

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA
“ALBERTO CAZORLA TALLERI”



Determinación *in silico* de la función hidrolasa de las enzimas candidatas a degradar plástico expresadas por procariotas del rumen de *Bos taurus*

Trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller en Ciencias con mención en Biología

Autoras:

Katherine Shayna Lau Len Guzmán
Allyson Daniela Palomino La Rosa

ASESORA:

Dra. Claudia Machicado Rivero

Lima - Perú
2023

Determinación *in silico* de la función hidrolasa de las enzimas candidatas a degradar plástico expresadas por procariotas del rumen de *Bos taurus*

Trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller en Ciencias con mención en Biología

Autoras:

Katherine Shayna Lau Len Guzmán
Allyson Daniela Palomino La Rosa

Asesora:

Dra. Claudia Machicado Rivero

Lima - Perú
2023

Fecha de entrega: 02-feb-2023 08:28a.m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega: 2004753169
Nombre del archivo: TDI_HITO_4_REVISION_FINAL_APKL_Rev_CMR.docx (38.13K)
Total de palabras: 6001
Total de caracteres: 36597

TDI 2022

INFORME DE ORIGINALIDAD

6% INDICE DE SIMILITUD
4% FUENTES DE INTERNET
1% PUBLICACIONES
2% TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad de Cartagena Trabajo del estudiante	1%
2	repositorio.ual.es Fuente de Internet	1%
3	zagan.unizar.es Fuente de Internet	1%
4	wedocs.unep.org Fuente de Internet	<1%
5	Submitted to Universidad Nacional Abierta y a Distancia, UNAD,UNAD Trabajo del estudiante	<1%
6	Submitted to Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Trabajo del estudiante	<1%
7	Submitted to Universidad de Costa Rica Trabajo del estudiante	<1%
8	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1%

TABLA DE CONTENIDOS

Resumen.....	3
1. Estado del arte	5
1.1. Características generales de los plásticos.....	5
1.1.1. Estructura y composición.....	5
1.1.2. Tipos de polímeros.....	5
1.1.3. Usos y contaminación por plásticos	6
1.2. Descomposición de plásticos.....	6
1.2.1. Física y Química.....	6
1.2.2. Biológica	7
1.2.2.1. Descomposición de plásticos en ecosistemas naturales... 7	
1.2.2.2. Comunidades microbianas que degradan plásticos..... 8	
1.2.2.3. Enzimas degradadoras de plásticos	8
1.3. Microbiota intestinal que degrada plásticos.....	9
1.3.1. Microbiota intestinal.....	9
1.3.2. Características de la microbiota del rumen.....	9
1.3.3. Microorganismos degradadores de plásticos que habitan el intestino de herbívoros.....	10
1.4. Estudios <i>in silico</i> para describir la biodegradación de poliéster plásticos..	10
1.4.1. Metagenómica y predicción de microorganismos descomponedores de plástico.....	11
1.4.2. Caracterización de la estructura 3D y función de enzimas que catalizan la descomposición de plásticos.....	11
1.4.3. Modelamiento de complejos enzima-sustrato	11
2. Problema de investigación	11
3. Estrategia	13
4. Referencias bibliográficas	15

RESUMEN:

La contaminación por plástico ocurre a nivel mundial desde que es utilizado en la mayoría de las áreas industriales, como el embalaje y la construcción [1]. Debido a su estructura y composición química, estos son polímeros poco biodegradables que pueden persistir en los ecosistemas durante miles de años sin descomponerse. Actualmente, gran parte de la contaminación plástica proviene del uso excesivo de productos de un sólo uso y su inadecuado manejo como residuos [2]. El tereftalato de polietileno (PET) es el compuesto más usado debido a sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas que lo hacen resistente a la degradación hidrolítica o enzimática [3]. Los programas de reciclaje utilizados actualmente no representan una opción viable para su manejo a largo plazo, por lo que una alternativa es su biodegradación utilizando enzimas microbianas [4]. Una de las enzimas más estudiadas para la degradación de PET son las PETasas de *Ideonella sakaiensis*, mientras que otras han sido recientemente propuestas como agentes degradadores, incluyendo un grupo de enzimas en el rumen de *Bos taurus* [5]. En el rumen habitan diversos tipos de microorganismos y en él ocurren diversas reacciones bioquímicas entre ellas la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa y de polímeros sintéticos [5]. Esto demuestra que la microbiota del rumen puede degradar plásticos, aunque se desconoce qué enzimas participan del proceso. Por ello, este trabajo determinará si las enzimas microbianas despolimerizadoras de arqueas y bacterias del rumen poseen características y propiedades compatibles con las enzimas bacterianas que degradan PET demostrada para la eliminación sistemática de residuos plásticos. Se utilizará herramientas bioinformáticas de comparación de secuencias y visualización de estructuras 3D para determinar la conservación de residuos catalíticos críticos de la función degradadora del pet en enzimas de rumen. Esto constituiría una prueba preliminar de que algunas enzimas del rumen podrían ser buenas candidatas para la degradación del PET. Dado que la microbiota del rumen puede vivir y tolerar condiciones extremas como una alta salinidad, la identificación de enzimas degradadoras de plástico podría ser utilizada para la despolimerización industrial de polímeros sintéticos.

