos del uso de ASR están relacionados con la reconstrucción de enzimas más estables lo cual podría ser ampliamente usado en procesos industriales (**Arenas, Weber, Liberles, & Bastolla, 2017**). **Gomez-Fernandez, Risso, Rueda, Sanchez-Ruiz, & Alcalde (2020)**, menciona que las enzimas resucitadas pueden exhibir una gama atractiva de rasgos bioquímicos, como la estabilidad, la promiscuidad

y una correcta expresión heteróloga.

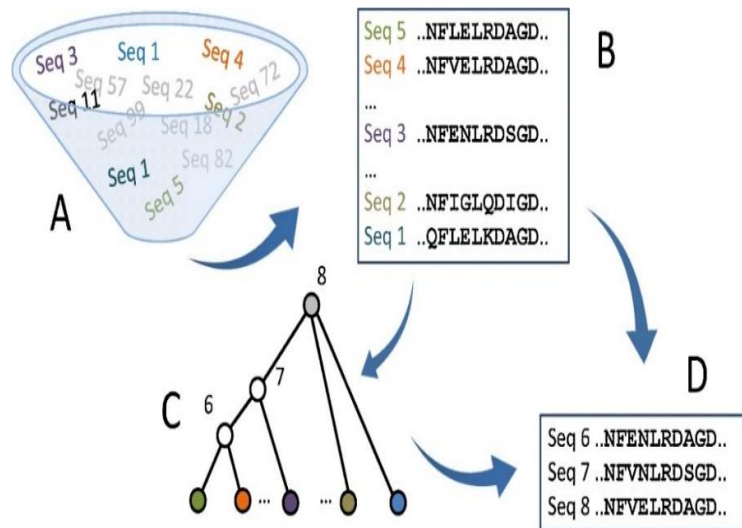
### **1.1.8. Procedimiento general de reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR)**

La ASR es considerada como una técnica *in silico*, es decir sus metodologías se basan mediante algoritmos de simulación y predicción computacional, que permiten deducir secuencias de proteínas antiguas a partir de secuencias de proteínas homologas existentes (**Mascotti, 2022**). La principal ventaja de esta técnica es que las biomoléculas que se van a modificar pueden ser obtenidas de manera ideal sin la necesidad de adquirir información adicional (estructura terciaria, principios de diseño, etc.).

La modificación parte de una investigación amplia de población diversificada de bibliotecas de genes virtuales que facilitan la selección de una propiedad adecuada con todas las características deseadas (**Schriever et al., 2021**). Según, **Furukawa, Toma, Yamazaki, & Akanuma (2020)**, la técnica de ASR normalmente parte con la identificación de secuencias homologas de aminoácidos para acceder a amino sustituciones ácidas que estén alejadas del sitio activo y que influyan en la actividad y termo estabilidad de la enzima.

Por tanto, su procedimiento general se resume en tres pasos: i) Interferencia de una secuencia ancestral basada en una comparación de secuencias homologas de aminoácidos; ii) síntesis artificial de un gen que codifique la secuencia de aminoácidos inferida; y iii) Expresión de un gen en un organismo huésped.

El protocolo de ASR está más detallado en la Figura 3, donde (A) representa al conjunto de secuencias que se recupera de una base de datos; (B) Compilación de secuencias en alineaciones de secuencias múltiples para la identificación de mutaciones; (C) Determinación de una filogenia y (D) Deducción de secuencias ancestrales para todos los nodos internos del árbol.



**Figura 3.** Protocolo de una reconstrucción de secuencias ancestrales (ASR).  
**Fuente:** Merkl & Sterner (2016)

### 1.1.8.1. Métodos aplicados en reconstrucción de secuencias ancestrales

Para la deducción de una secuencia de interés luego de adquirir el árbol filogenético, se prosigue con la reconstrucción de una secuencia ancestro a partir de métodos estadísticos sofisticados tales como la máxima parsimonia (MP) y la máxima verosimilitud (ML) (Spence, Kaczmarski, Saunders, & Jackson, 2021). Ambos métodos son ampliamente usados en la actualidad, sin embargo, MP fue el primer método aplicado a la reconstrucción de secuencias de proteínas ancestrales, debido a que su metodología tiene como base a una simplificación extrema del proceso evolutivo (Scossa & Fernie, 2020). MP no posee inconvenientes relacionados a la incapacidad de resolver reconstrucciones ambiguas y parsimoniosas, de hecho, generalmente MP se considera como un método estadístico de confianza (Foley Id et al., 2022).

El método ML por su parte, es muy popular debido a que se enfoca en la elección de estados ancestrales enfocados a la elección de una mayor probabilidad a posteriori en una determinada posición (Ishikawa, Zhukova, Iwasaki, Gascuel, & Pupko, 2019). Su principal ventaja es el uso de un modelo explícito del proceso de sustitución, diferente al modelo implícito usado en MP. No obstante, se menciona la existencia de un tercer método no muy reconocido denominado “inferencia bayesiana” (BI), el cual está especializado mayormente en el análisis filogenético. Según Merkl & Sterner (2016), la inferencia bayesiana (BI), es altamente relacionado con una distribución de probabilidad

posterior, en lugar de una "mejor" estimación, como el caso de MP y ML, además requiere una suma explícita sobre diferentes posibilidades para los parámetros no esenciales. Es importante mencionar que la precisión de cualquier reconstrucción ancestral por cualquier método junto a su grado de confianza en los resultados depende tanto de la precisión como del sesgo sistemático en la reconstrucción. Se recomienda evitar el sesgo, ya que puede conducir fácilmente a la aparición de tendencias espurias en la inferencia funcional (Sloutsky & Naegle, 2019).

#### **1.1.8.2. Proteínas obtenidas a partir de ASR**

Acorde a **Furukawa et al. (2020)**, el proceso de reconstrucción se culmina con la síntesis de los genes que codifican las proteínas ancestrales en un vector plasmídico de expresión en un organismo huésped como *E. coli*. **Ward, Chatzivasileiou, & Stephanopoulos (2018)**, mencionan que la expresión de enzimas está mayormente ligada a la formación de productos a través de organismos modelos como bacterias. Por tal razón la elección de la bacteria *E. coli*, es altamente considerada en gran parte de los estudios de expresión de enzimas. Posteriormente a la expresión enzimática se requiere el uso de técnicas de purificación para obtener la proteína sobreexpresada, considerando que la purificación de enzimas microbianas es diferente para cada enzima debido a que su procedimiento depende de la concentración intracelular o extracelular. Adicionalmente, la elección de técnicas cromatográficas también difiere según la fuente de los microorganismos y el tamaño de las proteínas (**Bharathi & Rajalakshmi, 2019**).

Las proteínas obtenidas a partir de reconstrucción normalmente suelen ser muy termoestables (**Sun, Calderini, & Kourist, 2021**). Acorde a **Kim & Pascual (2021)**, cuando se sustituye aminoácidos ancestrales putativos en enzimas naturales, es muy probable que la termoestabilidad incremente sin comprometer a la actividad catalítica. Un claro ejemplo de ello es el estudio de **Joho et al. (2022)**, reportó resultados favorables en el rastreo de la trayectoria evolutiva de antiguas serinas hidrolasas hasta *IsPETase* mediante el uso de ASR, en donde se identificó dos variantes enzimáticas con actividad catalíticas significativamente mayor a las actividades de las enzimas modernas. Se estima que exista una gran fomentación de estas técnicas hacia las industrias para que de esa manera se puedan producir enzimas ancestro con moléculas más complejas encargadas de atender necesidades específicas como la gestión de residuos plásticos de una manera más ecológica.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Aislar una enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Determinar las condiciones ideales de expresión para la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral.
- Purificar la enzima PETasa ancestral a través de cromatografía líquida rápida para proteínas (FPLC)
- Evaluar la actividad de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral sobre polímeros orgánicos mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

## CAPITULO II

### 2. METODOLOGÍA

#### 2.1. Materiales y Reactivos

##### 2.1.1. Materiales

- Guantes de nitrilo
- Gradillas
- Malla metálica
- Frascos de tapa azul
- Mascarillas
- Rotuladores
- Matraz Erlenmeyer 250, 1000 mL
- Probetas 10, 100 mL
- Micropipetas de volumen variable
- Balones de aforo
- Papel absorbente
- Puntas para pipetas de 200  $\mu$ L, 1 mL, 10 mL
- Papel filtro
- Papel aluminio
- Papel film
- Tubos Falcon de 50 mL
- Pipetas
- Hisopos
- Cajas Petri de vidrio
- Mechero
- Espátulas estériles
- Columna Ni-NTA

##### 2.1.2. Reactivos

- Lisozima
- Agua destilada
- Agua desionizada
- Extracto de levadura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Triptona
- Agar – agar
- Acetato sódico ( $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ )
- Alcohol etílico
- Tris HCl
- EDTA
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- SDS
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ )
- Cloranfenicol
- Glicerol
- Imidazol
- Acrilamida

### 2.1.3. Líneas celulares

- *E. coli* Rosetta (DE3)
- *E. coli* DH5 $\alpha$
- *E. coli* TF2

### 2.1.4. Equipos

- Estufa (Precisión-Thermo Scientific)
- Micropipeta manual (Thermo Scientific, Dinamarca)
- Centrífuga (Rotina 380-Hettich Zentrifugen)
- Incubadora (Isotherm)
- Refrigerador (LG)
- Ultra congelador (Binder)
- Cámara de flujo laminar (OptiMAIRR)
- Termociclador (Biorad)
- Autoclave (HIRAYAMA/HV-110)
- Agitador incubador orbital (Shaker mini-Benchmarle)
- FPLC (ÄKTA Start con colector de fracciones)
- Balanza analítica (Mettler Toledo XSE205 DualRange)
- Cámara de electroforesis (Biorad)
- Incubadora (ESCO/Isotherm)
- Cámara de flujo laminar (ESCO/ACB-4 A2)
- Plancha de agitación (IK.C-MAG HS7)
- Plancha de calentamiento (Labnet)
- pH metro (Metler Toledo/SevenCompact)
- Vortex (Labnet/Mixer/VX200)
- Baño termostático con agitación (Stuart)
- Nanodrop (Thermo Scientific)



### **2.1.5. Recursos tecnológicos**

- Mega X
- NCBI
- OrthoDB
- ProQuest
- SCIFINDER
- BLAST
- MAFFT
- FastML
- ProtASR
- Scopus
- ModelGenerator

## **2.2. Métodos**

El presente proyecto de investigación es un estudio experimental que pertenece al proyecto CEDIA “Degradación de polímeros orgánicos mediante el uso de enzimas recombinantes” liderado por investigadores de la Universidad Técnica de Ambato y en colaboración con investigadores de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE) y de la Universidad de Las Américas (UDLA).

### **2.2.1. Diseño de un plásmido de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral**

#### **2.2.1.1. Secuencia de PETasa ancestral**

La secuencia de la enzima PETasa fue obtenida por el PhD. Vinicio Armijos en colaboración con el PhD. Yunierkis Pérez, docentes - investigadores de la Universidad de Las Américas (UDLA) quienes forman parte del proyecto CEDIA antes mencionado. La secuencia de la enzima fue determinada mediante reconstrucción ancestral. En resumen, se realizó una compilación de secuencias de enzimas homólogas a PETasa de *I. sakaiensis* a través de un análisis de bases de datos con los programas bioinformáticos “OrthoDB” y “BLAST”. Se obtuvieron alineamientos múltiples de secuencias de los cuales se estableció la relación filogenética más probable aplicando pruebas bootstrap no paramétrico.

El árbol filogenético permitió inferir la secuencia del ancestro N1, que fue utilizada para el diseño del plásmido de expresión, el cual fue sintetizado por la compañía Gene Universal. Se adicionó una secuencia de 6xHis en el extremo C-terminal de la secuencia del ancestro N1. Finalmente, la secuencia se insertó en el plásmido pET28b, el cual contiene un sistema de expresión inducible mediante la adición de isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y un gen de resistencia a la kanamicina para la selección de los transformantes.

### **2.2.2. Transformación de células competentes de *Escherichia coli***

El plásmido pET28b\_N1 se empleó en la transformación de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  y *E. coli* TF2, las cuales permitieron almacenar el plásmido y expresar la enzima PETasa N1 respectivamente. Para la transformación bacteriana se empleó el método de choque térmico (Cohen, Chang, & Hsu, 1972). El método inicia con la descongelación de 100  $\mu$ L de células competentes almacenadas a -80 °C en un baño con hielo por 30 minutos, posteriormente se añadió 100 ng de ADN plasmídico y se incubó las células por 30 minutos en hielo, después se incubó las células a 42 °C durante 90 segundos.

Rápidamente, se transfirió las células a hielo por 2 minutos y se añadió 900  $\mu$ L de caldo SOC (Tabla 1). Las células se incubaron durante 1 hora a 37 °C con agitación constante a 220 rpm. A continuación, se inoculó alícuotas de 50, 100, 200 y 400  $\mu$ L en placas de LB (Tabla 2) suplementado con 50  $\mu$ g/mL de kanamicina y 34  $\mu$ g/mL cloranfenicol en el caso de *E. coli* Rosetta (DE3); y las células se incubaron durante una noche a 37 °C (Cerdeja-Mejía, 2016). Para culminar, se transfirió una colonia aislada a un matraz con 10 mL de caldo LB suplementado con antibiótico donde se almacenó a los transformantes con 20% glicerol a -80 °C.

