



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DEGRADACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO CON CUTINASAS RECOMBINANTES

Tesis

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

QFB ERIC ALVARADO MARTÍNEZ

TUTORA

DRA. AMELIA MARÍA DE GUADALUPE FARRES GONZÁLEZ SARABIA
FACULTAD DE QUÍMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. MIQUEL GIMENO SECO
FACULTAD DE QUÍMICA

DR. CARLOS FELIPE PEÑA MALACARA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CD. MX. JUNIO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Alvarado Martínez Eric
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 14 de marzo del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Degradación de ácido poliláctico con cutinasas recombinantes**", dirigida por el/la Dr(a). **Farrés González Sarabia Amelia María de Guadalupe**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

| | |
|------------|--|
| PRESIDENTE | Olvera Carranza Clarita (IBt) |
| VOCAL | Montiel Pacheco Carmina (FQ) |
| VOCAL | Gutiérrez Flores Selena (FQ) |
| VOCAL | Rodríguez Vázquez Refugio (CINVESTAV) |
| SECRETARIO | Navarro Ocaña Arturo (FQ) |

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20(Maestría)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 14 de marzo de 2022
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO 312 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA, EDIFICIO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA TUTORÍA DE LA **DRA. AMELIA FARRÉS GONZÁLEZ-SARABIA**.

DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DE CONACYT (NÚMERO DE **BECARIO:759537**, **CVU: 1041839**).

ESTE TRABAJO FUE FINANCIADO POR EL PROYECTO PAPIIT IT201921
Y PAIP FACULTAD DE QUIMICA
5000-9095

ESTE TRABAJO SE PRESENTÓ EN EL EVENTO:

XIX CONGRESO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA, SEPTIEMBRE 27- OCTUBRE 1, 2021,
SEDE VIRTUAL, DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA (SMBB), BAJO EL
TÍTULO: **“DEGRADACIÓN DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR CUTINASAS RECOMBINANTES DE
ASPERGILLUS NIDULANS”.**

AGRADECIMIENTOS

- A LA DOCTORA **AMELIA FARRÉS** POR DARME LA OPORTUNIDAD DE INTEGRARME A SU GRUPO DE TRABAJO, ADEMÁS DE PROPORCIONARME SU APOYO Y CONFIANZA INCONDICIONALES DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO. GRACIAS POR LA PACIENCIA, LOS CONSEJOS, LA EMPATÍA Y ENSEÑANZAS QUE ME TRASMITIÓ. LA ADMIRO Y APRECIO MUCHO.
- A LA **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**, POR PERMITIRME EL HONOR DE ESTUDIAR EL BACHILLERATO, LA LICENCIATURA Y AHORA EL POSGRADO, ESTOY MUY ORGULLOSO DE PERTENECER A LA MÁXIMA CASA DE ESTUDIOS EN MÉXICO, GRACIAS ALMA MATER.
- AL LABORATORIO 312 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA DEL EDIFICIO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA Y SU PERSONAL, SIEMPRE CALIFICADO Y DISPUESTOS A AYUDAR EN TODO LO QUE NECESITAMOS, ESPECIALMENTE A LA TÉCNICO **CINDY ESTRADA**.
- AL **CONACYT**, POR PORPORCIONARME EL APOYO ECONÓMICO PARA PODER SEGUIR DESARROLLANDOME PROFESIONALMENTE.
- AL M. EN C. **SALVADOR LÓPEZ MORALES**, POR SU ASESORAMIENTO Y APOYO ANALÍTICO PARA PODER DESARROLLAR ESTE PROYECTO.
- A LOS MIEMBROS DEL JURADO POR SUS APORTACIONES PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE ESCRITO.

DEDICATORIAS

- A MIS PAPÁS, **PEDRO ALVARADO Y GRACIELA MARTINEZ**, QUE AÚN CON MIS ALTIBAJOS ESTUVIERON DETRÁS DE ESTA AVENTURA, APOYANDOME UNA VEZ MÁS CON LOS MEDIOS NECESARIOS Y MÁS, SIEMPRE PREOCUPANDOSE QUE NO ME FALTARA ALGO, AÚN SOBRE SUS PROPORIDADES, DE ESTA MANERA ME RECTIFICAN QUE TIENEN UNA GRAN CONFIANZA EN MI, GRACIAS PA, GRACIAS MA.

- A MI HERMANA **JAZMIN ALVARADO** Y SU ESPOSO **RICARDO BONIFACIO**, QUE AUN EN PANDEMIA BUSCARON LA FORMA DE APOYARME CUANDO NECESITÉ DE SU AYUDA; Y A SUS CHAPARROS **CAMILA Y TADEO**, QUE SON COMO UN MOTOR QUE ME DA ENERGÍA CUANDO LA NECESITO.

- A LOS AMIGOS QUE ME DIÓ EL POSGRADO, SIEMPRE HACIENDO AMENO EL TRABAJO EN EL LABORATORIO, DANDO CONSEJOS Y APOYANDO INCONDICIONALMENTE PARA QUE EL TRABAJO SIEMPRE QUEDARA PERFECTO, POR LOS BUENOS MOMENTOS DENTRO Y FUERA DEL LABORATORIO, ES PADRE VERNOS CRECER ACADEMICA Y PERSONALMENTE: **AUGUSTO, VAL, DIANA, KAT, KRYS, FER Y FRANCK**.
TEAM CUTINASAS.

“VENI, VIDI, VICI”
-JULIO CESAR

ÍNDICE GENERAL

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | RESUMEN..... | 19 |
| 2. | INTRODUCCIÓN | 20 |
| 3. | MARCO TEÓRICO | 21 |
| 3.1 | Polímeros..... | 21 |
| 3.2 | Polímeros Naturales | 21 |
| 3.3 | Polímeros sintéticos | 22 |
| 3.4 | Plásticos | 22 |
| 3.5 | Producción de plásticos y problemas ambientales | 23 |
| 3.6 | Polímeros biodegradables | 25 |
| 3.7 | Ácido poliláctico (PLA) | 27 |
| 3.8 | Síntesis de ácido poliláctico..... | 28 |
| 3.8.1 | Obtención y usos del ácido láctico | 29 |
| 3.9 | Estereoquímica del ácido poliláctico | 32 |
| 3.10 | Usos y aplicaciones del ácido poliláctico | 32 |
| 3.11 | Cutinasas..... | 35 |
| 3.12 | Cutina..... | 37 |
| 3.13 | Mecanismo de hidrólisis de las cutinasas..... | 38 |
| 3.14 | Cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i> | 39 |
| 3.15 | Mecanismo de degradación de las cutinasas de <i>Aspergillus nidulans</i> | 40 |
| 3.16 | Cutinasas y degradación de ácido poliláctico | 41 |
| 3.17 | Limitaciones económicas del ácido poliláctico..... | 45 |
| 3.18 | Economía circular | 47 |
| 4. | JUSTIFICACIÓN..... | 50 |
| 5. | HIPÓTESIS | 51 |
| 6. | OBJETIVOS | 52 |
| 7. | Materiales y métodos..... | 53 |
| 7.1 | Reactivos..... | 54 |
| 7.2 | Equipos | 55 |
| 7.3 | Producción de enzimas recombinantes..... | 55 |
| 7.3.1 | Reactivación de la cepa | 55 |
| 7.3.2 | Crecimiento de la cepa | 56 |

| | | |
|--------|---|----|
| 7.3.3 | Expresión de la enzima | 56 |
| 7.4 | Concentración del sobrenadante enzimático..... | 56 |
| 7.5 | Preparación de proteinasa K | 57 |
| 7.6 | Determinación de concentración de proteína en microplaca..... | 57 |
| 7.7 | Determinación de actividad cuantitativa esterasa en microplaca | 57 |
| 7.8 | Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida | 57 |
| 7.8.1 | Electroforesis | 57 |
| 7.8.2 | Zimograma..... | 58 |
| 7.9 | Preparación de láminas de PLA | 58 |
| 7.10 | Trituración de PLA | 58 |
| 7.11 | Reacción de hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes..... | 59 |
| 7.12 | Reacción de hidrólisis de PLLA con proteinasa K..... | 59 |
| 7.13 | Diseño experimental para la combinación de cutinasas recombinantes..... | 59 |
| 7.13.1 | Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes | 61 |
| 7.13.2 | Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes | 61 |
| 7.14 | Mejoramiento de las condiciones de hidrólisis de PLLA con la enzima A1 | 62 |
| 7.14.1 | Influencia del tamaño de partícula..... | 62 |
| 7.14.2 | Influencia de la concentración de enzima (respecto al peso del polímero)..... | 62 |
| 7.14.3 | Influencia de la temperatura | 62 |
| 7.14.4 | Influencia del pH del regulador del medio de reacción..... | 63 |
| 7.15 | Reacción de hidrólisis de PLLA con A1 y las mejores condiciones determinadas | 63 |
| 7.16 | Reacción de hidrólisis de empaque comercial de PLA con A1 y las mejores condiciones determinadas | 63 |
| 7.17 | Cuantificación de ácido láctico por método colorimétrico | 64 |
| 7.18 | Determinación de pérdida de peso | 65 |
| 7.19 | Evaluación de cambios físicos del polímero y del empaque por observación a contraluz. | 65 |
| 7.20 | Evaluación del cambio morfológico del polímero y el empaque comercial por microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 65 |
| 7.21 | Evaluación del cambio de cristalinidad por Difracción de Rayos X (XRD) | 66 |
| 7.22 | Determinación del peso molecular del PLLA por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC) | 66 |
| 8. | Resultados y discusión..... | 67 |
| 8.1 | Producción de las enzimas recombinantes de <i>Aspergillus nidulans</i> | 67 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 8.2 | Preparación de proteinasa K | 67 |
| 8.3 | Perfil de proteína en gel SDS-PAGE y actividad “ <i>in situ</i> ” en zimograma | 68 |
| 8.4 | Evaluación inicial de la degradación de PLLA por cuantificación de ácido láctico | 69 |
| 8.5 | Reacción de hidrólisis de PLLA a 7 días. | 71 |
| 8.6 | Combinación de cutinasas recombinantes..... | 72 |
| 8.6.1 | Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes. | 72 |
| 8.6.2 | Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes. | 73 |
| 8.7 | Mejora de las condiciones de hidrólisis de PLLA con la enzima A1..... | 74 |
| 8.7.1 | Influencia del tamaño de partícula..... | 74 |
| 8.7.2 | Influencia de la concentración de enzima | 75 |
| 8.7.3 | Influencia de la temperatura | 76 |
| 8.7.4 | Influencia del pH del regulador del medio de reacción..... | 77 |
| 8.8 | Reacción de hidrólisis de PLLA usando A1 y combinando las mejores condiciones | 78 |
| 8.9 | Reacción de hidrólisis de empaque comercial con PLA, usando A1 y las mejores condiciones determinadas..... | 79 |
| 8.10 | Determinación de pérdida de peso | 81 |
| 8.11 | Evaluación de cambios físicos del polímero y del empaque por observación a contraluz. | 82 |
| 8.12 | Evaluación del cambio morfológico de los polímeros y el empaque comercial por microscopía electrónica de barrido (SEM)..... | 84 |
| 8.13 | Evaluación del cambio de cristalinidad por Difracción de Rayos X (XRD) | 86 |
| 8.14 | Determinación del peso molecular del PLA por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC) | 89 |
| 8.15 | Cálculo del porcentaje de degradación del poli(ácido L-láctico)de acuerdo con el ácido láctico liberado por la degradación con A1 y las mejores condiciones..... | 90 |
| 9. | Conclusiones..... | 95 |
| 10. | Perspectivas..... | 96 |
| 11. | BIBLIOGRAFIA | 97 |
| 12. | ANEXOS..... | 104 |
| 12.1 | ANEXO 1: Preparación de medios de cultivo utilizados para la producción de las cutinasas recombinantes..... | 104 |
| 12.2 | ANEXO 2: Preparación de Regulador y soluciones stock..... | 105 |
| 12.3 | ANEXO 3: Curva de calibración de la concentración de proteína por el método de Bradford. | 106 |
| 12.4 | ANEXO 3: Curva de calibración de p-NP para medición de actividad cuantitativa. | 107 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 12.5 | ANEXO 4: Curva de calibración de ácido láctico..... | 107 |
| 12.6 | ANEXO 6: Análisis de varianza (ANOVA) y diseño experimental de la combinación de las cutinasas recombinantes A1, A2 y A3 | 108 |
| 12.6.1 | ANOVA de tratamiento enzimático con cutinasas recombinantes A1, A2 y A3..... | 108 |
| 12.6.2 | Diseño experimental de la combinación de enzimas recombinantes..... | 110 |
| 12.6.3 | ANOVA y prueba de Tukey del factor tamaño de partícula. | 116 |
| 12.6.4 | ANOVA y prueba de Tukey del factor concentración de enzima | 118 |
| 12.6.5 | ANOVA y prueba de Tukey del factor temperatura del medio de reacción..... | 119 |
| 12.6.6 | ANOVA y prueba de Tukey del factor pH del Regulador para el medio de reacción | 121 |
| 12.6.7 | ANOVA para comparación de condiciones de reacción. | 123 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|-----|
| Tabla 1. Ejemplos de bacterias ácido-lácticas, la fuente de carbono que se les suministra para su crecimiento y el rendimiento de ácido láctico producido | 30 |
| Tabla 2. Comparación de propiedades de barrera contra gases y propiedades mecánicas de PLLA y PET | 33 |
| Tabla 3. Géneros productores de cutinasas | 37 |
| Tabla 4. Cutinasas de <i>A. nidulans</i> estudiadas en el grupo de trabajo..... | 40 |
| Tabla 5. Antecedentes de hidrólisis de PLA por cutinasas de diferentes microorganismos..... | 42 |
| Tabla 6. Métodos de análisis de degradación de PLA usados en otras investigaciones. | 42 |
| Tabla 7. Resultados preliminares de hidrólisis de PLLA LMW (de bajo peso molecular) en el grupo de trabajo usando cutinasas recombinantes de <i>A. nidulans</i> | 44 |
| Tabla 8. Antecedentes de enzimas no cutinasas que degradan PLA. | 44 |
| Tabla 9. Enzimas y nomenclatura usadas para el diseño..... | 60 |
| Tabla 10. Diseño experimental para la combinación de las 3 cutinasas recombinantes de <i>A. nidulans</i> | 60 |
| Tabla 11. Combinación de enzimas para probar en los respectivos reguladores..... | 61 |
| Tabla 12. Diluciones realizadas para cuantificar ácido láctico por el método colorimétrico. | 64 |
| Tabla 13. Mezcla de reacción para cuantificar ácido láctico..... | 64 |
| Tabla 14. Actividad esterasa y concentración de proteína de los extractos enzimáticos crudos y concentrados de las cutinasas recombinantes. | 67 |
| Tabla 15. Actividad esterasa y concentración de proteína del extracto enzimático de proteinasa K. | 67 |
| Tabla 16. % de pérdida de peso después de 7 días de reacción, se muestran los resultados para cada tratamiento enzimático, así como para los blancos de reacción sin tratamiento enzimático..... | 82 |
| Tabla 17. Resultados de peso molecular promedio del análisis de PLLA por HPSEC. * Se aumentó la concentración de PLA disuelto en THF..... | 89 |
| Tabla 18. Comparación de productividad de enzimas para liberar ácido láctico a partir de PLLA. | 94 |
| Tabla 19. ANOVA para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3..... | 108 |
| Tabla 20. Combinación de enzimas en los Reguladores a probar..... | 110 |
| Tabla 21. Datos obtenidos de liberación de ácido láctico del diseño experimental de la combinación de enzimas (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9)..... | 111 |
| Tabla 22. ANOVA para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9)..... | 112 |
| Tabla 23. Datos obtenidos de liberación de ácido láctico del diseño experimental de la combinación de enzimas (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7) | 114 |
| Tabla 24. ANOVA para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7)..... | 114 |
| Tabla 25. ANOVA para el tamaño de partícula del polímero PLA. | 116 |
| Tabla 26. ANOVA para concentración de enzima A1. | 118 |
| Tabla 27. ANOVA para la temperatura del medio de reacción..... | 120 |
| Tabla 28. ANOVA para el pH del Regulador para el medio de reacción. | 121 |
| Tabla 29. ANOVA para la comparación de condiciones de reacción. | 123 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representación molecular y fórmula desarrollada del polietileno, considerado el polímero más simple | 21 |
| Figura 2. Producción de plástico a nivel mundial..... | 24 |
| Figura 3. Demanda de plásticos por segmento..... | 25 |
| Figura 4. Clasificación y ejemplos de polímeros biodegradables..... | 26 |
| Figura 5. Capacidad de producción global de bioplásticos 2019 | 27 |
| Figura 6. Estructura del ácido poliláctico) | 28 |
| Figura 7. Rutas de síntesis de ácido poliláctico | 29 |
| Figura 8. El ácido láctico como precursor de otros productos químicos industriales..... | 31 |
| Figura 9. Enantiómeros del ácido láctico y sus respectivos polímeros | 32 |
| Figura 10. Producción global de polímeros en 2017, el PLA ocupó el 10% de la producción mundial..... | 34 |
| Figura 11. Principales empresas productoras de PLA a nivel mundial..... | 35 |
| Figura 12. Plegamiento típico α/β de hidrolasas | 36 |
| Figura 13. Estructura cristalizada de la cutinasa 1 de <i>A. oryzae</i> | 36 |
| Figura 14. Estructura de la cutina y sus monómeros | 38 |
| Figura 15. Mecanismo de hidrólisis de alfa beta hidrolasas (lipasa)..... | 39 |
| Figura 16. Esquema representativo del mecanismo y de reacción por las 4 cutinasas de <i>A. nidulans</i> sobre su sustrato natural la cutina | 41 |
| Figura 17. Precio del PLA en china, monitoreado entre los meses Enero-octubre de 2017..... | 45 |
| Figura 18. Porcentaje de costo operacional para tres posibles escenarios, se inicia desde la producción de PLA por fermentación, pasando por la formación de láctida hasta la producción de PLA | 46 |
| Figura 19. Esquema general de producción de usando sobrantes de alimentos | 47 |
| Figura 20. Diagrama del ciclo de economía circular..... | 49 |
| Figura 21. Perfil de proteínas de los sobrenadantes crudos de <i>P. pastoris</i> con A1, A2 y A3, y el extracto enzimático de Proteinasa K; en SDS-PAGE teñidos con azul de comassie | 68 |
| Figura 22. Zimogramas de los sobrenadantes crudos de <i>P. pastoris</i> con A1, A2 y A 3, y el extracto enzimático de Proteinasa K | 69 |
| Figura 23. Monitoreo de ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteinasa K | 70 |
| Figura 24. Monitoreo de la liberación de ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteinasa K..... | 71 |
| Figura 25. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteinasa K después de 7 días | 72 |
| Figura 26. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes después de 7 días | 73 |
| Figura 27. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes después de 7 días | 74 |
| Figura 28. Influencia del tamaño de partícula de PLLA en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días | 75 |

