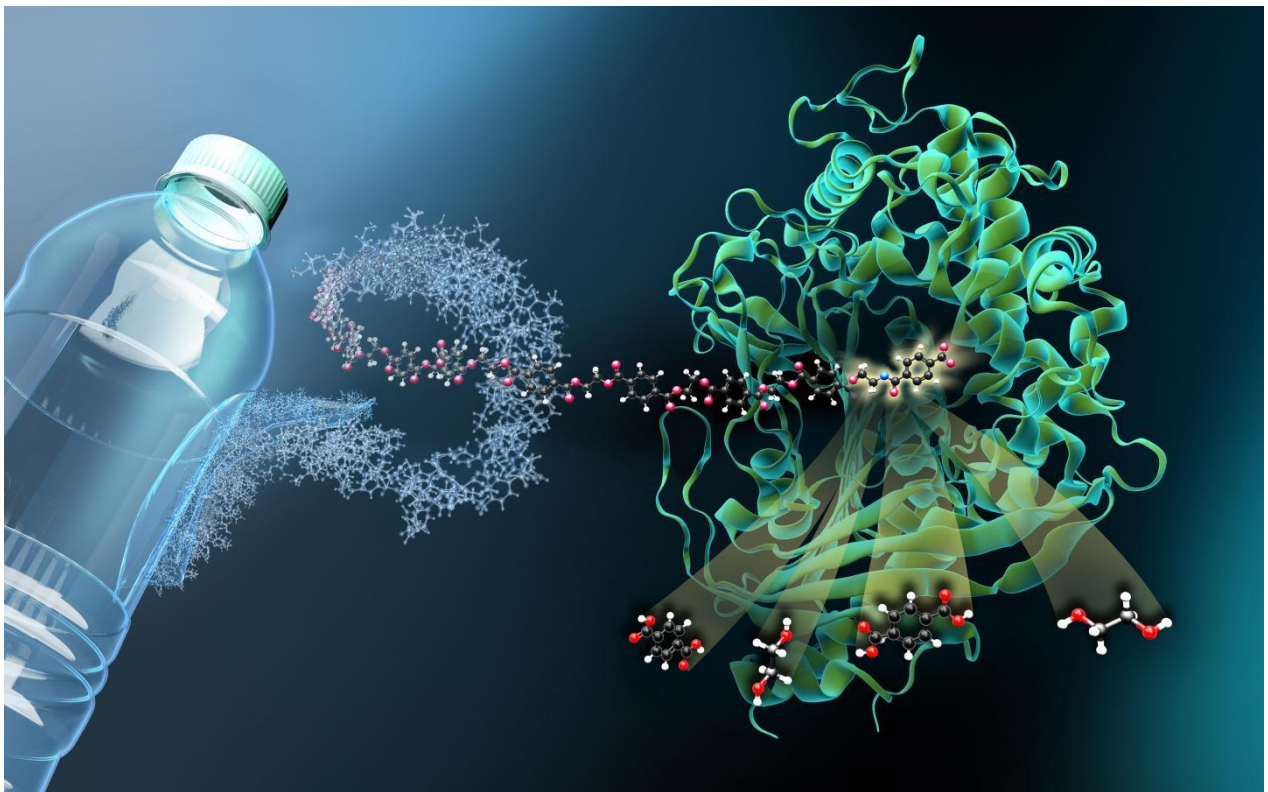




Sección de Biología  
Universidad de La Laguna

## **Biodegradación de tereftalato de polietileno: microorganismos, enzimas y perspectivas futuras**

**Biodegradation of polyethylene terephthalate:  
microorganisms, enzymes and future prospects**



<https://www.genengnews.com/news/molecular-scissors-for-plastic-waste/>

Trabajo de Fin de Grado

**Jorge Pérez Parrilla**

Tutorizado por Ana María Rodríguez Pérez y Samuel Rodríguez Martín

Grado en Biología. Julio 2020

---

## ÍNDICE

---

Resumen.....	1
Abstract.....	1
1. Introducción.....	2
1.1 Los plásticos, relevancia y peligros que suponen .....	2
1.2 Estrategias para el tratamiento de los residuos plásticos .....	3
1.2.1 Plásticos biodegradables .....	3
1.2.2 Reciclaje.....	4
1.2.3 Incineración y métodos químicos de reciclaje .....	5
1.2.4 Biodegradación.....	5
1.3 Biodegradación de plásticos: El caso del PET.....	7
2. Objetivos.....	9
3. Biodegradación del PET .....	10
3.1 Consideraciones previas. ....	10
3.2 Hidrólisis del PET. Enzimas descritas.....	11
3.2.1 <i>Thermobifida fusca</i> . TfH, TfCut2, TfCa .....	11
3.2.2 <i>Humicola insolens</i> y <i>Candida antarctica</i> . HiC y CALB.....	13
3.3 <i>Ideonella sakaiensis</i> , una bacteria capaz de degradar y asimilar el PET .....	14
3.3.1 Aislamiento y caracterización.....	14
3.3.2 La PETasa. Características estructurales y mecanismos moleculares.....	15
3.3.3 La MHETasa. Características estructurales y mecanismos moleculares.....	19
3.3.4 Mecanismo global de <i>Ideonella sakaiensis</i> . Un paso adelante para solventar el problema ambiental que supone el PET. ....	21
4 Situación actual y perspectivas futuras en la biodegradación del PET .....	22
5 Conclusiones .....	25
Bibliografía .....	27

---

## Resumen

Hoy en día, el problema medioambiental generado por la acumulación de residuos **plásticos** afecta a todo tipo de ecosistemas, alterándolos y causando multitud de efectos negativos en los seres vivos (seres humanos incluidos). Tal es la gravedad del problema que, en los últimos años, se han propuesto multitud de posibles tratamientos para reducir la cantidad de estos residuos, mitigando sus efectos nocivos. El uso de **microorganismos** para degradar plásticos supone una de las soluciones más prometedoras, constituyendo una vía económica y respetuosa con el medio natural. En este trabajo, centramos nuestra atención en la **biodegradación** del tereftalato de polietileno (**PET**), uno de los poliésteres de uso más extendido, destacando algunos microorganismos y enzimas involucrados en este proceso. Asimismo, se discutirán distintos enfoques para solventar las limitaciones de algunas de las enzimas y se describirá la estructura y el mecanismo molecular de las enzimas **PETasa** y **MHETasa**, producidas por *Ideonella sakaiensis*. Pretendemos pues, llevar a cabo una breve descripción de los hallazgos más relevantes obtenidos en la última década con el fin de ofrecer una visión del estado actual y perspectivas futuras de la biodegradación del PET.

**Palabras clave:** plásticos, microorganismos, biodegradación, PET, PETasa, MHETasa.

## Abstract

Nowadays, the environmental problem generated by the accumulation of **plastic** waste affects all kinds of ecosystems, altering them and causing a multitude of negative effects on living beings (including humans). Such is the seriousness of the problem that, in recent years, a multitude of possible treatments have been proposed to reduce the amount of this waste, mitigating its harmful effects. The use of **microorganisms** to degrade plastics is one of the most promising solutions, constituting an economic and environmentally friendly way. In this work, we focus our attention on the **biodegradation** of polyethylene terephthalate (**PET**), one of the most widely used polyesters, highlighting some microorganisms and enzymes involved in this process. Likewise, different approaches will be discussed to overcome the limitations of some of the enzymes and the structure and molecular mechanism of the **PETase** and **MHETase** enzymes, produced by *Ideonella sakaiensis*, will be described. We intend, therefore, to carry out a brief description of the most relevant findings obtained in the last decade in order to offer a vision of the current state and future perspectives of the biodegradation of PET.

**Key words:** plastic, microorganisms, biodegradation, PET, PETase, MHETase.

---

# 1. Introducción

## 1.1 Los plásticos, relevancia y peligros que suponen

El origen de los plásticos data de 1869, cuando se diseñó el primer polímero sintético en respuesta a un concurso que pretendía encontrar un sustituto adecuado para el marfil [1]. Desde entonces, el desarrollo de propiedades como su resistencia, plasticidad y ligereza, unidas a la facilidad y el bajo costo de producción, convirtieron al plástico en un material ideal para diversas industrias y productos de consumo [2]. Actualmente, el auge del plástico es más que patente, llegándose a producir a nivel mundial 359 millones de toneladas en 2018, un 3,16% más que en 2017 (véase <https://mundoplast.com/produccion-plasticos-2018/>). Tal es la importancia alcanzada en las últimas décadas que se considera un marcador del Antropoceno [3]. Sin embargo, a pesar de su importancia y utilidad, son varios los aspectos de este material que justifican su situación en el punto de mira de diversos estudios. El término “plástico” engloba a una serie de polímeros sintéticos de alto peso molecular, que difieren entre sí en estructura (lineales o ramificados), estado (cristalino, semicristalino o amorfo) o grupos químicos presentes (etileno, éster, hidroxilo...), entre otras diferencias [4]. Sin embargo, las mismas características que los hacen deseables para la industria, los convierten en compuestos recalcitrantes o resistentes a la degradación, provocando su inevitable acumulación en los diversos ecosistemas terrestres y marinos y convirtiéndolos en uno de los problemas ambientales de mayor relevancia en la actualidad [1].

Los plásticos producen numerosos efectos negativos y de distinta naturaleza sobre el medio ambiente. En primer lugar, existen desechos macroscópicos que pueden amenazar la supervivencia de muchas especies, enredándose en sus extremidades y restringiendo su movilidad, lo que puede provocar la pérdida de extremidades o la incapacidad de subir a la superficie marina a respirar. Este tipo de desecho también puede ingerirse, permaneciendo en el tracto digestivo de los animales, minimizando la cantidad de alimento que pueden consumir y bloqueando las vías respiratorias, lo que, en última instancia, puede provocar la muerte del animal por asfixia [5]. Por otra parte, existen residuos denominados microplásticos (MP) que engloban todas aquellas partículas de plástico menores a 5 mm [6]. Los MP derivan de distintos tipos de plásticos y pueden alterar ecosistemas terrestres y marinos. Al igual que los macroplásticos, su ingesta puede dañar los órganos digestivos de distintos organismos y, si son lo suficientemente pequeños (nanoplásticos 50 nm – 180 nm), pueden transportarse a los tejidos y a las células, causando alteraciones histológicas notables [6]. También pueden afectar a la

---

flotabilidad de algunos peces mesopelágicos, llevándolos a la muerte. Asimismo, se ha observado la existencia de MP en distintos niveles de la escala trófica, lo que indica su posible transferencia y/o acumulación en la cadena alimenticia, suponiendo un riesgo adicional para el ser humano [6].

En segundo lugar, dada la capacidad de distintas comunidades microbianas para colonizar el plástico, estos residuos pueden comportarse como vectores de dispersión de microorganismos patógenos oportunistas [3,5,7]. De hecho, recientemente, se ha descrito el concepto de “Plastisfera” para referirse al nicho habitable por los microorganismos en los desechos plásticos y como éstos pueden llegar a alterar la ecología de las poblaciones microbianas presentes en ambientes acuáticos y aumentar el intercambio génico entre las poblaciones que colonizan dicha Plastisfera [3,7,8]. Como consecuencia de ello, los plásticos podrían comportarse como reservorios de genes de resistencia antibiótica (ARG) y genes de resistencia a metales (MRG), lo cual supone un efecto negativo adicional [7].

En tercer lugar, muchos de los aditivos que contienen (colorantes, plastificantes, estabilizantes, agentes antiestáticos...) pueden ser liberados, no sólo durante su fabricación, sino durante su uso y posterior acumulación, resultando peligrosos para la salud humana. De hecho, han sido clasificados como persistentes, bioacumulativos, cancerígenos o tóxicos [9,10]

## **1.2 Estrategias para el tratamiento de los residuos plásticos**

A tenor de lo anteriormente expuesto, resulta evidente que los efectos perjudiciales derivados del plástico lo convierten en una gran amenaza para los seres vivos, de ahí que, la búsqueda de un método eficaz y viable para su eliminación de los ecosistemas, se haya vuelto imperativa. Con el objetivo de solventar el problema medioambiental que supone el plástico, se han desarrollado varias aproximaciones con la intención de reducir la cantidad de residuos, así como eliminar su presencia en el medio ambiente.