**Tabla 1.** Formulación del medio de cultivo SOC.

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad por L de medio de cultivo</b>
Solución de glucosa 20%	20 mL
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	0,584 g
Triptona	20 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,186 g
Sulfato de magnesio (MgSO <sub>4</sub> )	2,4 g

**Fuente: (Agilent Technologies, 2015)**

**Tabla 2.** Formulación del medio de cultivo Luria Bertani (LB).

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad por L de medio de cultivo</b>
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio (NaCl)	10 g
Triptona	10 g
Agar	20 g

**Fuente: (Sigma-Aldrich, 2013)**

### **2.2.3. Expresión de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción ancestral**

En base a la metodología de **M. Furukawa, Kawakami, Oda, & Miyamoto (2018)**, se procedió a realizar la expresión de la proteína, partiendo de inóculos iniciales, donde se transfirió una colonia aislada y transformada de *E. coli* TF2 con el plásmido a 25 mL de caldo LB suplementado con antibióticos. Posteriormente se incubó los cultivos a 37 °C con agitación constante (200 rpm) durante una noche. Al siguiente día, se trasladó el cultivo a 500 mL de caldo LB suplementado con antibióticos y se incubó a 37 °C con agitación constante (200 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0,6 – 0,8.

La inducción de la proteína se inició con la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final 1 mM junto a la adición de tetraciclina a una concentración final de 10 ng/mL. Como último punto, los cultivos se incubaron a 22 °C durante 18 h. Finalmente, las células se colectaron por centrifugación a 5000 rpm y 4°C por 30 min. El pellet de células se resuspendieron en 12,5 mL de buffer Tris 50 mM, pH 8, 150 mM NaCl y se almacenaron a -80 °C hasta la purificación de la proteína.

### **2.2.4. Purificación de la enzima PETasa obtenida mediante reconstrucción**

#### **ancestral**

#### **2.2.4.1.Lisis celular**

La lisis celular se llevó a cabo mediante la adición de 10 μL de EDTA (0.5 M) acorde a la cantidad de mL de buffer de lisis (Tris 25 mM, pH 7.5, 150 mM NaCl y 20 mM Imidazol). La cantidad de buffer de lisis fue de 6mL por cada gramo de células. Posteriormente la solución final fue lisada en un sonicador marca MRC, con 10 ciclos de 10s de sonicación constante a una frecuencia del 40% y con pausas de 10s entre cada ciclo. La proteína en suspensión se separó de los restos celulares mediante centrifugación a 14000 rpm, a 4 °C durante 1 h. El sobrenadante se conservó para el proceso de purificación (**Dermitt & Mardakheh, 2021**).

#### **2.2.4.2. Purificación de la proteína**

La purificación de la enzima PETasa N1 se realizó de forma similar a lo descrito por **Austin et al. (2018)**. En síntesis, la proteína se purificó mediante cromatografía de afinidad, empleando una columna pre-empacada His trap, con un volumen de 1 mL acoplada a un sistema FPLC ÄKTA Start con un colector de fracciones. El sobrenadante lisado celular previamente preparado se cargó en la columna pre-empacada de Ni-NTA previamente equilibrada con 10 volúmenes de columna de buffer Tris 50 mM, pH 8, 150 mM NaCl (Buffer A) y 5 mM imidazol. Las proteínas no adheridas a la columna se lavaron con 10 volúmenes de columna de buffer A.

Posteriormente, la elución de la enzima se realizó mediante un gradiente de concentración 0 a 100% de buffer B, que consiste en 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 250 mM Imidazol. La enzima eluida se colectó en fracciones de 0.5 mL empleando tubos estériles. Todas las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE (**Dermitt & Mardakheh, 2021**). Finalmente, la cuantificación de la proteína se midió mediante el equipo NanoDrop 2000, donde se empleó el coeficiente de extinción molar inferido a partir de la secuencia del ancestro N1 obtenida a través del servidor Expasy.

#### **2.2.5. Pruebas de actividad sobre polímeros orgánicos**

Dado que en la gran parte de industrias de plásticos se usan diversos tipos de polímeros orgánicos, el presente proyecto de investigación midió la eficiencia de la actividad enzimática de la proteína purificada en polímeros seleccionados tales como el polietileno tereftalato (PET), polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC), polietileno de alta densidad (HDPE) y polietileno de baja densidad (LDPE). Cada polímero fue evaluado a través de microscopia electrónica de barrido (SEM). Las pruebas se realizaron en base a la metodología propuesta por **Austin et al., (2018)**, donde principalmente se usaron films de cada material, con un espesor de 150-200  $\mu\text{m}$  y 6 mm de diámetro tratado con la enzima ancestral y una solución buffer. Posteriormente cada film fue lavado con una solución SDS 1%, agua desionizada y alcohol. Finalmente, las muestras se recubrieron con iridio y se montaron en pins de aluminio para SEM y perfilometría. La colección de imágenes se realizó a 0.45 torr y con un detector de estado sólido-gaseoso (15 keV).

## CAPÍTULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Diseño de una enzima PETasa ancestral

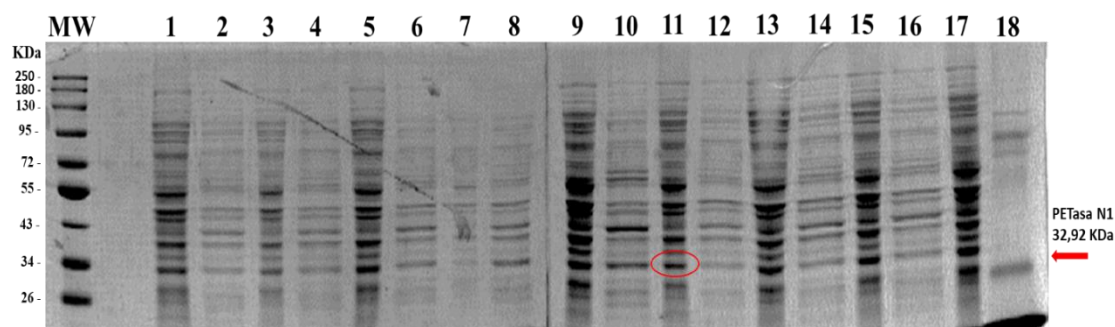
En base a la evaluación de varios métodos de reconstrucción ancestral realizados por parte de los investigadores Vinicio Armijos, PhD. y Yunierkis Pérez, PhD., se determinó la secuencia de la enzima PETasa N1 a partir de la proteína PETasa de *Ideonella sakaiensis*, la cual fue sintetizada en la compañía Gene Universal e insertada en el plásmido de expresión pET-28b.

El diseño mantiene un sistema de expresión inducible mediante la adición de IPTG, un gen de resistencia a kanamicina y se adicionó una cola de 6xHis en el extremo C-terminal de la secuencia del ancestro N1 (Tham, Song, Yusoff, & Tan, 2020).

#### 3.2. Ensayo de expresión de la enzima PETasa N1

Con el fin de conocer la expresión del gen de la enzima ancestral N1, se efectuó un ensayo de expresión, para determinar las condiciones óptimas de la enzima. La expresión se realizó a partir de una colonia obtenida de transformación bacteriana en *E. coli* TF2. En el ensayo de expresión se establecieron tres temperaturas de inducción (ambiente, 30 °C y 37 °C). En este ensayo además se utilizó diferentes concentraciones de Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG).

La inducción con IPTG, se realizó en concentraciones de 0.1 mM, 0.5mM y 1mM en intervalos de incubación de 2 horas para los tratamientos a 37 °C ; 4 horas para los tratamientos a 30°C y 16 horas para los tratamientos a temperatura ambiente (22°C aproximadamente). Los resultados obtenidos al transcurrir esos rangos de tiempo y temperatura, fueron analizados a través de una electroforesis desnaturante SDS-PAGE como se observa en la Figura 4.



**Figura 4. Ensayo de expresión de la enzima PETasa ancestral N1 en TF2.** 1) Sobrenadante, 0.1 mM IPTG, 37 °C; 2) Pellet, 0.1 mM IPTG, 37 °C; 3) Sobrenadante, 0.5 mM IPTG, 37 °C; 4) Pellet, 0.5 mM IPTG, 37 °C; 5) Sobrenadante, 1 mM IPTG, 37 °C; 6) Pellet 1 mM IPTG, 37 °C; 7) Sobrenadante 0.1 mM IPTG, Ambiente; 8) Pellet 0.1 mM IPTG, Ambiente; 9) Sobrenadante 0.5 mM IPTG, Ambiente; 10) Pellet 0.5 mM IPTG, Ambiente; 11) Sobrenadante 1 mM IPTG, Ambiente; 12) Pellet 1 mM IPTG, Ambiente; 13) Sobrenadante 0.1 mM IPTG, 30 °C; 14) Pellet 0.1 mM IPTG, 30 °C; 15) Sobrenadante 0.5 mM IPTG, 30 °C; 16) Pellet 0.5 mM IPTG, 30 °C; 17) Sobrenadante 1 mM IPTG, 30 °C; 18) Pellet 1 mM IPTG, 30 °C.

El gel de SDS-PAGE, indica la presencia de la enzima PETasa N1 en casi todos los carriles de cada tratamiento, el peso molecular calculado de la enzima es de 32,92 KDa. El tratamiento ubicado en el carril 11 perteneciente a la muestra del sobrenadante a una concentración de IPTG 1mM y a una temperatura ambiente, fue seleccionado para los ensayos posteriores, debido a que en estas condiciones la expresión de proteínas es mayor.

Este resultado es diferente a previos estudios de expresión de enzimas PETasa de tipo silvestre o mutantes, ya que investigaciones como la de **Cui et al. (2021)** y la de **Almeida, Rincón, Jackson, & Dobson (2019)**, sugieren que las concentraciones de IPTG adecuadas de expresión son producidas en rangos de 0.1mM y 0.5mM. Sin embargo se considera que la enzima N1 es completamente nueva en el campo científico y en base a estudios previos de reconstrucción ancestral de proteínas, se ha determinado que algunas de estas reconstrucciones no han pasado por procesos de evolución dirigida con características específicas (**Trudeau & Tawfik, 2019**).

Sin embargo, dichas características pueden ser añadidas a través de otros procesos que dan como resultado variantes especiales poseedoras de termoestabilidad, mejoramiento en su actividad, etc., (**Spence et al., 2021**). Según **Sternke, Tripp, & Barrick (2019)**, el uso de ASR combinado con procesos de Máxima verosimilitud (ML) puede ser superior al diseño racional de ASR, ya que puede mejorar la capacidad del proceso para incorporar una coevolución de aminoácidos y interacciones de epistasia en la reconstrucción (**Hendrikse, Charpentier, Nordling, & Syrén, 2018**). Por tanto, se puede inferir que las

reconstrucciones ancestrales requieren más recursos (mayor concentración de IPTG), para un correcto funcionamiento. Sin embargo, se podría asegurar que la enzima obtenida a partir de la reconstrucción ancestral se expresa de una forma adecuada.

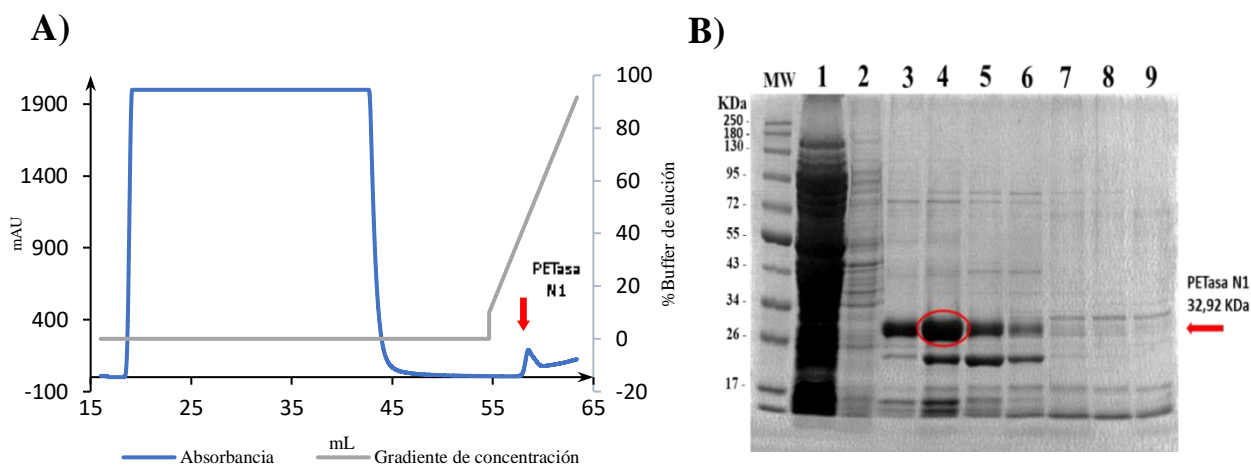
Dentro de la selección de parámetros ideales de expresión, la temperatura y el tiempo de incubación son un componente importante. Según **Heyde et al. (2021)**, las condiciones de inducción están ligadas a la temperatura, debido a que esta proporciona estabilidad a la proteína. **Safary, Moniri, Hamzeh-Mivehroud, & Dastmalchi (2019)**, comentan que la temperatura tiene un efecto en la solubilidad de las enzimas, puesto que si existe una baja temperatura en las condiciones de expresión, la muestra tiende a tener una reducción de las interacciones hidrofóbicas de los aminoácidos y a su vez puede provocar un aumento en la maquinaria de plegamiento que caracteriza a la expresión de la proteína (**Baker, 2019**).