| | |
|---|-----|
| Figura 29. Influencia de la concentración de enzima (respecto al peso del polímero) en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días..... | 76 |
| Figura 30. Influencia de la temperatura del medio de reacción en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días..... | 77 |
| Figura 31. Influencia del pH del Regulador de reacción en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días | 78 |
| Figura 32. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con A1 y mejores condiciones determinadas después de 7 días | 79 |
| Figura 33. Empaque comercial recién usado y triturado antes de someterlo al tratamiento enzimático con A1 y las mejores condiciones determinadas..... | 80 |
| Figura 34. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de empaque comercial con A1 y mejores condiciones determinadas después de 7 días | 81 |
| Figura 35. Fotografía de inspección a contraluz de PLLA tratado con A1 después de 7 días de reacción..... | 83 |
| Figura 36. Fotografía de inspección a contraluz del empaque tratado con A1 después de 7 días de reacción. .. | 84 |
| Figura 37. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X100) (C)..... | 84 |
| Figura 38. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A2, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A2, 7 días (X100) (C)..... | 85 |
| Figura 39. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A3, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A3, 7 días (X100) (C)..... | 85 |
| Figura 40. Morfología de empaque sin tratamiento enzimático (X500) (A). Empaque tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X500) (B). Empaque tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X50) (C). | 86 |
| Figura 41. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A1 y mejores condiciones después de 7 días. | 87 |
| Figura 42. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A2 después de 7 días..... | 87 |
| Figura 43. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A3 después de 7 días..... | 88 |
| Figura 44. Difractograma de empaque sin tratamiento enzimático (Empaque control) y empaque tratado con A1 y mejores condiciones, después de 7 días. | 88 |
| Figura 45. Curva de distribución de peso molecular promedio distribución de las muestras analizadas de PLA. | 90 |
| Figura 46. Curva patrón para cuantificar proteína por el método de Bradford..... | 106 |
| Figura 47. Curva patrón para cuantificar actividad esterasa con p-nitrofenol | 107 |
| Figura 48. Curva patrón para cuantificar ácido láctico por método colorimétrico..... | 107 |
| Figura 49. Prueba de Tukey para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3. | 109 |
| Figura 50. Gráfica de intervalos para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3. | 109 |
| Figura 51. Diagrama de Pareto para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9)..... | 113 |
| Figura 52. Diagrama de Pareto para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7) | 115 |
| Figura 53. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula del polímero PLA..... | 117 |
| Figura 54. Gráfica de intervalos para el tamaño de partícula del polímero PLA..... | 117 |

| | |
|--|-----|
| Figura 55. Prueba de Tukey para concentración de enzima A1 | 118 |
| Figura 56. Gráfica de intervalos para concentración de enzima A1..... | 119 |
| Figura 57. Prueba de Tukey para la temperatura del medio de reacción..... | 120 |
| Figura 58. Gráfica de intervalos para la temperatura del medio de reacción. | 121 |
| Figura 59. Prueba de Tukey para el pH del Regulador para el medio de reacción. | 122 |
| Figura 60. Gráfica de intervalos para el pH del Regulador para el medio de reacción. | 122 |

Abreviaturas

µg: Microgramo

µL: Microlitro

A1: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A1"

A2: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A2"

A3: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A3"

AOX: Alcohol oxidasa

BMGY/ BMMY: del inglés "*Reguladored minimal glycerol o methanol medium*"

DO: Densidad óptica

HMW: Alto peso molecular

HPSEC: Cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución

kDa: KiloDalton

LMW: Bajo peso molecular

mM: Milimolar

M_w : Peso Molecular Promedio en Peso

M_n : Peso molecular promedio en número

nm: Nanómetros

PB: Polímero biodegradable

PCL: Policaprolactona

PDLLA: Poli(ácido DL-láctico)

PHA: Polihidroxi-alcanoatos

PHB: Polihidroxi-butarato

PLA: Poli(ácido láctico)

PLDA: Poli(ácido D-láctico)

PLLA: Poli(ácido L-láctico)

PHBV: Poli(hidroxi-butarato-co-hidroxi-valerato)

sp: especie

p-NF: *p*-nitrofenol

p-NFB: *p*-nitrofenol butirato

Rpm: Revoluciones por minuto

ROP: Polimerización por apertura de anillo, de las siglas en inglés *Ring opening polymerization*

sc-PLA: Estereocomplejo de poli(ácido láctico)

SDS: Dodecilsulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SEM: Microscopía electrónica de barrido

T_g : Temperatura de transición vítrea

YNB: Bases nitrogenadas de levadura

YP: Extracto de levadura, peptona

YPD: Extracto de levadura, peptona y dextrosa

XRD: Difracción de Rayos X

α -NA: Acetato de alfa-naftilo

1. RESUMEN

El poli(ácido L-láctico) (PLA) es un polímero biodegradable que tiene un gran potencial de aplicación en materiales de empaque. Su monómero, el ácido láctico, es un compuesto de interés económico debido a sus múltiples usos en los sectores alimenticio, cosmético y químico. Si este compuesto se pudiera obtener a partir del PLA mediante métodos amigables con el medio ambiente, como lo es la hidrólisis enzimática, ese método se podría implementar como una estrategia de economía circular.

La producción de ácido láctico a partir de PLA se puede llevar a cabo empleando enzimas denominadas cutinasas. Las cutinasas son enzimas que se clasifican como carboxilesterasas, puesto que realizan la hidrólisis de ésteres de ácidos carboxílicos. Su sustrato natural, la cutina, es un polímero cuticular de las plantas que está compuesto de ácidos grasos. Algunas cutinasas pueden hidrolizar una amplia variedad de sustratos, incluidos ésteres solubles de bajo peso molecular y triacilglicerolos de cadena corta y larga, así como también son capaces de catalizar la esterificación y la transesterificación. Debido a que pueden hidrolizar una amplia variedad de sustratos estas enzimas tienen una amplia aplicación en la industria, algunas se han clonado y expresado en sistemas heterólogos con el fin de producir una mayor cantidad de estas enzimas.

En nuestro grupo de trabajo, los genes AN CUT1, AN CUT2 y AN CUT3 que codifican para cutinasas, se aislaron, clonaron y expresaron en *Pichia pastoris*, demostrando su potencial en la degradación de poli(ácido L-láctico) (PLA) de bajo peso molecular.

En este proyecto se evaluó el potencial de las 3 enzimas en la hidrólisis de poli(ácido L-láctico) de alto peso molecular, la liberación de ácido láctico se comparó con la proteínasa K de *E. álbun*, enzima que se reporta libera ácido láctico al hidrolizar PLA. Los resultados preliminares muestran que las 3 cutinasas degradan al polímero, sin embargo, la enzima AN CUT1, a consecuencia de la hidrólisis, logró liberar una mayor concentración de ácido láctico (25.86 mM). Posteriormente se evaluó la combinación de las enzimas para aumentar la liberación de ácido láctico, los resultados mostraron que la combinación de enzimas no mejora la liberación del monómero.

Se determinaron algunas condiciones de reacción: tamaño de partícula, concentración de enzima, temperatura y pH del Regulador del medio de reacción, con las que se obtiene una mayor concentración de ácido láctico liberado de la hidrólisis con AN CUT1, y se hizo una prueba de hidrólisis de PLLA con AN CUT1 y las mejores condiciones determinadas, se obtuvo una mayor liberación de ácido láctico (41.84 mM) y una pérdida de peso de 45.96% después de 7 días de reacción. Estas mismas condiciones determinadas para AN CUT1 se usaron para degradar un empaque comercial biodegradable que se sabe tiene PLA. Después de 7 días de degradación se alcanzó una concentración de ácido láctico de 1.94 mM y una pérdida de peso de 49.7% para este empaque.

Con este trabajo se demostró que se puede obtener ácido láctico a partir de PLA por medio de una hidrólisis enzimática realizada con la cutinasas AN CUT1 y AN CUT2 de *Aspergillus nidulans*, obteniendo mejores rendimientos con la primera enzima. En el caso de la cutinasa AN CUT3, esta mostró que puede degradar al polímero, pero no libera al monómero. Falta caracterizar a los productos liberados por esa hidrólisis para caracterizar mejor a la enzima y poder explorar alternativas que contribuyan a la obtención de ácido láctico a partir de PLA.

2. INTRODUCCIÓN

La humanidad ha usado polímeros por miles de años, originalmente de tipo natural, como el caucho. Sin embargo, debido a la demanda, los polímeros naturales se sometieron a modificaciones y con el tiempo se lograron generar nuevos polímeros sintéticamente. La fácil producción en masa y el bajo costo hicieron que los polímeros sintéticos rápidamente tomaran un papel importante en la vida diaria, pero esto ha provocado que la contaminación causada por sus desechos sea un problema grave debido a su naturaleza recalcitrante (Tripathi *et al.*, 2014; Wei, 2017; Kumar *et al.*, 2019)

En fechas recientes se ha puesto atención a algunos poliésteres amigables con el medio ambiente, debido a que se degradan naturalmente en un período de tiempo menor al de otros polímeros sintéticos. Además, algunos de estos monómeros pueden obtenerse por biotecnología. Debido a estas características la demanda de algunos poliésteres biodegradables como el ácido poliláctico (o comúnmente llamado ácido poliláctico) ha aumentado y se espera que para 2025 esta tendencia se conserve (Jem, 2020).

En el presente proyecto se propone la degradación de poli (ácido L-láctico) por cutinasas, para reducir aún más el período de degradación natural. Se pretende generar un modelo circular donde el poli (ácido L-láctico) usado se degrade y el monómero obtenido sirva para otras aplicaciones, por ejemplo, como sustrato para sintetizar el mismo poli (ácido L-láctico), o derivados del mismo con usos en industrias como la alimenticia y médica.