Palabras claves: Rumen, *Bos taurus*, hidrolasas, biodegradación de plásticos

ABSTRACT:

Plastic pollution occurs worldwide since it is used in most industrial areas, such as packaging and construction [1]. Due to its structure and chemical composition, these polymers are not easily biodegradable and can persist in ecosystems for thousands of years without breaking down. Currently, a significant portion of plastic pollution comes from the excessive use of single-use products and their inadequate waste management [2]. Polyethylene terephthalate (PET) is the most commonly used compound due to its mechanical and physicochemical properties that make it resistant to hydrolytic or enzymatic degradation [3]. The recycling programs currently in use do not provide a viable long-term solution, so an alternative is to biodegrade plastic using microbial enzymes [4]. One of the most studied enzymes for PET degradation is PETase from *Ideonella sakaiensis*, while others have recently been proposed as degrading agents, including a group of enzymes found in the rumen of *Bos taurus* [5]. The rumen harbors various types of microorganisms and undergoes various biochemical reactions, including enzymatic hydrolysis of hemicellulose and synthetic polymers [5]. This demonstrates that rumen microbiota can degrade plastics, although the enzymes involved in the process are not yet known. Therefore, this study will determine whether depolymerizing microbial enzymes from rumen archaea and bacteria possess characteristics and properties compatible with bacterial enzymes known to degrade PET, thus providing a systematic approach for plastic waste elimination. Bioinformatic tools for sequence comparison and 3D structure visualization will be used to determine the conservation of critical catalytic residues involved in PET degradation function in rumen enzymes. This would constitute preliminary evidence that some rumen enzymes could be good candidates for PET degradation. Since rumen microbiota can live and tolerate extreme conditions such as high salinity, the identification of plastic-degrading enzymes could be utilized for industrial depolymerization of synthetic polymers.

Keywords: Rumen, *Bos taurus*, hydrolases, plastic biodegradation

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Características generales de los plásticos

1.1.1. Estructura y composición (1,2,3)

Los polímeros tienen diferentes propiedades materiales, como flexibles a rígidos, permeables e impermeables e hidrofílicos a hidrofóbicos, lo que los hace muy duraderos. Estas propiedades están determinadas por la estructura de los bloques de construcción poliméricos repetitivos: los monómeros. Cuando un material polimérico se ha procesado, generalmente por calor, y se le ha dado una forma final y comercialmente adecuada, se denominan plásticos.

La mayoría de los plásticos son termoplásticos compuestos por cadenas poliméricas lineales, que permiten la remodelación térmica, como las que se utilizan en botellas y textiles, mientras que algunos polímeros se entrecruzan durante el procesamiento para formar termoestables (1)(2). Los plásticos son en su mayoría polímeros sintéticos formados por cadenas de átomos de carbono con hidrógeno, oxígeno, nitrógeno y azufre construidos alrededor de las cadenas de carbono (3).

1.1.2. Tipos de polímeros (3,4)

Los plásticos han revolucionado todas las industrias debido a su versatilidad y propiedad de moldeado con diferentes químicos. Debido a la variedad de polímeros existentes, se pueden clasificar de diferentes formas: según su origen, según su estructura interna o la clase de monómeros que los componen, según sus propiedades mecánicas, químicas o térmicas, etc. Según su origen, los plásticos pueden ser derivados de combustibles fósiles o petróleo, también conocidos como petro-plásticos (no biodegradables en su tiempo de vida útil) o de origen biológico biodegradables (a partir de fuentes renovables) (4), los cuales suelen ser vegetales y de origen bacteriano como *Azotobacter vinelandii* (5). Estos últimos constituyen sólo una pequeña fracción en la producción de plástico anual. Por otro lado, de acuerdo a su estructura, los plásticos se clasifican en amorfos como el PVC y semicristalinos como el propileno. Asimismo, según sus propiedades, los plásticos pueden ser termoplásticos, los cuales son capaces de volver a recuperar sus propiedades originales después de haberse calentado para ser reprocesado y no sufren un cambio químico; o bien termoestables, los cuales son insolubles(3)(4).

Dentro de los plásticos más utilizados están el polietileno (PE), tereftalato de polietileno (PET), polipropileno (PP), cloruro de polivinilo (PVC) y poliestireno (PS). Su uso masivo se debe a las propiedades mecánicas y bajos costos de producción. El PE es un polímero de monómeros de etileno y pertenece a la clase de termoplásticos. Por su parte, el PET es un polímero sintético muy resistente y firme que también pertenece a la clase de termoplásticos. Asimismo está el PP, que es uno de los plásticos más utilizados formado por monómeros de propileno y que posee la ventaja de que se puede polimerizar con otros polímeros. En tanto, el PVC es el tercer plástico sintético más utilizado en el mundo y se puede producir en dos formas generales, rígido y flexible. Finalmente, el PS es un homopolímero compuesto por unidades repetitivas de estireno, que puede ser un termoplástico o un plástico termoendurecible (3).

1.1.3. Usos y contaminación por plásticos (6,7)

El principal uso de los plásticos es el embalaje, seguido de la edificación y construcción. Aunque se conocen distintos tipos de polímeros, sólo se utilizan ocho de ellos, que constituyen la mayoría en el uso de la producción. El incremento del uso de los plásticos tiene un impacto directo en la contaminación del medio ambiente. Su versatilidad en distintos ámbitos de la industria genera una alta demanda de esos materiales, lo cual incrementa su producción (6).