### **1.2.1 Plásticos biodegradables**

El desarrollo de plásticos biodegradables se ha convertido en una importante alternativa con la que se pretende minimizar la producción de polímeros sintéticos recalcitrantes, sustituyéndolos por polímeros sintetizados a partir de materias primas biodegradables (como almidón o celulosa), o sintetizados por microorganismos, como los polihidroxicanoatos (PHA). Estos polímeros son poliésteres biodegradables que algunos microorganismos sintetizan y acumulan como fuente de carbono y energía, siendo el más común el polihidroxibutirato (PHB) [2, 11]. Dado que se trata de plásticos, en teoría biodegradables, deberían suponer una ventaja al

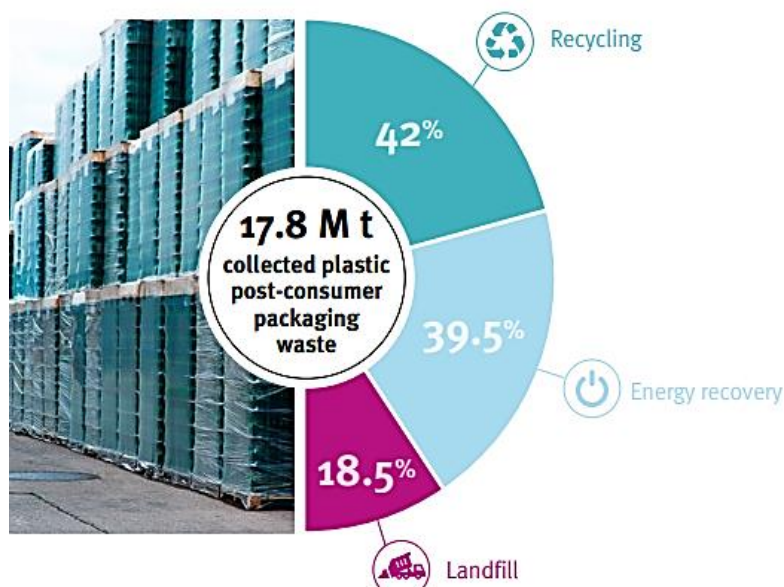
---

poderse degradar de forma natural por la actividad microbiana. Sin embargo, algunos estudios cuestionan su biodegradabilidad y, en algunos casos, ésta puede suponer la liberación de intermediarios que inhiben el crecimiento de algunos vegetales o suponen un riesgo para la salud de los seres vivos, en forma de microplásticos. En este sentido, los resultados mostrados por diferentes autores indican que, la biodegradabilidad de estos bioplásticos depende de unas determinadas condiciones bióticas y abióticas en el ambiente, y éstas no siempre se dan en ambientes naturales [11]. Además, muchos de estos plásticos biodegradables presentan aditivos (como plastificantes) que pueden resultar igualmente dañinos y que, por su naturaleza, requieren un estudio más detallado [11].

Por otro lado, es preciso señalar que, los resultados obtenidos en estudios realizados con la mayoría de estos plásticos, definidos como biodegradables, han sido realizados en ambientes terrestres y no en ambientes marinos, por lo que no se puede afirmar que sean totalmente biodegradables [12]. Por tanto, podría concluirse que, por sí sola, la mera sustitución de los polímeros sintéticos basados en combustibles fósiles, por estos polímeros biodegradables, no soluciona el problema de la acumulación de estos residuos en el medio ambiente [2].

### **1.2.2 Reciclaje**

En 2018, se recogieron en la Unión Europea 17,8 millones de toneladas de residuos de envases plásticos, destinándose un 42 % al reciclaje, un 39,5% a la recuperación de energía y un 18,5% a los vertederos (**Figura 1**) [13]. En la actualidad, el reciclaje se ha convertido en un método, relativamente eficiente, para reducir este tipo de desechos, lo que ha producido un aumento significativo de dicha estrategia en los últimos años. Sin embargo, este sistema también presenta algunas desventajas, como el hecho de que, no todos los plásticos cumplen las condiciones necesarias para ser reciclados [14]. Además, el reciclaje también puede provocar la acumulación de productos químicos peligrosos en materiales secundarios, lo que afecta negativamente a su valor de mercado, restringiendo sus aplicaciones posteriores [9]. Por otro lado, los altos costes del proceso de reciclaje suponen una seria limitación a su implementación [15].



*Figura 1: Tratamiento de envases plásticos residuales en 2018 en la UE [13].*

### 1.2.3 Incineración y métodos químicos de reciclaje

Cuando la recolección, clasificación y separación de los residuos plásticos es complicada o económicamente inviable, la incineración supone una alternativa que permite recuperar, en forma de calor, la energía almacenada en los plásticos [16]. Para ello, se utilizan reactores especiales (Incineradores), en los que los residuos son sometidos a un proceso de combustión, generando  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  como productos finales. En este proceso, el calor producido en forma de vapor de agua se puede utilizar para generar electricidad a través de turbinas [16]. A pesar de ello, este tratamiento resulta aún más peligroso que los anteriores, puesto que, como consecuencia de su aplicación, se generan gases tóxicos, como monóxido de carbono y dioxinas, liberándose también al medio ambiente metales pesados como el Cadmio [16,17,18].

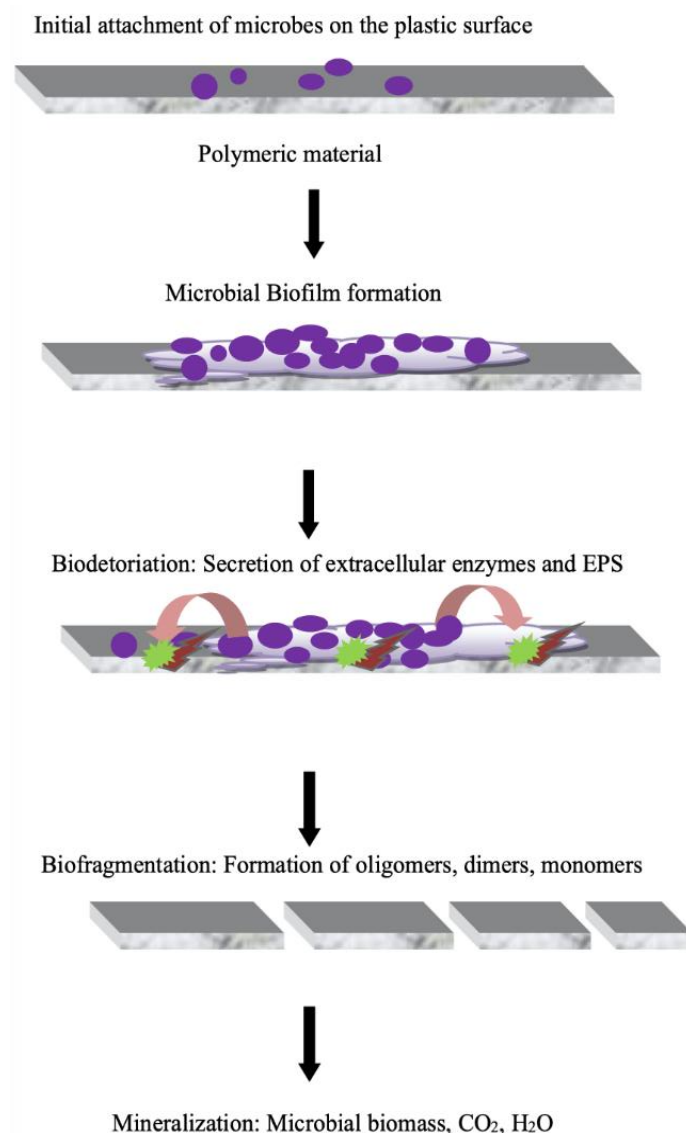
Por lo que a los métodos químicos se refiere, se han descrito diferentes tipos de tratamientos. En el caso concreto de los poliésteres, su escisión puede llevarse a cabo utilizando diferentes reactivos como el agua (hidrólisis), alcoholes (alcohólisis), ácidos (acidólisis), glicoles (glicólisis) y amidas (aminólisis), capaces de romper los enlaces éster. Sin embargo, estos métodos presentan dos inconvenientes importantes: por un lado, liberan productos secundarios contaminantes y, por otro, exigen un alto consumo energético [16,18].

### 1.2.4 Biodegradación

Actualmente, la estrategia más atractiva para solucionar los problemas de contaminación ambiental causada por los residuos plásticos es la biodegradación, máxime si tenemos en cuenta los inconvenientes planteados por el resto de las estrategias consideradas hasta ahora. La biodegradación podría definirse como un proceso complejo en el que pueden identificarse las

siguientes fases: biodeterioro, biofragmentación, asimilación y mineralización (**Figura 2**) [1,3,19].

En este contexto, es preciso señalar que la primera etapa de biodeterioro incluye factores, tanto bióticos como abióticos, que modifican las propiedades mecánicas, físicas y químicas del material. De hecho, la acción inicial de los factores abióticos (temperatura, radiación UV, oxígeno...) debilitan la estructura del polímero, generando rugosidades, poros y cambios moleculares que facilitan la colonización del sustrato por los microorganismos [1,3,19]. El posterior desarrollo de un biofilm en la superficie del plástico actúa conjuntamente con los factores abióticos para modificar las propiedades del material. Durante la fase de biofragmentación, los microorganismos que componen el biofilm liberan enzimas extracelulares (oxigenasas, lipasas, esterases, depolimerasas...) que reducen el peso molecular de los polímeros, liberando oligómeros y monómeros que pueden ser asimilados por las células [1,3,19] (**Figura 2**).



**Figura 2:** Principio de la degradación microbiana de un poliéster. Los microorganismos colonizan a la superficie del polímero, forman un biofilm, y secretan una serie de enzimas hidrolíticas que rompen los enlaces éster de las cadenas del polímero. Los productos liberados por la hidrólisis (monómeros, dímeros, etc.) son asimilados y posteriormente metabolizados por los microorganismos [20].



---

En la fase de asimilación, estas moléculas provenientes de los fragmentos del polímero son introducidas en el interior de las células microbianas, para la obtención de energía, electrones, carbono y, eventualmente, otros elementos (nitrógeno, azufre, fósforo) [1,3,19]. Por último, la mineralización resulta en la excreción de metabolitos completamente oxidados cuya naturaleza dependerá del tipo de degradación que se lleve a cabo. Si la degradación es aerobia, se liberará  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ , mientras que si es anaerobia se liberarán  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  [1,3,19].

Aunque, desde un punto de vista conceptual, se pueden describir con precisión las diferentes etapas que participan en la biodegradación de los plásticos, son varios los factores que afectan dicho proceso, entre ellos, el tamaño, la forma, el peso molecular, la topología de la superficie o los aditivos, que pueden propiciar o limitar la formación del biofilm. También, la cristalinidad del polímero se comporta como factor limitante, ya que los microorganismos se adhieren preferentemente a las regiones amorfas de su superficie [1]. De igual modo, las características fisicoquímicas del ambiente, como la temperatura, la disponibilidad de nutrientes y el pH, entre otros, juegan un papel importante en la biodegradación [1].

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, parece evidente que, la biodegradación, a diferencia del resto de estrategias aquí comentadas, ofrece una alternativa más ecológica, ya que previene la contaminación secundaria del medio ambiente y, a la par, más económica, dado que reduce los costes del tratamiento [15,19]. No obstante, este método también presenta alguna desventaja como, por ejemplo, resulta más lento que otros procesos físicos y químicos [15]. A pesar de ello, la biodegradación representa sin duda, una de las opciones más prometedoras hoy en día.

### **1.3 Biodegradación de plásticos: El caso del PET**

Desde el punto de vista de su demanda, los tipos de plásticos más importantes en Europa son: polipropileno (PP), polietileno (PE), cloruro de polivinilo (PVC), poliuretano (PUR), poliestireno expandido (EPS), poliestireno (PS) y polietilentereftalato o tereftalato de polietileno (PET). Dentro de este grupo, el PET supone un 7,7% de la demanda total (**Figura 3-Figura 4**) [13] y, al igual que sucede con otros plásticos, sus propiedades especiales facilitan su acumulación en el medio ambiente durante cientos de años, causando graves problemas medioambientales, como se ha comentado con anterioridad. A este respecto, son varios los autores que señalan una posible relación entre el PET y la liberación de disruptores endocrinos al medio, si bien esta relación resulta controvertida [18, 21,22]. Entre ellos, destacan los ftalatos, diésteres de ácido ftálico, capaces de alterar el control hormonal involucrado en distintas vías

metabólicas, pudiendo alterar nuestra fisiología y, en último término, nuestra salud. [18,21,22,23].