Se he reportado que diversas enzimas tales como proteasas, lipasas, esterases y cutinasas pueden degradar poliésteres (Biundo *et al.*, 2018; Satti *et al.*, 2020) En este trabajo se va a plantear un ensayo donde se prueben algunas cutinasas recombinantes a diferentes condiciones, para establecer aquellas en donde se obtiene una mayor cantidad del monómero ácido láctico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Polímeros

Los polímeros son moléculas que están formadas por la unión de muchas unidades repetitivas, con la capacidad potencial de sufrir modificaciones estructurales significativas y reversibles. Generalmente, los polímeros involucran uniones covalentes entre los átomos de carbono, que constituyen la columna vertebral de la cadena polimérica (Figura 1). El vocablo polímero significa una molécula constituida por la repetición de una unidad más simple: los monómeros que son pequeñas moléculas de las que se parte para formar los polímeros [Del griego: (πολύ) poli = muchos; (μέρος) meros = parte, mono = uno] (López-Serrano, 2015).

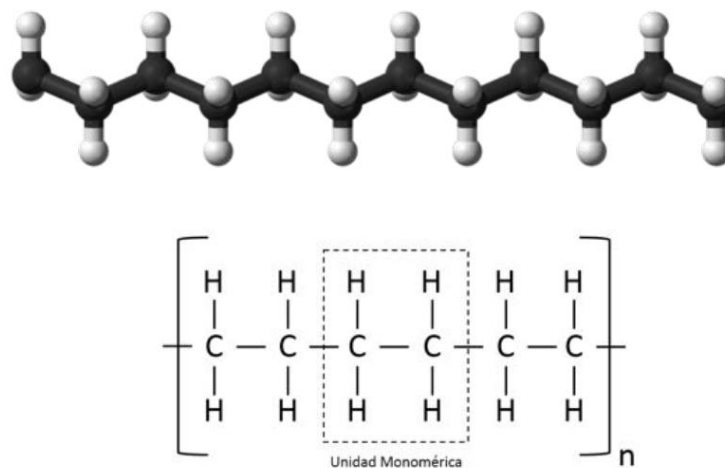


Figura 1. Representación molecular y fórmula desarrollada del polietileno, considerado el polímero más simple (López-Serrano, 2015).

Los polímeros se pueden clasificar de manera general en 2 grupos, naturales y sintéticos.

3.2 Polímeros Naturales

Los polímeros naturales se definen como materiales que se producen ampliamente en la naturaleza o se extraen de plantas o animales. Los polímeros naturales son esenciales para la vida diaria, puesto que las formas humanas se basan en ellos. Algunos de los ejemplos de polímeros naturales son las proteínas y el ácido nucleico que se encuentran en los seres vivos, así como la celulosa, el caucho natural, la seda y la lana. El almidón es un polímero natural que está formado por cientos de moléculas de glucosa, mientras el caucho natural es un polímero isoprénico obtenido del látex de un árbol de caucho (Carraher, 2016).

3.3 Polímeros sintéticos

Los polímeros sintéticos o artificiales se definen como polímeros que se sintetizan en laboratorios o industrias. Su materia prima normalmente se obtiene a partir de derivados de petróleo. Algunos ejemplos de polímeros sintéticos son: polietileno (PE), poliestireno (PS), poliamidas (nylon), poli (cloruro de vinilo) (PVC), caucho sintético, teflón, resinas epóxicas entre otros. Los polímeros sintéticos se derivan típicamente del petróleo en un entorno controlado y están formados por enlaces carbono-carbono como columna vertebral. Una combinación de calor y presión, en presencia de un catalizador, altera los enlaces químicos que mantienen unidos a los monómeros, haciendo que se unan entre sí (Carraher, 2016).

Los polímeros sintéticos, por su aplicación, se pueden clasificar en tres diferentes tipos de materiales:

- Elastómeros: son polímeros muy elásticos formados por moléculas cuyas estructuras químicas tienen enlaces intermoleculares, que las hace capaces de recuperar su forma original después de ser estirados. Los elastómeros son ligeramente reticulados y amorfos, se emplean para fabricar gomas, mangueras o neumáticos (Chamorro, 2011).
- Fibras: Son polímeros que poseen una longitud elevada si se compara con su sección transversal, su estructura se basa en cadenas lineales no ramificadas y simétricas que tienen la capacidad de enrollarse formando hilachas que se entrecruzan con la finalidad de formar la fibra. La gran mayoría de los polímeros fibrosos se usan en la industria del textil y se necesita que tengan una alta resistencia a la tracción. Este tipo de polímeros son bastante cristalinos, pues la resistencia de éstos aumenta según su grado de cristalinidad (Chang, 2017).
- Plásticos: son polímeros que pueden ser moldeados a presión y alta temperatura para ser transformados en diversos objetos con formas diferentes, o bien, usados como pinturas o recubrimientos de superficies (López-Carrasquero, 2004).

3.4 Plásticos

En general el término “**plásticos**” es familiar y se refiere a polímeros que se utilizan en la fabricación de artículos estructurales (Ramos *et al.*, 2015). Los plásticos son materiales cuyas propiedades son intermedias entre los elastómeros y las fibras (Coreño, 2010). Estos materiales tienen una infinidad de aplicaciones que se pueden dividir, como:

- Plásticos de uso general, también llamados “*commodities*”, son materiales que se fabrican en grandes cantidades a bajo costo y son empleados en productos de la vida diaria (Morillas *et al.*, 2014), como pueden ser recipientes, enseres domésticos, juguetes, etc.
- Plásticos de ingeniería, su volumen de producción es menor y su precio más elevado. Se caracterizan por tener propiedades particulares para aplicaciones específicas. Estos plásticos pueden competir con los materiales metálicos o cerámicos a los que aventajan por su menor densidad y facilidad de procesado (Shrivastava, 2018). Encuentran una aplicación amplia en la industria automotriz.

- Plásticos avanzados, son materiales que se diseñan con una constitución molecular definida para satisfacer una aplicación concreta. Estos materiales tienen propiedades excepcionales que los califican como polímeros de vanguardia para el futuro. Entre las propiedades más relevantes de ellos destacan, la biocompatibilidad y la formación de fases cristal líquido (López-Carrasquero, 2004).

3.5 Producción de plásticos y problemas ambientales

Para comprender la magnitud de la entrada de plásticos en el medio ambiente natural y los océanos del mundo, se deben comprender varios elementos de la cadena de producción, distribución y gestión de residuos de plástico. Esto es crucial no solo para comprender la escala del problema, sino para implementar las intervenciones más efectivas para la reducción (Ritchie, 2018).

Los fabricantes hasta ahora han producido más de 9 mil millones de toneladas métricas de plástico. Casi todo proviene de combustibles fósiles y representa aproximadamente el 8% del consumo mundial de petróleo: aproximadamente el 4% para el plástico en sí y el 4% para el proceso de fabricación (Dauvergne, 2018). Si bien los plásticos y los envases de plástico son una parte integral de la economía global y brindan muchos beneficios, sus cadenas de valor, arquetípicamente lineales, conllevan importantes inconvenientes económicos y ambientales (Pittaluga, 2021).

Los plásticos se han utilizado ampliamente en la producción y la vida desde el día en que se inventaron, debido a sus notables propiedades de durabilidad, ligereza, estabilidad y bajo costo (Hopewell, 2009). La producción mundial de plástico alcanzó los 348 millones de toneladas en 2017 (Plastics Europe, 2018), aunque de acuerdo con Ritchie, 2018, esa cantidad se superó en el mismo 2017 (Figura 2).

De manera problemática, la durabilidad y la tenacidad de los plásticos tienen dos lados. Estas propiedades no solo mejoran el rendimiento de plástico también hacen que sean resistentes a la degradación natural, causando una grave amenaza para el ambiente. Esta resistencia tiende a convertirse en un gran desafío en el proceso de gestión de residuos, especialmente en el área de gestión sostenible de residuos. Una gran cantidad de residuos plásticos se ha descargado al ambiente en todo el mundo, causando el problema actual de contaminación (Dauvergne, 2018).

Producción mundial de plásticos, 1950 a 2017

Producción mundial anual de resinas poliméricas y fibras (producción de plásticos), medida en toneladas métricas por año.

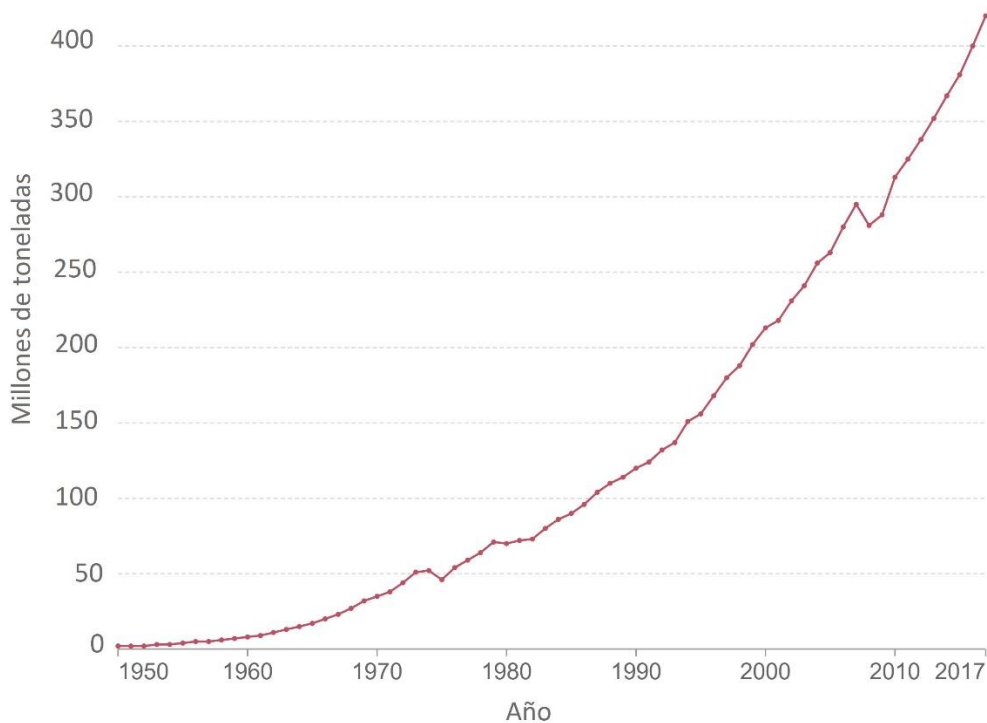


Figura 2. Producción de plástico a nivel mundial (Adaptado de Ritchie, 2018).

Los empaques plásticos son uno de los tipos más problemáticos de residuos porque generalmente están diseñados para un solo uso, por lo que están siempre presentes en la basura y son extremadamente difíciles de reciclar (Plastics Europe, 2016). La producción mundial de plástico es usada principalmente para el sector de empaquetado que se considera de un solo uso, ocupando el 40% del plástico producido a nivel mundial en 2019 (Figura 3).

El uso flexible y creciente y el empaque de múltiples capas plantea desafíos para la recolección, separación y reciclaje. Aunque algunos plásticos se pueden reciclar, hay muchos pasos involucrados que requieren recolección separada, transporte de larga distancia, procesamiento y remanufactura. El alto costo de estos pasos, el bajo valor comercial de los plásticos reciclados y el bajo costo de las materias primas limitan el reciclaje (Pauer, *et al.*, 2020).

Además, cuando se queman residuos plásticos, se liberan los gases de efecto invernadero (CO_2) y otros gases irritantes (HCl). También se liberan al medio ambiente productos químicos nocivos empleados en su fabricación. En los últimos años se han tomado algunas medidas para abordar el problema de los residuos plásticos, incluidos el "límite plástico", la "prohibición plástica" y la mejora de la eficiencia del tratamiento de los residuos plásticos. Sin embargo, estos métodos solo son efectivos en cierta medida, porque su escala de producción es mucho mayor que la reducción, además gran parte de la población necesita ser educada sobre los métodos responsables de tratamiento de residuos. Con la creciente producción mundial de plásticos, las personas son cada vez más conscientes de los problemas ambientales asociados con los residuos generados (Shen *et al.*, 2020).

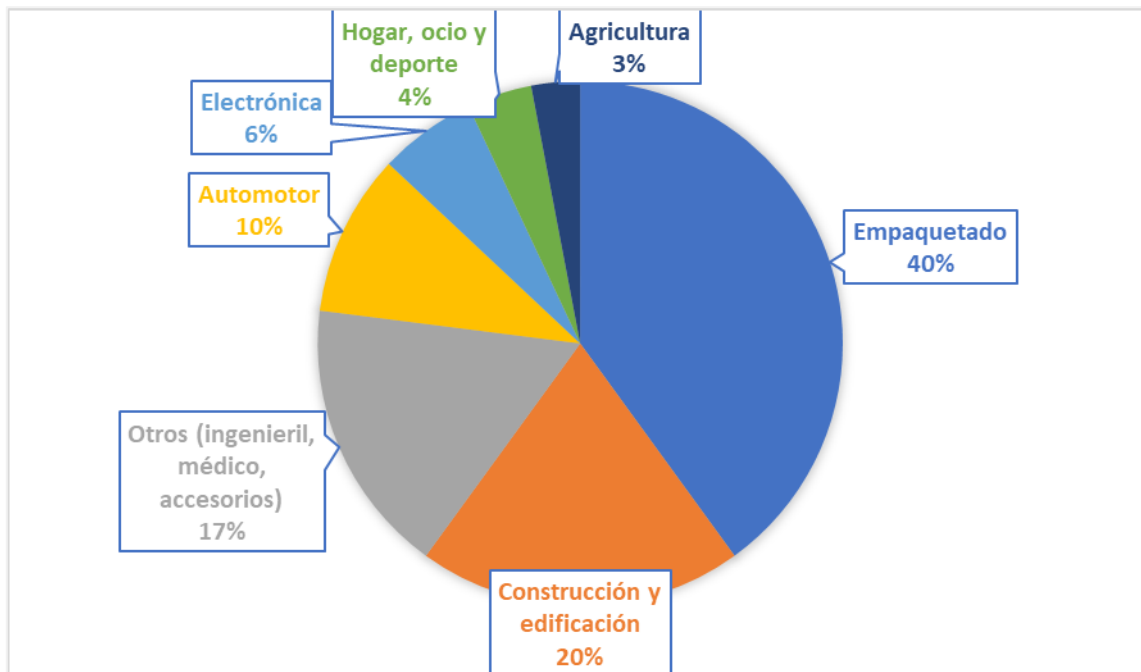


Figura 3. Demanda de plásticos por segmento (Plastics – the Facts 2019).