Actualmente, el plástico es el tipo de desecho de origen antropogénico más abundante, con unos 0,13 kg de desechos plásticos emitidos al océano por persona per cápita, registrado hasta el 2019. Esto debido a su uso masivo, prolongada estabilidad, flotabilidad y bajo costo de producción, lo cual reduce los incentivos de reciclaje y reutilización. Cuando la vida útil de un plástico termina, su destino será el reciclaje, la incineración o bien el descarte común. A su vez, se estima que sólo aproximadamente el 10% de estos materiales pasan por algún método de reciclaje; el 14% son incinerados y el 76% son enviados a vertederos de residuos o en lugares donde el material termina ingresando al medio ambiente (7).

Esto último provoca una contaminación por plásticos, tanto en forma como microplásticos o nanoplásticos, que pueden perturbar la cadena alimenticia de los animales. En este sentido, se ha demostrado que más de 800 especies de animales han sido afectadas por este tipo de contaminación, teniendo como resultado un impacto toxicológico así como alteraciones del sistema digestivo y disminución de las tasas de alimentación en numerosas especies. Además, se sabe que el efecto del consumo de plástico ocurre a distintos niveles, afectando incluso a la microbiota intestinal y si bien se sigue investigando el impacto del plástico en distintos microbiomas, no cabe duda que este involucra consecuencias negativas (6)(7).

1.2. Descomposición de plásticos

1.2.1. Física y Química (8,9)

Los residuos plásticos sintéticos se pueden degradar por varios factores abióticos como la temperatura y la radiación UV. Dentro de los tratamientos físicos, los plásticos sintéticos se pueden degradar mediante el entierro del suelo, la combustión de sustancias orgánicas y registro para el reciclaje de residuos. En el proceso físico de degradación, los residuos plásticos se extraen primero en un lixiviado ácido o básico, dependiendo del peso molecular de los compuestos. En general, para degradar los plásticos durante el reciclaje se generan humos de carbono que son una amenaza para las plantas y los animales y promueven el calentamiento global (8). Por lo tanto, la degradación física del plástico puede considerarse dañina para el medio ambiente al crear materiales orgánicos persistentes y contaminantes.

En el método químico, la degradación tiene lugar principalmente a través de la ruptura de las cadenas principales o cadenas laterales del polímero, inducidas por hidrólisis, fotooxidación o degradación con productos químicos agresivos. Por ejemplo, la hidrólisis de poliésteres catalizada por bases ocurre en condiciones fisiológicas, mientras que la hidrólisis catalizada por ácido comienza con la deslocalización del protón del ion hidroxonio (H_3O^+) a uno de los pares solitarios del oxígeno carbonílico del grupo éster, seguido de la hidrólisis del carbono carbonílico, lo que da como resultado la generación de un intermedio

tetraédrico. El intermedio tetraédrico puede entonces disociarse en un ácido carboxílico y un alcohol (8) (9).

Por otra parte, las limitaciones dentro de las descomposiciones físicas incluyen plásticos sensibles a la temperatura, compuestos y termoplásticos que no se pueden licuar a altas temperaturas. Mientras que en el método químico, los elevados costos energéticos pero los bajos costos de los monómeros vírgenes de la competencia hacen que este método sea poco atractivo (10).

1.2.2. Biológica (2,11)

La biodegradación es un proceso mediante el cual los organismos microbianos, principalmente bacterias y hongos, transforman o alteran la estructura de los productos químicos introducidos en el medio ambiente, mediante acción metabólica o enzimática. La biodegradación depende de varios factores, como la disponibilidad de un sustrato, las características de la superficie, la morfología y el peso molecular de los polímeros (2).

La biodegradación del PET, por ejemplo, se demostró mediante un cultivo de muestras ambientales, encontrando un consorcio microbiano único responsable de la descomposición polimérica. Dichas comunidades microbianas pueden crecer en películas de PET de baja cristalinidad, el cual se refiere al grado de orden estructural de un sólido. Un hallazgo interesante fue el descubrimiento de una especie bacteriana capaz de metabolizar el PET amorfo sin ayuda de otros microorganismos del consorcio. Dicha bacteria pertenece al género *Ideonella* y se denominó *Ideonella sakaiensis* 201-F6 (11).

1.2.2.1. Descomposición de plásticos en ecosistemas naturales (7,12,13)

Cuando los desechos plásticos ingresan al ambiente marino, las partículas grandes de plástico primero se fragmentan para formar partículas microplásticas o nanoplásticas. Este proceso de múltiples etapas está influenciado por una variedad de factores bióticos y abióticos incluidos microorganismos, radiación UV, temperatura y estrés físico. Ello significa que la unión microbiana en la superficie y la formación de biopelículas, los cuales son combinaciones de células microbianas unidas a la superficie y encerradas en una matriz de sustancias poliméricas, no solo dependen de las habilidades de los microorganismos sino también de las propiedades del material y la estructura de la superficie. Una de las bacterias encontradas en el mar con potencial de degradar plástico es *Pseudomona* sp. el cual puede degradar PCL(12).

En ambientes terrestres, la presencia de plásticos ejerce impactos físicos directamente a las comunidades microbianas del suelo. Por ejemplo, las películas de manto de plástico agrícola aplicadas para mejorar la productividad de los cultivos a corto plazo cubren millones de hectáreas de tierras de cultivo en todo el mundo y es una fuente importante de contaminación plástica terrestre. Aunque la mayoría de los estudios se han centrado en los efectos de las películas plásticas sintéticas, vale la pena señalar que el consumo microbiano de plásticos biodegradables tiene efectos significativos en las comunidades microbianas del suelo, en donde podemos encontrar bacterias como *Rhodococcus* sp. (7).