Esto se puede ver evidenciado en los carriles 9 y 17 de la Figura 4, ya que muestran una sobreexpresión de la proteína a temperatura ambiente y 30 °C, a diferencia de los carriles con tratamientos expuestos a una temperatura más alta de 37 °C, que muestran la presencia de bandas con una intensidad débil a 32,92 kDa, lo cual podría verse relacionado con una baja expresión de la enzima. Sin embargo el carril 11, posee bandas de expresión. Según, **Puspitasari, Tsai, & Lee (2021)**, es recomendable dejar actuar al IPTG en un rango estimado de 16 horas de incubación para obtener resultados de expresión precisos, debido a que la temperatura mantiene una relación cercana a los principios del crecimiento celular, donde a mayor tiempo de incubación, mayor cantidad de proteína expresada.

### **3.3. Expresión y purificación de la enzima PETasa N1**

Las células que contenían a la enzima N1, producidas en las condiciones antes mencionadas, fueron cosechadas, lisadas, centrifugadas y purificadas en el equipo AKTA. En la Figura 5A, se observa el cromatograma de la purificación de la enzima PETasa ancestral N1, la cual presenta un pico elevado de absorbancia, que alcanzó un resultado de 162.83 mAu a un porcentaje de elución de 47 a 60%. En la purificación realizada con gradientes de elución, se obtuvieron 20 fracciones de enzima recolectada, sin embargo se tomaron 7 fracciones para ser analizadas por SDS Page (Figura 5B).





**Figura 5. Purificación de la enzima ancestral PETasa N1 obtenida a partir de la técnica de cromatografía de afinidad (FPLC).** **A)** Cromatograma obtenido a través de la purificación de la enzima PETasa N1 con gradiente de concentración, donde se muestra el pico de elución de la proteína de interés. **B)** Gel de electroforesis SDS (12%) de los resultados de la purificación de la enzima PETasa N1 en TF2 con gradiente de concentración. Los carriles de la electroforesis fueron cargados de la siguiente manera: **1)** Sobrenadante; **2)** Pellet; **3)** Fracción 8; **4)** Fracción 9; **5)** Fracción 10; **6)** Fracción 11; **7)** Fracción 13; **8)** Fracción 14; **9)** Fracción 15.

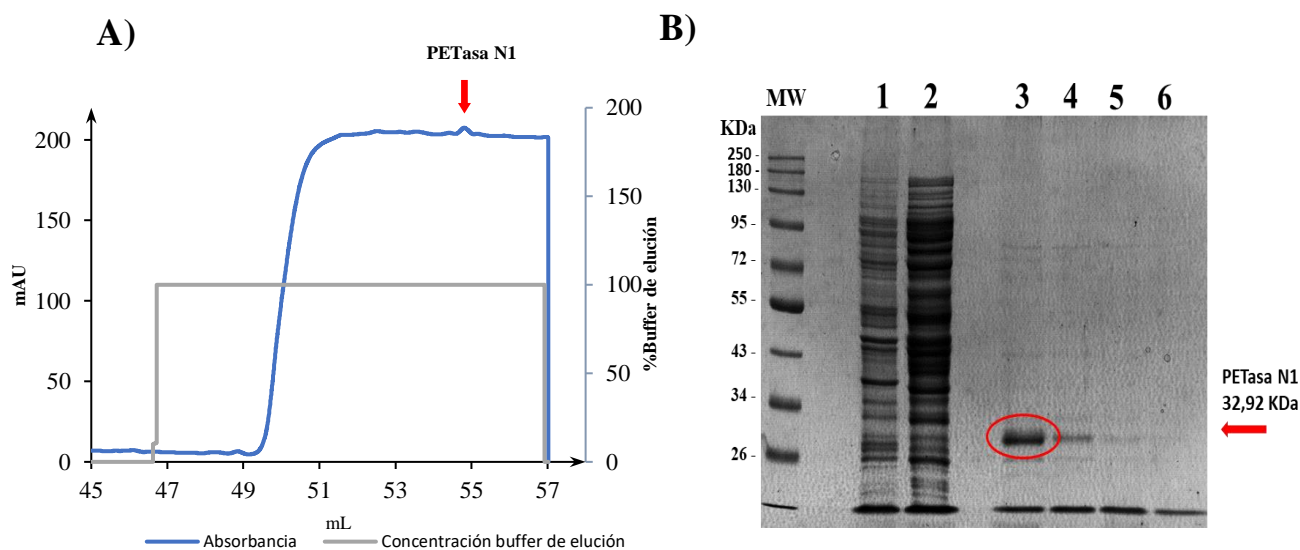
En la Figura 5B, se muestran los carriles 3, 4, 5 y 6 reflejan la presencia de la enzima ancestral PETasa N1 (32,92 KDa), mientras que en los carriles 7, 8 y 9 no existen las bandas que corresponden a la enzima. De la misma manera en los carriles 4, 5 y 6 existe la presencia de otras bandas diferentes a las correspondientes del peso molecular de la enzima N1, lo que pueden indicar la presencia de otras proteínas o que la proteína tuvo un proceso de degradación en la lisis celular o en la purificación.

Es importante mencionar, que la enzima ancestral PETasa N1, fue analizada en el servidor ExPASy ProtParam, con el cual se calculó indistintos parámetros fisicoquímicos de la proteína, a través de la interpretación de la secuencia obtenida en la reconstrucción ancestral (**Gasteiger et al., 2005**). De esta manera, se obtuvo una predicción cercana del peso molecular (Mw) de la enzima ancestral N1 representada en un valor de 32,92 kDa y el coeficiente de extinción de  $32430 M^{-1} cm^{-1}$ , parámetros necesarios para la determinación de la concentración de la proteína purificada en el equipo Nanodrop.

Además se utilizó un análisis de enfoques imparciales y reproducibles para extraer datos cuantificables de las imágenes obtenidas en la electroforesis SDS PAGE mediante el programa “ImageJ” (**Natale, Maresca, Abrescia, & Bucci, 2011**). El análisis de ImageJ, permitió la cuantificación del porcentaje de la concentración de la proteína de interés

basado en la intensidad de las bandas (Figura 5B); se determinó que el porcentaje de la enzima N1 presente en la fracción 9 es del 48%, el mismo que corresponde a 0,254 mg/ml.

En la Figura 5B se observa una posible proteólisis, por lo que se realizaron modificaciones en los parámetros para la purificación; se añadieron 19,26 ml de buffer de lisis, 192 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se agregó complementariamente el compuesto fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), que actúa como un inhibidor de proteasas. (Manavalan, Manavalan, Ramachandran, & Heese, 2020). La purificación de la proteína se realizó como se detalló anteriormente, a diferencia de que en este proceso no se efectuó el gradiente de elución, sino más bien se optó por una elución al 100% de buffer de elución (Figura 6).



**Figura 6. Purificación de la enzima ancestral PETasa N1 obtenida a partir de la técnica de cromatografía de afinidad (FPLC).** **A)** Cromatograma de purificación de la enzima PETasa N1 con una concentración de buffer de elución del 100%. **B)** Gel de electroforesis SDS (12%) de los resultados de la purificación de la enzima PETasa N1 en TF2 sin gradiente de concentración. Los carriles de la electroforesis fueron cargados de la siguiente manera: **1)** Pellet; **2)** Sobrenadante; **3)** Fracción 8; **4)** Fracción 9; **5)** Fracción 10; **6)** Fracción 11.

Según Puig et al. (2001), en lo que respecta a la purificación por afinidad, es recomendable aumentar las concentraciones de sal o agregar detergentes no iónicos que permitan solubilizar de mejor manera la proteína de interés; al no usar un gradiente de elución se evidencia que la enzima PETasa N1 obtenida es pura, ya que no existe ninguna banda adicional, lo que se puede atribuir al uso del PMSF, que es un inhibidor de

serinproteasas y al EDTA que es un inhibidor de las metaloproteasas; la interacción de ambos inhibidores permitió obtener una concentración de proteína purificada de 0,635 mg/ml.

Además, en la Figura 6A se detalla el cromatograma, en el que se observa un pico diferente a la anterior purificación, pero con un resultado de absorbancia un tanto superior de 206,42 mAU. Cabe mencionar que esta purificación generó alrededor de 20 fracciones, sin embargo, solo se seleccionaron 4 fracciones (8, 9, 10 y 11) para su posterior análisis en un gel de electroforesis SDS PAGE (Figura 6B).

### **3.4. Determinación de buffer para pruebas sobre polímeros orgánicos**

Se realizó un ensayo inicial con el fin de determinar el buffer con el que se trabajara posteriormente con la enzima N1. Esta prueba inicial se concibió solamente para films de plástico PET, debido a que la enzima es una PETasa ancestral, para conocer el comportamiento de la enzima N1 se utilizaron 3 soluciones buffer adicionales a los descritos en la metodología en el apartado 2.3. La elección de cada buffer fue en base a metodologías propuestas por otras investigaciones enfocadas en la actividad enzimática de enzimas PETasa.

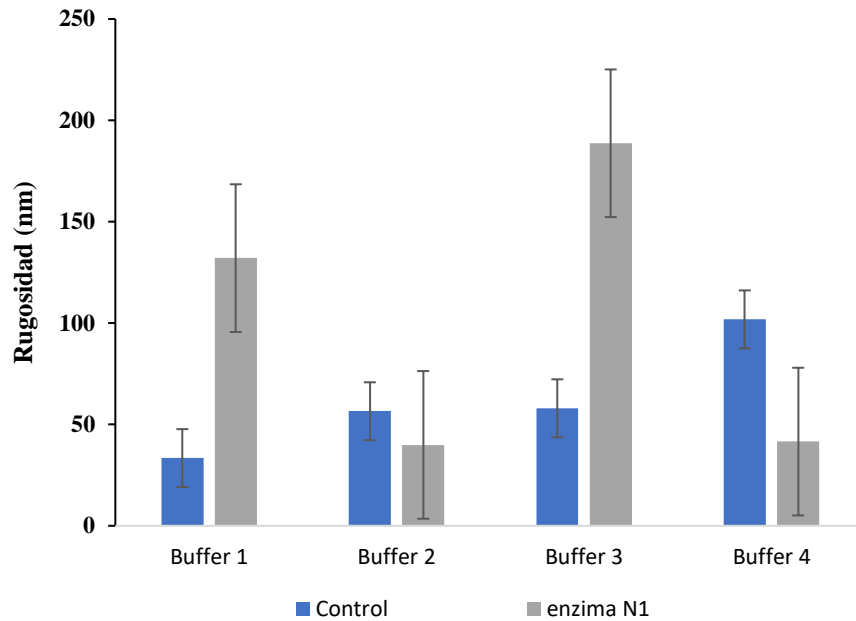
Se realizaron los ensayos con cada buffer, la enzima y el film de PET cada uno de estos tratamientos con una muestra control (Figura 7); cada film de plástico PET fue tratado con 1  $\mu$ M de enzima purificada junto al buffer seleccionado. La primera y segunda solución buffer fue de glicina-NaOH 50 mM pH 9.4 y 9 respectivamente (**Z. Chen et al., 2022**), (**Joo et al., 2018**); la tercera fue una solución buffer de fosfato 50 mM a pH 7,2 (**Austin et al., 2018**) y la última una solución buffer de glicerol al 20% (**Liu, Shi, Zhu, Wei, & Yin, 2019**).

La reacción enzimática se realizó a una temperatura de 30°C durante 72 horas; después los films fueron lavados y preparados para ser analizados en el perfilómetro de contacto en los laboratorios de biotecnología de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE). En la Figura 7, se observan los datos promedios de rugosidad de los films tratados y de los controles.

El tratamiento con solución buffer 1 y 3 posee altos valores de rugosidad medida en nm en comparación a sus controles, mientras que los resultados de las muestras con buffer 2 y 4, la rugosidad en las muestras es menor que en las muestras control. La diferencia en los promedios de rugosidad se debe a las alteraciones superficiales del film PET detectadas por el perfilómetro. Acorde a **Leksycki & Królczyk (2021)**, los perfilómetros permiten obtener análisis topográficos de cualquier superficie, a través de mediciones como: la rugosidad de la superficie, las alturas de los escalones de las muestras y la morfología de la superficie.

Este estudio preliminar se realizó, debido a que la microscopía electrónica de barrido (SEM), solo permite la evaluación visual de las propiedades de la superficie en dimensiones lineales, mientras que el perfilómetro permite una evaluación general de la rugosidad del área superficial (topografía), con datos visuales y numéricos (**Ekici, Aslantaş, Kanık, & Keleş, 2021**). Los datos de topografía son esenciales en evaluaciones de degradación de plásticos, ya que permiten observar cambios en características como la apariencia o topología de la superficie de polímeros tratados (**Amini & Khavandi, 2019**).

Algunos de los aspectos más notorios son la aparición de poros, grietas y cambios en el color o la cristalinidad que se manifiestan en irregularidades en la superficie (**Mohanan et al., 2020**). Por tanto, las irregularidades presentes en muestras de polímeros proporcionan una mayor rugosidad en mediciones de topografía. En la Figura 7, se puede comparar los datos de rugosidad y se sobresalen la rugosidad obtenida en las muestras con el buffer 1 y 3.