3.6 Polímeros biodegradables

El término “polímero biodegradable” (PB) se refiere a un tipo de plástico cuyas propiedades pueden cumplir con los requisitos de uso y permanecer sin cambios durante el período de almacenamiento, pero puede degradarse en sustancias que no afectan al medio después de su uso. Son un nuevo tipo de “plásticos” que pueden biodegradarse y desaparecer en el medio natural (Picó y Barceló *et al.*, 2019).

Tales polímeros pueden descomponerse por microorganismos (bacterias, hongos, algas, etc.) existentes en la naturaleza en materiales que pueden integrarse en el ecosistema natural sin efecto ecotóxico o residual por subproductos de degradación. El PB ideal es un tipo de material que tiene un rendimiento excelente al biodegradarse y que puede existir en la naturaleza como parte del ciclo del carbono (Shen *et al.*, 2020). Algunos ejemplos de polímeros biodegradables, así como su clasificación de acuerdo con su origen se encuentran en la Figura 4.

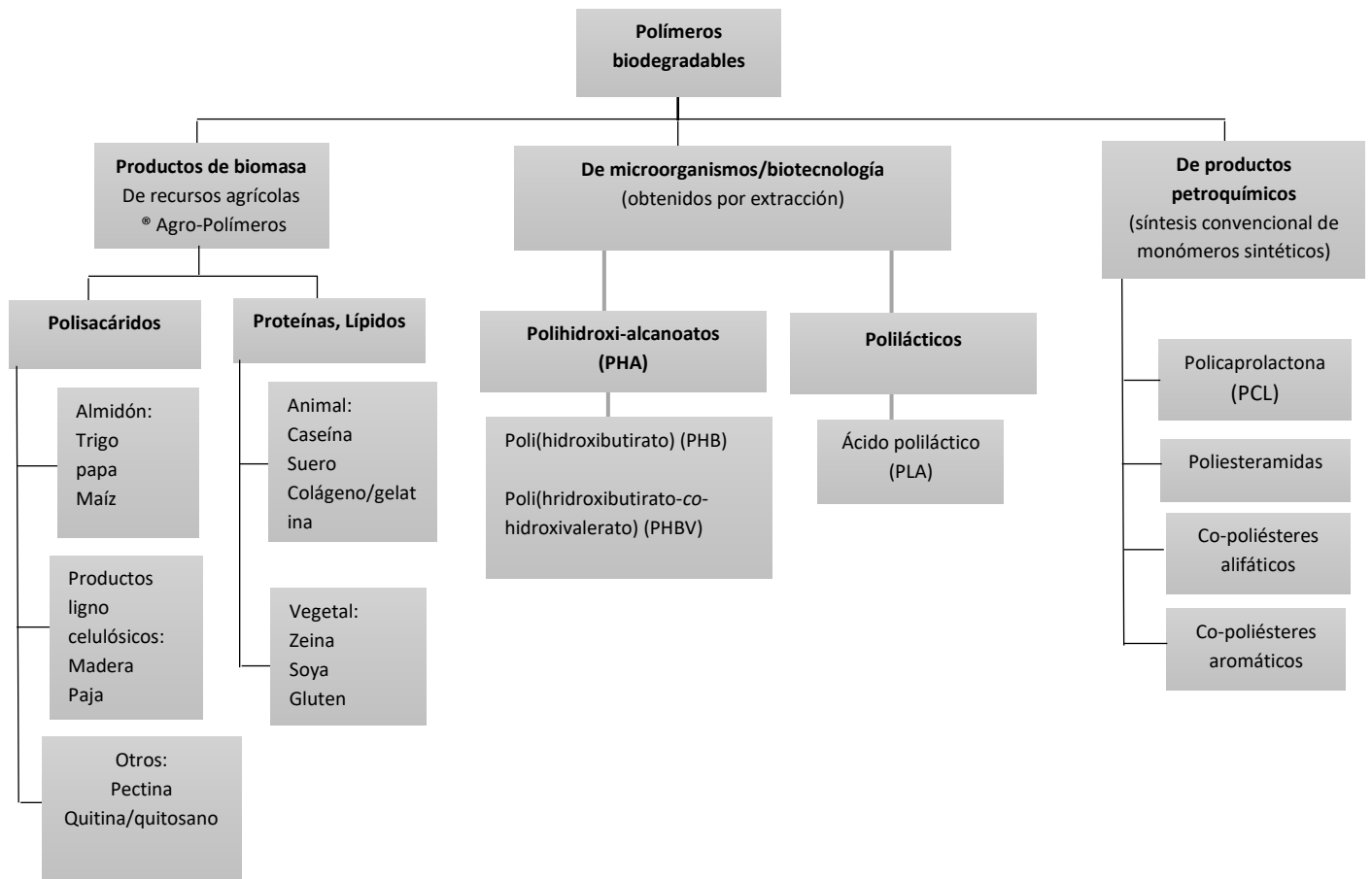


Figura 4. Clasificación y ejemplos de polímeros biodegradables (Avérous, 2004).

Debido a que algunos PB son biodegradables, se utilizan principalmente como materiales de envasado de alimentos blandos y duros. El embalaje es el sector que demanda más bioplásticos en la actualidad (European Bioplastics, 2019). Los productos más vendidos son bolsas de basura, envases blandos, envases rígidos y cerámicas desechables. En el futuro, el principal mercado de PB es la película de embalaje de plástico, película agrícola, bolsa de plástico desechable y vajilla de plástico desechable. En comparación con los materiales plásticos convencionales a base de petróleo, el costo de los PB es mayor (Rujnić-Sokele *et al.*, 2017), por ejemplo, en 2017, el precio del PLA fue de 4-5 dólares por kg (Plastics Insight, 2017), que fue entre 4 y 5 veces mayor al precio del PET cuyo precio ronda 1 dólar por kg (Jiang, 2020), pero algunas personas están dispuestas a elegir nuevos PB con un precio más alto para proteger el ambiente. Por lo tanto, la industria de BP tiene una gran perspectiva de desarrollo y un amplio mercado de aplicaciones (Shen *et al.*, 2020). Existen alternativas de bioplásticos para casi todos los materiales plásticos convencionales y su correspondiente aplicación. Con más materiales bioplásticos disponibles comercialmente, las capacidades de producción continuarán diversificándose, se muestra la capacidad de producción de PB en 2019 (Figura 5).

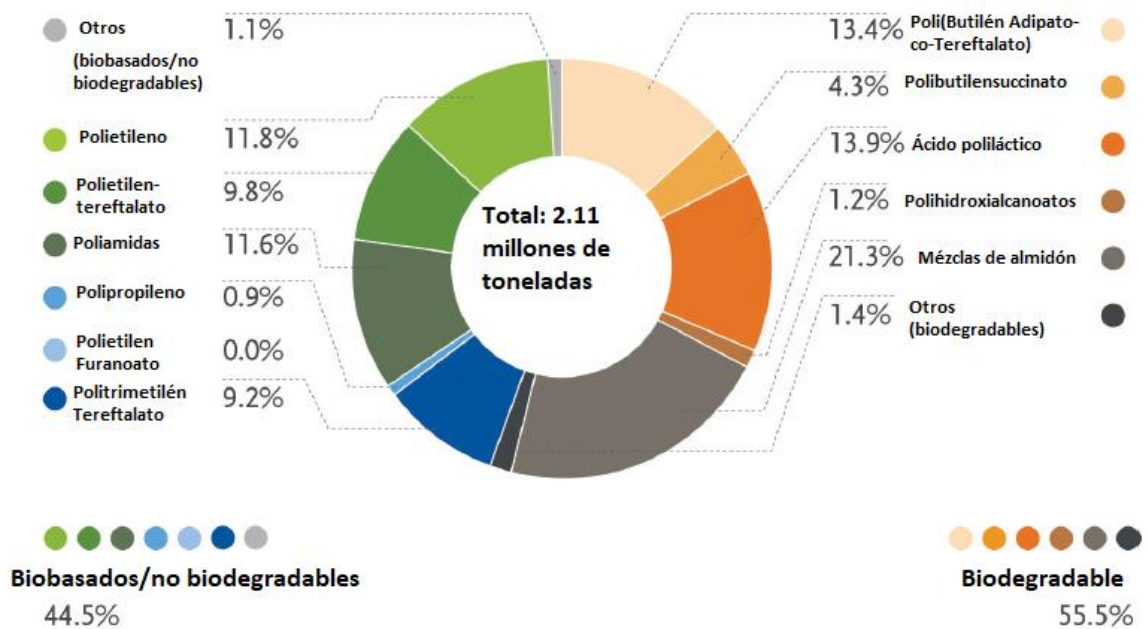


Figura 5. Capacidad de producción global de bioplásticos 2019 (por tipo de material) (Bioplastics, 2019).

El término bioplástico engloba a un grupo grande de plásticos amigables con el medio ambiente, se pueden encontrar 2 subgrupos: los biobasados y los biodegradables, que no son lo mismo.

Los biobasados son materiales hechos de fuentes renovables, tales como biomasa, y otras materias primas de origen biológico (Kimura, 2009); sin embargo, en algunos casos sus características químicas siguen siendo las mismas, por lo tanto, los plásticos de biobasados no son necesariamente biodegradables (Iwata, 2015).

Por otra parte, se tienen los biodegradables, que se refiere a los materiales que pueden degradarse completamente en biogas y biomasa sin dejar residuos tóxicos visibles y de manera natural, como resultado de estar expuestos a un ambiente microbiano y humedad, como los que se encuentran en el suelo (Arikan, 2015). Adicionalmente, se tiene a los bioplásticos compostables, estos se descomponen biológicamente por un proceso de compostaje como otros materiales compostables, para designarlo como compostable se debe determinar el grado de biodegradabilidad, su grado de desintegración, y la ecotoxicidad mediante pruebas estándar (Arikan, 2015).

Dentro de estos polímeros biodegradables el ácido poliláctico (PLA) tiene un gran potencial de aplicación como material de empaque, se han hecho estudios para mejorar sus propiedades mecánicas y térmicas para poder usarlo en empaques en general y particularmente en cualquier tipo de alimentos y bebidas.

3.7 Ácido poliláctico (PLA)

El comúnmente llamado ácido poliláctico o poli(ácido láctico) (PLA), es un polímero derivado de hidroxiácidos, pertenece a la familia de poliésteres alifáticos (Sengupta *et al.*, 2018) (Figura 6). Es un polímero biodegradable que ha sido ampliamente estudiado. Se utiliza para envases domésticos y aplicaciones biomédicas, como suturas

reabsorbibles, implantes quirúrgicos, almacén para tejido, dispositivos de ingeniería y de suministro controlado de medicamentos (Sin *et al.*, 2012).

El inicio del PLA se remonta a 1932, cuando Carothers lo sintetizó por primera vez, con un peso molecular de aproximadamente 3 000 Da. En la década de 1960, el PLA encontró su uso en campos médicos como material bioabsorbible (Kawai *et al.*, 2011).

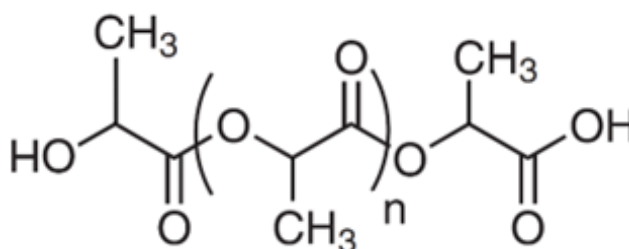


Figura 6. Estructura del ácido poliláctico) (Auras *et al.*, 2004).

3.8 Síntesis de ácido poliláctico

El PLA se sintetiza a través de un proceso de polimerización de su monómero, el ácido láctico. Hay dos rutas generales de polimerización, la primera por condensación directa y la segunda es por apertura del anillo láctido o ROP (de las siglas en inglés *Ring opening polimerization*) (Jamshidian *et al.*, 2010).

El PLA de condensación directa tiene un bajo peso molecular que puede incrementarse a un alto peso molecular mediante el uso de agentes de acoplamiento de cadena y la esterificación, sin embargo, estos productos de adición utilizados generan subproductos indeseados.

El método ROP produce PLA de alto peso molecular (*High Molecular Weight*). Este método fue el único método para producir PLA HMW puro, hasta que *Mitsui Toatsu Chemicals* comercializó un proceso en el que el ácido láctico se deshidrata azeotrópicamente en reflujo, a altas temperaturas, y presiones reducidas para obtener el polímero con un peso molecular promedio >300,000 Daltones (Garlotta, 2001). En la Figura 7 se ilustran las rutas de síntesis de PLA mencionadas.