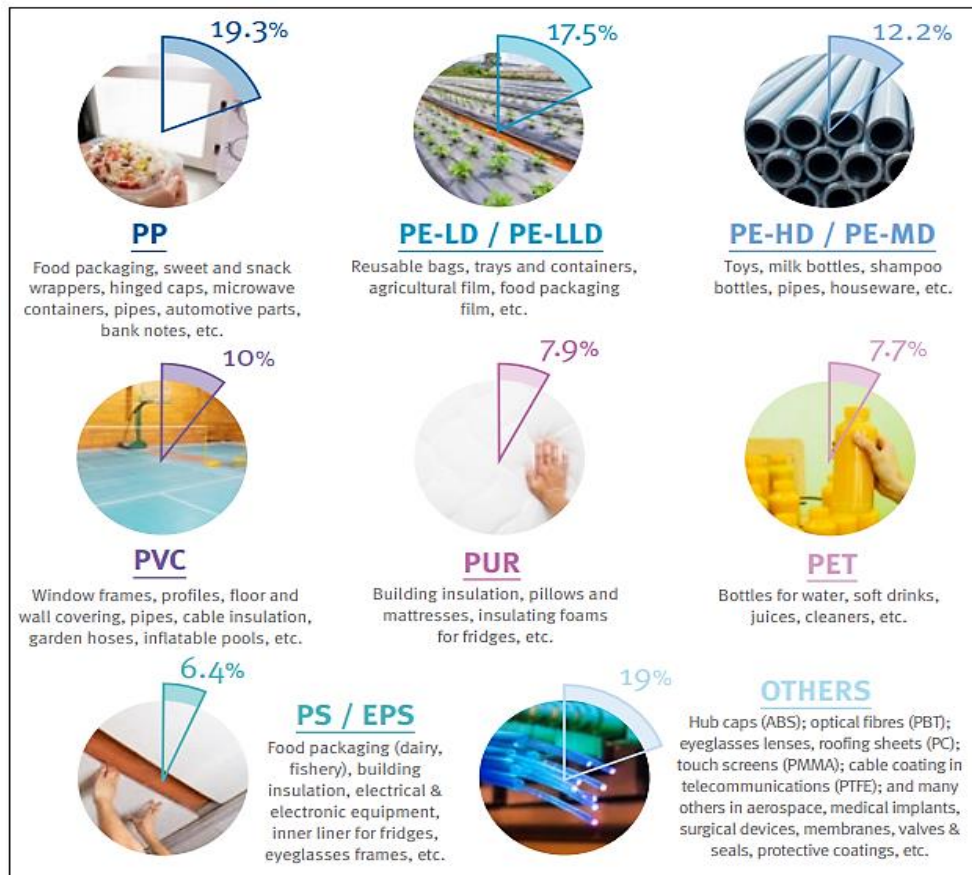


Figura 3: Distribución de la demanda de plástico en Europa por tipo de resina [13].

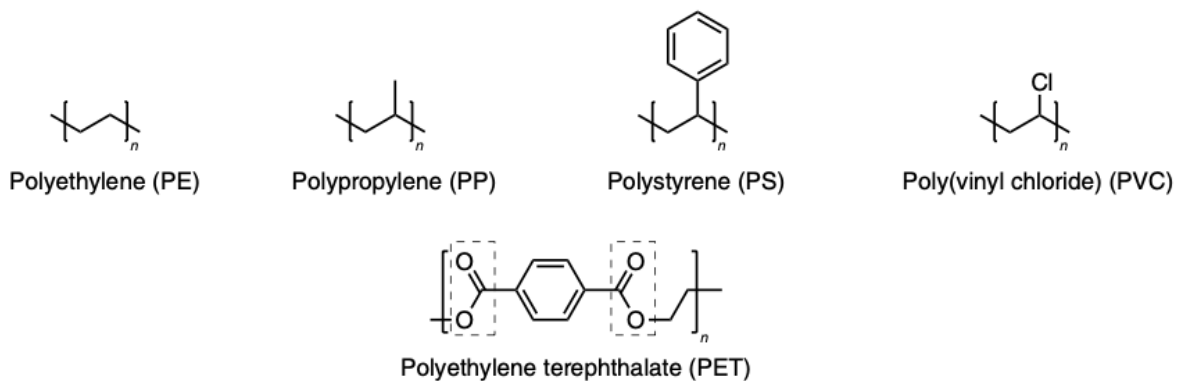
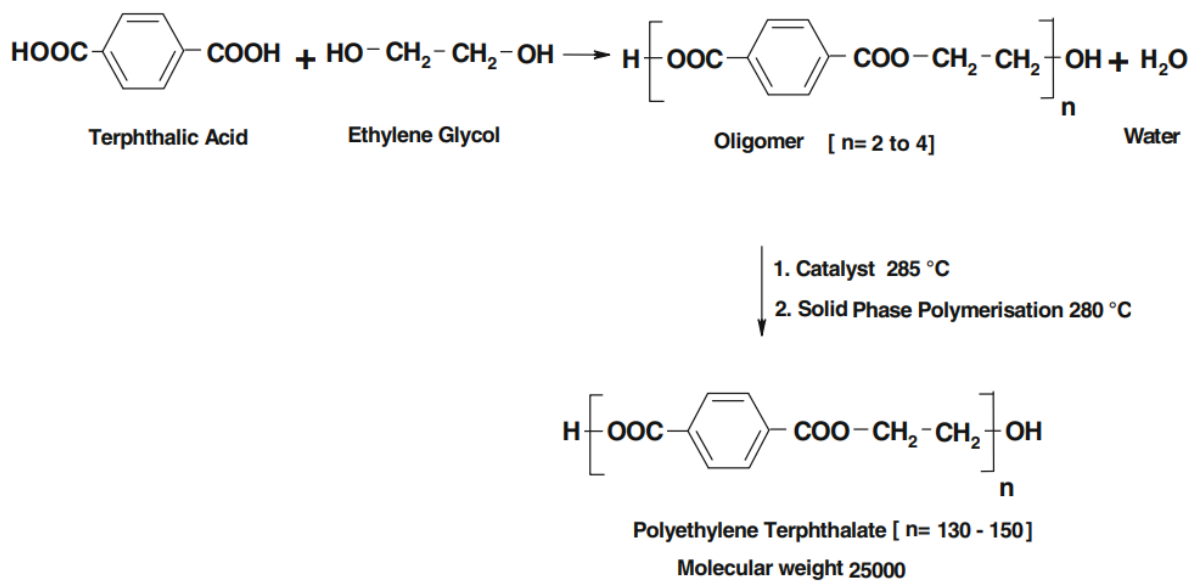


Figura 4: Estructura de los principales termoplásticos comerciales.

El PET es un poliéster perteneciente a la familia de los termoplásticos, caracterizados por derretirse o deformarse al aumentar la temperatura y endurecerse cuando ésta descende. Se trata de una característica reversible, pudiéndose recalentar, reformar y enfriar repetidamente [1,13]. Está compuesto principalmente por etilenglicol (EG) y ácido tereftálico (TPA), unidos por enlaces éster (Figura 5), y es utilizado principalmente en la industria textil, como fibras

sintéticas para la ropa, y como material de empaquetado de alimentos y bebidas. En muchas de sus formas comerciales, el PET es semicristalino, es decir, presenta una fracción amorfa y otra cristalina, variando sus proporciones dependiendo del producto que se desee [1]. Su resistencia y baja biodegradabilidad se deben a la presencia de unidades aromáticas repetidas de tereftalato en su esqueleto y la movilidad limitada de las cadenas del polímero. Del mismo modo, su superficie hidrofóbica supone una barrera significativa para la biodegradación, limitando la colonización microbiana y la acción de las enzimas hidrolíticas capaces de degradarlo.



*Figura 5: Fabricación del PET mediante la polimerización del EG y el TPA [16].*

## 2. Objetivos

Dada la importancia industrial de los polímeros plásticos, así como su importancia socioeconómica y relevancia ambiental y sanitaria, en los últimos años, han surgido multitud de actuaciones y movilizaciones sociales en pos de la protección medioambiental a las que no ha sido ajena la sociedad científica mundial. De hecho, son muchas las investigaciones que, desde hace algunos años y bajo diferentes puntos de vista, se están llevando a cabo con el fin de minimizar o eliminar los efectos negativos producidos por los polímeros plásticos. De acuerdo con ello y, con el fin de profundizar un poco más en algunos de estos aspectos, nos hemos propuesto en este trabajo varios objetivos.

### Objetivo General:

Presentar un breve análisis del estado actual del conocimiento de la biodegradación de uno de estos polímeros plásticos, el polietilentereftalato (PET).

---

## **Objetivos Específicos:**

Presentar un estudio genérico de las principales enzimas implicadas en este proceso, así como de los microorganismos responsables.

Analizar el estado actual y perspectivas futuras de los estudios llevados a cabo con la bacteria degradadora de PET *Ideonella sakaiensis*.

## **3. Biodegradación del PET**

### **3.1 Consideraciones previas.**

Como se ha comentado anteriormente, el PET está compuesto por monómeros unidos entre sí mediante enlaces tipo éster. Consecuentemente, aquellos microorganismos que posean enzimas hidrolíticas capaces de atacar y romper estos enlaces podrían generar compuestos de bajo peso molecular (monómeros) asimilables por la célula. No obstante, debemos tener presentes una serie de consideraciones previas, a la hora de afrontar los estudios sobre la biodegradación del PET.

La capacidad de los microorganismos para degradar el PET va a depender de sus propiedades fisicoquímicas, por lo que, no todos los tipos de PET son igualmente susceptibles a la degradación [24]. En este sentido, se ha demostrado que la velocidad a la que se degradan los poliésteres está relacionada con la movilidad de las cadenas del polímero, la cual viene determinada por el grado de cristalinidad y la diferencia entre la temperatura de degradación y la temperatura de fusión o de transición vítrea (dependiendo de la cristalinidad del polímero) [25]. De hecho, en los polímeros semicristalinos como el PET, un alto porcentaje de cristalinidad afecta negativamente a la actividad de algunas enzimas, obstaculizando su degradación. Eso se debe a que, en las regiones amorfas, las cadenas del polímero están menos empaquetadas y su movilidad es mayor, resultando más accesibles para las enzimas y haciendo que estas partes sean más susceptibles a la biodegradación. En cambio, en la fracción cristalina las cadenas están ordenadas y fijadas por fuerzas intramoleculares, por lo que su movilidad es mucho menor [24,25,26]. Como consecuencia de ello, la biodegradación será más lenta en aquellos polímeros de PET que presenten mayor grado de cristalinidad.

También la temperatura afecta a la movilidad de las cadenas, ya que, las que forman parte de la fracción cristalina, se vuelven más desordenadas cuando se alcanza la temperatura de fusión ( $T_f$ ), lo mismo que sucede con las de la fracción amorfa cuando se alcanza la temperatura de

---

transición vítrea (Tg). En ambos casos, estas temperaturas son muy altas cuando se trata de poliésteres como el PET, de ahí que la degradación de este polímero se vea favorecida a altas temperaturas. Este comportamiento térmico peculiar del polímero supone un serio problema respecto a su biodegradación, ya que la mayor parte de las enzimas operan a temperaturas próximas a la ambiental [1,24,26, 27].

## **3.2 Hidrólisis del PET. Enzimas descritas.**

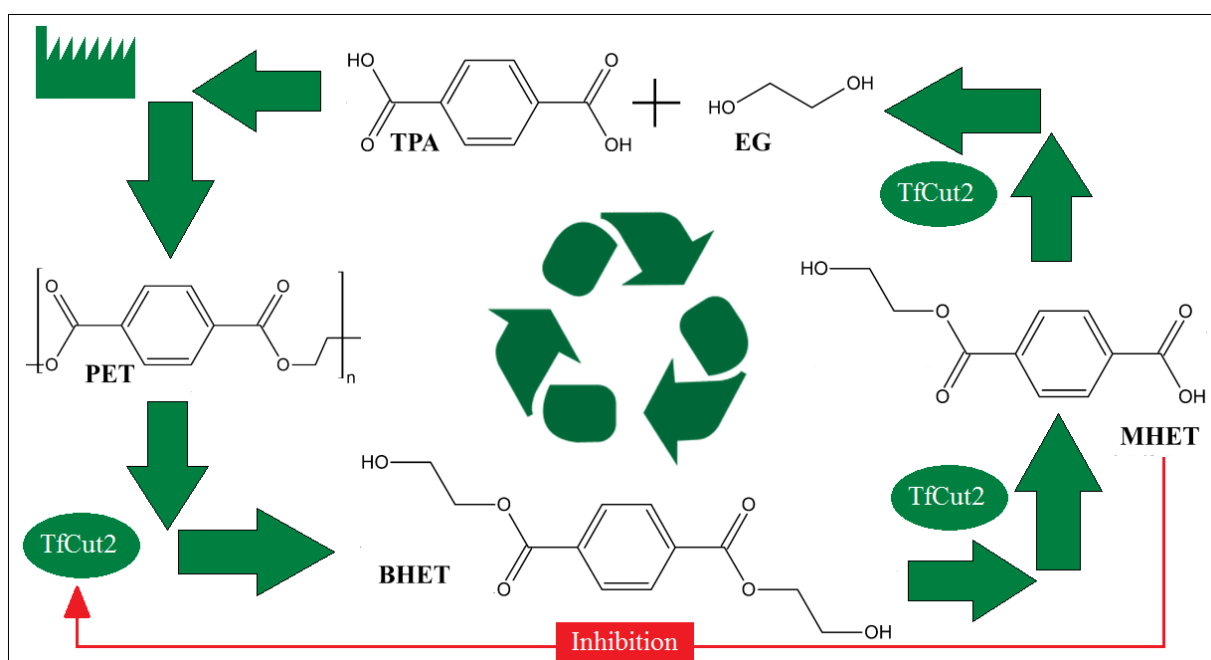
Las principales enzimas capaces de degradar PET son las hidrolasas, principalmente lipasas, esterases, carboxilesterasas y cutinasas [28], que pueden catalizar la escisión de los enlaces éster por medio de una reacción en la que se consume una molécula de agua. A continuación, se describen algunas de las enzimas que, de acuerdo con la bibliografía consultada, han destacado por su actividad hidrolítica sobre el PET. Asimismo, se mostrarán algunas de las estrategias propuestas para maximizar su rendimiento.