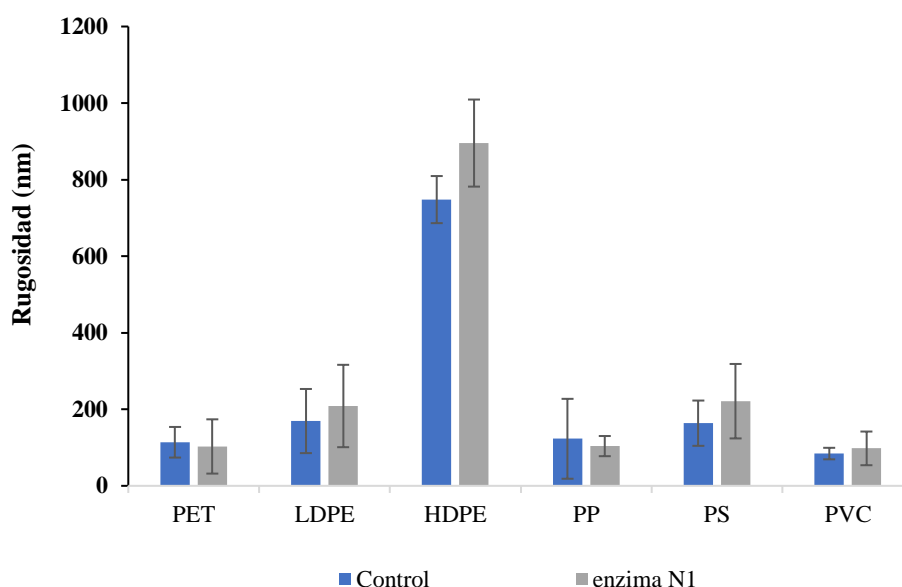
**Figura 7.** Análisis de diferentes soluciones buffer, expuestas a plástico PET en conjunto a la enzima N1 para la elección correcta de tratamiento.

Sin embargo, al comparar los resultados de los tratamientos con la solución buffer 2 y 4, se detectan una desviación de los datos, ya que las medidas se realizaron a partir de dos replicas en donde solo se tomó en cuenta un lado convexo y cóncavo. En ese contexto se pudo determinar que ambos lados presentaban resultados de medición con diferencias significativas de afección ya sea solo en el lado convexo y no en el cóncavo o viceversa.

Se evidenció que la interacción de cada buffer modificó la composición superficial del plástico PET y que en conjunto a un tratamiento con enzima N1, como fue el caso de los tratamientos 1 y 3, existieron resultados con mayores irregularidades que podrían estar ligados a procesos de biodegradación. Según los datos de rugosidad se seleccionó la solución buffer 3, como una buena alternativa para la enzima N1.

### 3.5. Rugosidad de los diferentes polímeros con la enzima N1

Una vez que se seleccionó el buffer para las reacciones enzimáticas, se realizaron ensayos sobre otros polímeros orgánicos como PET, LDPE, HDPE, PP, PS y PVC. Cada polímero fue tratado con 2  $\mu$ M de enzima N1 purificada con 300uL de solución buffer fosfato (pH 7,2) durante 72 horas a 30°C, terminada la reacción fueron lavados y analizados.



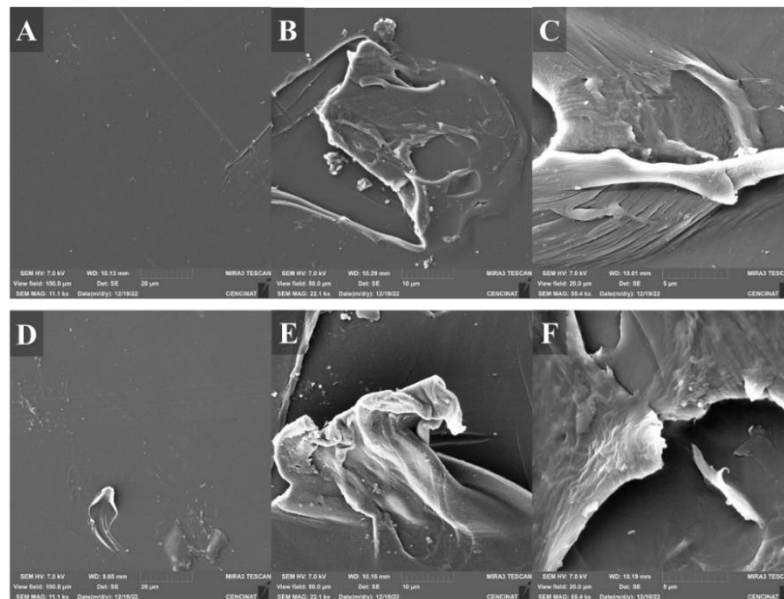
**Figura 8.** Rugosidad de los diferentes polímeros tratados con la enzima N1.

En la Figura 8, se observa que casi todos los tratamientos mantienen mínimas diferencia de irregularidades, la rugosidad de las muestras de PET y PP es casi similar a la de los controles. La rugosidad de los polímeros HDPE, LDPE, PS y PVC tratados con la enzima N1, tienen valores más altos que los controles, debiéndose tal vez a la acción de la enzima N1, que podría estar ligado a degradación de los polímeros.

### 3.6. Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

#### 3.6.1. Tereftalato de polietileno (PET)

En la Figura 9, se detalla el análisis por SEM del polímero PET, se hicieron imágenes a diferentes resoluciones (100, 50 y 20 micras) en el control y tratamiento, se observa que existen diferencias del tratamiento cuando son comparadas con el control, existen en la superficie cierto tipos de irregularidades, que se observan en PET tratado, además se presentan ligeros cambios en las imperfecciones propias del PET, estos cambios están ligados al desgaste del material. Según **Kim et al. (2020)**, al analizar por SEM muestras de PET tratados con enzima con actividad PETasa se observan imágenes de controles similares a los de la Figura 9B y Figura 9E.

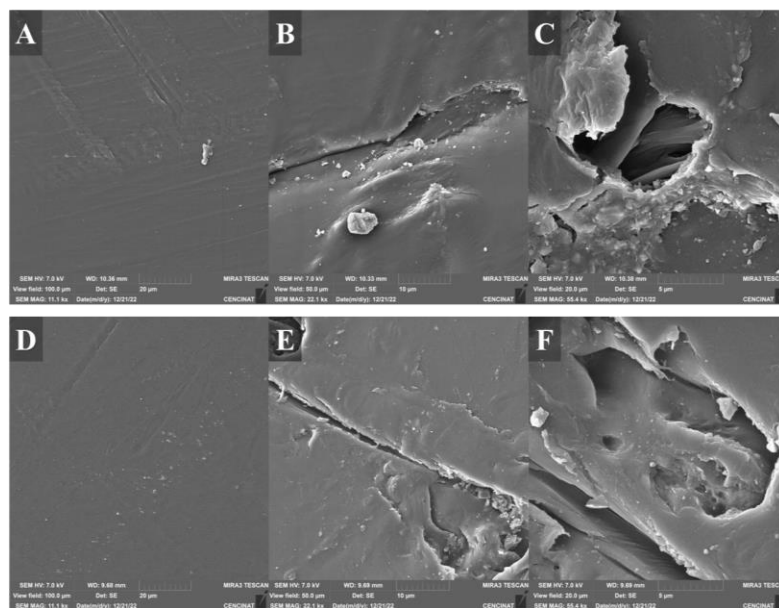


**Figura 9. Imágenes del polímero PET obtenidas mediante la técnica SEM. A)** Control del film PET a 100  $\mu\text{m}$ ; **B)** Control del film PET a 50  $\mu\text{m}$ ; **C)** Control del film PET a 20  $\mu\text{m}$ ; **D)** Film de PET tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; **E)** Film de PET tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y **F)** Film de PET tratado con la enzima N1 a 20  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 9 se observan un tipo de porosidades en las muestras tratadas, lo cual puede estar relacionado con la actividad enzimática de N1. Considerando que los estudios enfocados en evaluación de degradación de plástico PET casi siempre reflejan cambios en las superficies de las muestras a través de porosidades o grietas que ejemplifican la actividad de la enzima (**Benavides Fernández et al., 2022**).

### 3.6.2. Polipropileno (PP)

Las imágenes obtenidas del polímero PP en SEM (Figura 10), mostró que la enzima N1 tiene cierta actividad de degradación, ya que se tiene un cambio superficial y ciertos cambios en los bordes. Se tienen signos de desgaste en todos los aumentos observados. En la Figura 10B y 10E, se observa que el control no posee algunas grietas que están presentes en la muestra tratada, además el plástico tiene signos de desgaste en los bordes, estos síntomas están relacionados directamente a la acción de la enzima sobre este polímero. **Fernández-González et al. (2021)**, menciona que el material del PP generalmente posee una alta rugosidad debido a los procedimientos de fabricación y que tiende a aumentar gradualmente con la intemperie.



**Figura 10. Imágenes del polímero PP obtenidas mediante la técnica SEM. A)** Control del film PP a 100  $\mu\text{m}$ ; **B)** Control del film PP a 50  $\mu\text{m}$ ; **C)** Control del film PP a 20  $\mu\text{m}$ ; **D)** Film de PP tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; **E)** Film de PP tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y **F)** Film de PP tratado con la enzima N1 a 20  $\mu\text{m}$ .

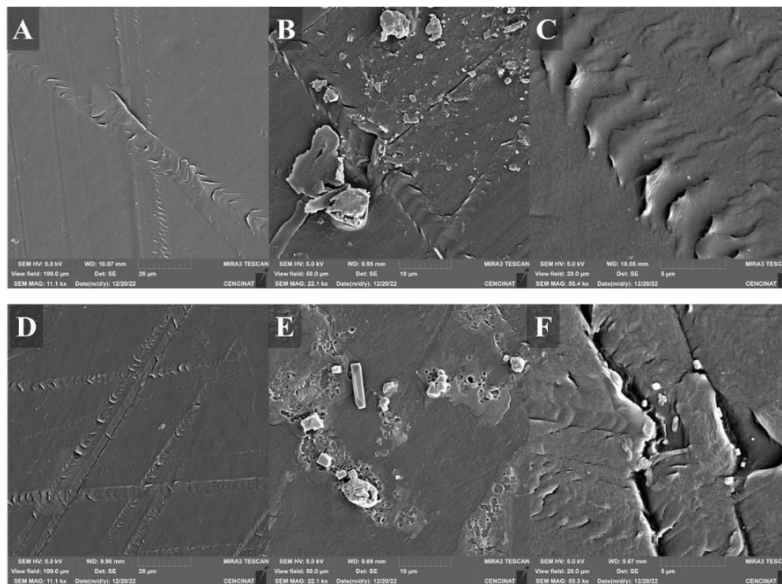
En la industria, el proceso de polimerización de PP cuenta con varias limitaciones en la obtención de un material resistente y en ocasiones se modifica la composición primaria con otros agregados, para mejorar su estabilidad (**Fu et al., 2019**). El material utilizado en la presente investigación probablemente proviene de un proceso de polimerización que no ha pasado por modificaciones que mejoren su estabilidad, lo que implica que su composición sea frágil y se vea afectada al estar expuesta a condiciones de pH presentes en el buffer de tratamiento.



Acorde a **Ibrahim et al. (2021)**, el pH, la temperatura, la humedad y el oxígeno son factores suficientes para ayudar en la degradación de polímeros. Se podría deducir de esa manera que las condiciones de tratamiento con buffer pH 7,2 ayudo potencialmente en la incrementación de rugosidad y formación de leves brechas en la superficie del polímero.

### 3.6.3. Polietileno de baja densidad (LDPE)

Según **Dey, Bose, Mohapatra, & Sar (2020)**, actualmente existe una gran variedad de estudios enfocados en la biodegradación de LDPE mediante enzimas. Cepas como: *Bacillus* y *Pseudomonas* son capaces de degradar superficies plásticas del polímero LDPE con mucho éxito (**Maity et al., 2021**). En lo que concierne a investigaciones de degradación por enzimas PETasa, no hay mucha información que represente resultados significativos. Sin embargo, al comparar las imágenes obtenidas en SEM (Figura 11), con resultados en el que se aplicaron enzimas degradadoras de otros organismos, se evidenció rasgos altamente similares.

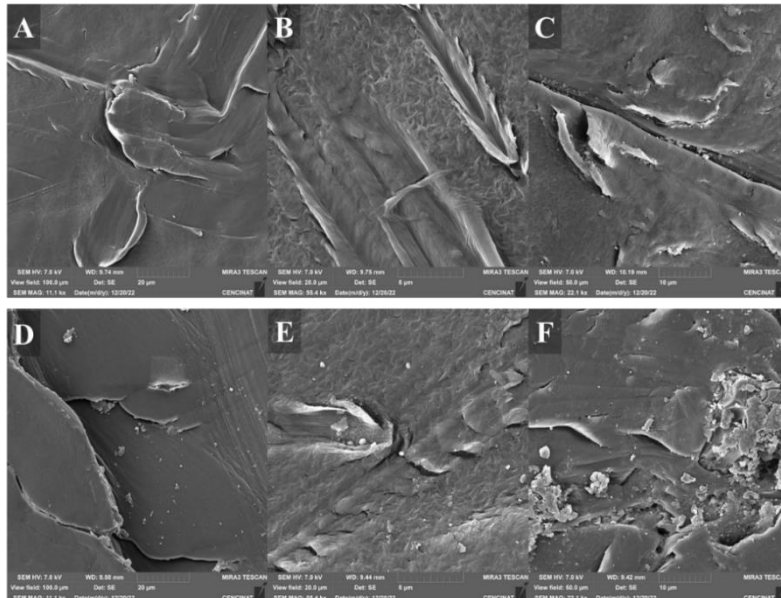


**Figura 11. Imágenes del polímero LDPE obtenidas mediante la técnica SEM. A)** Control del film LDPE a 100  $\mu\text{m}$ ; **B)** Control del film LDPE a 50  $\mu\text{m}$ ; **C)** Control del film LDPE a 20  $\mu\text{m}$ ; **D)** Film de LDPE tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; **E)** Film de LDPE tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y **F)** Film de LDPE tratado con la enzima N1 20  $\mu\text{m}$ .