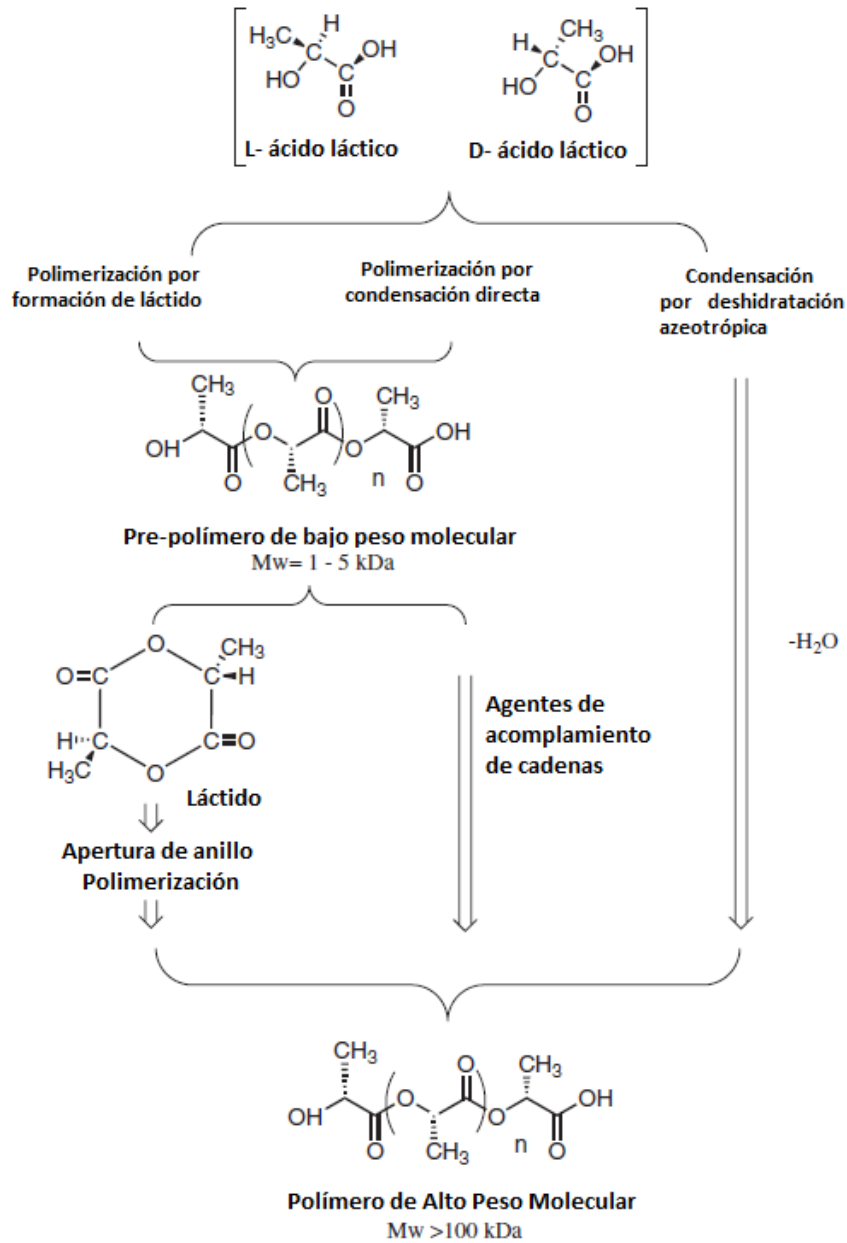


Figura 7. Rutas de síntesis de ácido poliláctico (Castro-Aguirre et al., 2016).

3.8.1 Obtención y usos del ácido láctico

El monómero del PLA, el ácido láctico, se produce industrialmente mediante el proceso de fermentación láctica, también se puede obtener por síntesis química, sin embargo, esta segunda vía tiene limitaciones importantes: la capacidad de producción es limitada, debido a la dependencia de un subproducto de otro proceso, los altos costos de fabricación y que el ácido láctico producido es una mezcla de enantiómeros D y L ópticamente inactiva (Datta y Henry, 2006) haciendo imposible producir sólo un estereoisómero. En el caso de la fermentación, la mayoría de las bacterias ácido-lácticas producen únicamente una forma enantiomérica, pues las enzimas lactato deshidrogenasas son estereoespecíficas (Serna-Cock et al., 2005). Por lo tanto, la fermentación es la vía preferida

para producir cualquiera de los enantiómeros de ácido láctico requeridos para fines industriales (Pretula *et al.*, 2016).

En la fermentación se prefiere el método homofermentativo porque da mayor rendimiento de ácido láctico (Jamshidian *et al.*, 2010). Se usan bacterias ácido-lácticas pertenecientes a distintos géneros (Tabla 1), el género *Lactobacillus* es el de mayor importancia, puesto que aporta alrededor de 80 especies ácido-lácticas. Algunas de estas cepas producen ácido láctico en una sola variante enantiomérica predominante o la mezcla de ambos. Por ejemplo, *Lactococcus lactis* LL0018 y *Lactobacillus casei* *sp.* producen ácido láctico con contenido de ácido L-láctico hasta 99.0%. Mientras que *Lactobacillus delbrueckii* LD0025 y *Sporolactobacillus inulinus* SI0073 producen ácido D-láctico con pureza enantiomérica de hasta 99.4%. En contraste, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus jensenii*, y *Lactobacillus acidophilus*, que puede producir una mezcla de ambos isómeros (Sin *et al.*, 2012).

Aunque el ácido L-láctico tiene mayor relevancia en el mercado global, su contraparte enantiomérica, ácido D-láctico, también posee relevancia en producción de ácido poli D-láctico, polímero que tiene relevancia en la producción de empaques.

Tabla 1. Ejemplos de bacterias ácido-lácticas, la fuente de carbono que se les suministra para su crecimiento y el rendimiento de ácido láctico producido (Adaptado de Nampoothiri *et al.*, 2010).

| Fuente de carbono | Microorganismo | Rendimiento de ácido láctico |
|--------------------------------|--|------------------------------|
| Celulosa | <i>Lactobacillus coryniformi</i> ssp. Subsp. <i>torquens</i> | 0.89 g/g |
| Cebada | <i>Lactobacillus casei</i> NRRL B-441 | 0.87-0.98 g/g |
| Bagazo de mandioca | <i>L. delbrueckii</i> NCIM 2025, <i>L. casei</i> | 0.90-0.98 g/g |
| Almidón de trigo | <i>Lactococcus lactis</i> ssp. ATCC 19435 | 0.77-1 g/g |
| Trigo | <i>Lactococcus lactis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 0.93-0.95 g/g |
| Almidón de papa | <i>Rhizopus oryzae</i> , <i>R. arrhizus</i> | 0,87-0.97 g/g |
| Almidón de maíz, arroz y trigo | <i>Lactobacillus amylovorus</i> ATCC 33620 | <0.70 g/g |
| Almidón de maíz | <i>Lactobacillus amylovorus</i> NRRL B-4542 | 0.935 g/g |

El ácido láctico (LA) es uno de los 12 componentes básicos de valor agregado más prometedores que pueden derivarse de los azúcares y utilizarse para la producción de otros productos químicos industriales (Department of Energy, 2004) (Figura 8). Una de las aplicaciones más comunes de LA es la síntesis de ácido poliláctico (PLA), que contribuye a más del 35% del mercado de bioplásticos debido a sus propiedades biodegradables (AMR,

3.9 Estereoquímica del ácido poliláctico

El ácido poliláctico se produce por la polimerización de su monómero, el ácido láctico (ácido 2 hidroxipropiónico). Éste existe en enantiómeros ópticamente activos: L o D. La proporción de enantiómeros da como resultado la producción de PLA con propiedades variables (Sengupta *et al.*, 2018). La polimerización del ácido láctico para dar PLA va a dar lugar a tres tipos de polímeros dependiendo del enantiómero del ácido láctico usado:

- La polimerización del enantiómero L-ácido láctico va a dar lugar al ácido poli (L-láctico) (PLLA). Éste tiene mayor relevancia en el mercado debido a su relación con los sistemas biológicos (lado derecho, Figura 9).
- La polimerización del enantiómero D-ácido láctico va a dar lugar al ácido poli (D-láctico) (PDLA) (lado izquierdo, Figura 9).
- La polimerización de ambos enantiómeros va a dar lugar al poli (ácido DL-láctico) (PDLLA).

Adicionalmente, al mezclar polímeros PDLA y PLLA, se obtiene un estereocomplejo, del cual se pueden variar la proporción de ambos polímeros, esta mezcla se conoce como estereocomplejo de ácido poliláctico (sc-PLA).

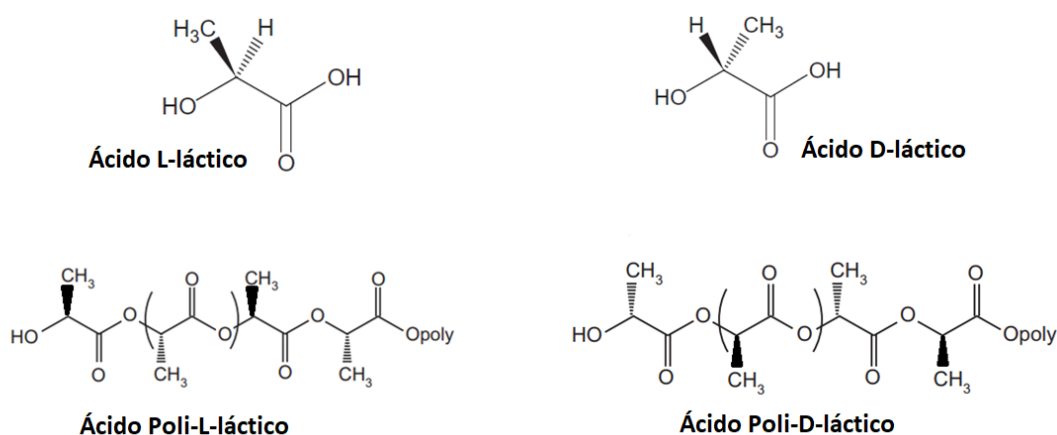


Figura 9. Enantiómeros del ácido láctico y sus respectivos polímeros (Modificado de Sin, 2013).

3.10 Usos y aplicaciones del ácido poliláctico

En la década de 1960, el PLA se desarrolló como material biomédico en función de su naturaleza bioabsorbible y biocompatible (Jiménez, 2014), principalmente en componentes internos del cuerpo, como tornillos en tobillos, rodillas y manos, como tachuelas y clavijas para la fijación de ligamentos; placas y tornillos para la fijación del hueso craneomaxilofacial, así como para suturas quirúrgicas e implantes (Farah *et al.*, 2016). En el ámbito farmacéutico, se usa en sistemas de administración de fármacos, para encapsulación y administración de proteínas, desarrollo de microesferas e hidrogeles, entre otros (Jiménez, 2014).

Por algunos años, las aplicaciones del PLA fueron limitadas debido a su alto costo, así como a sus pobres propiedades mecánicas (debido a que se usaba PLA de bajo peso molecular) (Sin, 2012). Fue hasta principios de los 90, cuando Cargill Inc. logró sintetizar PLA de alto peso molecular mediante el método de polimerización por apertura de anillo (ROP). Este PLA tuvo mejores propiedades mecánicas además de su biodegradabilidad, el cual se comercializó a mediados de los 90 y debido a su buen desempeño mecánico se postuló como un material que podía reemplazar a polímeros convencionales derivados del petróleo (Jiménez, 2014).

Debido a su potencial como material de empaque, se han hecho estudios para determinar sus propiedades mecánicas. En la industria del envasado de alimentos, se requieren condiciones específicas para mantener la vida útil y conservar la calidad de los alimentos durante el proceso de almacenamiento. Para mantener estas condiciones dentro del paquete, los materiales necesitan propiedades de barrera contra gases; para determinar estas, comúnmente se hacen pruebas de permeabilidad al oxígeno y al vapor de agua. En estas pruebas, la permeabilidad es mejor mientras menor sea la cantidad de gas que pasa por el material. Algunos resultados de estas pruebas realizadas han mostrado que el PLA tiene propiedades de barrera de gas comparables con algunos plásticos derivados del petróleo, como el PET (Ashok, 2016).

Otras propiedades relevantes en empaques son las mecánicas, de estas depende que el material/alimento consumido no modifique su composición o propiedades a consecuencia de una rotura o deformación del empaque, para determinar el desempeño mecánico, algunas pruebas comunes que se hacen son la tensión de rotura, el porcentaje de elongación y el módulo de elasticidad. De manera general se puede decir que mientras más grande sea el valor determinado para cada prueba, es mejor el desempeño mecánico.

Tabla 2. Comparación de propiedades de barrera contra gases y propiedades mecánicas de PLLA y PET (Auras et al., 2005).

| Prueba experimental | PLLA | PET |
|---|----------|----------|
| Coefficiente de permeabilidad al oxígeno (kg/m/(m²/s/Pa)) | 4.33E-18 | 6.95E-19 |
| Coefficiente de permeabilidad al vapor de agua (kg/m/(m²/s/Pa)) | 1.34E-14 | 2.82E-15 |
| Tensión de rotura (a 22.2 °C) (kpsi) | 8.2 | 7.1 |
| Elongación (a 22.2 °C) (%) | 3.8 | 4.1 |
| Módulo de elasticidad (a 22.2 °C) (kpsi) | 295 | 212 |

En la Tabla 2, se presenta la comparación de los resultados de pruebas de PLLA y PET como materiales de empaque. En el caso de pruebas de permeabilidad, el desempeño de PLLA y PET es similar, siendo mejor el PET en una orden de magnitud. En el caso de las pruebas de desempeño mecánico, también se aprecia que tienen desempeños similares, sin embargo, en las pruebas de tensión de rotura y módulo de elasticidad, el PLLA tiene mejor desempeño que el PET.

En los últimos años, se han explorado nuevas opciones para mejorar las propiedades de barrera y mecánicas del PLA. Ahmadzadeh en 2020 produjo un poli(ácido DL-láctico) (PDLLA) de alto peso molecular, el cual tiene mejores propiedades para la aplicación en envases que el PLLA. Por otro lado, Tsuji en 2016 sintetizó un estereocomplejo de ácido poliláctico (sc-PLA), él menciona que dentro del estereocomplejo, hay una fuerte interacción entre los segmentos individuales de cada polímero mezclado, dando como consecuencia que este material tenga mejores propiedades mecánicas y de barrera contra gases respecto al PLLA.

Debido a su aplicación como material de empaque, la demanda de PLA está aumentando a la par de la capacidad de producción. En 2017 este polímero ocupó un 10% del total de polímeros producidos a nivel mundial (Figura 10).

Capacidad global de producción de polímeros en 2017

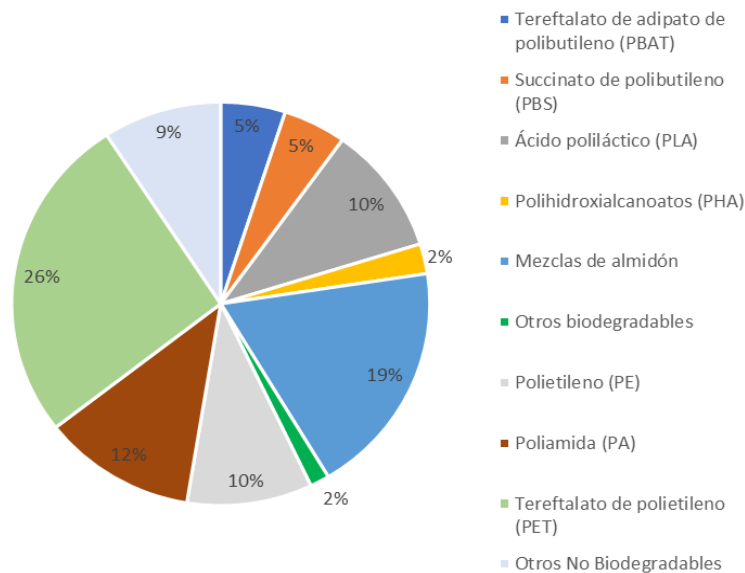


Figura 10. Producción global de polímeros en 2017, el PLA ocupó el 10% de la producción mundial (Adaptado de Ahmadzadeh, 2020).