En el caso del PET, este plástico está presente en los ambientes marinos y terrestres. Uno

de los ejemplos más destacados es el llamado parche de basura del Pacífico, en donde los peces y otros organismos marinos suelen comerse los desechos del PET. De esta manera, los productos y aditivos de degradación del PET (es decir, sustancias solubles) entran en la cadena alimentaria, donde tienen un impacto negativo en la salud humana y animal (13).

1.2.2.2. Comunidades microbianas que degradan plásticos (1,7, 8,14)

La primera evidencia de que los taxones ambientales de vida libre contribuyen a la degradación del plástico se publicó recién unos 30 años después de la primera producción comercial de plástico, en el año 1974 (7). Varios microorganismos como hongos, bacterias y arqueas son responsables de la degradación de los plásticos sintéticos y naturales. Se trata de organismos que consumen polímeros sintéticos como fuente de carbono utilizando diversas enzimas para descomponer los plásticos en monómeros y permitir su aprovechamiento energético. Estos microorganismos descomponedores de plásticos habitan diversos hábitats que incluyen el suelo, el compost y el agua de mar e incluso el lodo activado, que es un cultivo de floculación de organismos desarrollados bajo condiciones controladas en tanques de aire. Debido a que los microorganismos son ubicuos, tienen propiedades únicas asociadas con la superficie de los materiales (1)(8).

Una importante alternativa a los métodos tradicionales y basada en la biotecnología es el establecimiento de consorcios microbianos o co-cultivos degradadores de plásticos. Las comunidades microbianas naturales o diseñadas pueden usarse para degradar plásticos usando enzimas microbianas que actúan sobre el andamio principal (esqueleto carbonado) del polímero. Por lo tanto, la ingeniería de comunidades bacterianas ofrece una estrategia innovadora para la degradación de los desechos plásticos (14).

1.2.2.3. Enzimas degradadoras de plásticos (3,15,16,17,18)

La biodegradación es una forma viable de lidiar de manera sostenible con los millones de toneladas de desechos plásticos que se acumulan en ambientes terrestres y marinos. Sin embargo, la diversidad de enzimas que degradan plásticos sigue siendo poco conocida (15).

Las enzimas son biocatalizadores que participan en una reacción, actúan sobre un sustrato particular y aceleran el proceso de conversión de ese sustrato en un producto. Existe un gran interés por describir el mecanismo básico por el cual los microorganismos pueden degradar plásticos, a pesar de ser estructuras altamente resistentes. La degradación comúnmente tiene lugar con la ayuda de enzimas (extracelulares e intracelulares) presentes en las células microbianas, que provocan la ruptura de las cadenas de polímeros a través de la asimilación dentro de sus células y la liberación de productos metabólicos (3).

Las enzimas que catalizan la degradación de poliésteres como el PET se encuentran dentro de la clase de hidrolasas de éster carboxílico, la mayoría de ellas clasificadas como cutinasas. Estas enzimas están naturalmente adaptadas para actuar sobre sustratos como la cutícula de cera de las plantas. Para la degradación del PET, faltan estudios exhaustivos de detección basados en la actividad. Sin embargo, un estudio de bioinformática que utilizó un modelo oculto de Markov logró identificar genes de hidrolasa de PET utilizando la base de datos UniProtKB y más de 100 conjuntos de datos de metagenomas, muchos de los

cuales se originaron en fuentes marinas (16)(17).

Se han aislado numerosas enzimas de algas, actinomicetos, bacterias y hongos, las cuales pueden ayudar a descomponer los alimentos de estos organismos y además degradan varios tipos de materiales plásticos. Dentro de esas enzimas se encuentran las carboxilesterasas, hidrolasas (i.e. lipasas), proteasas y estererasas (3). Por ejemplo, las hidrolasas extracelulares de *Pseudomonas* sp. hidrolizan materiales de poliéster mientras que una lipasa de *Pseudomonas cepacia* hidroliza poli(butileno succinato-co-tereftalato, PBST) (18). La existencia de estas enzimas degradadoras de plástico es un hecho prometedor que puede aprovecharse en el tratamiento y eliminación de residuos plásticos.

1.3. Microbiota intestinal que degrada plásticos

1.3.1. Microbiota intestinal (19,20)

El rumen es un compartimiento aglandular del intestino grueso anterior. Cumple el rol de almacenaje de productos de fermentación, generados de la conversión de material vegetal en nutrientes que son utilizables por el organismo para satisfacer sus requerimientos energéticos (19).

Los mamíferos presentan una microbiota gastrointestinal que depende, en su mayoría, de polisacáridos adquiridos de su dieta. Estos azúcares, al encontrarse en el rumen e intestino grueso, se descomponen por acción de las comunidades microbianas y posteriormente esos productos pueden ser digeridos por las enzimas digestivas del animal. Entre estas comunidades microbianas en el rumen se encuentran microorganismos eucariotas (hongos anaerobios y protozoos), bacterias y arqueas (20).

1.3.2. Características de la microbiota del rumen (21,22,23)

El rumen en mamíferos herbívoros es el lugar donde el alimento ingerido es sometido a una degradación microbiana antes que empiece la digestión por el animal. El rumen presenta características propias, como ser muy heterogéneo al estar compuesto de forraje, sedimentos, líquidos y células microbianas. Así mismo, el pH del rumen oscila entre 6 y 7, bajo condiciones normales, aunque factores como una alta exposición a oxígeno puede provocar una rápida acidificación del rumen.