En la Figura 11D, se puede observar que la composición superficial del polímero adquiere unas líneas más escamosas de orden aleatorio similares a los resultados reportados en un estudio de biodegradación bacteriana marina sobre LDPE (Khandare, Chaudhary, & Jha, 2021b). De la misma manera en el estudio de El-Sayed, Rabie, & Hamed (2021), respecto a un tratamiento de diferentes organismos combinados en la biodegradación de LDPE, se reportaron resultados con porosidades semejantes a las observadas en la Figura 11E.

### 3.6.4. Polietileno de alta densidad (HDPE)

Al igual que el polímero LDPE, la biodegradación por enzimas en HDPE ha sido ampliamente estudiada a través de enzimas microbianas como proteasas, lipasas, cutinasas, lacasas, peroxidasas de manganeso, lignina peroxidasas, alcano hidroxilasas, etc. (Othman et al., 2021). Sin embargo, la mayoría se enfoca en la biodegradación de polímeros pretratados y lastimosamente no hay mucha información sobre polímeros no pretratados (Danso, Chow, & Streita, 2019). Al analizar las imágenes obtenidas en SEM del polímero HDPE con la enzima N1 y su respectivo control (Figura 12), se observaron diferencias significativas.



**Figura 12.** Imágenes del polímero HDPE obtenidas mediante la técnica SEM. A) Control de film HDPE a 100  $\mu\text{m}$ ; B) Control de film HDPE a 50  $\mu\text{m}$ ; C) Control de film HDPE a 20  $\mu\text{m}$ ; D) Film de HDPE tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; E) Film de HDPE tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y F) Film de HDPE tratado con la enzima N1 a 20  $\mu\text{m}$ .

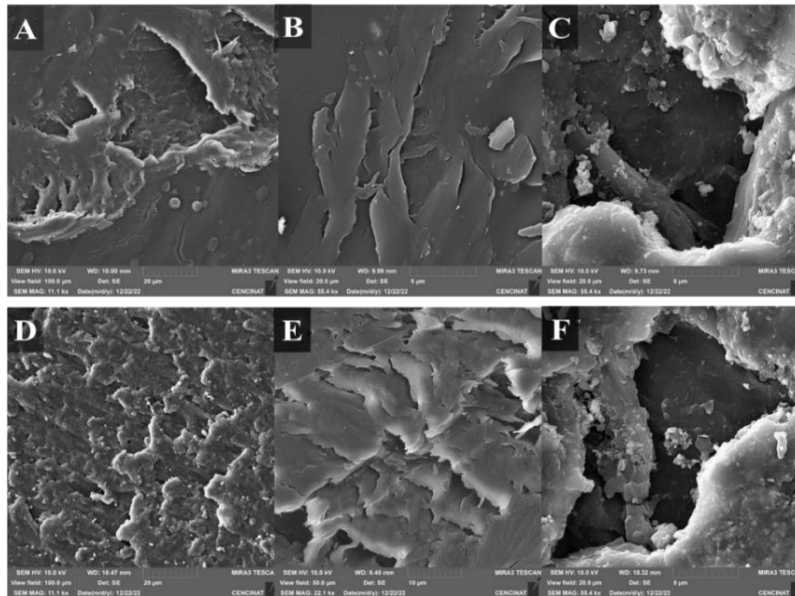
La enzima del tipo lacasa, ha reportado varios estudios asociados a la biodegradación de HDPE y sus resultados más favorables están ligados a una despolimerización mediante una oxidación de la región amorfa de HDPE que expone una región carbonilo de fácil acceso dentro de la cadena del polímero (**Ghatge et al., 2020**).

La biodegradación de la enzima lacasa en films de HDPE, se ha visto expuesta en la formación de daños físicos como hendiduras y grietas en la superficie del polímero después de un tiempo prolongado de incubación (**Kang, Kim, Song, & Lee, 2019**). Los resultados expuestos en la Figura 12D exponen rasgos de agrietamiento y hendiduras similares a los producidos por la actividad de la enzima lacasa.

Adicionalmente, al comparar los resultados de la Figura 12 con las imágenes SEM de un estudio de biodegradación de bolsas de plástico en donde se reportó la formación de hoyos y cavidades en la superficie de un film de HDPE (**Mohanrasu et al., 2018**), se detectaron aberturas y ondulaciones altamente semejantes a los de la Figura 12D y 12F; este resultado podría sugerir que la enzima PETasa ancestral N1 presenta actividad de degradación sobre el polímero HDPE.

### **3.6.5. Poliestireno (PS)**

En la Figura 13, las imágenes del tratamiento tienen mínimas diferencias a las imágenes del control. La Figura 13A expone una superficie con pocas aberturas y desplegamientos leves, mientras que en la Figura 13D (tratamiento), se observa una superficie escamosa con más rugosidad. Se puede ver que la superficie escamosa de la Figura 13E, mantiene bordes similares a rupturas o desgastes, mientras que los desplegamientos de la Figura 13B son superficiales. Por otro lado, las imágenes observadas a una magnificación de 20  $\mu\text{m}$  del control y el tratamiento mantienen una composición casi similar.



**Figura 13. Imágenes del polímero PS obtenidas mediante la técnica SEM. A) Control de film PS a 100  $\mu\text{m}$ ; B) Control de film PS a 50  $\mu\text{m}$ ; C) Control de film PS a 20  $\mu\text{m}$ ; D) Film de PS tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; E) Film de PS tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y F) Film de PS tratado con la enzima N1 a 20  $\mu\text{m}$ .**

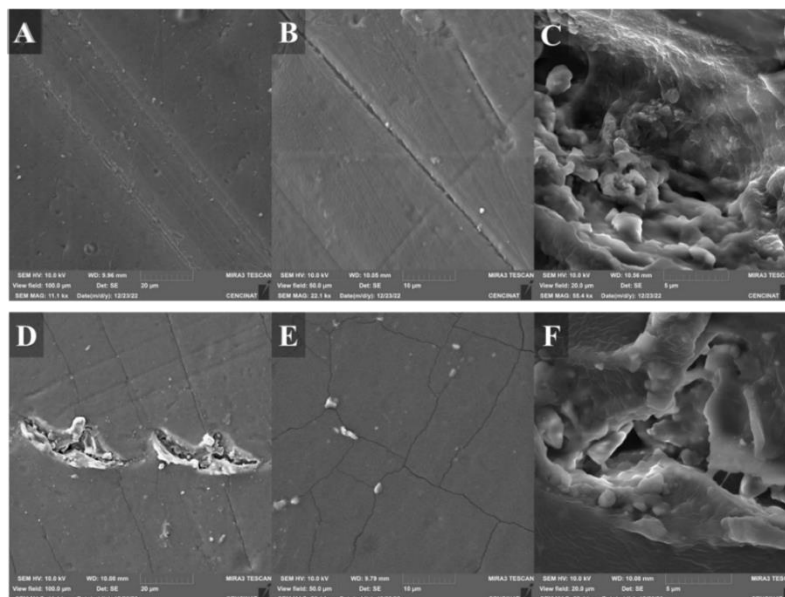
Acorde a **Fernández-González et al. (2021)**, los rasgos más representativos de degradación de PS, están relacionados con efectos agresivos en la superficie del polímero expresados en forma de erosiones, numerosos agujeros, grietas, fracturas, escamas con formaciones cristalinas y una composición envejecida. Al comparar dichas características con las irregularidades presentes en la Figura 13, se puede observar que el tratamiento con enzima N1 solo provocó en su composición unas pocas formaciones escamosas.

Además, la composición del polímero en el control (Figura 13A, 13B y 13C), también presentan algunas irregularidades y esto podría verse explicado por procesos de polimerización del material, debido a que este polímero se utiliza principalmente en la fabricación de productos de un solo uso y cuando es sometido a radiación ultravioleta (UV) en presencia de aire, sufre una rápida fragilización gradual (**Santhoskumar & Chitra, 2019**).

Dado que los films de PS provinieron de una cuchara plástica (Anexo 1), se podría inferir que el material en algún momento de su vida útil pasó por exposiciones de luz UV que probablemente afectó a la superficie de su composición y a su vez a su rugosidad. Por tanto, las diferencias entre el control y el tratamiento son relativamente diferentes y podría interpretarse como una baja actividad de la enzima ancestral N1.

### 3.6.6. Cloruro de polivinilo (PVC)

En la Figura 14 no se observan grandes rasgos de porosidades, rupturas o desplegamientos superficiales a diferencia de los anteriores polímeros. Sin embargo, en la Figura 14D se puede ver la presencia de dos hoyos similares a una cortadura, mientras que en la Figura 14E existe la presencia de grietas delgadas que no están presentes en el control (Figura 14B).



**Figura 14.** Imágenes del polímero PS obtenidas mediante la técnica SEM. **A)** Control de PVC a 100  $\mu\text{m}$ ; **B)** Control de PVC a 50  $\mu\text{m}$ ; **C)** Control de PVC a 20  $\mu\text{m}$ ; **D)** Film de PVC tratado con la enzima N1 a 100  $\mu\text{m}$ ; **E)** Film de PVC tratado con la enzima N1 a 50  $\mu\text{m}$  y **F)** Film de PVC tratado con la enzima N1 a 20  $\mu\text{m}$ .

En base a varios estudios de biodegradación de PVC, se han reportado resultados en los que la morfología/topografía de la superficie de las muestras tratadas con organismos o enzimas presentan rasgos de degradación a través de características como: la erosión superficial, grietas, hoyos y surcos (Khandare, Chaudhary, & Jha, 2021a). Por otro lado, el fundamento de degradación del PVC determina que el polímero se descompone en cloruro de hidrógeno a altas temperaturas y forma polienos conjugados característicos del deterioro de las propiedades del material polimérico representado generalmente en decoloraciones del polímero (Korkusuz & Tüzüm Demir, 2020).

En el caso de la Figura 14 se puede observar que el patrón básico de degradación en la Figura 14D y 14E (hoyos y leves grietas) del tratamiento con enzima N1 se mantiene, pero no de una forma muy drástica. El film de PVC con el tratamiento no experimentó ningún tipo de cambio en el color de su material, por lo cual, se puede intuir que la enzima ancestral N1 tiene poca actividad de degradación frente al polímero PVC.

Esto puede verse corroborado con una comparación con los resultados de degradación de las investigaciones de **(Vivi, Martins-Franchetti, & Attili-Angelis, 2019)**, y **(Khatoon, Jamal, & Ali, 2018)**, en donde las imágenes reportadas con tratamientos de biodegradación mostraron rasgos de degradación sumamente notorios mezclados con características de envejecimiento, erosión y cambios de color en las muestras.

Como referencia final se debe comentar el hecho de que en casi todos los polímeros se observó una formación de cristales en la superficie, especialmente en las imágenes de HDPE y LDPE, esto podría deberse a una concentración de sales residuales de la solución fosfato utilizada en el tratamiento. Sin embargo, se considera la posibilidad de disrupción de microplásticos. Según **(Sang, Wallis, Hill, & Britovsek, 2020)**, la degradación no uniforme de los polímeros es una de las principales preocupaciones de su aplicación a gran escala, debido a que la mala rotura del material podría provocar la generación de microplásticos.

## CAPÍTULO IV

### 4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

1. En el presente estudio se logró aislar una enzima PETasa N1 obtenida a partir de una reconstrucción ancestral basada en una compilación de secuencias de enzimas homólogas a la enzima PETasa de *I. sakaiensis*.
2. A través de un ensayo de expresión, se determinaron las condiciones óptimas de expresión de la enzima, las cuales fueron: 1mM de IPTG a temperatura ambiente durante 16 horas. Adicionalmente, se realizó la purificación de la enzima N1, en donde se evidenció la necesidad de añadir inhibidores de proteasas como EDTA (0.5M) y PMSF (1mM) para prevenir la digestión de la enzima en procesos de lisis celular o purificación.
3. Se evaluó la actividad de la enzima ancestral N1 en seis polímeros de alto valor comercial y se evidenció rasgos de actividad de degradación en los polímeros PET, LDPE, PS, y PP, mientras que en los polímeros HDPE y PVC los perfiles de degradación de la enzima N1 no fueron conclusivos.

### **3.2.Recomendaciones**

1. Se recomienda realizar análisis adicionales para caracterizar de mejor manera la actividad degradadora de la enzima ancestral N1 sobre los diferentes plásticos analizados, mediante técnicas como: difracción de rayos X; variaciones en la masa y el peso del polímero; cambios en los espectros de absorción atómica de los polímeros; detección de la aparición y desaparición de grupos funcionales por espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR), etc.
2. Caracterizar el perfil enzimático de la enzima a través de otras condiciones de tratamiento, especialmente en las que se prueben rangos de temperaturas superiores, que permitan inferir si la enzima N1 tiene mayor actividad a mayor temperatura.