Actualmente, *NatureWorks* es el principal productor de PLA, produce 150 000 toneladas anuales de PLA usando maíz como materia prima, seguido de otras empresas como *Pyramid technologies* y *WeForYou* entre otros (Figura 11). *Nature Works* produce su propio ácido láctico el cual usa en la producción de su marca comercial *Ingeo®* PLA (Castro Aguirre *et al.*, 2016).

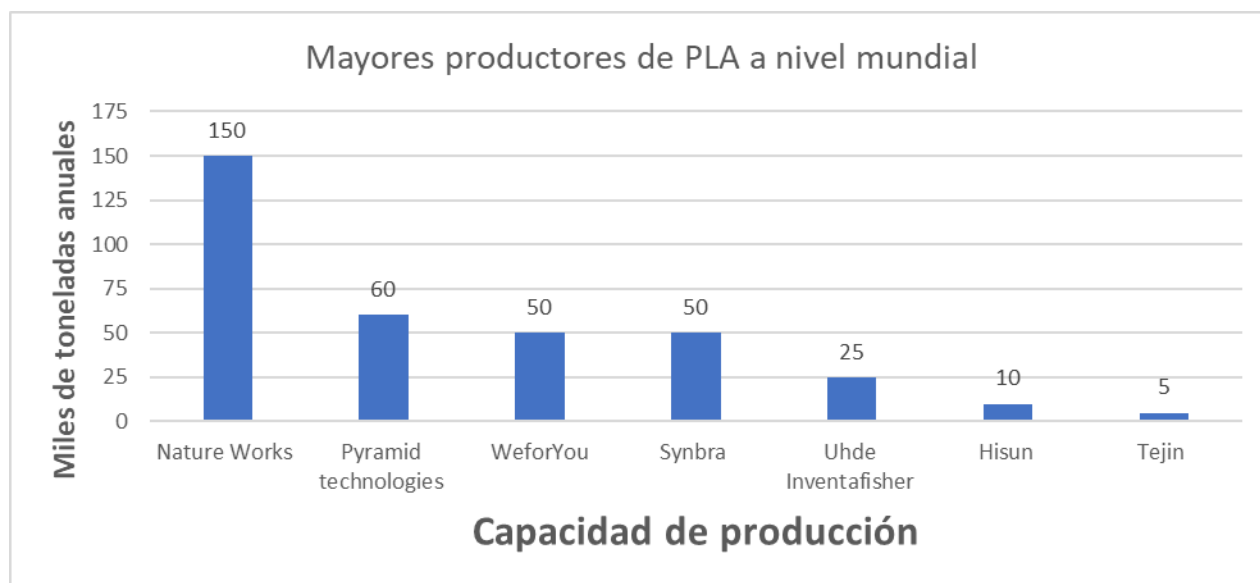


Figura 11. Principales empresas productoras de PLA a nivel mundial (Plastics Insight, 2017).

El PLA es un polímero biodegradable que tiene un gran potencial de aplicación, principalmente en materiales de empaque, el enlace éster que posee en su estructura es susceptible a la hidrólisis por algunas enzimas, este método de hidrólisis es amigable con el medio ambiente, con el cual puede obtenerse al monómero, el cual podría tener un valor agregado, debido a sus múltiples aplicaciones en otros sectores como el químico (como precursor de otros productos), alimenticio, cosmético entre otros, algunas de las enzimas que pueden degradar PLA, son las cutinasas.

3.11 Cutinasas

Las cutinasas (EC 3.1.1.74) son serín esterases que pertenecen a la super familia de las α / β hidrolasas (Figura 12). Poseen una clásica tríada catalítica “Serina - Histidina – Aspártico”, en la cual la serina catalítica se expone al disolvente. Las cutinasas carecen de la tapa hidrofóbica que cubre la serina del sitio activo en la mayoría de las verdaderas lipasas, por lo que el sitio activo de la cutinasa es lo suficientemente grande como para acomodar cutina, que es un sustrato de alto peso molecular. Algunas cutinasas también pueden hidrolizar poliésteres sintéticos de alto peso molecular y son capaces de hidrolizar una mayor variedad de sustratos, incluidos ésteres solubles de bajo peso molecular y triacilglicerol de cadena corta y larga, así como también son capaces de catalizar la esterificación y la transesterificación (Chen *et al.*, 2013).

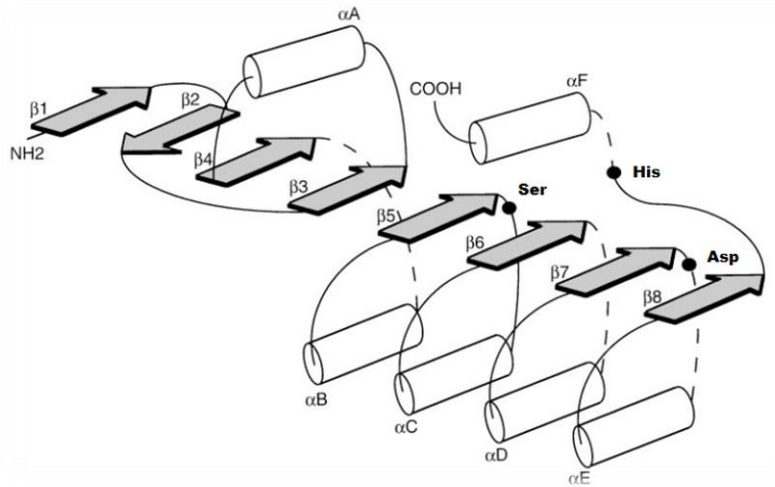


Figura 12. Plegamiento típico α/β de hidrolasas. α Hélices están indicadas por cilindros y β plegadas representadas por flechas. Se indica la triada Ser - His – Asp del sitio catalítico (Jaeger et al., 1999).

Las cutinasas se han identificado y caracterizado principalmente en hongos y varias bacterias. Entre ellos, la cutinasa de *Fusarium solani pisi* ha sido la más estudiada y ampliamente utilizada en aplicaciones industriales. Las propiedades bioquímicas de cutinasas de otros hongos tales como *Alternaria brassicicola*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia fructicola*, *Sirococcus conigenus*, *Trichoderma reesei* y *Thielavia terrestris* se han estudiado en años recientes, se cree que la hidrólisis de la capa cuticular catalizada por cutinasas es esencial para un ataque fúngico inicial en plantas (Yang et al., 2018). Un ejemplo de la estructura de una cutinasa se encuentra en la Figura 13, pertenece a la cutinasa 1 de *Aspergillus oryzae*.

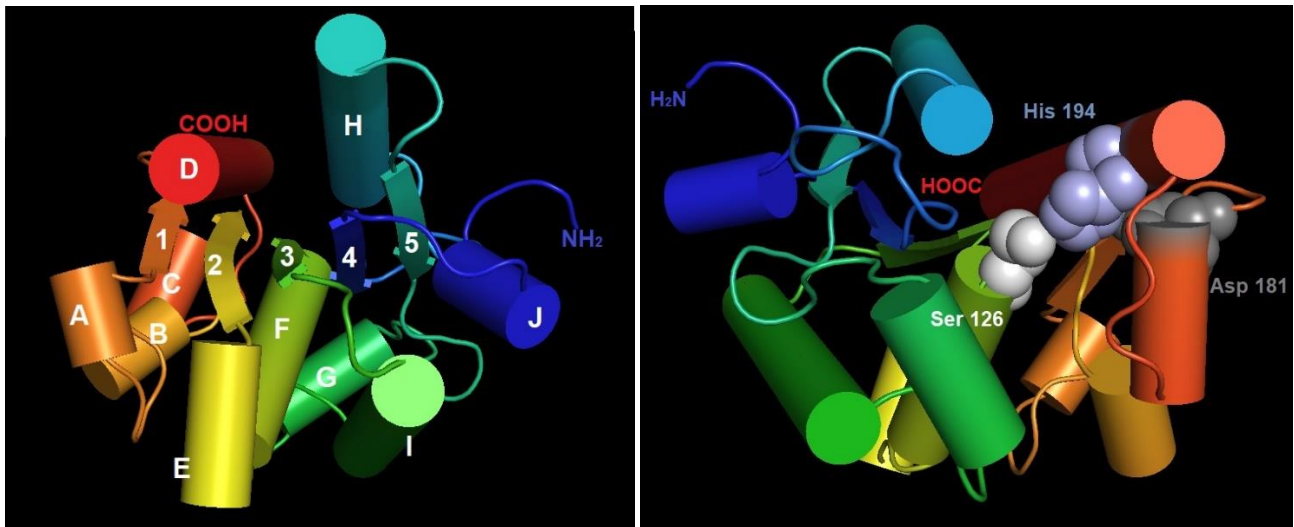


Figura 13. Estructura cristalizada de la cutinasa 1 de *A. oryzae*, Las α hélices están indicadas por cilindros e identificadas por letras, las β plegadas representadas por flechas e identificadas por números. Se muestra una vista de la triada del sitio activo (Ser121, Asp181 e His 194). Obtenida de Protein Data Bank, 3GBS, (Liu et al., 2009).

Existen diferentes géneros productores de cutinasas (Tabla 3), sin embargo, la primera cutinasa identificada se descubrió por primera vez en la década de 1960 y se caracterizó a principios de 1970, y fue la cutinasa del hongo filamentoso *F. solani pisi*, que se convirtió rápidamente en un sistema modelo para el estudio de la estructura, función y reactividad de cutinasas en general (Chen *et al.*, 2013).

Las cutinasas se clasifican entre las α / β hidrolasas porque, a diferencia de la mayoría de las esterasas, son capaces de hidrolizar sustratos lipídicos y, a diferencia de las lipasas típicas, la actividad de la cutinasa no se activa por efectos interfaciales, hidroliza eficientemente los sustratos hidrófobos en solución o en emulsiones. Estas propiedades, que pueden usarse para identificar las cutinasas verdaderas, desdibujan la distinción entre esterasas y lipasas hasta el punto de que algunos han defendido un nuevo sistema de clasificación biofísicoquímico (Ali B. *et al.*, 2012).

Tabla 3. Géneros productores de cutinasas (Nampoothiri *et al.*, 2010).

| Organismo | Género | Especie | Referencia |
|------------------|----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| Hongos | <i>Alternaria</i> | <i>alternata</i> | Tanabe <i>et al.</i> , 1988 |
| | <i>Aspergillus</i> | <i>oryzae</i> | Maeda <i>et al.</i> , 2005 |
| | <i>Botrytis</i> | <i>cinerea</i> | Van Kan <i>et al.</i> , 1997 |
| | <i>Colleotrichum</i> | <i>gloesporioides</i> | Dickman & Suresh, 2009 |
| | <i>Fusarium</i> | <i>solani</i> | Martínez <i>et al.</i> , 1992 |
| | <i>Trichoderma</i> | <i>harzianum</i> | Rubio <i>et al.</i> , 2008 |
| | <i>Glomerella</i> | <i>cingulata</i> | Abu Bakar <i>et al.</i> , 2005 |
| Bacterias | <i>Streptomyces</i> | <i>scabies</i> | McQueen & Schottel, 1987 |
| | <i>Pseudomonas</i> | <i>putida</i> | Sebastian & Kolattukudy, 1987 |
| | <i>Thermonospora</i> | <i>fusca</i> | Fett <i>et al.</i> , 1999 |
| | <i>Thermobifida</i> | <i>fusca</i> | Chen <i>et al.</i> , 2008 |
| Levaduras | <i>Cryptococcus</i> | sp. | Masaki <i>et al.</i> , 2005 |
| Polen | <i>Tropaelum</i> | <i>majus</i> | Maiti <i>et al.</i> , 1979 |
| | <i>Brassica</i> | <i>napus</i> | Hiscock <i>et al.</i> , 1994 |

3.12 Cutina

La cutina, el polímero cuticular de plantas superiores, es un poliéster lipídico compuesto de ácidos grasos hidroxilados y epoxi. De 16 y 18 carbonos unidos por un enlace éster (Figura 14). Desempeña un papel clave en la protección contra la entrada de patógenos en plantas, y su degradación enzimática ha demostrado ser uno de los primeros pasos en un proceso de infección. Se ha demostrado que algunos microorganismos viven con cutina como su

única fuente de carbono y se ha presentado la producción extracelular de enzimas cutinolíticas (Carvalho *et al.*, 1999). Microorganismos, principalmente hongos y bacterias, pueden hidrolizar este polímero secretando enzimas llamadas cutinasas (Chen *et al.*, 2013).

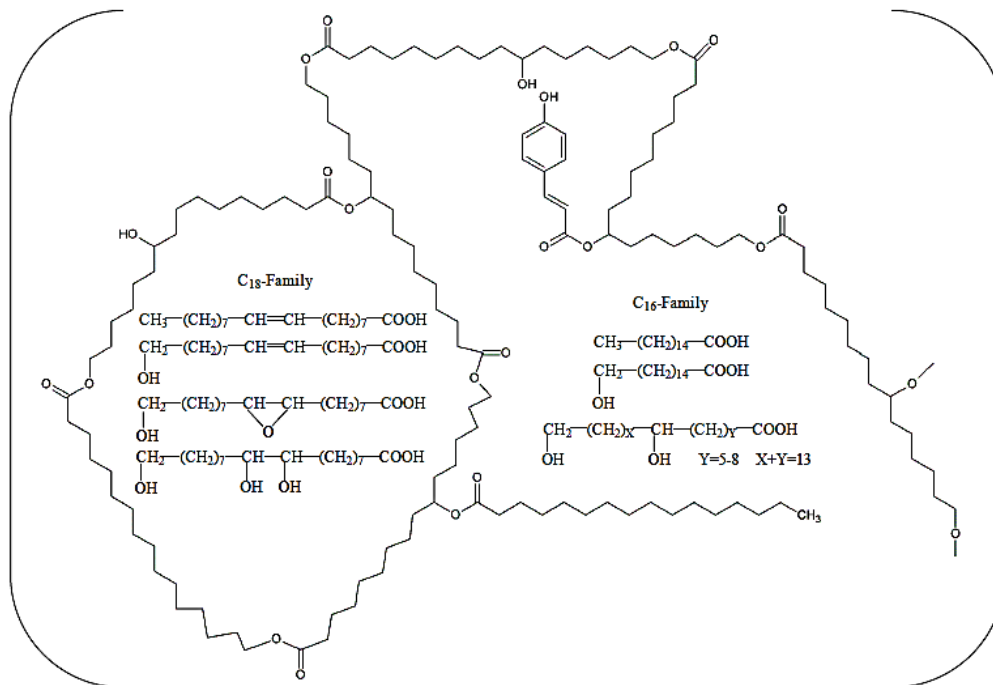


Figura 14. Estructura de la cutina y sus monómeros (Nikolaivits *et al.*, 2018).