### **3.2.1 *Thermobifida fusca*. TfH, TfCut2, TfCa**

En el año 2005, Müller et al. [29] describen una hidrolasa extracelular, producida por un actinomiceto termófilo (*Thermobifida fusca* DSM 43793), que es capaz de despolimerizar el PET, demostrando por primera vez que este polímero puede ser hidrolizado por enzimas de manera efectiva y planteando la posibilidad de que el reciclaje biológico del PET, una opción considerada hasta entonces inviable, puede ser una alternativa para el tratamiento de este tipo de residuos plásticos. La enzima, denominada TfH, demostró tener una alta capacidad hidrolítica sobre el PET, si bien los materiales de PET utilizados en los experimentos presentaban dos características que hacían que su degradación fuera más fácil: una baja cristalinidad y una temperatura de transición vítrea próxima a la temperatura óptima de la enzima (55°C) [29]. En este estudio se sugiere que la gran actividad de la TfH para hidrolizar el PET se debe, en gran medida, a su termo-estabilidad, que le permite mantener su actividad a temperaturas altas. Además, la enzima presenta características estructurales que le permiten degradar con mayor facilidad las cadenas menos móviles del polímero [29].

Posteriormente, se describió una cutinasa, secretada por *T. fusca* KW3, que también presenta una gran actividad hidrolítica sobre el PET [30, 31]. La familia de las cutinasas está formada por enzimas que catalizan la ruptura de los enlaces ésteres de la cutina, sin embargo, se han descrito varias enzimas pertenecientes a esta familia que son capaces de degradar los enlaces ésteres del PET [26]. Esta cutinasa en concreto se denominó TfCut2 y entre sus características destaca, al igual que en la TfH, su termo-estabilidad [31]. En la reacción de hidrólisis del PET

catalizada por TfCut2 se producen diversos productos solubles, principalmente ácido mono(2-hidroxiethyl) tereftálico (MHET), junto con cantidades menores de ácido bis(2-hidroxiethyl) tereftálico (BHET) y TPA [31,32]. A pesar de su gran actividad hidrolítica, esta enzima presenta inconvenientes, ya que los productos intermedios MHET y BHET pueden ocupar el lugar del PET en el sitio de unión al sustrato y, en consecuencia, actuar como inhibidores competitivos de la TfCut2 [32]. La enzima también puede descomponer los intermedios MHET y BHET para producir EG y TPA, sin embargo, estos compuestos se degradan lentamente, especialmente el MHET. Como resultado, la concentración de MHET en el medio aumenta, provocando una disminución de la eficacia de TfCut2 para degradar el PET (**Figura 6**) [32]. Esta limitación plantea un grave problema de cara a utilizar esta enzima a gran escala para degradar este polímero [32].



**Figura 6:** Biodegradación de PET catalizada por la enzima TfCu2 de *T. fusca*, mostrando los productos intermedios (BHET y MHET), los productos finales (TPA y EG) y el efecto inhibitorio del MHET sobre la enzima. (basado en [32] y en <https://www.sciencedirect-com.accedys2.bbt.k.uill.es/science/article/pii/S1369703X14002964>)

Una de las estrategias planteadas para solventar este problema consiste en utilizar un sistema en el que intervienen dos enzimas: la cutinasa TfCut2, que es capaz de degradar las cadenas del polímero, y una carboxilesterasa (TfCa), también producida por *T. fusca* KW3, que es capaz de eliminar los intermedios procedentes de la hidrólisis del PET [33]. La utilización del sistema TfCut2+TfCa mejora notablemente el rendimiento obtenido con la TfCut2, observándose pérdidas de peso del 47,9% en láminas de PET incubadas durante 24 horas con las dos enzimas, frente al 20,4% obtenido en las incubaciones realizadas únicamente con TfCut2 [33]. Estudios como este demuestran las ventajas que supone utilizar un sistema que combina la actividad de

---

varias enzimas como estrategia para la biodegradación del PET, sin embargo, no deja de ser un estudio preliminar que requiere más desarrollo.

### **3.2.2 *Humicola insolens* y *Candida antarctica*. HiC y CALB**

Entre la diversidad de lipasas y cutinasas que presentan actividad hidrolítica sobre el PET, cabe destacar la cutinasa HiC, producida por el hongo termófilo *Humicola insolens*, y la lipasa B de la levadura *Candida antarctica* (CALB) [26,28,38]. Existen varios estudios en los que se describe que la actividad hidrolítica de la HiC es bastante superior a la de otras cutinasas y lipasas, llegando a provocar en láminas de PET de baja cristalinidad (7%), una pérdida de peso del 97% después de 96 horas de incubación a 70°C [26,28]. Según estos estudios, esta superioridad se debe principalmente a la termo-estabilidad de la enzima, que le permite mantener su actividad a 70-80°C. Esto implica que la hidrólisis del PET amorfo se produce a temperaturas muy cercanas a su temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>, 75°C), lo que, como ya se mencionó en apartados anteriores, hace que el polímero sea más susceptible a la degradación [26,28,34]. Sin embargo, la cutinasa HiC presenta limitaciones, ya que tiene una baja actividad a temperatura ambiente y es poco efectiva sobre polímeros de PET de alta cristalinidad [26]. Además, los intermediarios liberados por la hidrólisis (MHET y BHET) actúan como inhibidores competitivos, disminuyendo la efectividad de la enzima. Para resolver este problema también se ha planteado la utilización de sistemas que combinan, en este caso, la cutinasa HiC con una segunda enzima (CALB) que cataliza rápidamente la conversión de MHET en TPA, impidiendo de esta forma que el intermediario actúe como un inhibidor competitivo de la cutinasa [28,34]. Dado que las enzimas presentan rangos óptimos de temperatura distintos (30-60°C para la CALB y 35-70°C para la HiC), se diseñaron dos vías de actuación: en una de ellas, las enzimas se añaden simultáneamente y se incuban a una temperatura de 60°C; en la otra, las enzimas se añaden secuencialmente y se incuban a distintas temperaturas, haciendo uso en primer lugar de la HiC a 60°C y, tras catorce días, de la CALB a 37°C [28]. En ambos casos se demostró que la sinergia entre las enzimas mejora el rendimiento de la degradación llevada a cabo por HiC, especialmente cuando se utilizan de forma secuencial [28,34]. Al igual que el caso expuesto en el apartado anterior, este estudio supone una vía sumamente interesante de cara al futuro, en la que se plantea la utilización de sistemas duales de enzimas para degradar totalmente el PET. Sin embargo, es necesario seguir desarrollándola para poder aplicarla a gran escala.

---

### 3.3 *Ideonella sakaiensis*, una bacteria capaz de degradar y asimilar el PET

#### 3.3.1 Aislamiento y caracterización.

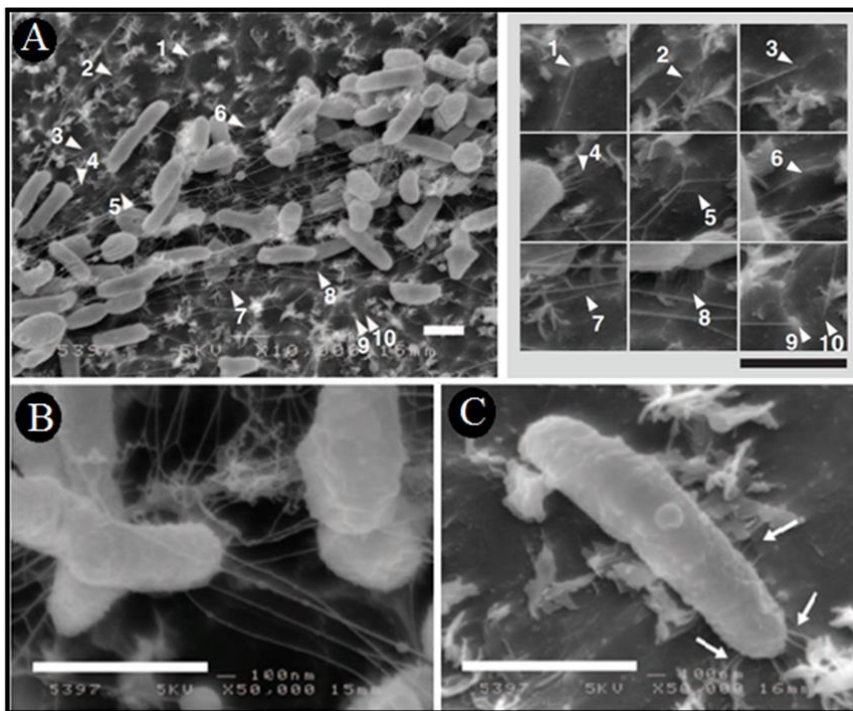
En 2016, Yoshida et al. [35] describieron una bacteria que, por sí sola, es capaz de degradar completamente el PET, utilizando este sustrato como fuente de carbono y energía. En este estudio, se recolectaron 250 muestras de ambientes contaminados con este tipo de desechos, incluyendo sedimentos, suelos, aguas residuales y lodos activados. En una de las muestras de sedimento, se puso de manifiesto la existencia de un consorcio microbiano, identificado como “no. 46”, capaz de producir alteraciones significativas sobre láminas de PET de baja cristalinidad (1,9%). A partir de este consorcio se aisló una cepa bacteriana del género *Ideonella* (*I. sakaiensis* 201-F6), que parecía estar implicada en la actividad biodegradadora del mismo. Esta hipótesis se vio sustentada por el hallazgo de un sub-consorcio que había perdido la capacidad para degradar el PET y carecía de *I. sakaiensis*, lo que sugiere que la capacidad biodegradadora del consorcio original se debía a la presencia de esta bacteria [35]. Al igual que el resto de especies del género *Ideonella*, *I. sakaiensis* pertenece a la familia *Comamonadaceae* de la clase *Betaproteobacteria*. Las bacterias de esta especie son bacilos Gram-negativos, aerobios, no formadores de esporas y móviles, con un flagelo polar (**Figura 7**) [36]. Con respecto al pH, su rango de crecimiento está entre 5.5 y 9, siendo el pH óptimo 7-7,5. En cuanto a la temperatura, son bacterias mesófilas que crecen entre 15°C y 42°C, con una temperatura óptima de 30-37°C y cuyo crecimiento se ve totalmente inhibido a 45°C. Por otra parte, se trata de bacterias no halófilas, incapaces de crecer en presencia de NaCl al 3% [36].



**Figura 7:** Micrografía electrónica de transmisión de una célula de *I. sakaiensis* 201- F6T [36]



Las células de *I. sakaiensis* presentan una serie de apéndices que les permiten conectarse entre ellas, adherirse a la superficie del plástico y colonizarlo, tal y como se muestra en la **Figura 8** [35]. La existencia de estos apéndices también facilita la secreción de enzimas extracelulares sobre el sustrato, de forma que se considera que juegan un papel importante en la actividad biodegradativa de la bacteria [35]. Sin embargo, la razón principal por la que *I. sakaiensis* es capaz de degradar el PET y utilizarlo como fuente de carbono y energía, es su capacidad para producir dos enzimas hidrolíticas, denominadas PETasa y MHETasa, que atacan al polímero y a sus intermediarios para transformarlos en monómeros fácilmente asimilables por la célula [35,36]. Por tanto, para comprender el mecanismo que permite a esta bacteria utilizar el PET como recurso, es preciso dilucidar la estructura de estas enzimas y establecer las diferencias que pueden presentar con respecto a otras enzimas degradadoras de PET. Este conocimiento puede sentar las bases para desarrollar nuevas cepas más eficaces que proporcionen una solución real a la acumulación de PET en el medio ambiente.