En el rumen se producen distintas reacciones bioquímicas como la hidrólisis enzimática de la hemicelulosa, que proviene del forrajeo de los rumiantes. Sin embargo, hay otras reacciones enzimáticas en el rumen que han sido poco estudiadas incluida la degradación de poliésteres vegetales provenientes de la dieta de los rumiantes, por lo cual se puede considerar la presencia de enzimas con actividades hidrolíticas (21).

Entre los rumiantes, destaca la vaca (*B. taurus*), en la cual se ha descrito mediante metagenómica la microbiota del rumen y su relación simbiótica con los alimentos ingeridos por el animal (22)(23).

1.3.3. Microorganismos degradadores de plásticos que habitan el intestino de herbívoros (21)

Se ha demostrado que la comunidad microbiana del rumen de *B. taurus* posee

propiedades de degradación de poliésteres sintéticos como el PET, PBAT y el PEF (21). En dicho estudio se investigó el contenido ruminal de *B. taurus* con relación a las enzimas de hidrólisis de poliéster sintético, observándose que el extracto de rumen descomponía las estructuras poliméricas.

Tras reconocer a los microorganismos del rumen, se identificó aquellos que poseían enzimas capaces de descomponer plásticos. De esa manera, se reconocieron bacterias, eucariotas y arqueobacterias que, de acuerdo a la literatura, poseían esterases, lipasas y cutinasas que hidrolizan poliésteres sintéticos y proteasas que hidrolizan poliamida. Teniendo ello en cuenta, se propusieron un grupo de bacterias potenciales a degradar plásticos en el rumen, incluyendo la bacteria de *Pseudomonas spp.* que posee esterases, lipasas y cutinasas, por lo que virtualmente podría hidrolizar el PET.

También se propuso un grupo de hongos que posee hidrolasas, lipasas y esterases, que son utilizadas en sectores industriales y que podrían descomponer el plástico. Estas especies son *Aspergillus*, *Penicillium* y *Candida*. En el rumen también se han detectado hongos involucrados en la degradación de la pared celular vegetal, como *Thermothelomyces thermophilus*, *Talaromyces wortmannii* y *Thielavia terrestris*. También se encuentra *Knufia quersoneso* que secreta una esterasa similar a feruloil esterasa de *I. sakaiensis*, lo que sugiere que puede estar involucrada en la degradación de poliéster sintético. De igual manera se evaluó a *Penicillium citrinum*, en el cual se caracterizó su capacidad de hidrolizar PET en un filtrado de cultivo (21).

Adicionalmente, algunas Archaea del rumen también poseen enzimas esterases termófilas, lo cual podría hacerlas descomponedores de plástico. Estos microorganismos pueden tolerar y vivir en condiciones extremas, como altas temperaturas, pH extremos y muy alta salinidad. Entre las Archaea encontradas en el rumen documentó la presencia de *Methanoregula spp.* (21).

1.4. Estudios *in silico* para describir la biodegradación de poliéster plásticos

1.4.1. Metagenómica y predicción de microorganismos descomponedores de plástico (14, 24, 25, 26)

Los estudios de metagenómica producen gran cantidad de datos, los cuales son depositados y organizados en recursos web conocidos como bases de datos. Estos recursos ponen a disposición de usuarios en todo el mundo datos diversos, provenientes de múltiples estudios, con el fin de ser re utilizados y re analizados. El tratamiento de dichos datos, mediante herramientas bioinformáticas, proporcionan predicciones e información sobre aspectos celulares, moleculares y genéticos de la degradación de plásticos (14). Uno de esos recursos es la base de datos de enzimas activas de plásticos (PAZy), donde se tiene registrado datos de la actividad de enzimas conocidas y verificadas experimentalmente que actúan sobre polímeros sintéticos como el polietileno (PET) y el poliuretano (PUR) (24).

Este tipo de predicción entre los microorganismos y las enzimas ayuda a sentar las bases estructurales y moleculares para poder lograr el análisis de la degradación del plástico.

Entre las bases de datos útiles en estudios de degradación se encuentran FMM, DESHARKY y Metabolic Tinker, que son recursos que se utilizan en la predicción de rutas y recursos en biodegradación. Así, con este enfoque se puede llegar a revelar las vías metabólicas activas y así poder confirmar las predicciones funcionales de las estimaciones metagenómicas que se muestran en la predicción (14)(25)(26).

1.4.2. Caracterización de la estructura 3D y función de enzimas que catalizan la descomposición de plásticos (14,20,27)

Al igual que otras proteínas, la función de las enzimas depende de su estructura tridimensional (3D). En consecuencia, la estructura 3D es una parte fundamental para estudiar el mecanismo de biodegradación de los polímeros. Entre las enzimas degradadoras de plástico que han sido estudiadas se encuentran las serin hidrolasas, así como las cutinasas, las lipasas y las carboxilesterasas; además de grupos como la tanasa, PET hidrolasa y la MHETasa. La caracterización de su estructura 3D es posible tanto por técnicas experimentales como la cristalización y difracción de rayos X como por métodos teóricos-computacionales. Actualmente, las estructuras de este grupo de enzimas se encuentran disponibles tanto en el Protein Data Bank (PDB), si fueron reveladas experimentalmente, como en Alphafold si fueron modeladas (14)(20)(27).