## MATERIAL DE REFERENCIA

- Aadland, K., Pugh, C., & Kolaczkowski, B. (2019). High-Throughput Reconstruction of Ancestral Protein Sequence, Structure, and Molecular Function. *Methods in Molecular Biology*, 1851, 135–170. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8736-8\\_8/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8736-8_8/COVER)
- Agilent Technologies. (2015). *QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit User Manual*. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2014.03.434>
- Ahmad, N., Abnisa, F., & Daud, W. M. A. W. (2016). Potential use of natural rubber to produce liquid fuels using hydrous pyrolysis – a review. *RSC Advances*, 6(73), 68906–68921. <https://doi.org/10.1039/C6RA09085K>
- Almeida, E. L., Rincón, A. F. C., Jackson, S. A., & Dobson, A. D. W. (2019). In silico Screening and Heterologous Expression of a Polyethylene Terephthalate Hydrolase (PETase)-Like Enzyme (SM14est) With Polycaprolactone (PCL)-Degrading Activity, From the Marine Sponge-Derived Strain *Streptomyces* sp. SM14. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2187. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.02187/BIBTEX>
- Amini, M., & Khavandi, A. (2019). Degradation of polymer-based composites in corrosive media: experimental attempts towards underlying mechanisms. *Mechanics of Time-Dependent Materials*, 23(2), 153–172. <https://doi.org/10.1007/S11043-018-09408-7/TABLES/7>
- Arenas, M., Weber, C. C., Liberles, D. A., & Bastolla, U. (2017). ProtASR: An Evolutionary Framework for Ancestral Protein Reconstruction with Selection on Folding Stability. *Systematic Biology*, 66(6), 1054–1064. <https://doi.org/10.1093/SYSBIO/SYW121>
- Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, F. L., Silveira, R. L., ... Beckham, G. T. (2018). Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), E4350–E4357. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1718804115>
- Baker, D. (2019). What has de novo protein design taught us about protein folding and

- biophysics? *Protein Science*, 28(4), 678–683. <https://doi.org/10.1002/PRO.3588>
- Benavides Fernández, C. D., Guzmán Castillo, M. P., Quijano Pérez, S. A., & Carvajal Rodríguez, L. V. (2022). Microbial degradation of polyethylene terephthalate: a systematic review. *SN Applied Sciences*, 4(10), 1–13. <https://doi.org/10.1007/S42452-022-05143-4/FIGURES/2>
- Bharathi, D., & Rajalakshmi, G. (2019). Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 22, 101368. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.101368>
- Bomhard, M.-E. von. (2019). Qualitative analysis of reducing packaging consumption through reusable systems for takeaway containers (Wien). <https://doi.org/10.34726/HSS.2019.62904>
- Briassoulis, D., Pikasi, A., & Hiskakis, M. (2021). Recirculation potential of post-consumer /industrial bio-based plastics through mechanical recycling - Techno-economic sustainability criteria and indicators. *Polymer Degradation and Stability*, 183, 109217. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2020.109217>
- Bronchud Molina, V. (2021). *Production of carbon fiber and polypropylene tapes transformed by heat compression moulding*. Retrieved from <https://upcommons.upc.edu/handle/2117/346115>
- Byrne, E., Schaerer, L. G., Kulas, D. G., Ankathi, S. K., Putman, L. I., Codere, K. R., ... Techtmann, S. M. (2022). Pyrolysis-Aided Microbial Biodegradation of High-Density Polyethylene Plastic by Environmental Inocula Enrichment Cultures. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 10(6), 2022–2033. [https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C05318/ASSET/IMAGES/LARGE/SC1C05318\\_0009.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C05318/ASSET/IMAGES/LARGE/SC1C05318_0009.JPEG)
- Cerda-Mejía, L. (2016). *Enzimas modificadoras de la pared celular vegetal. Celulasas de interés biotecnológico papelerero*. Universitat de Barcelona, Barcelona.
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., ... Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. [https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06635/ASSET/IMAGES/LARGE/SC9B06635\\_0009.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.9B06635/ASSET/IMAGES/LARGE/SC9B06635_0009.JPEG)

- Chaudhary, A. K., & Vijayakumar, R. P. (2020). Studies on biological degradation of polystyrene by pure fungal cultures. *Environment, Development and Sustainability*, 22(5), 4495–4508. <https://doi.org/10.1007/S10668-019-00394-5/TABLES/5>
- Chauhan, V., Kärki, T., & Varis, J. (2019). Review of natural fiber-reinforced engineering plastic composites, their applications in the transportation sector and processing techniques. *https://Doi.Org/10.1177/0892705719889095*, 35(8), 1169–1209. <https://doi.org/10.1177/0892705719889095>
- Chen, C., Han, X., Ko, T. P., Liu, W., & Guo, R. T. (2018). Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, 285(20), 3717–3723. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14612>
- Chen, K., & Arnold, F. H. (2020). Engineering new catalytic activities in enzymes. *Nature Catalysis* 2020 3:3, 3(3), 203–213. <https://doi.org/10.1038/s41929-019-0385-5>
- Chen, Y., Zhang, S., Han, X., Zhang, X., Yi, M., Yang, S., ... Liu, W. (2018). Catalytic Dechlorination and Charring Reaction of Polyvinyl Chloride by CuAl Layered Double Hydroxide. *Energy and Fuels*, 32(2), 2407–2413. <https://doi.org/10.1021/ACS.ENERGYFUELS.7B03271>
- Chen, Z., Duan, R., Xiao, Y., Wei, Y., Zhang, H., Sun, X., ... Wang, Z. (2022). Biodegradation of highly crystallized poly(ethylene terephthalate) through cell surface codisplay of bacterial PETase and hydrophobin. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34908-z>
- Cohen, S. N., Chang, A. C., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(8), 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/PNAS.69.8.2110>
- Cui, L., Qiu, Y., Liang, Y., Du, C., Dong, W., Cheng, C., & He, B. (2021). Excretory expression of IsPETase in *E. coli* by an enhancer of signal peptides and enhanced PET hydrolysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, 188, 568–575. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.08.012>
- Danso, D., Chow, J., & Streita, W. R. (2019). Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(19). <https://doi.org/10.1128/AEM.01095->

- Dermit, M., & Mardakheh, F. (2021). Purification and quantitative proteomic analysis of cell bodies and protrusions. *STAR Protocols*, 2(2).
- Dey, A. S., Bose, H., Mohapatra, B., & Sar, P. (2020). Biodegradation of Unpretreated Low-Density Polyethylene (LDPE) by *Stenotrophomonas* sp. and *Achromobacter* sp., Isolated From Waste Dumpsite and Drilling Fluid. *Frontiers in Microbiology*, 11, 3095. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.603210/BIBTEX>
- Duque, J. V. F., Martins, M. F., Debenest, G., & Orlando, M. T. D. A. (2020). The influence of the recycling stress history on LDPE waste pyrolysis. *Polymer Testing*, 86, 106460. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMERTESTING.2020.106460>
- Edmondson, S., & Gilbert, M. (2017). The Chemical Nature of Plastics Polymerization. *Brydson's Plastics Materials: Eighth Edition*, 19–37. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35824-8.00002-5>
- Ekici, Ö., Aslantaş, K., Kanık, Ö., & Keleş, A. (2021). Evaluation of surface roughness after root resection: An optical profilometer study. *Microscopy Research and Technique*, 84(4), 828–836. <https://doi.org/10.1002/JEMT.23714>
- El-Rafey, E., Walid, W. M., Syala, E., Ezzat, A. A., & Ali, S. F. A. (2022). A study on the physical, mechanical, thermal properties and soil biodegradation of HDPE blended with PBS/HDPE-g-MA. *Polymer Bulletin*, 79(4), 2383–2409. <https://doi.org/10.1007/S00289-021-03623-Y/FIGURES/6>
- El-Sayed, M. T., Rabie, G. H., & Hamed, E. A. (2021). Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*. *Environment, Development and Sustainability*, 23(10), 14556–14584. <https://doi.org/10.1007/S10668-021-01258-7/FIGURES/13>
- Evode, N., Qamar, S. A., Bilal, M., Barceló, D., & Iqbal, H. M. N. (2021). Plastic waste and its management strategies for environmental sustainability. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 4. <https://doi.org/10.1016/J.CSCEE.2021.100142>
- Fernández-González, V., Andrade-Garda, J. M., López-Mahía, P., & Muniategui-Lorenzo, S. (2021). Impact of weathering on the chemical identification of

- microplastics from usual packaging polymers in the marine environment. *Analytica Chimica Acta*, *1142*, 179–188. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2020.11.002>
- Foley, G., Mora, A., Ross, C. M., Bottoms, S.,... Bodé Nid, M. (2022). Engineering indel and substitution variants of diverse and ancient enzymes using Graphical Representation of Ancestral Sequence Predictions (GRASP). *PLOS Computational Biology*, *18*(10), e1010633. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1010633>
- Fu, X., Liu, X., Zhang, C., Liu, H., Hu, Y., & Zhang, X. (2019). Synthesis of Propylene-co-Styrenic Monomer Copolymers via Arylation of Chlorinated PP and Their Compatibilization for PP/PS Blend. *Polymers* *2019*, Vol. *11*, Page *157*, *11*(1), 157. <https://doi.org/10.3390/POLYM11010157>
- 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>
- Furukawa, R., Toma, W., Yamazaki, K., & Akanuma, S. (2020). Ancestral sequence reconstruction produces thermally stable enzymes with mesophilic enzyme-like catalytic properties. *Scientific Reports* *2020* *10:1*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72418-4>
- Gao, H., Sun, Y., Wang, M., Wu, B., Han, G., Jin, L., ... Xia, Y. (2021). Self-healable and reprocessable acrylate-based elastomers with exchangeable disulfide crosslinks by thiol-ene click chemistry. *Polymer*, *212*, 123132. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMER.2020.123132>
- Garcia, A. K., & Kaçar, B. (2019). How to resurrect ancestral proteins as proxies for ancient biogeochemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, *140*, 260–269. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.03.033>
- García, G. P. (2020). ¿Qué tipos de interacción entre dos especies existen? *Restauración de Ecosistemas*, *4*. Retrieved from <https://laprestampa.com/el-proceso-grafico/materiales-productos-y-soportes/tipos-de-plastico-usos-y-aplicaciones/>
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. *The Proteomics Protocols Handbook*, 571–607. <https://doi.org/10.1385/1-59259-29>

- Geyer, R., Jambeck, J. R., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). [https://doi.org/10.1126/SCIADV.1700782/SUPPL\\_FILE/1700782\\_SM.PDF](https://doi.org/10.1126/SCIADV.1700782/SUPPL_FILE/1700782_SM.PDF)
- Ghatge, S., Yang, Y., Ahn, J. H., & Hur, H. G. (2020). Biodegradation of polyethylene: a brief review. *Applied Biological Chemistry* 2020 63:1, 63(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13765-020-00511-3>
- Gomez-Fernandez, B. J., Risso, V. A., Rueda, A., Sanchez-Ruiz, J. M., & Alcalde, M. (2020). Ancestral resurrection and directed evolution of fungal mesozoic laccases. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(14). [https://doi.org/10.1128/AEM.00778-20/SUPPL\\_FILE/AEM.00778-20-S0001.PDF](https://doi.org/10.1128/AEM.00778-20/SUPPL_FILE/AEM.00778-20-S0001.PDF)
- Habib, S., Iruthayam, A., Shukor, M. Y. A., Alias, S. A., Smykla, J., & Yasid, N. A. (2020). Biodeterioration of Untreated Polypropylene Microplastic Particles by Antarctic Bacteria. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 2616, 12(11), 2616. <https://doi.org/10.3390/POLYM12112616>
- Harris, K. L., Thomson, R. E. S., Gumulya, Y., Foley, G., Carrera-Pacheco, S. E., Syed, P., ... Gillam, E. M. J. (2022). Ancestral Sequence Reconstruction of a Cytochrome P450 Family Involved in Chemical Defense Reveals the Functional Evolution of a Promiscuous, Xenobiotic-Metabolizing Enzyme in Vertebrates. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6). <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAC116>
- Hendrikse, N. M., Charpentier, G., Nordling, E., & Syrén, P. O. (2018). Ancestral diterpene cyclases show increased thermostability and substrate acceptance. *The FEBS Journal*, 285(24), 4660–4673. <https://doi.org/10.1111/FEBS.14686>
- Heyde, S. A. H., Arnlung Bååth, J., Westh, P., Nørholm, M. H. H., & Jensen, K. (2021). Surface display as a functional screening platform for detecting enzymes active on PET. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12934-021-01582-7/FIGURES/4>
- Hiraga, K., Taniguchi, I., Yoshida, S., Kimura, Y., & Oda, K. (2019). Biodegradation of waste PET. *EMBO Reports*, 20(11). <https://doi.org/10.15252/EMBR.201949365>
- Ibrahim, N. I., Shahar, F. S., Hameed Sultan, M. T., Md Shah, A. U., Azrie Safri, S. N.,