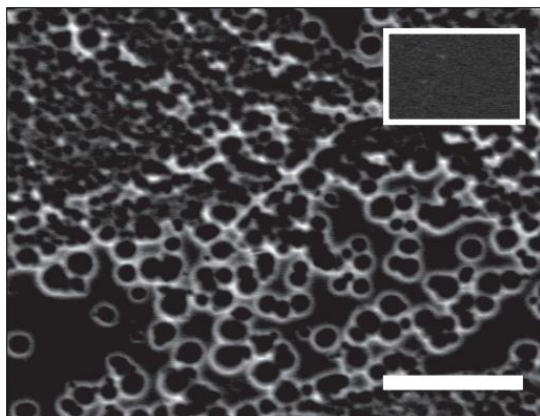


**Figura 8:** Micrografías electrónicas de barrido que muestran la colonización de una lámina de PET por *I. sakaiensis* 201-F6. En la imagen A, las fechas indican los puntos de contacto de los apéndices de las bacterias con la superficie del PET. La Imagen B muestra células aparentemente unidas entre sí por medio de estos apéndices. En la imagen C, detalle de una célula de *I. sakaiensis* unida a la superficie del PET a través de los apéndices de la bacteria (señalados por fechas) [35].

### 3.3.2 La PETasa. Características estructurales y mecanismos moleculares.

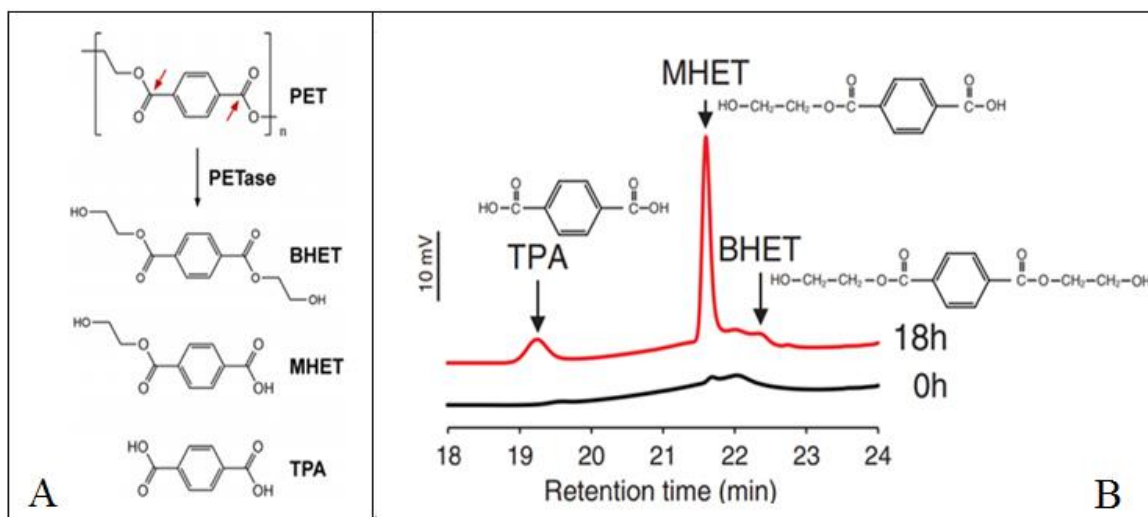
En su trabajo, Yoshida et al. [35] lograron identificar, mediante análisis genéticos y bioquímicos, las enzimas de *I. sakaiensis* implicadas en la hidrólisis del PET. A partir del genoma de la bacteria, se identificó un marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) que codificaba una supuesta lipasa, cuya secuencia de aminoácidos presentaba una homología del 51% con respecto a la hidrolasa TfH de *T. fusca* [35,37]. Una vez purificada, la proteína se incubó con una lámina de PET a 30°C. Después de 18 horas de incubación, se observó, por un

lado, la aparición de oquedades en la superficie del plástico (**Figura 9**) y, por otro, la liberación de intermediarios provenientes de la hidrólisis del PET, ambos hechos indicativos de la capacidad hidrolítica de dicha proteína [35].



**Figura 9:** Micrografía electrónica de barrido de la superficie de una película de PET tras 18 horas de incubación con la enzima PETasa a 30°C. El recuadro muestra una imagen de la película de PET intacta. La barra de escala es de 5 mm [35].

Esta enzima extracelular, denominada PETasa, es capaz de hidrolizar el PET liberando principalmente MHET, junto con cantidades menores de BHET y TPA (**Figura 10**) [35,37 ,38 ,39]. La PETasa también es capaz de actuar sobre uno de los intermediarios, el BHET, cuya hidrólisis produce MHET [35]. Cuando la actividad de la PETasa se compara con la de otras enzimas que hidrolizan PET como, por ejemplo, la Tfh de *T. fusca*, se observa que la actividad de la PETasa sobre ésteres alifáticos unidos a *p*-nitrofenol, es menor que la de Tfh. Sin embargo, cuando se utiliza PET como sustrato, la actividad de la PETasa es 120 veces mayor que la de Tfh, y lo mismo sucede con el BHET [35]. Estos resultados indican que la PETasa tiene una mayor especificidad por el PET y el BHET que otras enzimas hidrolíticas descritas previamente. Además, la PETasa es ligeramente termolábil y muestra una buena actividad a 30°C, una temperatura considerablemente más baja que la requerida por otras enzimas degradadoras de PET [35,37]. Así pues, la PETasa presenta dos características que la convierten en una enzima más eficaz que otras hidrolasas de PET descritas previamente: en primer lugar, una mayor afinidad por el PET y el BHET como sustratos y, en segundo, su capacidad para actuar sobre el polímero a temperatura ambiente.



**Figura 10:** La imagen A [39] muestra los productos generados por la acción de la PETasa sobre el PET (BHET, MHET, TPA), con indicación de los enlaces susceptibles de ser hidrolizados por la enzima (flechas rojas). La imagen B [35] muestra la detección, mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), de dichos productos después de una incubación de 18 horas a 30°C.

Tal y como se ha mencionado, la PETasa comparte cierto grado de identidad de secuencia con enzimas de tipo cutinasas, capaces de hidrolizar el PET. Sin embargo, la PETasa muestra algunas características estructurales únicas, a las que cabe atribuir las diferencias observadas entre la PETasa y otras enzimas degradadoras de PET, en relación con su actividad hidrolítica sobre el polímero. Recientemente, varios grupos de investigación han descrito la estructura cristalina de la PETasa, con el fin de determinar dichas características y dilucidar el mecanismo molecular de la enzima [39-43].

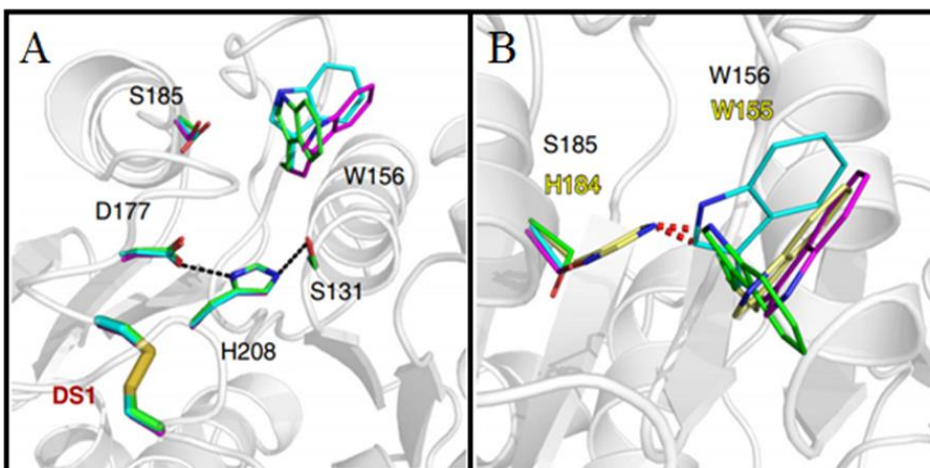
La PETasa presenta el pliegue característico de la superfamilia de las  $\alpha/\beta$  hidrolasas, con una lámina  $\beta$  central retorcida que consta de nueve hebras  $\beta$  conectadas por seis hélices  $\alpha$  [39,41,42,43]. En su sitio activo presenta una tríada catalítica formada por serina, histidina y aspártico (S131-H208-D177), fácilmente reconocible gracias a su homología con algunas cutinasas (**Figura 11**) [39,41]. De acuerdo con los estudios realizados, el surco superficial que se localiza sobre la serina nucleofílica conforma el bolsillo de unión al sustrato. Según estos estudios, el sitio activo de la PETasa es más amplio que el de otras cutinasas, lo que podría explicar por qué puede unirse a un sustrato tan voluminoso como el PET. Sin embargo, como ya se ha indicado, los residuos que conforman el bolsillo de unión de la PETasa están altamente conservados en enzimas homólogas, lo que sugiere la existencia de otros factores que confieren al bolsillo de unión de la PETasa una estructura peculiar [39].

En primer lugar, la PETasa tiene dos puentes disulfuro intramoleculares (DS1 y DS2), a diferencia de otras enzimas homólogas que presentan uno solo (DS2). El puente DS2 conecta

la hélice C-terminal con el último bucle, mientras que el puente DS1 permite la unión de los bucles b7-a5 y b8-a6, que albergan, respectivamente, el ácido catalítico (D177) y la base catalítica (H208) (**Figura 11**) [39,40,41]. Diversos estudios sugieren que el deterioro del puente disulfuro DS1, específico de la PETasa, lleva a una disminución de la actividad catalítica de la enzima, lo que implica que dicho enlace juega un papel fundamental en su capacidad para hidrolizar PET [39,41].

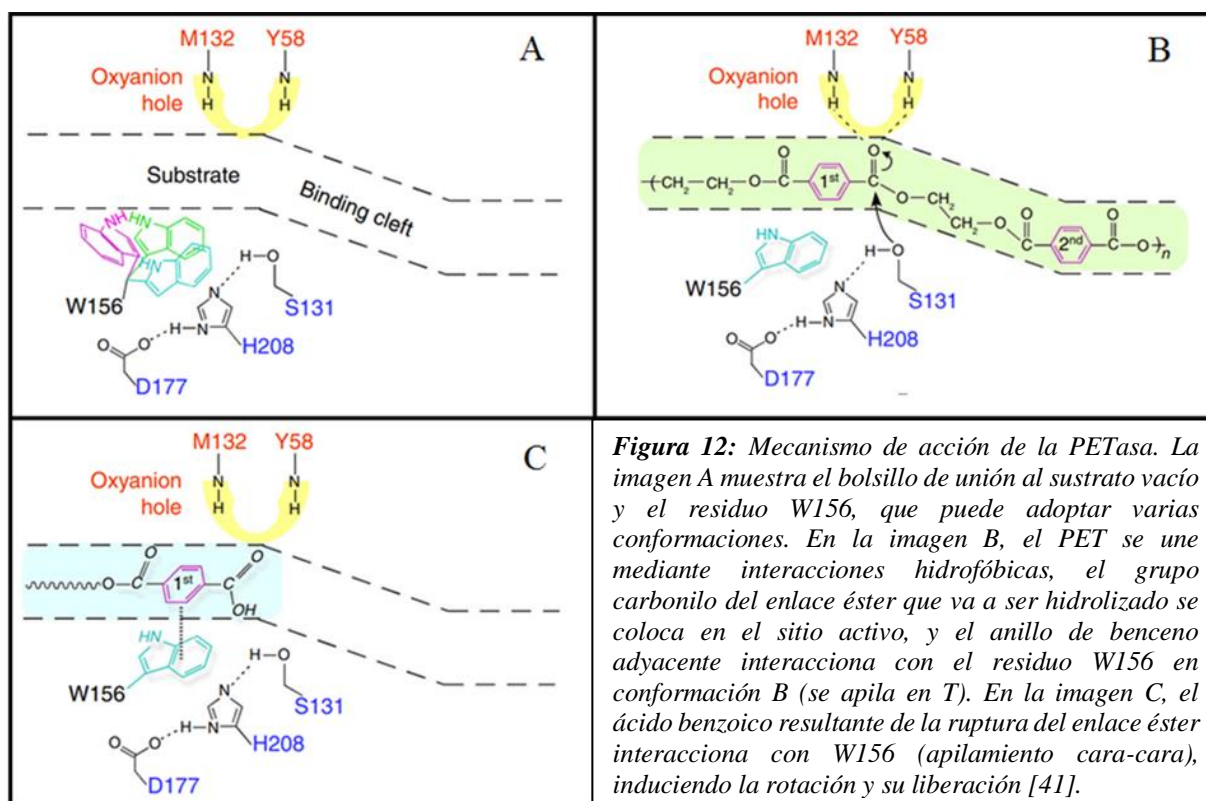
En segundo lugar, el bucle b8-a6 de la PETasa posee tres aminoácidos más que el de otras enzimas homólogas. Se ha propuesto que este bucle extendido proporciona un espacio más amplio que permite la unión del PET a la enzima. Del mismo modo, es probable que el puente disulfuro DS1 sea necesario para mantener el bucle y los residuos de la tríada catalítica en sus posiciones funcionales [39,40].