1.4.3. Modelamiento de complejos enzima-sustrato (14,28,29,30)

La catálisis enzimática es posible gracias a la formación del complejo enzima-sustrato. En enzimas degradadoras de plástico, el polímero se une al sitio catalítico y se va descomponiendo por etapas. Algunas estructuras 3D de complejos de enzimas degradadoras como PETasas y polímeros han sido determinadas experimentalmente como se observó en un estudio en el cual realizaron simulaciones demostrando esta relación de polímero-proteína (28). Por otro lado, una buena alternativa cuando no es posible la determinación experimental de la estructura 3D es el uso de herramientas bioinformáticas, que logran realizar modelamientos computacionales y simulaciones de acoplamiento con buen nivel de precisión (14). Un ejemplo de ello fue un estudio que modeló e identificó el mecanismo de acción de la lipasa de *Pseudomona spp* sobre el tereftalato de polietileno y el sultanato de poliestireno. Además, mediante pruebas de acoplamiento molecular, se identificó los residuos de aminoácidos de la lipasa que interactuaban con el polímero incluyendo Leu127, Ser136 y Leu161. Todo este proceso, desde el reconocimiento de la cavidad de unión y el cambio de conformaciones de interacción del receptor-ligando se logró con un estudio *in silico* (29).

En otro estudio se utilizó estructuras poliméricas cortas, las cuales se simuló en un acoplamiento flexible con la proteína. Para esto se empleó un tipo de algoritmo llamado CB-Dock, el cual escanea la superficie de la proteína para así poder detectar las cavidades donde se podría acoplar el ligando (30).

Este tipo de estudios deja precedentes en la utilización de herramientas bioinformáticas para el análisis de enzimas descomponedoras de plástico, la caracterización de sus mecanismos de acción y su comparación entre distintos organismos biodegradadores.

2. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

La contaminación por plásticos es un problema actual de gran impacto debido al evidente aumento de su producción, por una mayor demanda de su uso en los últimos años. A

pesar de poseer características que son beneficiosas en la vida del ser humano, sus consecuencias son más desfavorables que los beneficios que su uso otorga. Además, debido a la gran cantidad de plástico producido, se ha llegado al punto en el que este ha sido introducido a la cadena alimenticia, teniendo así un impacto negativo tanto en el bienestar humano y animal (13). Esto se puede evidenciar en algunos estudios realizados en los cuales muestran la respuesta de adaptación de animales debido a la contaminación por plástico en su medio, ya sea ingerido directa o indirectamente en sus medios. Por ejemplo, en el caso de *Sparus aurata*, se encontró que, al contacto con los contaminantes, se redujo su sensibilidad a estos. Además, a nivel celular, se encontró que el sistema antioxidante posee una gran adaptación al estrés oxidativo al contrarrestar la excesiva producción de especies de oxígeno reactivas (31).

Debido a ello, actualmente se busca distintas rutas o mecanismos donde se pueda degradar este polímero ya que los métodos actuales utilizados en la gestión de residuos plásticos no son viables a largo plazo. Entre estos métodos se encuentran los vertederos, la despolimerización térmica y el reciclaje. Sin embargo, estos procesos presentan diversas limitaciones y una baja efectividad. Por esto, una buena alternativa son los microorganismos que degradan plástico de manera eficiente, siendo recomendable el estudio y caracterización de las enzimas responsables de la biodegradación (6)(7)(14).

Se sabe que la mayor parte de los polímeros más utilizados son sintéticos no biodegradables, lo cual es la principal razón de enfocarse en microorganismos que puedan degradarlos, transformarlos y metabolizarlos. De hecho, son las enzimas de estos microorganismos, como las hidrolasas, lipasas, proteasas y otras, las que hidrolizan el esqueleto de carbonos del polímero plástico, generando compuestos más sencillos como producto (14).

Los microorganismos degradan los polímeros hasta su completa mineralización utilizando diversos mecanismos metabólicos, bioquímicos y enzimáticos. Las enzimas son altamente específicas de cada especie, ya que sólo pueden descomponer algunos pocos polímeros específicos. Estos microorganismos y sus enzimas son responsables de la biodegradación de varios plásticos como el PET. Si bien se ha informado sobre la hidrólisis enzimática de estos poliésteres, todavía existe una fuerte demanda de enzimas más eficientes que permitan la implementación industrial (21).

Las comunidades microbianas de diferentes entornos, incluidos el suelo, el mar y el sistema digestivo de animales, pueden contener nuevas enzimas que degradan el plástico. De hecho, el contenido del rumen de *B. taurus* mostró actividad descomponedora de poliéster en ensayos *in vitro*, sugiriendo que la microbiota del rumen cumple un rol en dicha descomposición. Todo apunta a que ciertas enzimas expresadas por microorganismos (principalmente bacterias) que habitan el rumen y que tienen actividad compatible, aunque no demostrada, con la degradación de plásticos sean responsables de la degradación. Sin embargo, estas enzimas en el rumen no se han explotado por completo a pesar de ser fuertes candidatas para la descomposición. Es por eso que la identificación de las posibles enzimas que sean capaces de degradar plástico puede tener interesantes propiedades para las aplicaciones industriales.

Además, al utilizar enzimas hidrolizantes y oxidantes de polímeros se busca despolimerizar los componentes monoméricos que quedan de los residuos plásticos. Estos metabolitos,

monómeros y oligómeros liberados de estos residuos se podría utilizar como alimento a comunidades microbianas que los conviertan en metabolitos centrales que puedan ser utilizados para una síntesis de nuevos polímeros (10).

No se conoce si las enzimas de origen bacteriano y de proteobacterias del rumen presentan características fisicoquímicas y estructurales compatibles con las enzimas que degradan el PET. Por lo que, en el presente estudio la pregunta de investigación planteada es “Las enzimas candidatas a degradar poliéster, expresadas en procariontes provenientes de la microbiota del rumen de *B. taurus*, ¿muestran similitudes de patrones de secuencia y propiedades estructurales similares a verdaderas hidrolasas de poliéster?”.