- & Mat Yazik, M. H. (2021). Overview of Bioplastic Introduction and Its Applications in Product Packaging. *Coatings 2021*, Vol. 11, Page 1423, 11(11), 1423. <https://doi.org/10.3390/COATINGS11111423>
- Ignatyev, I. A., Thielemans, W., & Vander Beke, B. (2014). Recycling of Polymers: A Review. *ChemSusChem*, 7(6), 1579–1593. <https://doi.org/10.1002/CSSC.201300898>
- Ishikawa, S. A., Zhukova, A., Iwasaki, W., Gascuel, O., & Pupko, T. (2019). A Fast Likelihood Method to Reconstruct and Visualize Ancestral Scenarios. *Molecular Biology and Evolution*, 36(9), 2069–2085. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSZ131>
- Jain, D., Bhadauria, S. S., & Kushwah, S. S. (2022). An experimental study of utilization of plastic waste for manufacturing of composite construction material. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/S13762-022-04447-7/FIGURES/7>
- Jeon, J. M., Park, S. J., Choi, T. R., Park, J. H., Yang, Y. H., & Yoon, J. J. (2021). Biodegradation of polyethylene and polypropylene by *Lysinibacillus* species JJY0216 isolated from soil grove. *Polymer Degradation and Stability*, 191, 109662. <https://doi.org/10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2021.109662>
- Ji, F., Li, J., Weng, Y., & Ren, J. (2019). Synthesis of PLA-based thermoplastic elastomer and study on preparation and properties of PLA-based shape memory polymers. *Materials Research Express*, 7(1), 015315. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/AB61A8>
- Joho, Y., Vongsouthi, V., Spence, M. A., Ton, J., Gomez, C., Tan, L. L., ... Ardevol, A. (2022). Ancestral Sequence Reconstruction Identifies Structural Changes Underlying the Evolution of *Ideonella sakaiensis* PETase and Variants with Improved Stability and Activity. *Biochemistry*. [https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.2C00323/SUPPL\\_FILE/BI2C00323\\_SI\\_001.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.BIOCHEM.2C00323/SUPPL_FILE/BI2C00323_SI_001.PDF)
- Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., ... Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications* 2018 9:1, 9(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1038/s41467-018-02881-1>

- Kang, B. R., Kim, S. Bin, Song, H. A., & Lee, T. K. (2019). Accelerating the Biodegradation of High-Density Polyethylene (HDPE) Using *Bjerkandera adusta* TBB-03 and Lignocellulose Substrates. *Microorganisms*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS7090304>
- Kaushal, J., Khatri, M., & Arya, S. K. (2021). Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini - review. *Cleaner Engineering and Technology*, 2, 100083. <https://doi.org/10.1016/J.CLET.2021.100083>
- 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/FIGURES/1>
- Kawai, F., Zhang, B., & Liu, B. (2021). The Current State of Research on PET Hydrolyzing Enzymes Available for Biorecycling. *Catalysts 2021, Vol. 11, Page 206*, 11(2), 206. <https://doi.org/10.3390/CATAL11020206>
- Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021a). Bioremediation of polyvinyl chloride (PVC) films by marine bacteria. *Marine Pollution Bulletin*, 169, 112566. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2021.112566>
- Khandare, S. D., Chaudhary, D. R., & Jha, B. (2021b). Marine bacterial biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) plastic. *Biodegradation*, 32(2), 127–143. <https://doi.org/10.1007/S10532-021-09927-0>
- Khatoon, N., Jamal, A., & Ali, M. I. (2018). Lignin peroxidase isoenzyme: a novel approach to biodegrade the toxic synthetic polymer waste. *Https://Doi.Org/10.1080/09593330.2017.1422550*, 40(11), 1366–1375. <https://doi.org/10.1080/09593330.2017.1422550>
- Kim, J. W., Park, S. Bin, Tran, Q. G., Cho, D. H., Choi, D. Y., Lee, Y. J., & Kim, H. S. (2020). Functional expression of polyethylene terephthalate-degrading enzyme (PETase) in green microalgae. *Microbial Cell Factories*, 19(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S12934-020-01355-8/TABLES/1>
- Kim, S., & Pascual, R. (2021). Mushroom Ligninolytic Enzymes—Features and



Application of Potential Enzymes for Conversion of Lignin into Bio-Based Chemicals and Materials. *Applied Sciences* 2021, Vol. 11, Page 6161, 11(13), 6161. <https://doi.org/10.3390/APP11136161>

Knott, B. C., Erickson, E., Allen, M. D., Gado, J. E., Graham, R., Kearns, F. L., ... McGeehan, J. E. (2020). Characterization and engineering of a two-enzyme system for plastics depolymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(41), 25476–25485. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2006753117/SUPPL\\_FILE/PNAS.2006753117.SM03.MP4](https://doi.org/10.1073/PNAS.2006753117/SUPPL_FILE/PNAS.2006753117.SM03.MP4)

Korkusuz, & Tüzüm Demir, A. P. (2020). Evaluation of the thermal stabilization behavior of hydrotalcite against organic stabilizers for plasticized PVC films. *Polymer Bulletin*, 77(9), 4805–4831. <https://doi.org/10.1007/S00289-019-02977-8/FIGURES/12>

Kuduğ, H., Ataman, B., İmamoğlu, R., Düzgün, D., & Gökçe, İ. (2019). Production of red fluorescent protein (mCherry) in an inducible E. coli expression system in a bioreactor, purification and characterization. *International Advanced Researches and Engineering Journal*, 3(1), 20–25. Retrieved from <https://dergipark.org.tr/en/pub/iarej/issue/44303/429547>

Kumar, S. (2019). Recent Developments of Biobased Plasticizers and Their Effect on Mechanical and Thermal Properties of Poly(vinyl chloride): A Review. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 58(27), 11659–11672. [https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.9B02080/ASSET/IMAGES/MEDIUM/IE-2019-02080R\\_0020.GIF](https://doi.org/10.1021/ACS.IECR.9B02080/ASSET/IMAGES/MEDIUM/IE-2019-02080R_0020.GIF)

Le, N. T. P., Phan, T. T. P., Phan, H. T. T., Truong, T. T. T., Schumann, W., & Nguyen, H. D. (2022). Influence of N-terminal His-tags on the production of recombinant proteins in the cytoplasm of *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Reports*, 35, e00754. <https://doi.org/10.1016/J.BTRE.2022.E00754>

Leksycki, K., & Królczyk, J. B. (2021). Comparative assessment of the surface topography for different optical profilometry techniques after dry turning of Ti6Al4V titanium alloy. *Measurement*, 169, 108378. <https://doi.org/10.1016/J.MEASUREMENT.2020.108378>

- Li, W. J., Jayakody, L. N., Franden, M. A., Wehrmann, M., Daun, T., Hauer, B., ... Wierckx, N. (2019). Laboratory evolution reveals the metabolic and regulatory basis of ethylene glycol metabolism by *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*, 21(10), 3669–3682. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14703>
- Magnin, A., Pollet, E., Perrin, R., Ullmann, C., Persillon, C., Phalip, V., & Avérous, L. (2019). Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Management*, 85. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>
- Maity, W., Maity, S., Bera, S., & Roy, A. (2021). Emerging Roles of PETase and MHETase in the Biodegradation of Plastic Wastes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(8), 2699–2716. <https://doi.org/10.1007/S12010-021-03562-4/TABLES/2>
- Manavalan, T., Manavalan, A., Ramachandran, S., & Heese, K. (2020). Identification of a Novel Thermostable Alkaline Protease from *Bacillus megaterium*-TK1 for the Detergent and Leather Industry. *Biology 2020*, Vol. 9, Page 472, 9(12), 472. <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY9120472>
- Markl, E., & Lackner, M. (2020). Devulcanization Technologies for Recycling of Tire-Derived Rubber: A Review. *Materials 2020*, Vol. 13, Page 1246, 13(5), 1246. <https://doi.org/10.3390/MA13051246>
- Mascotti, M. L. (2022). Resurrecting Enzymes by Ancestral Sequence Reconstruction. *Methods in Molecular Biology*, 2397, 111–136. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1826-4\\_7/COVER](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1826-4_7/COVER)
- 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, 1332. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.602325/BIBTEX>
- Merkel, R., & Sterner, R. (2016a). Ancestral protein reconstruction: Techniques and applications. *Biological Chemistry*, 397(1), 1–21. [https://doi.org/10.1515/HSZ-2015-0158/ASSET/GRAPHIC/J\\_HSZ-2015-0158\\_CV\\_002.JPG](https://doi.org/10.1515/HSZ-2015-0158/ASSET/GRAPHIC/J_HSZ-2015-0158_CV_002.JPG)
- Merkel, R., & Sterner, R. (2016b). Reconstruction of ancestral enzymes. *Perspectives in Science*, 9, 17–23. <https://doi.org/10.1016/J.PISC.2016.08.002>

- Meys, R., Frick, F., Westhues, S., Sternberg, A., Klankermayer, J., & Bardow, A. (2020). Towards a circular economy for plastic packaging wastes – the environmental potential of chemical recycling. *Resources, Conservation and Recycling*, *162*, 105010. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2020.105010>
- Millican, J. M., & Agarwal, S. (2021). Plastic Pollution: A Material Problem? *Macromolecules*, *54*(10), 4455–4469. <https://doi.org/10.1021/ACS.MACROMOL.0C02814>
- Mohanan, N., Montazer, Z., Sharma, P. K., & Levin, D. B. (2020). Microbial and Enzymatic Degradation of Synthetic Plastics. *Frontiers in Microbiology*, *11*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2020.580709>
- Mohanrasu, K., Premnath, N., Siva Prakash, G., Sudhakar, M., Boobalan, T., & Arun, A. (2018). Exploring multi potential uses of marine bacteria; an integrated approach for PHB production, PAHs and polyethylene biodegradation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, *185*, 55–65. <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2018.05.014>
- Natale, M., Maresca, B., Abrescia, P., & Bucci, E. M. (2011). Image analysis workflow for 2-D electrophoresis gels based on imageJ. *Proteomics Insights*, *4*, 37–49. [https://doi.org/10.4137/PRI.S7971/ASSET/IMAGES/LARGE/10.4137\\_PRI.S7971-FIG4.JPEG](https://doi.org/10.4137/PRI.S7971/ASSET/IMAGES/LARGE/10.4137_PRI.S7971-FIG4.JPEG)
- Nuyken, O., & Pask, S. D. (2013). Ring-Opening Polymerization—An Introductory Review. *Polymers 2013, Vol. 5, Pages 361-403*, *5*(2), 361–403. <https://doi.org/10.3390/POLYM5020361>
- ONU. (2022, March). El mundo se une contra el plástico. Retrieved November 8, 2022, from Noticias ONU website: <https://news.un.org/es/story/2022/03/1504922>
- Othman, A. R., Hasan, H. A., Muhamad, M. H., Ismail, N. 'Izzati, & Abdullah, S. R. S. (2021). Microbial degradation of microplastics by enzymatic processes: a review. *Environmental Chemistry Letters* *2021 19:4*, *19*(4), 3057–3073. <https://doi.org/10.1007/S10311-021-01197-9>
- Park, A. R., Kim, S. W., Kim, S. Y., & Kwon, K. C. (2021). Expression of Antimicrobial Peptide (AMP), Cecropin B, in a Fused Form to SUMO Tag With or Without Three-Glycine Linker in Escherichia coli and Evaluation of Bacteriolytic Activity of the

- Purified AMP. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(6), 1780–1789.  
<https://doi.org/10.1007/S12602-021-09797-1/FIGURES/3>
- Pauling, L., Zuckerkandl, E., Henriksen, T., & Lövstad, R. (1963). Chemical Paleogenetics. Molecular & Restoration Studies of Extinct Forms of Life. *Acta Chemica Scandinavica*, 17 suppl., 9–16.  
<https://doi.org/10.3891/ACTA.CHEM.SCAND.17S-0009>
- Peng, B. Y., Chen, Z., Chen, J., Yu, H., Zhou, X., Criddle, C. S., ... Zhang, Y. (2020). Biodegradation of Polyvinyl Chloride (PVC) in *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) larvae. *Environment International*, 145, 106106.  
<https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106106>
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., ... Séraphin, B. (2001). The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods*, 24(3), 218–229.  
<https://doi.org/10.1006/METH.2001.1183>
- Puspitasari, N., Tsai, S. L., & Lee, C. K. (2021). Class I hydrophobins pretreatment stimulates PETase for monomers recycling of waste PETs. *International Journal of Biological Macromolecules*, 176, 157–164.  
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.026>
- Ravichandran, S., Vengatesan, E., & Ramakrishnan, A. (2020). Synthesis and dynamic mechanical analysis of fiber reinforced low-density polyethylene hybrid polymer composites. *Materials Today: Proceedings*, 27, 177–180.  
<https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2019.09.216>
- Rhodes, C. J. (2018). Plastic Pollution and Potential Solutions. <https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>, 101(3), 207–260.  
<https://doi.org/10.3184/003685018X15294876706211>
- Safary, A., Moniri, R., Hamzeh-Mivehroud, M., & Dastmalchi, S. (2019). Highly efficient novel recombinant L-asparaginase with no glutaminase activity from a new halo-thermotolerant *Bacillus* strain. *BioImpacts: BI*, 9(1), 15.  
<https://doi.org/10.15171/BI.2019.03>
- Salam, M., Devi Salam, M., Varma, A., Prashar, R., & Choudhary, D. (2021). Review on Efficacy of Microbial Degradation of Polyethylene Terephthalate and Bio-upcycling

- as a Part of Plastic Waste Management Lignin degrading microorganisms View project Review on Efficacy of Microbial Degradation of Polyethylene Terephthalate and Bio-upcycling as a Part of Plastic Waste Management. *Applied Ecology and Environmental Sciences*, 9(7), 695–703. <https://doi.org/10.12691/aees-9-7-8>
- Sang, T., Wallis, C. J., Hill, G., & Britovsek, G. J. P. (2020). Polyethylene terephthalate degradation under natural and accelerated weathering conditions. *European Polymer Journal*, 136, 109873. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2020.109873>
- Santhoskumar, A. U., & Chitra, N. J. (2019). Structural Characteristics Changes after the Degradation of Polyethylene with Cobalt 12-Hydroxy Oleate Acrylic Dextrose. *Chemical Methodologies*, 3(1), 83–93. <https://doi.org/10.22034/CHEMM.2018.135055.1062>
- Sathe, D., Zhou, J., Chen, H., Su, H. W., Xie, W., Hsu, T. G., ... Wang, J. (2021). Olefin metathesis-based chemically recyclable polymers enabled by fused-ring monomers. *Nature Chemistry* 2021 13:8, 13(8), 743–750. <https://doi.org/10.1038/s41557-021-00748-5>
- Sazali, N., Ibrahim, H., Jamaludin, A. S., Mohamed, M. A., Salleh, W. N. W., & Abidin, M. N. Z. (2020). Degradation and stability of polymer: A mini review. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 788(1), 012048. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/788/1/012048>
- Schriever, K., Saenz-Mendez, P., Rudraraju, R. S., Hendrikse, N. M., Hudson, E. P., Biundo, A., ... Syrén, P. O. (2021). Engineering of Ancestors as a Tool to Elucidate Structure, Mechanism, and Specificity of Extant Terpene Cyclase. *Journal of the American Chemical Society*, 143(10), 3794–3807. [https://doi.org/10.1021/JACS.0C10214/ASSET/IMAGES/LARGE/JA0C10214\\_0005.JPEG](https://doi.org/10.1021/JACS.0C10214/ASSET/IMAGES/LARGE/JA0C10214_0005.JPEG)
- Scossa, F., & Fernie, A. R. (2020). The evolution of metabolism: How to test evolutionary hypotheses at the genomic level. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 18, 482–500. <https://doi.org/10.1016/J.CSBJ.2020.02.009>
- Shen, M., Song, B., Zeng, G., Zhang, Y., Huang, W., Wen, X., & Tang, W. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*, 263, 114469.