Por último, la PETasa presenta un residuo de triptófano (W156), localizado cerca del centro catalítico, que es capaz de adoptar tres conformaciones distintas en la estructura cristalina (A, B y C), mientras que, en otras enzimas homólogas, el residuo Trp equivalente solo permite la conformación C. Este cambio conformacional, único de la PETasa, se denomina “bamboleo de W156” (*W156 wobbling*) y puede estar involucrado en la unión al sustrato [39,41]. El análisis de los residuos adyacentes a W156 han puesto de manifiesto la existencia de un residuo de serina (S185) distintivo de la PETasa, que es remplazado por un residuo de histidina en otras enzimas homólogas (**Figura 11**). Se ha propuesto que el residuo de serina, al poseer un tamaño menor que la histidina, permite que el residuo W156 de la PETasa tenga espacio para rotar, pudiendo cambiar de conformación, mientras que, en otras enzimas homólogas, la histidina restringe dicha movilidad y se mantiene la conformación C. Estudios mutagénicos han demostrado que un mutante S185H presenta una actividad hidrolítica del PET mucho menor.



**Figura 11:** La imagen A muestra la estructura de la PETasa, con la tríada catalítica S131-H208-D177, los residuos S185 y W156, y el puente disulfuro DS1, específico de la PETasa, uniendo de los bucles b7-a5 y b8-a6. La imagen B muestra la estructura de la hidrolasa de *T. fusca*, con los residuos equivalentes de W156 y S185 en color amarillo [41].

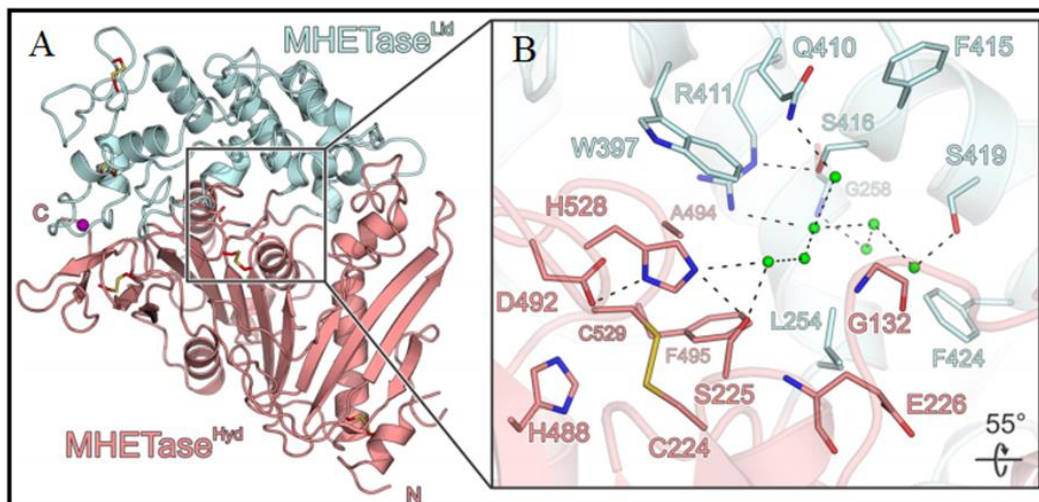
Todos estos estudios han permitido dilucidar el modelo de unión al sustrato de la PETasa y proponer el mecanismo de acción de la enzima que se muestra en la **Figura 12** [39,41]. De acuerdo con el mecanismo propuesto, la PETasa posee una hendidura superficial en la que W156 puede adoptar varias conformaciones. Para que el sustrato se una a la enzima, W156 debe estar en conformación B, aportando la fuerza de apilamiento T (interacción borde-cara) necesaria para la unión del sustrato [39]. Cuando el PET se une al bolsillo mediante interacciones hidrofóbicas, el grupo carbonilo se posiciona en el centro catalítico y el átomo de oxígeno de este grupo queda enfrente al agujero de oxianión. A continuación, la tríada catalítica lleva a cabo un ataque nucleofílico y el agujero de oxianión, polariza el enlace éster y estabiliza la reacción intermedia. La consecuente formación del intermediario acilenzima, y un segundo ataque nucleofílico por parte de una molécula de agua, provoca la escisión del enlace éster. El ácido benzoico resultante, que presenta una superficie plana de gran amplitud, es susceptible de interactuar con la cadena lateral de W156 (apilamiento  $\pi$ ), lo que provoca que el producto rote y sea liberado [39,41].



### 3.3.3 La MHETasa. Características estructurales y mecanismos moleculares.

Yoshida et al. [35] también observaron que los niveles de transcripción del gen que codifica la PETasa aumentaban considerablemente cuando la bacteria crecía en presencia de PET, lo que sugiere que la expresión de la PETasa es inducida por la presencia de este sustrato. Durante sus

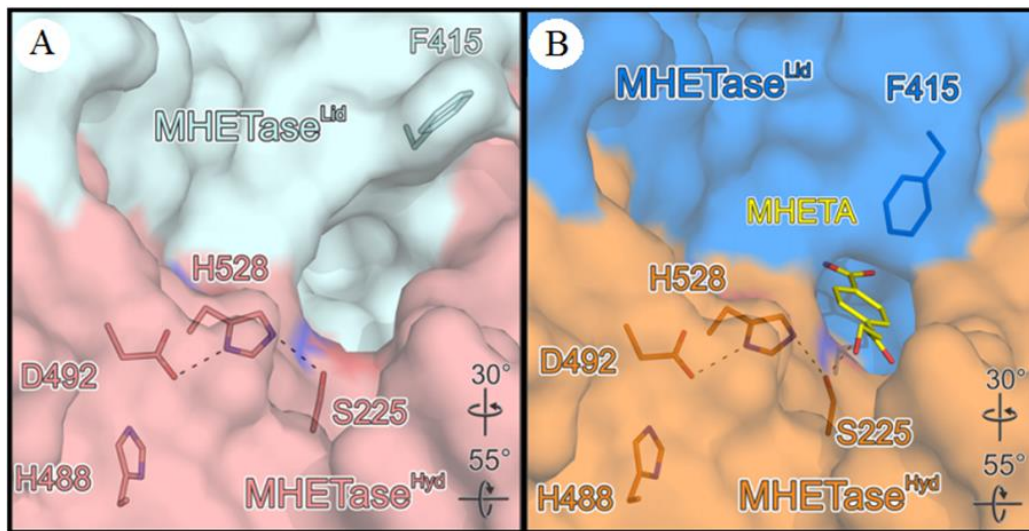
estudios, estos investigadores se percataron de que existía otro ORF cuyos niveles de expresión eran similares a los del gen de la PETasa [35]. Al purificar la proteína que codificaba, se observó que degradaba eficientemente el MHET, pero no presentaba ninguna actividad frente al PET, BHET o esteres alifáticos unidos a *p*-nitrofenol [35,36,38]. Esto sugiere que la proteína actúa específicamente sobre el MHET y que es la responsable de su conversión en TPA y EG. Esta enzima fue bautizada como MHETasa y recientemente se ha logrado determinar su estructura cristalina en su forma libre de ligando y unida a un análogo de MHET no hidrolizable (MHETA) [44]. Según análisis filogenéticos, la MHETasa se agrupa con las feruloil esterasas y tanasas del bloque X en la base de datos ESTHER [44]. Al igual que la PETasa, presenta el pliegue característico de la superfamilia  $\alpha/\beta$  hidrolasa, sin embargo, a diferencia de ella, la MHETasa tiene una estructura bipartida que consta de un dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa y un dominio tapa, insertado entre la cadena  $\beta$  7 y la hélice  $\alpha$  15 del pliegue  $\alpha/\beta$ -hidrolasa (**Figura 13**) [38,44].



**Figura 13:** En la imagen de la izquierda (A), podemos observar la estructura bipartida de la MHETasa, con el dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa en color salmón y el dominio tapa en azul claro. También se pueden observar en rojo y amarillo los puentes disulfuro. En la imagen B, detalle de la tríada catalítica y el agujero de oxianión, con moléculas de agua (en verde) ocupando el sitio de unión al sustrato en ausencia de este [44].

El dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa de la MHETasa está bien conservado en otras enzimas homólogas pertenecientes al mismo grupo. En este dominio se encuentra la tríada catalítica (S225- H528- D492), flanqueada por uno de los cinco enlaces disulfuro que presenta la enzima, y el agujero oxianión que comprende los átomos de nitrógeno del grupo amida de los residuos de glicina G132 y glutámico E226 [44]. El dominio tapa, aunque está presente en otras enzimas (como las feruloil esterasas de *Aspergillus oryzae*), está menos conservado, presentando cambios considerables en la secuencia de aminoácidos. Cuando la MHETasa se encuentra en su forma libre de sustrato, el centro catalítico está ocupado por moléculas de agua. Cuando la MHETasa se une al sustrato (en este caso, el análogo no hidrolizable de MHET, MHETA) la conformación

de la enzima es prácticamente idéntica, a excepción de unas ligeras modificaciones en su estructura. En el dominio tapa existen tres residuos: fenilalanina (F415), leucina (L254) y aspártico (W397), que interaccionan estrechamente con el sustrato. Se ha descrito que la unión del sustrato a la enzima provoca que el residuo F415 de la tapa rote 180°, cerrando el sitio activo y consolidando la interacción (**Figura 14**) [44]. Esto indica que la especificidad de la enzima por el sustrato se debe casi exclusivamente al dominio tapa, que permite que la unión entre el sustrato y la enzima sea muy fuerte, a diferencia de la PETasa [38,44].

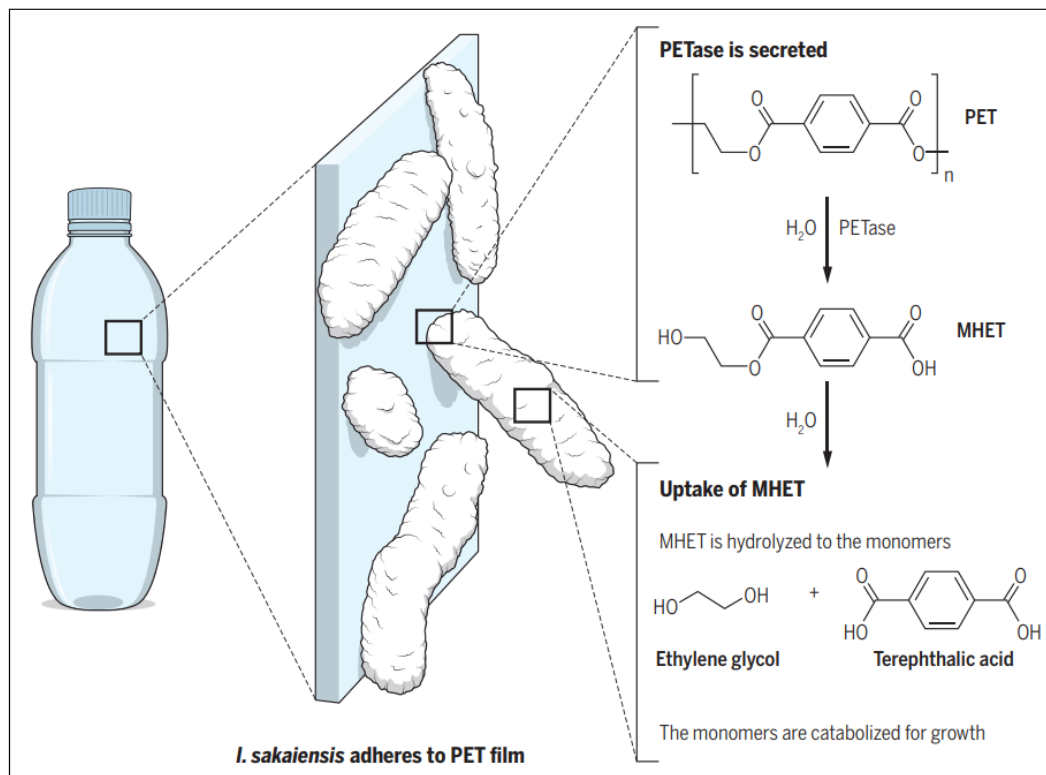


**Figura 14:** La imagen A muestra la MHETasa en su forma libre de sustrato, con el dominio tapa de color azul claro y el dominio  $\alpha/\beta$  hidrolasa de color salmón. La imagen B muestra cómo la unión del MHETA induce que el residuo de tapa F415 gire 180° hacia el sustrato, interaccionando con él y consolidando la unión enzima-sustrato [44].