3.13 Mecanismo de hidrólisis de las cutinasas

El mecanismo de hidrólisis del sustrato es en general el mismo para las alfa beta hidrolasas (Figura 15) y consiste en el incremento del carácter nucleofílico de la serina por la transferencia de un protón al residuo de histidina, conduciendo al ataque por parte del átomo de oxígeno del grupo hidroxilo de la serina sobre el carbono del grupo carbonilo del enlace éster susceptible (1). Se forma un intermediario tetraédrico, donde el átomo del oxígeno del carbonilo se carga negativamente y se estabiliza a través de puentes de hidrógeno con los grupos amino de la cadena principal. Estos residuos construyen una cavidad oxianiónica que en algunas lipasas y en el caso de las cutinasas es preformada con una orientación correcta (2). Posteriormente la histidina dona un protón al oxígeno del enlace éster en el cual se lleva la ruptura, se libera el alcohol y se forma un segundo intermediario con el ácido graso del sustrato que se encuentra esterificado a la serina formándose la enzima acilada (3). El siguiente paso se da por una reacción de desacetilación, en la que ocurre un ataque nucleofílico al átomo de carbono del carbonilo del intermediario covalente por parte de una molécula de agua, lo que provoca la ruptura del enlace éster entre la serina y el componente acilo que resulta en la liberación del producto y la regeneración de la enzima (4) (Jaegger *et al.*, 1999; Bornscheuer *et al.*, 2006).

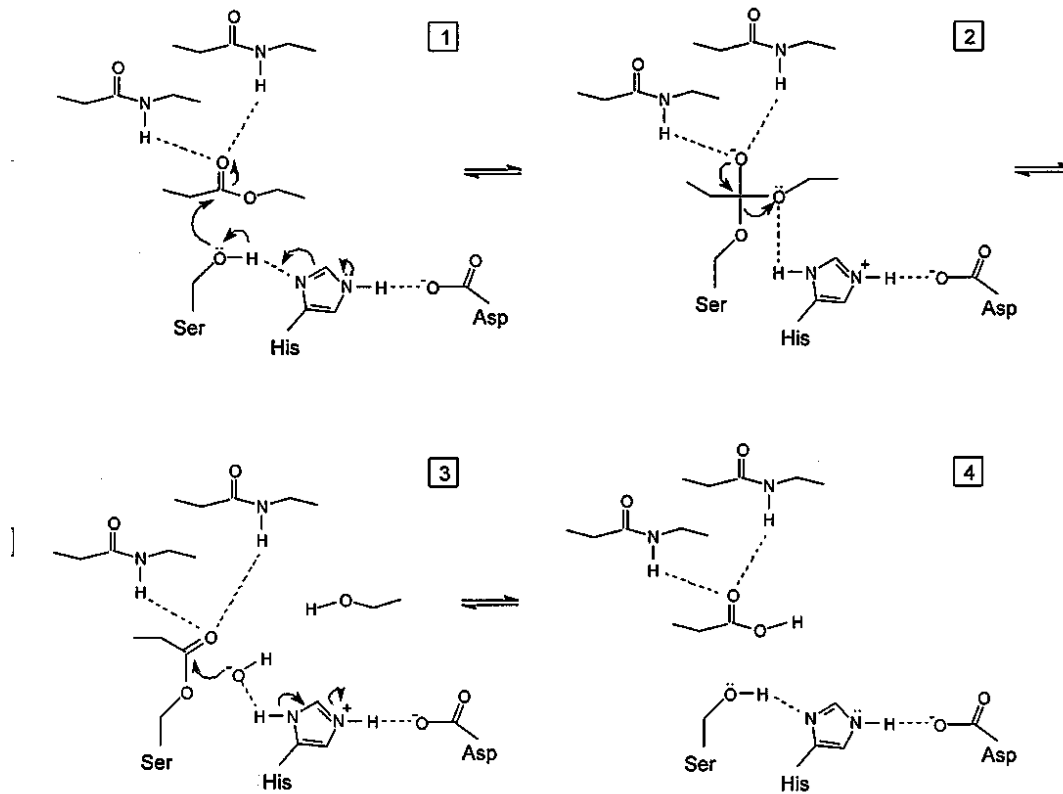


Figura 15. Mecanismo de hidrólisis de alfa beta hidrolasas (lipasa). 1. Ataque nucleofílico; 2. Intermediario tetraédrico; 3. Desacetilación; 4. Liberación del producto y regeneración del sitio activo de la enzima (Jaeger et al., 1999).

3.14 Cutinasas de *Aspergillus nidulans*

Aspergillus nidulans es un hongo ascomiceto que produce esporas sexuales y asexuales, pertenece a la clase Eurotiomycetes y al orden Eurotiales. Tiene un crecimiento rápido en medio sólido o líquido bajo una variedad de condiciones nutricionales (Rittenour et al., 2009). Se ha convertido en uno de los organismos más importantes dentro de la genética de eucariontes. Los trabajos realizados han contribuido en avances en el conocimiento sobre el desarrollo sexual y asexual de hongos, regulación metabólica, control del ciclo celular, reparación del ADN, entre otros (Galagan et al., 2005). A pesar de no ser utilizado industrialmente, es capaz de producir gran variedad de enzimas extracelulares con aplicaciones potenciales ya que estas enzimas pueden poseer actividad de proteasa, esterasa o cutinasa. *Aspergillus nidulans* requiere cuatro cutinasas, y el grupo de trabajo ha propuesto un modelo en el que se postula el papel de cada una de ellas (Bermúdez et al., 2019) en respuesta a efectores regulatorios y a mecanismos de degradación de la cutina a partir del análisis de su genoma, en el grupo de trabajo se han reportado, aislado, clonado, expresado y caracterizado los 4 genes que codifican para dichas cutinasas. En la tabla 4 se muestran los genes que codifican 3 cutinasas, así como parte de la caracterización que se ha hecho dentro del grupo de trabajo.

Tabla 4. Cutinasas de *A. nidulans* estudiadas en el grupo de trabajo.

| | A1 | A2 | A3 |
|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|
| Gen | AN05309 | AN07541 | AN07180 |
| Número de aminoácidos | 213 | 255 | 221 |
| Peso | 24.8 kDa | 33kDa | 29.4 kDa |
| pH óptimo | 9 | 7-9 | 9 |
| Temperatura óptima | 60 °C | 40 °C | 40 °C |
| Degradación de poliésteres | Poliésteres de cadena corta | Poliésteres de cadena corta y larga | Poliésteres de cadena corta |
| Disolventes | Isopropanol y hexano (30%) | | Hexano y tolueno (30%) |
| Referencia | Solís, 2015 | Morales, 2015 | Llanos, 2018 |

3.15 Mecanismo de degradación de las cutinasas de *Aspergillus nidulans*

La cutina es un componente clave de la cutícula, la función principal de esta capa es proteger a las plantas contra la desecación y el estrés biótico. Algunos microorganismos patogénicos secretan enzimas como lipasas o cutinasas para penetrar la cutícula de las plantas; se ha sugerido que algunas de las enzimas secretadas escinden a la cutina de la planta, liberando monómeros. El genoma de *A. nidulans* codifica 4 cutinasas que se han caracterizado bioquímicamente, sin embargo, se desconoce si estas se expresan simultánea o secuencialmente, tampoco hay información disponible referente al mecanismo de acción de cada una o si en conjunto forman un sistema para degradar a la cutina.

Bermúdez-García *et al.* en 2019, estudió la regulación de los genes de las 4 cutinasas de *A. nidulans* y el papel de cada cutinasa en la degradación de la cutina. Los resultados mostraron que el tipo de monómeros liberados probablemente depende del mecanismo de acción de cada cutinasa. Los productos producidos por A1 y A3 fueron similares, sin embargo, las muestras de cutina incubadas con A1 mostraron la presencia de ácido 9,10-dihidroxihexadecanoico, sugiriendo que esta enzima escinde los enlaces de reticulación en la estructura de la

cutina, mostrando un mecanismo de escisión endolítico. Por otra parte, A2 y A3 liberan ácidos grasos que se encuentran típicamente en los extremos de la molécula y que participan en la formación de ésteres primarios, lo que sugiere que estas enzimas tienen un mecanismo de escisión exolítico (Figura 16).

Los mecanismos de escisión de las 4 cutinasas de *A. nidulans* sobre la cutina, reflejan una estrategia integral y complementaria para degradar la cutina, por lo que cada una de ellas puede tener diferentes usos biotecnológicos, asimismo, esta estrategia integral podría reflejarse en otro sustrato diferente de la cutina.

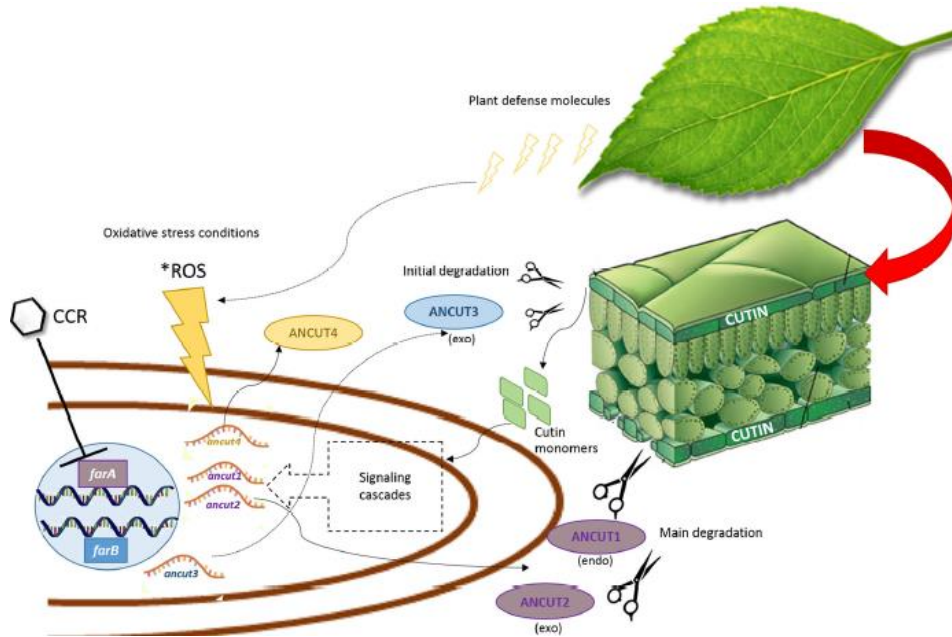


Figura 16. Esquema representativo del mecanismo y de reacción por las 4 cutinasas de *A. nidulans* sobre su sustrato natural la cutina (Bermúdez et al., 2019).

3.16 Cutinasas y degradación de ácido poliláctico

El PLA está formado por unidades de ácido láctico unidas entre sí mediante un enlace éster, este enlace es susceptible para ser hidrolizado por enzimas. La presencia de este enlace éster proporciona susceptibilidad del

PLA para ser hidrolizado por enzimas, esta susceptibilidad se ha aprovechado para hacer estudios de hidrólisis cutinasas de diferentes microorganismos (Tabla 5).

Tabla 5. Antecedentes de hidrólisis de PLA por cutinasas de diferentes microorganismos.

Dentro de los estudios que demuestran la degradación de PLA por cutinasas de diferentes microorganismos, utilizan diferentes métodos para determinar la degradación del polímero, algunos de estos, se encuentran en la

| Microorganismo | Enzima(s) | Temperatura (°C) | Agitación (rpm) | Medio (Regulador) | Pretratamiento y tipo de poli(ácido láctico) | Ref. |
|-------------------------------------|--|------------------|-----------------|-------------------------|--|--------------------------------|
| <i>Thermobifida cellulosilytica</i> | Thc_CUT1, Thc_CUT2, | 37° | 130 | Fosfatos pH=7 | PLLA, Cortado y prelavado con tritón X100 | Ribitsch <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudozyma antarctica</i> | PaE (PaCLE1) | 30°, 72 hrs | - | Tris-HCl pH= 8.8 | - | Shinozaki <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Humicola insolens</i> | HiC | 37° | 130 rpm | Tris HCl pH=7 | PLLA Cortado prelavado con tritón X100 | Pellis <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Cryptococcus magnus</i> | CmCut1 | 30°, 24 hrs | - | HEPES_NaOH pH=7.4 | - | Suzuki <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Cryptococcus flavus</i> | CfCLE | 30°, 24 hrs | - | HEPES–NaOH pH= 7.8 | Láminas PLLA, PDLLA | Watanabe <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> | mtCUT | 30°, 50 hrs | 100 rpm | Tris-HCl pH= 8.5 | PLA cortado | Yang <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Cryptococcus sp. strain S-2</i> | CLE from <i>Cryptococcus sp strain S-2</i> | 30°, 60 hrs | 50 rpm | Tris-HCl (20 mM) pH=8.0 | PLA emulsificado | Masaki <i>et al.</i> , 2005 |

tabla 6.