El estudio busca determinar teóricamente la capacidad de las enzimas del rumen de *B. taurus* para degradar poliéster, basándonos en sus similitudes con verdaderas enzimas degradadoras de plásticos. Este conocimiento podría ser importante en el descubrimiento de nuevas enzimas descomponedoras de plástico que eventualmente puedan ser empleadas en el manejo y limpieza de residuos. Buscamos así una solución biológica al problema de la contaminación por plásticos que ayude a reducir su impacto negativo en el medio ambiente. Planteamos un estudio *in silico* que incluye comparación de secuencias y análisis de la estructura 3D, a razón de que la función enzimática es dependiente del plegamiento. Cabe resaltar que el alcance de este estudio aborda la investigación de enzimas que despolimerizan el PET. Sin embargo, no abarcará otras enzimas que se encarguen de procesos como la formación de metabolitos, individualización, etc.

3. ESTRATEGIA

Es un estudio retrospectivo, de análisis secundario de datos, *in silico*. La investigación se desarrollará en 3 etapas, incluyendo: i) la identificación de patrones conservados (incluyendo secuencias, dominios y propiedades) presentes en enzimas degradadoras de plástico; (ii) el reconocimiento de homología entre verdaderas enzimas degradadoras de plástico y enzimas con propiedades con propiedades hidrolíticas del rumen y comparación de secuencias de enzimas del rumen de *B. taurus* con verdaderas enzimas degradadoras (comparación por familias: esterasas, cutinasas, lipasas, proteasas, amidasas); iii) propiedades fisicoquímicas, bioquímicas y estructurales de enzimas candidatas a degradar plástico en el rumen.

Para la primera etapa, se obtendrán las características y prototipos de enzimas degradadoras consultando la publicación de Buchholz et al. (24), incluidos patrones y residuos conservados. También se consultará la base de datos Pazy (<https://www.pazy.eu/doku.php?id=start>) y PMDB (<http://pmbd.genome-mining.cn/home/>) para obtener información sobre enzimas degradadoras. La segunda fase incluirá identificación de homólogos con BLAST o HMM (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>) y alineamientos múltiples de las enzimas del rumen con enzimas degradadoras, obtenidas en Quartinello et al. (21), clasificándolas por tipo, usando el programa MEGA. Se identificarán los patrones de secuencia típicos y residuos conservados en las enzimas del rumen, basándonos en la información obtenida de la etapa previa. Se armará una matriz con los resultados de cada variable y enzima estudiada. Por último, se estimarán algunas propiedades bio- y físico-químicas así como estructurales de las enzimas degradadoras,

incluidos prototipos de sitios de unión a polímeros (i.e. tamaño y perfil hidrófobo del sitio de unión, etc.) usando programas de visualización como Chimera y Pymol y detectores de sitios de unión como FPOCKET y Prankweb. Dichas características serán contrastadas con un grupo de enzimas del rumen que muestren alto % identidad con las enzimas degradadoras y donde la homología se haya verificado mediante BLAST. Las estructuras 3D de las enzimas degradadoras y del rumen serán obtenidas del PDB, en caso de no estar disponibles se buscará en AlphaFold.