### 3.3.4 Mecanismo global de *Ideonella sakaiensis*. Un paso adelante para solventar el problema ambiental que supone el PET.

Así pues, *I. sakaiensis* es capaz de colonizar láminas de PET, formando un biofilm sobre la superficie del plástico, y secretar una enzima extracelular, la PETasa, capaz de romper los enlaces éster que unen los monómeros del polímero, produciendo principalmente MHET. El MHET es asimilado por la célula y sufre el ataque de una enzima intracelular, la MHETasa, que lo descompone en EG y TPA. Estos últimos compuestos entran en distintas vías catabólicas y son metabolizados por las células, degradándolos hasta  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (**Figura 15**) [37,38,45]. El descubrimiento de *I. sakaiensis*, una bacteria que es capaz, por sí sola, de mineralizar el PET amorfo a temperatura ambiente y que también presenta actividad sobre el PET cristalino, supone un gran avance en la búsqueda de microorganismos degradadores de plástico. Actualmente, *I. sakaiensis* se ha convertido en uno de los modelos mejor estudiados y, a partir de los conocimientos adquiridos en el estudio de esta bacteria y sus enzimas, se han generado

nuevas líneas de investigación que comentaremos a continuación [45]. Sin embargo, debemos tener en cuenta que las tasas de degradación obtenidas hasta ahora siguen siendo demasiado bajas para su aplicación a gran escala.



**Figura 15:** *I. sakaiensis* es capaz de adherirse a la superficie de una película de PET y secretar una enzima extracelular, la PETasa, que degrada las cadenas del polímero liberando MHET. El MHET es asimilado por la célula y convertido en TPA y EG gracias a la MHETasa [37].

## 4. Situación actual y perspectivas futuras en la biodegradación del PET

Sin duda alguna, esta revisión bibliográfica plantea diferentes enfoques para tratar de resolver el problema global que supone el plástico. De entre las distintas aproximaciones, la biodegradación se expone como una de las vías más prometedoras, no obstante, las carencias de este método se hacen patentes, reafirmando el gran desafío que aún supone la biodegradación de los residuos plásticos hoy en día. Entre los distintos poliésteres sintéticos, el PET es probablemente el más conocido y de uso más extendido a nivel global, así como uno de los plásticos cuya biodegradación se ha estudiado en mayor profundidad. Esto se debe, entre otras razones, a la naturaleza hidrolizable de los enlaces éster que unen sus monómeros, que lo convierten en un polímero más susceptible a la degradación enzimática que otros polímeros sintéticos, cuyos esqueletos solo contienen enlaces C-C [47]. A raíz de estos estudios, se han descubierto y descrito diversas enzimas con actividad hidrolítica sobre el PET, sin embargo, la



---

mayor parte de estas enzimas presentan limitaciones: por ejemplo, la mayoría solo poseen actividad hidrolítica frente a PET amorfo, siendo incapaces de degradar el PET de alta cristalinidad, como el que compone la mayoría de las botellas y fibras textiles (cristalinidad de un 30-40%) [48]. Por otra parte, aquellas enzimas que presentan una actividad alta requieren, en general, altas temperaturas, cercanas a la Tg del polímero. Este hecho puede obstaculizar el diseño de sistemas biológicos para el reciclaje del PET o para remediar el problema de la acumulación del plástico en el medio ambiente, donde las temperaturas son mucho menores que la Tg del PET. Por último, muchas de las enzimas que presentan actividad hidrolítica sobre el PET, en especial las cutinasas, son inhibidas por los intermediarios mayoritarios de la hidrólisis del polímero, el MHET y el BHET, limitando en gran medida su actividad.

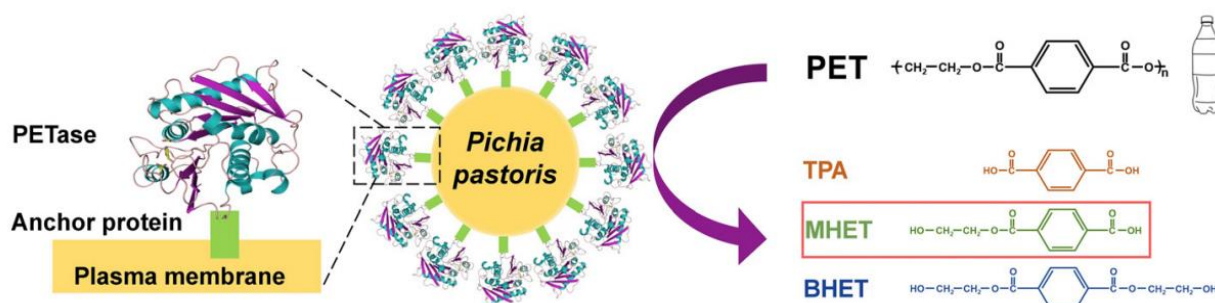
En este último caso, una de las soluciones que se han planteado consiste en el diseño de un reactor biológico de membrana que permita eliminar estos intermediarios del medio continuamente, reduciendo considerablemente la inhibición de la enzima [49]. A pesar de su utilidad, este método también presenta una serie de problemas, puesto que se requieren grandes cantidades de tampón del medio para mantener una tasa adecuada de dilución en el reactor de membrana, y que solo se obtienen pequeñas concentraciones de los productos de la hidrólisis del PET [33].

Una alternativa a los problemas anteriormente considerados sería el empleo de mezclas o sistemas duales de enzimas (ya comentados en apartados anteriores) que comprendan una hidrolasa, responsable de la degradación de las cadenas del polímero y producción de compuestos intermediarios y, otra enzima, capaz de eliminar dichos intermediarios [28,33,34]. Estos estudios abren paso a futuras vías de investigación en los que se deberá optimizar las condiciones de la reacción (temperatura, pH...), así como la proporción de las enzimas.

Por otro lado, el descubrimiento de las enzimas PETasa y MHETasa de *I. sakaiensis*, y la posterior resolución de sus estructuras cristalinas, ha abierto un gran abanico de posibilidades en lo que se refiere al bio-reciclaje de polímeros sintéticos. Respecto a la PETasa, algunos trabajos sugieren que, de cara al futuro, será de vital importancia continuar buscando y aislando microorganismos y enzimas que, por una parte, sean capaces de degradar el PET a altas temperaturas (dado que la PETasa de *I. sakaiensis* es ligeramente termolábil) [45,47] y, por otra, que los microorganismos productores toleren ambientes con altas salinidades, de tal forma que las enzimas secretadas fueran resistentes a la salinidad. En tal caso, no cabe duda de que ello supondría un avance significativo para abordar la posible eliminación de este tipo de residuos en ambientes marinos. [45].

Por otra parte, gracias a los avances obtenidos en los estudios moleculares realizados sobre la estructura y mecanismos de acción de las enzimas PETasa y MHETasa, es posible afrontar una nueva y prometedora alternativa basada en el diseño de nuevas hidrolasas de PET que presenten una mayor especificidad por el sustrato, así como una actividad catalítica mejorada [42]. De hecho, algunos estudios plantean que la modificación racional de ciertos residuos de la PETasa y la MHETasa puede aumentar su termoestabilidad, así como su eficiencia catalítica frente a PET altamente cristalizado. Ello permitiría el diseño de un sistema de bio-reciclaje de PET a temperaturas más elevadas, donde la cristalinidad del polímero se vea reducida y la degradación sea más fácil [39,45]. La posible obtención de enzimas de esta índole puede propiciar una mejora significativa en el desarrollo de una industria sostenible de bio-reciclaje de PET.

Más recientemente, Chen et al. [46] han propuesto y desarrollado un sistema en el que la PETasa se dispone en la superficie celular de una levadura (*Pichia pastoris*), con el fin de aumentar la actividad degradadora de la enzima frente a PET altamente cristalino. Es la primera vez que se describe el desarrollo de un biocatalizador con células enteras a las que se enlaza superficialmente la enzima PETasa (**Figura 16**) [46]. El estudio demuestra, no sólo que la PETasa puede mantener la funcionalidad al unirse a la superficie celular de la levadura, sino que, además, la actividad enzimática de este sistema frente a PET altamente cristalino es 36 veces mayor que la actividad mostrada por la PETasa purificada. Los autores de este estudio también plantean futuras líneas de investigación encaminadas, no sólo a optimizar el uso de estos sistemas mediante el ensayo de nuevas proteínas de anclaje (un aspecto crucial en este tipo de sistemas ya que afectan a la actividad enzimática) sino, también, a desarrollar sistemas de anclaje a la superficie celular que aumenten la termo-estabilidad de la PETasa o, en la línea de lo comentado anteriormente, utilizar PETasas mutantes, que presenten una actividad hidrolítica mejorada, para incrementar la tasa de degradación del sistema.



**Figura 16:** Biocatalizador desarrollado por Chen et al., con la PETasa unida, mediante una proteína de anclaje, a la superficie celular de la levadura *Pichia pastoris* [46]

---

## 5. Conclusiones

A tenor de las consideraciones anteriormente descritas y, en virtud del estado actual de nuestros conocimientos relativos a la biodegradación del polímero plástico polietilentereftalato (PET), podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. La biodegradación de los polímeros plásticos supone una alternativa más económica y respetuosa con la naturaleza para afrontar los problemas medioambientales y sanitarios derivados de la acumulación de estos residuos, tanto en ambientes marinos como terrestres.
2. Dada la relevancia industrial y socioeconómica del PET, los estudios llevados a cabo sobre su biodegradación han causado un gran impacto científico y social. Dichos estudios han demostrado, por primera vez, la capacidad de una bacteria, *Ideonella sakaiensis*, para degradar un polímero plástico de origen petroquímico.
3. Hasta ahora, las enzimas estudiadas con actividad hidrolítica sobre PET muestran una baja actividad enzimática. De hecho, se muestran incapaces de hidrolizar PET con alto porcentaje de cristalización y, las que presentan mayor actividad enzimática, requieren altas temperaturas para ejercer su actividad catalítica. Además, la liberación de intermediarios, como el MHET y BHET, puede inhibir la actividad enzimática.
4. Se han descrito algunas enzimas termoestables, una hidrolasa (TfH) y dos cutinasas (TfCut2 e HiC), producidas por *Thermobifida fusca* y *Humicola insolens*, que presentan una actividad hidrolítica destacable frente a PET amorfo. En ambos casos, la actividad biodegradadora puede ser mejorada utilizando sistemas duales formados por una cutinasa (TfCut2 o HiC) y una carboxilesterasa (TfCa de *Thermobifida fusca*), o una lipasa (CALB de *Candida antarctica*). La función de las enzimas carboxilesterasa y lipasa, es evitar la inhibición producida por los dos principales metabolitos resultantes del proceso hidrolítico, MHET y BHET.
5. La PETasa y la MHETasa, producidas por *Ideonella sakaiensis*, presentan una mayor especificidad por el PET y el MHET como sustratos que otras enzimas. Además, estas enzimas son capaces de actuar a temperatura ambiente (30°C) y la PETasa presenta cierta capacidad hidrolítica frente a PET cristalino. El estudio de su estructura cristalina y la determinación de sus características únicas, han permitido, a la luz de nuestro conocimiento actual, abrir nuevas líneas de investigación con el fin de descubrir y desarrollar nuevas enzimas o tomar en consideración la modificación de otras preexistentes.
6. Los grandes avances alcanzados en los estudios sobre la biodegradación del PET dejan claro que aún está lejos la implantación de sistemas de bio-reciclaje a gran escala. A pesar de ello,

---

estos avances nos acercan, un poco más, a un futuro en el que la industria del bio-reciclaje del PET, pueda llegar a ser rentable y respetuosa con el medio ambiente.