<https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2020.114469>

Siddiqui, M. N., Gondal, M. A., & Redhwi, H. H. (2008). Identification of different type of polymers in plastics waste. *Https://Doi.Org/10.1080/10934520802177946*, 43(11), 1303–1310. <https://doi.org/10.1080/10934520802177946>

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

Siracusa, V., & Blanco, I. (2020). Bio-Polyethylene (Bio-PE), Bio-Polypropylene (Bio-PP) and Bio-Poly(ethylene terephthalate) (Bio-PET): Recent Developments in Bio-Based Polymers Analogous to Petroleum-Derived Ones for Packaging and Engineering Applications. *Polymers 2020*, Vol. 12, Page 1641, 12(8), 1641. <https://doi.org/10.3390/POLYM12081641>

Sloutsky, R., & Naegle, K. M. (2019). ASPEN, a methodology for reconstructing protein evolution with improved accuracy using ensemble models. *ELife*, 8. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.47676>

Soares, A. de S., Augusto, P. E. D., Leite Júnior, B. R. de C., Nogueira, C. A., Vieira, É. N. R., de Barros, F. A. R., ... Ramos, A. M. (2019). Ultrasound assisted enzymatic hydrolysis of sucrose catalyzed by invertase: Investigation on substrate, enzyme and kinetics parameters. *LWT*, 107, 164–170. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2019.02.083>

Spence, M. A., Kaczmarek, J. A., Saunders, J. W., & Jackson, C. J. (2021). Ancestral sequence reconstruction for protein engineers. *Current Opinion in Structural Biology*, 69, 131–141. <https://doi.org/10.1016/J.SBI.2021.04.001>

Spoerk, M., Holzer, C., & Gonzalez-Gutierrez, J. (2020). Material extrusion-based additive manufacturing of polypropylene: A review on how to improve dimensional inaccuracy and warpage. *Journal of Applied Polymer Science*, 137(12), 48545. <https://doi.org/10.1002/APP.48545>

Sternke, M., Tripp, K. W., & Barrick, D. (2019). Consensus sequence design as a general strategy to create hyperstable, biologically active proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 166(23), 11275–11284.

[https://doi.org/10.1073/PNAS.1816707116/SUPPL\\_FILE/PNAS.1816707116.SD06.TXT](https://doi.org/10.1073/PNAS.1816707116/SUPPL_FILE/PNAS.1816707116.SD06.TXT)

- Streit, A. F. M., de Santana, M. P., de Oliveira Júnior, D. L., Bassaco, M. M., Tanabe, E. H., Dotto, G. L., & Bertuol, D. A. (2022). Development of a pre-treatment process of polymeric wastes (HDPE, LDPE/LLDPE, PP) for application in the qualification of selectors of recyclable materials. *Environment, Development and Sustainability*, 24(5), 6349–6371. <https://doi.org/10.1007/S10668-021-01705-5/FIGURES/8>
- Sun, Y., Calderini, E., & Kourist, R. (2021). A Reconstructed Common Ancestor of the Fatty Acid Photo-decarboxylase Clade Shows Photo-decarboxylation Activity and Increased Thermostability. *ChemBioChem*, 22(10), 1833–1840. <https://doi.org/10.1002/CBIC.202000851>
- Tanaka, S., Kaneti, Y. V., Bhattacharjee, R., Islam, M. N., Nakahata, R., Abdullah, N., ... Hossain, M. S. A. (2018). Mesoporous Iron Oxide Synthesized Using Poly(styrene-b-acrylic acid-b-ethylene glycol) Block Copolymer Micelles as Templates for Colorimetric and Electrochemical Detection of Glucose. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(1). <https://doi.org/10.1021/acsami.7b13835>
- 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/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CS-2018-05171U\\_0012.GIF](https://doi.org/10.1021/ACSCATAL.8B05171/ASSET/IMAGES/MEDIUM/CS-2018-05171U_0012.GIF)
- Temporiti, M. E. E., Nicola, L., Nielsen, E., & Tosi, S. (2022). Fungal Enzymes Involved in Plastics Biodegradation. *Microorganisms 2022, Vol. 10, Page 1180*, 10(6), 1180. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS10061180>
- Tham, H. Y., Song, A. A. L., Yusoff, K., & Tan, G. H. (2020). Effect of different cloning strategies in pet-28a on solubility and functionality of a staphylococcal phage endolysin. *BioTechniques*, 69(3), 161–170. <https://doi.org/10.2144/BTN-2020-0034/ASSET/IMAGES/LARGE/FIGURE6.JPEG>
- Thiele, C. J., Hudson, M. D., Russell, A. E., Saluveer, M., & Sidaoui-Haddad, G. (2021). Microplastics in fish and fishmeal: an emerging environmental challenge? *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81499-8>
- Tournier, V., Topham, C. M., Gilles, A., David, B., Folgoas, C., Moya-Leclair, E., ... Marty, A. (2020). An engineered PET depolymerase to break down and recycle

- plastic bottles. *Nature* 2020 580:7802, 580(7802), 216–219. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2149-4>
- Trudeau, D. L., & Tawfik, D. S. (2019). Protein engineers turned evolutionists—the quest for the optimal starting point. *Current Opinion in Biotechnology*, 60, 46–52. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2018.12.002>
- Ugarte, L., Calvo-Correas, T., Gonzalez-Gurrutxaga, I., Peña-Rodriguez, C., Etxeberria, O., Corcuera, M. A., & Eceiza, A. (2018). Towards Circular Economy: Different Strategies for Polyurethane Waste Recycling and the Obtaining of New Products. *Proceedings 2018*, Vol. 2, Page 1490, 2(23), 1490. <https://doi.org/10.3390/PROCEEDINGS2231490>
- Ugoeze, K., Amogu, E., Oluigbo, K., & Nwachukwu, N. (2021). Environmental and public health impacts of plastic wastes due to healthcare and food products packages: A Review. *Journal of Environmental Science and Public Health*, 5(1), 1–31. Retrieved from <http://www.fotunejournals.com/environmental-and-public-health-impacts-of-plastic-wastes-due-to-healthcare-and-food-products-packages-a-review.html>
- Uzosike, C. C., Yee, L. H., & Padilla, R. V. (2023). Small-Scale Mechanical Recycling of Solid Thermoplastic Wastes: A Review of PET, PEs, and PP. *Energies* 2023, Vol. 16, Page 1406, 16(3), 1406. <https://doi.org/10.3390/EN16031406>
- Vadera, S., & Khan, S. (2021). A Critical Analysis of the Rising Global Demand of Plastics and its Adverse Im-pact on Environmental Sustainability. *J Environ Pollut Manage*, 3, 105. Retrieved from [www.scholarena.com](http://www.scholarena.com)
- Van Der Vegt, A. K. (2006). *From polymers to plastics* (First). Retrieved from <http://www.vssd.nl/hlf/m028.htm>
- Vivi, V. K., Martins-Franchetti, S. M., & Attili-Angelis, D. (2019). Biodegradation of PCL and PVC: Chaetomium globosum (ATCC 16021) activity. *Folia Microbiologica*, 64(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/S12223-018-0621-4/FIGURES/3>
- Wang, Z., Xin, X., Shi, X., & Zhang, Y. (2020). A polystyrene-degrading Acinetobacter bacterium isolated from the larvae of Tribolium castaneum. *Science of The Total Environment*, 726, 138564. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.138564>

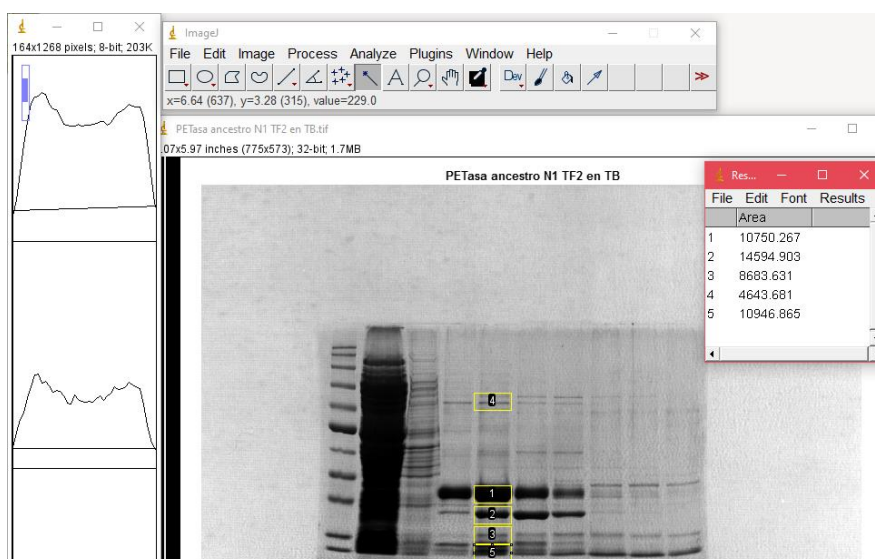


- Ward, V. C. A., Chatzivasileiou, A. O., & Stephanopoulos, G. (2018). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of isoprenoids. *FEMS Microbiology Letters*, 365(10), 79. <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNY079>
- Wilkes, R., Aristilde, L., Ludmilla Aristilde, C., & Hall, R.-R. (2017). Degradation and metabolism of synthetic plastics and associated products by *Pseudomonas* sp.: capabilities and challenges. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 582–593. <https://doi.org/10.1111/JAM.13472>
- Xue, Y., & Liu, X. (2021). Detoxification, solidification and recycling of municipal solid waste incineration fly ash: A review. *Chemical Engineering Journal*, 420, 130349. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2021.130349>
- Yang, S. S., Brandon, A. M., Andrew Flanagan, J. C., Yang, J., Ning, D., Cai, S. Y., ... Wu, W. M. (2018). Biodegradation of polystyrene wastes in yellow mealworms (larvae of *Tenebrio molitor* Linnaeus): Factors affecting biodegradation rates and the ability of polystyrene-fed larvae to complete their life cycle. *Chemosphere*, 191, 979–989. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.10.117>
- Yang, S. S., Ding, M. Q., He, L., Zhang, C. H., Li, Q. X., Xing, D. F., ... Wu, W. M. (2021). Biodegradation of polypropylene by yellow mealworms (*Tenebrio molitor*) and superworms (*Zophobas atratus*) via gut-microbe-dependent depolymerization. *Science of The Total Environment*, 756, 144087. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.144087>
- Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196–1199. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD6359>
- Zhang, F., Zhao, Y., Wang, D., Yan, M., Zhang, J., Zhang, P., ... Chen, C. (2021). Current technologies for plastic waste treatment: A review. *Journal of Cleaner Production*, 282, 124523. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124523>
- Zhao, X., Wang, X. L., Tian, F., An, W. L., Xu, S., & Wang, Y. Z. (2019). A fast and mild closed-loop recycling of anhydride-cured epoxy through microwave-assisted catalytic degradation by trifunctional amine and subsequent reuse without separation. *Green Chemistry*, 21(9), 2487–2493. <https://doi.org/10.1039/C9GC00685K>

## ANEXOS



**Anexo 1.** Objetos de los que se obtuvo los films de cada polímero. Botella de plástico (PET); Frasco de orina (PP); Fundas Ziploc (LDPE); Frasco de medio de cultivo (HDPE); Cucharas plásticas (PS); Pelota (PVC).



**Anexo 2.** Determinación del porcentaje de proteína presente en las bandas de gel de electroforesis SDS page a través del programa ImageJ.