4. Referencias bibliográficas

1. Jiménez DJ, Öztürk B, Wei R, Bugg TD, Amaya Gomez CV, Salcedo Galan F, et al. Merging plastics, microbes, and enzymes: Highlights from an international workshop. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2022 [citado el 1 de agosto de 2022];88(14):e0072122. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35762791/>
2. Mohanan N, Montazer Z, Sharma PK, Levin DB. Microbial and enzymatic degradation of synthetic plastics. *Front Microbiol* [Internet]. 2020;11:580709. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.580709>
3. Kaushal J, Khatri M, Arya SK. Recent insight into enzymatic degradation of plastics prevalent in the environment: A mini - review. *Cleaner Engineering and Technology* [Internet]. 2021;(100083):100083. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clet.2021.100083>
4. Labeaga Viteri, A. (2018). *Polímeros biodegradables. Importancia y potenciales aplicaciones*. <http://e-spacio.uned.es/fez/view/bibliuned:master-Ciencias-CyTQ-Alabeaga>
5. Domínguez CA, Tejada P. Unam.mx. [citado el 2 de diciembre de 2022]. Disponible en: http://www.unamiradaalaciencia.unam.mx/download/pdf_prensa/unamirada_714.pdf
6. Suaria G, Aliani S. Floating debris in the Mediterranean Sea. *Mar Pollut Bull* [Internet]. 2014;86(1–2):494–504. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025326X14004056>
7. Lear G, Kingsbury JM, Franchini S, Gambarini V, Maday SDM, Wallbank JA, et al. Plastics and the microbiome: impacts and solutions. *Environ Microbiome* [Internet]. 2021;16(1):2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40793-020-00371-w>
8. Bano, K., Kuddus, M., Zaheer, M. R., Zia, Q., Khan, M. F., Ashraf, G. M., Gupta, A., & Aliev, G. Microbial Enzymatic Degradation of Biodegradable Plastics. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2017; 18(5):429-440. Disponible en: <https://doi.org/10.2174/1389201018666170523165742>
9. Murthy N, Wilson S, Sy JC, Aqida SN. Biodegradation of Polymers ☆. En: *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Elsevier; 2017.
10. Ballerstedt, H., Tiso, T., Wierckx, N., Wei, R., Averous, L., Bornscheuer, U., O'Connor, K., Floehr, T., Jupke, A., Klankermayer, J., Liu, L., de Lorenzo, V., Narancic, T., Nogales, J., Perrin, R., Pollet, E., Prieto, A., Casey, W., Haarmann, T., ... Blank, L. M. (2021). MIXed plastics biodegradation and UPcycling using microbial communities: EU Horizon 2020 project MIX-UP started January 2020. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00536-5>
11. Hiraga K, Taniguchi I, Yoshida S, Kimura Y, Oda K. Biodegradation of waste PET: A sustainable solution for dealing with plastic pollution: A sustainable solution for dealing with plastic pollution. *EMBO Rep* [Internet]. 2019;20(11):e49365. Available from: <http://dx.doi.org/10.15252/embr.201949365>
12. Urbanek AK, Rymowicz W, Mirończuk AM. Degradation of plastics and plastic-degrading bacteria in cold marine habitats. *Appl Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2018;102(18):7669–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-018-9195-y>
13. Danso D, Schmeisser C, Chow J, Zimmermann W, Wei R, Leggewie C, et al. New insights into the function and global distribution of Polyethylene terephthalate (PET)-degrading bacteria and enzymes in marine and terrestrial metagenomes. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018;84(8). Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.02773-17>
14. Skariyachan S, Taskeen N, Kishore AP, Krishna BV. Recent advances in plastic degradation - From microbial consortia-based methods to data sciences and computational biology driven approaches. *J Hazard Mater* [Internet]. 2022;426(128086):128086. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389421030557>
 15. Zrimec J, Kokina M, Jonasson S, Zorrilla F, Zelezniak A. Plastic-degrading potential across the global microbiome correlates with recent pollution trends. *MBio* [Internet]. 2021;12(5):e0215521. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02155-21>
 16. Hongli Zhang, Pablo Pérez-García, Robert Dierkes, Sebastian Weigert. Bacteroidetal cold-active and promiscuous esterases play a significant role in global polyethylene terephthalate (PET) degradation. Available at: https://www.researchgate.net/publication/352139338_Bacteroidetal_cold-active_and_promiscuous_esterases_play_a_significant_role_in_global_polyethylene_terephthalate_PET_degradation
 17. Bollinger A, Thies S, Knieps-Grünhagen E, Gertzen C, Kobus S, Höppner A, et al. A novel polyester hydrolase from the marine bacterium *Pseudomonas aestusnigri* - structural and functional insights. *Front Microbiol* [Internet]. 2020;11:114. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00114>
 18. Haernvall K, Zitzenbacher S, Wallig K, Yamamoto M, Schick MB, Ribitsch D, et al. Hydrolysis of ionic phthalic acid based polyesters by wastewater microorganisms and their enzymes. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2017;51(8):4596–605. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b00062>
 19. Sbardellati DL, Fischer A, Cox MS, Li W, Kalscheur KF, Suen G. The bovine epimural microbiota displays compositional and structural heterogeneity across different ruminal locations. *J Dairy Sci* [Internet]. 2020;103(4):3636–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17649>
 20. Flint HJ, Bayer EA, Rincon MT, Lamed R, White BA. Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2008;6(2):121–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1817>
 21. Quartinello F, Kremser K, Schoen H, Tesei D, Ploszczanski L, Nagler M, et al. Together is better: The Rumen microbial community as biological toolbox for degradation of synthetic polyesters. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2021;9. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2021.684459>
 22. Walsh P, Palu C, Kelly B, Lawor B, Wassan JT, Zheng H, et al. A metagenomics analysis of rumen microbiome. In: 2017 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM). IEEE; 2017
 23. Bayer S, Kunert A, Ballschmiter M, Greiner-Stoeffele T. Indication for a new lipolytic enzyme family: isolation and characterization of two esterases from a metagenomic library. *J Mol Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2010;18(3):181–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1159/000315459>
 24. Buchholz PCF, Feuerriegel G, Zhang H, Perez-Garcia P, Nover L-L, Chow J, et al. Plastics degradation by hydrolytic enzymes: The plastics-active enzymes database-PAZy. *Proteins* [Internet]. 2022;90(7):1443–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/prot.26325>
 25. Yoshida S, Hiraga K, Takehana T, Taniguchi I, Yamaji H, Maeda Y, et al. A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science* [Internet].

- 2016;351(6278):1196–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.aad6359>
26. Viljakainen VR, Hug LA. New approaches for the characterization of plastic-associated microbial communities and the discovery of plastic-degrading microorganisms and enzymes. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2021;19:6191–200. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2001037021004888>
27. Berselli A, Ramos MJ, Menziani MC. Novel pet-degrading enzymes: Structure-function from a computational perspective. *Chembiochem* [Internet]. 2021;22(12):2032–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cbic.202000841>
28. Waltmann, C., Mills, C. E., Wang, J., Qiao, B., Torkelson, J. M., Tullman-Ercek, D., & Olvera de la Cruz, M. (2022). Functional enzyme-polymer complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 119(13), e2119509119. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.2119509119>
29. Almeida, E. L., Carrillo Rincón, A. F., 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>
30. Leitão AL, Enguita FJ. Structural Insights into Carboxylic Polyester-Degrading Enzymes and Their Functional Depolymerizing Neighbors. *International Journal of Molecular Sciences* 2021;22:2332. <https://doi.org/10.3390/ijms220>
31. Smit, J., & Micaela, M. (2020). *Estudio de la ingesta de microplásticos52332. en doradas expuestas a una dieta enriquecida con plásticos.*