## Conclusions:

Based on the considerations described before and on the current state of our knowledge regarding the biodegradation of the plastic polymer polyethylene terephthalate (PET), we can draw the following conclusions:

1. The biodegradation of plastic polymers is a more economical and respectful alternative facing the environmental and sanitary problems derived from the accumulation of these residues, both in marine and terrestrial environments.
2. Given the industrial and socio-economic relevance of PET, the studies carried out on its biodegradation have a great scientific and social impact. These studies have shown, for the first time, the ability of a bacterium, *Ideonella sakaiensis*, to degrade a plastic polymer of petrochemical origin.
3. Until now, the enzymes studied with hydrolytic activity on PET show low enzyme activity. In fact, they are unable to hydrolyze PET with a high percentage of crystallization, and those with the highest enzymatic activity require high temperatures to exert their catalytic activity. Furthermore, the release of intermediates, such as MHET and BHET, can inhibit enzyme activity.
4. Some thermostable enzymes have been described as one hydrolase (TfH) and two cutinases (TfCut2 and HiC), produced by *Thermobifida fusca* and *Humicola insolens*. They show remarkable hydrolytic activity against amorphous PET. In both cases, the biodegradable activity can be improved using dual systems consisting of a cutinase (TfCut2 or HiC) and a carboxylesterase (TfCa of *Thermobifida fusca*), or a lipase (CALB of *Candida antarctica*). The function of the carboxylesterase and lipase enzymes is to avoid the inhibition produced by the two main metabolites resulting from the hydrolytic process, MHET and BHET.
5. PETase and MHETase, produced by *Ideonella sakaiensis*, have a higher specificity for PET and MHET as substrates than other enzymes. Furthermore, these enzymes are active at room temperature (30°C) and PETase has a certain hydrolytic ability against crystalline PET. The study of its crystalline structure and the determination of its unique characteristics have allowed, in the light of our current knowledge, to open new lines of research in order to discover and develop new enzymes or the modification of already known ones.

- 
6. The great advances made in studies on the biodegradation of PET make it clear that the introduction of large-scale bio-recycling systems is still a long way off. Despite this, these advances bring us a little closer to a future in which the PET bio-recycling industry can become profitable and respectful of the environment.

## Bibliografía

- [1] **Glaser, J. A.** 2019. Biological Degradation of Polymers in the Environment, p.1-22. En: Gomiero, A. (ed.) *Plastics in the Environment*.
- [2] **Narancic, T. y O'Connor, K. E.** 2019. Plastic waste as a global challenge: are biodegradable plastics the answer to the plastic waste problem?. *Microbiology*. Vol. 165, p. 129-137.
- [3] **Jacquin, J., Cheng, J., Odobel, C., Pandin, C., Conan, P., et al.** 2019. Microbial Ecotoxicology of Marine Plastic Debris: A Review on Colonization and Biodegradation by the "Plastisphere". *Frontiers in Microbiology*. Vol. 10, p. 1-16.
- [4] **Posada Bustamante, B.** 2012. La degradación de los plásticos, *Revista Universidad EAFIT*, Vol. 30, p. 67-86.
- [5] **Krueger, M. C., Harms, H. y Schlosser, D.** 2015. Prospects for microbiological solutions to environmental pollution with plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol. 99, p. 8857-8874.
- [6] **Zhang, S., Wang, J., Liu, X., Qu, F., Wang, X., et al.** 2019. Microplastics in the environment: A review of analytical methods, distribution, and biological effects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 111, p. 62-72.
- [7] **Yang, Y., Liu, G., Song, W., Ye, C., Lin, H., et al.** 2019. Plastics in the marine environment are reservoirs for antibiotic and metal resistance genes. *Environment International*. Vol. 123, p. 79-86.
- [8] **Arias-Andres, M., Rojas-Jimenez, K. and Grossart, H-P.** 2019. Collateral effects of microplastic pollution on aquatic microorganisms: An ecological perspective. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. Vol. 112, p. 234-240.
- [9] **Groh, K. J., Backhaus, T., Carney-Almroth, B., Geueke, B., Inostroza, P. A., et al.** 2019. Overview of known plastic packaging-associated chemicals and their hazards. *Science of The Total Environment*. Vol. 651, p. 3253-3268.
- [10] **Lithner, D., Larsson, Å. y Dave, G.** 2011. Environmental and health hazard ranking and assessment of plastic polymers based on chemical composition. *Science of The Total Environment*. Vol. 409, p. 3309-3324.
- [11] **Meng, K., Ren, W., Teng, Y., Wang, B., Han, Y., et al.** 2019. Application of biodegradable seedling trays in Paddy fields: Impacts on the microbial community. *Science of The Total Environment*. Vol. 656, p. 750-759.
- [12] **Nazareth, M., Marques, M. R., Leite, M. C. y Castro, Í. B.** 2019. Commercial plastics claiming biodegradable status: Is this also accurate for marine environments? *Journal of Hazardous Materials*. Vol. 366, p. 714-722.
- [13] **Plastics Europe.** *Plastics-The Facts 2019* (<https://www.plasticseurope.org/es/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>)
- [14] **Hopewell, J., Dvorak, R. y Kosior, E.** 2009. Plastics recycling: Challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, Vol. 364, p. 2115-2126.
- [15] **Farzi, A., Dehnad, A. y Fotouhi, A. F.** 2019. Biodegradation of polyethylene terephthalate waste using *Streptomyces* species and kinetic modeling of the process. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Vol. 17, p. 25-31.
- [16] **Sinha, V., Patel, M. R., y Patel, J. V.** 2008. Pet Waste Management by Chemical Recycling: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, Vol. 18, p. 8-25

- 
- [17] **Sharon, C. y Sharon, M.** 2012. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*. Vol. 2, p. 248-257.
- [18] **Gómez, J., Oliveros, C.** 2016. Biodegradación de Polietileno de Tereftalato por Microorganismos Aislados de Sitios de Disposición Final de Residuos Sólidos, Táchira, Venezuela, Vol. 6, p. 57-62,
- [19] **Ghosh, S., Qureshi, A., y Purohit, H. J.** 2019. Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways, p. 184-199. En: Kumar, V., Kumar, R., Singh, J. y Kumar, P. (eds.), *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation*.
- [20] **Ganesh Kumar, A., Anjana, K., Hinduja, M., Sujitha, K., y Dharani, G.** 2020. Review on plastic wastes in marine environment – Biodegradation and biotechnological solutions. *Marine Pollution Bulletin*, Vol. 150, p. 1-8.
- [21] **Bach, C.** 2011. Evaluation de la migration des constituents de l’emballage en poly(ethylene terephthalate)(PET) vers l’eau, des facteurs d’influence et du potentiel toxique des migrants. Institut National Polytechnique de Lorraine. Français.
- [22] **Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M., y Etienne, S.** 2012. Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*, Vol. 46, p. 571-583.
- [23] **Halden, R. U.** 2010. Plastics and health risks. *Annual Review of Public Health*, Vol. 31, p. 179-194.
- [24] **Salvador, M., Abdulmutalib, U., Gonzalez, J., Kim, J., Smith, A. A., et al.** 2019. Microbial Genes for a Circular and Sustainable Bio-PET Economy. *Genes*, Vol. 10, p. 1-15.
- [25] **Marten, E., Müller, R.-J., & Deckwer, W.-D.** 2003. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters I. Low molecular mass model esters and aliphatic polyesters. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 80, p. 485-501.
- [26] **Ronkvist, Å. M., Xie, W., Lu, W., & Gross, R. A.** 2009. Cutinase-Catalyzed Hydrolysis of Poly(ethylene terephthalate). *Macromolecules*, Vol. 42, p. 5128-5138.
- [27] **Marten, E., Müller, R.-J., & Deckwer, W.-D.** 2005. Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters. *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 88, p. 371-381.
- [28] **de Castro, A. M., Carniel, A., Nicomedes Junior, J., da Conceição Gomes, A., & Valoni, É.** 2017. Screening of commercial enzymes for poly(ethylene terephthalate) (PET) hydrolysis and synergy studies on different substrate sources. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, Vol. 44, p. 835-844.
- [29] **Müller, R.-J., Schrader, H., Profe, J., Dresler, K., & Deckwer, W.-D.** 2005. Enzymatic Degradation of Poly(ethylene terephthalate): Rapid Hydrolyse using a Hydrolase from *T. fusca*. *Macromolecular Rapid Communications*, Vol. 26, p. 1400-1405.
- [30] **Acero, E., Ribitsch, D., Steinkellner, G., Gruber, K., Greimel, K., et al.** 2011. Enzymatic Surface Hydrolysis of PET: Effect of Structural Diversity on Kinetic Properties of Cutinases from *Thermobifida*. *Macromolecules*, Vol. 44, p. 4632-4640.
- [31] **Roth, C., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Föllner, C., et al.** 2014. Structural and functional studies on a thermostable polyethylene terephthalate degrading hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol 98, p. 7815-7823.
- [32] **Barth, M., Oeser, T., Wei, R., Then, J., Schmidt, J., & Zimmermann, W.** 2015. Effect of hydrolysis products on the enzymatic degradation of polyethylene terephthalate nanoparticles by a polyester hydrolase from *Thermobifida fusca*. *Biochemical Engineering Journal*, Vol. 93, p. 222-228.
- [33] **Barth, M., Honak, A., Oeser, T., Wei, R., Belisário-Ferrari, M. R., et al.** 2016. A dual enzyme system composed of a polyester hydrolase and a carboxylesterase enhances the biocatalytic degradation of polyethylene terephthalate films. *Biotechnology Journal*, Vol. 11, p. 1082-1087.
- [34] **Carniel, A., Valoni, É., Nicomedes, J., Junior, Gomes, A. da C., & Castro, A. M. de.** 2017. Lipase from *Candida antarctica* (CALB) and cutinase from *Humicola insolens* act synergistically for PET hydrolysis to terephthalic acid. *Process Biochemistry*, Vol. 59, p. 84-90.

- 
- [35] **Yoshida, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., et al.** 2016. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, Vol. 351, p. 1196-1199.
- [36] **Tanasupawat, S., Takehana, T., Yoshida, S., Hiraga, K., y Oda, K.** 2016. *Ideonella sakaiensis* Sp. Nov., isolated from a microbial consortium that degrades poly(ethylene terephthalate). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 66, p. 2813-2818.
- [37] **Bornscheuer, U. T.** 2016. Feeding on plastic. A bacterium completely degrades poly(ethylene terephthalate). *Science*, Vol. 351, p. 1154-1155.
- [38] **Danso, D., Chow, J., y Streit, W. R.** 2019. Plastics: Environmental and biotechnological perspectives on microbial degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 85, p. 1-14.
- [39] **Chen, C.-C., Han, X., Ko, T.-P., Liu, W. y Guo, R.-T.** 2018. Structural studies reveal the molecular mechanism of PETase. *The FEBS Journal*, Vol 285, p. 3717-3723.
- [40] **Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H.-Y., et al.** 2018. Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature Communications*, Vol. 9, p. 1-11.
- [41] **Han, X., Liu, W., Huang, J.-W., Ma, J., Zheng, Y., et al.** 2017. Structural insight into catalytic mechanism of PET hydrolase. *Nature Communications*, Vol. 8, p. 1-6.
- [42] **Liu, B., He, L., Wang, L., Li, T., Li, C., et al.** 2018. Protein Crystallography and Site-Direct Mutagenesis Analysis of the Poly(ethylene terephthalate) Hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, Vol. 19, p. 1471-1475.
- [43] **Austin, H. P., Allen, M. D., Donohoe, B. S., Rorrer, N. A., Kearns, L. F., et al.** 2018. Characterization and engineering of a plastic-degrading aromatic polyesterase, Vol. 115, p. 4350-4357.
- [44] **Palm, G. J., Reisky, L., Böttcher, D., Müller, H., Michels, E. A. P., et al.** 2019. Structure of the plastic-degrading *Ideonella sakaiensis* MHETase bound to a substrate. *Nature Communications*, Vol. 10, p. 1-10.
- [45] **Hiraga, K., Taniguchi, I., Yoshida, S., Kimura, Y., & Oda, K.** 2019. Biodegradation of waste PET. *EMBO reports*, Vol. 20, p. 1- 5.
- [46] **Chen, Z., Wang, Y., Cheng, Y., Wang, X., Tong, S., et al.** 2020. Efficient biodegradation of highly crystallized polyethylene terephthalate through cell surface display of bacterial PETase. *Science of The Total Environment*, Vol. 709, p. 1-9.
- [47] **Chen, C.-C., Dai, L., Ma, L., & Guo, R.-T.** 2020. Enzymatic degradation of plant biomass and synthetic polymers. *Nature Reviews Chemistry*, Vol. 4, p. 114-126
- [48] **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*, Vol. 103, p. 4253-4268.
- [49] **Barth, M., Wei, R., Oeser, T., Then, J., Schmidt, J., et al.** 2015. Enzymatic hydrolysis of polyethylene terephthalate films in an ultrafiltration membrane reactor. *Journal of Membrane Science*, Vol. 494, p. 182-187.