Tabla 6. Métodos de análisis de degradación de PLA usados en otras investigaciones.

| Microorganismo | Enzima(s) | Métodos de análisis de degradación de PLA | Ref. |
|-------------------------------------|--|--|--------------------------------|
| <i>Thermobifida cellulosilytica</i> | Thc_CUT1, Thc_CUT2, | Liberación de ácido láctico por cromatografía de líquidos de alto desempeño con detector de índice de refracción (HPLC-RI) | Ribitsch <i>et al.</i> , 2017 |
| <i>Pseudozyma antártica</i> | PaE (PaCLE1) | Carbono orgánico total (TOC) liberado por la degradación de PLA, Microscopía electrónica de barrido (SEM) | Shinozaki <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Humicola insolens</i> | HiC | Liberación de ácido láctico por cromatografía de líquidos de alto desempeño con detector de índice de refracción (HPLC-RI) | Pellis <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Cryptococcus magnus</i> | CmCut1 | Carbono orgánico total (TOC) liberado por la degradación de PLA | Suzuki <i>et al.</i> , 2013 |
| <i>Cryptococcus flavus</i> | CfCLE | Carbono orgánico total (TOC) liberado por la degradación de PLA | Watanabe <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Myceliophthora thermophila</i> | mtCUT | Pérdida por peso | Yang <i>et al.</i> , 2018 |
| <i>Cryptococcus sp.</i> strain S-2 | CLE from <i>Cryptococcus sp</i> strain S-2 | No mencionado | Masaki <i>et al.</i> , 2005 |
| <i>Aspergillus nidulans</i> | A 1, A2, A3 y A4 | Titulación con NaOH, pérdida por peso y microscopía electrónica de barrido (SEM). | Llanos, 2018 y Sánchez, 2015 |
| <i>Cryptococcus sp.</i> S-2 | CLE from <i>Cryptococcus sp</i> S-2 | Pérdida de peso, determinación de cristalinidad dispersión de rayos X de gran angular (WAXS), determinación de productos liberados por Espectrometría de masas con ionización por electro aerosol (ESI-MS) | Kawai, 2011 |

En el grupo de trabajo se ha demostrado que las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* para degradan ácido poliláctico de bajo peso molecular (Tabla 7).

Tabla 7. Resultados preliminares de hidrólisis de PLLA LMW (de bajo peso molecular) en el grupo de trabajo usando cutinasas recombinantes de *A. nidulans*.

| Enzima | Temperatura | pH | Tiempo | Medio (Regulador) | Condiciones del polímero | Pérdida de peso | Referencia |
|--------|-------------|----|-----------|-------------------------------|--------------------------|-----------------|---------------|
| A1 | 37 ° | 7 | 72 horas | Fosfatos de Sodio 50 mM, pH=7 | PLLA (5000 Mn), lámina | 14.94 % | Sánchez, 2015 |
| A2 | 37 ° | 7 | 72 horas | Fosfatos de Sodio 50 mM, pH=7 | PLLA (5000 Mn), Lámina | 13.47 % | Sánchez, 2015 |
| A3 | 37 ° | 9 | 4 semanas | Tris-HCl 50 mM, pH=9 | PLLA (5000 Mn), lámina | 30.12 % | Llanos, 2018 |
| A4 | 37 ° | 7 | 4 semanas | Fosfatos de Sodio 50 mM, pH=7 | PLLA (5000 Mn), lámina | 7.54 % | Llanos, 2018 |

Aunque muchos estudios se basan en la degradación de PLA por cutinasas debido a su susceptibilidad por el enlace éster que posee, hay reportes de otras enzimas no cutinasas que también pueden degradar PLA (Tabla 8).

Tabla 8. Antecedentes de enzimas no cutinasas que degradan PLA.

| Microorganismo | Enzima | Tipo | Referencia |
|------------------------------------|--------------|----------|--------------------------------|
| <i>Candida antarctica</i> | fCaLB | Lipasa | Pellis <i>et al.</i> , 2015 |
| <i>Tritirachium album</i> | Proteinasa K | Proteasa | Pranamuda <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Rhizopus delemere</i> | - | Lipasa | Fukuzaki <i>et al.</i> , 1989 |
| <i>Comamonas acidovorans</i> TB-35 | - | Esterasa | Akutsu <i>et al.</i> , 1998 |
| <i>Amycolatopsis sp</i> | - | Esterasa | Ikura <i>et al.</i> , 1999 |
| <i>Tritirachium album</i> | Proteinasa K | Proteasa | Kawai <i>et al.</i> , 2011 |

El ácido poliláctico es un material que puede sustituir a algunos polímeros derivados del petróleo debido a que tiene buenas características como material de empaque, a su biodegradabilidad, sin embargo, la producción de este polímero es elevada, limitando su aplicación en el mercado de empaques y embalajes.

3.17 Limitaciones económicas del ácido poliláctico

Aunque el ácido poliláctico tiene características importantes como material de empaque, una de las limitantes es su alto precio (Rujnić-Sokele *et al.*, 2017), que ronda los 5 000 dólares por tonelada (Plastics Insight, 2017) (Figura 17) que, comparado con los 1000 dólares por tonelada del PET (Jiang, 2020), resulta ser que el precio es entre 4 y 5 veces mayor al de un plástico convencional.

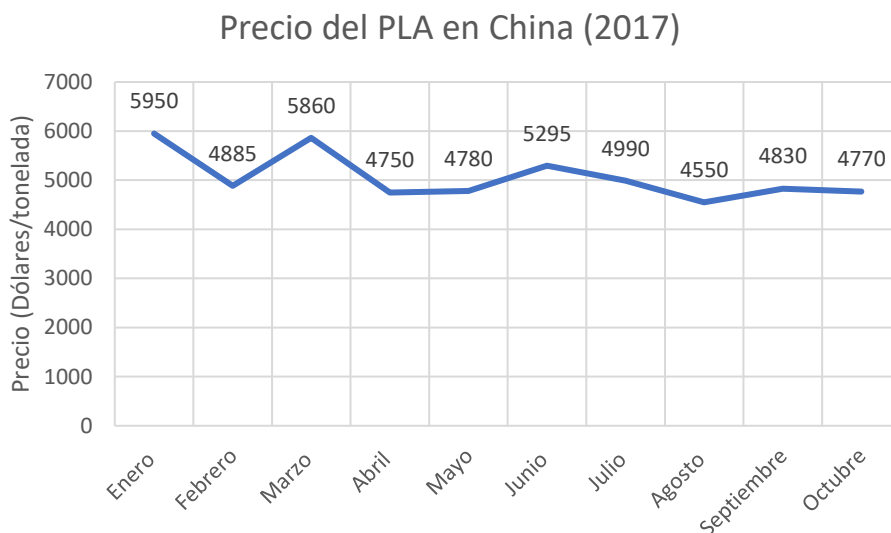


Figura 17. Precio del PLA en china, monitoreado entre los meses Enero-octubre de 2017 (Plastics Insight, 2017)

El alto costo de producción de PLA se atribuye a la fermentación. Las bacterias ácido-lácticas que producen este monómero, tienen requerimientos nutricionales complejos debido a su limitada capacidad para sintetizar aminoácidos y vitamina B (Hofvendahl *et al.*, 2000). Para garantizar la producción de ácido láctico de alta pureza se deben adicionar nutrientes complejos, lo que se refleja en un aumento de costo de producción del monómero (Serna-Cock *et al.*, 2005). Se han hecho estudios económicos en donde se observa que, en la producción de PLA, la fermentación láctica es la que genera mayor gasto, rondando el 40 % del costo total de operación de una planta productora de PLA (Kwan *et al.*, 2018) (Figura 18).

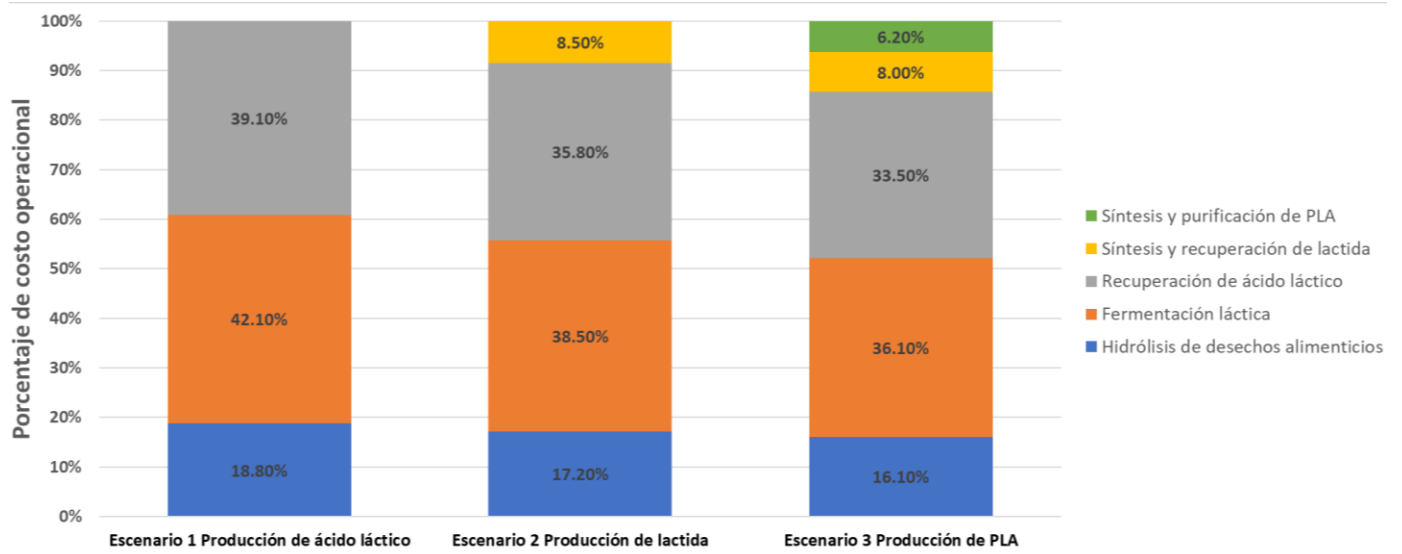


Figura 18. Porcentaje de costo operacional para tres posibles escenarios, se inicia desde la producción de PLA por fermentación, pasando por la formación de lactida hasta la producción de PLA (Adaptado de Kwan et al., 2018).

Otro factor involucrado en la fermentación que aumenta el costo de producción es la fuente de carbono. Por ejemplo, en la producción fermentativa de PHB, la fuente de carbono ronda el 30% del costo total de la fermentación (Choi y Lee, 1997). También se ha observado que factor energético incrementa el costo en una fermentación, Koutinas en 2016 dice que para producir 2,3-butanodiol alrededor del 80% del uso de electricidad está relacionado con la fermentación, el uso energético se atribuye principalmente a centrifugas, biorreactores y fermentadores. Sumado a esto, la fermentación requiere grandes cantidades de hidróxido de sodio como amortiguador de pH, así como extracto de levadura como suplemento de nitrógeno, que representa del 10 al 14% de los costos totales de una fermentación (Kwan et al., 2018).

Estas particularidades económicas en la producción de PLA han sido estudiadas desde un punto de vista económico por Kwan en 2018, notó que la fermentación requiere mucha mano de obra, . Concluyó que hay tres factores que tienen un alto impacto en el costo de producción de PLA, estos son el costo de materias primas (21-23%), costos laborales (12-13%) y costos de servicios públicos (11-12%).

El alto costo de producción de PLA ha llevado a proponer soluciones para disminuir su costo de producción para incluirlo más en el mercado de empaques. Kwan y su grupo de trabajo han realizado estudios de factibilidad económica enfocados en la producción de ácido láctico por fermentación (Kwan et al., 2015; Kwan et al., 2016; Kwan et al., 2018), una solución que proponen para disminuir el costo del PLA es usar sobrantes de comida como fuente de carbono y nutrientes para las bacterias ácido-lácticas. En la Figura 19 se muestra un esquema general del proceso. El análisis tecno económico es factible usando un valor mínimo de venta del PLA de 3330 dólares/tonelada el cuál es menor comparado con el precio del PLA en 2017 de 4000-5000 dólares/tonelada. Este estudio da una referencia de alternativas para disminuir el precio del PLA para incluirlo más en el mercado de empaques.

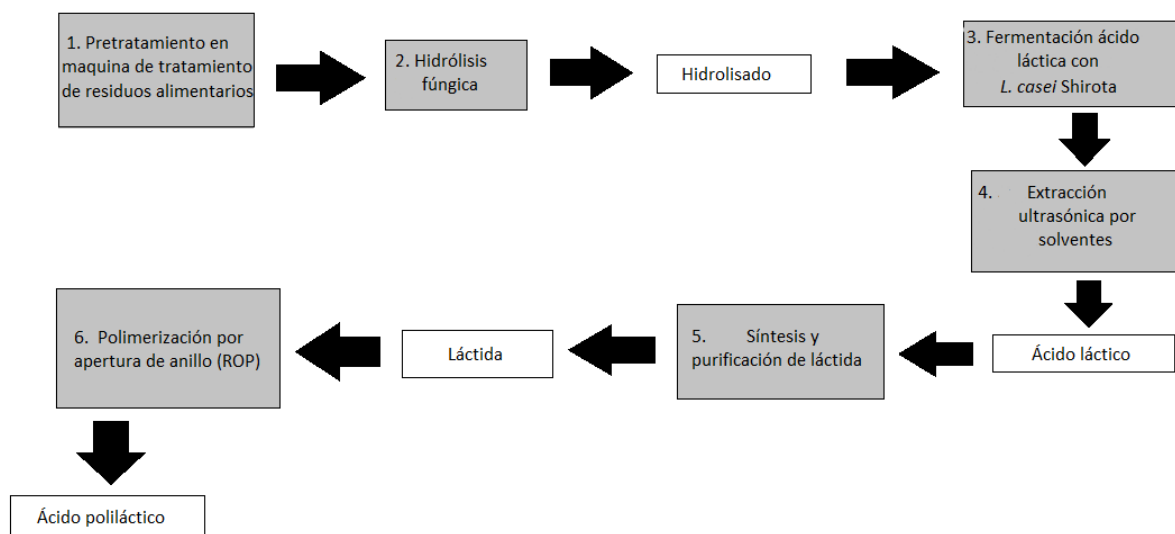


Figura 19. Esquema general de producción de usando sobrantes de alimentos (Adaptado de Kwan et al., 2018).

Otro ejemplo para disminuir el costo del PLA lo aplica la empresa Total Corbion, que usa PLA post consumo, lo despolimeriza por un método químico hasta obtener ácido láctico, el cual es usado para sintetizar PLA nuevo, al cual denominan comercialmente Luminy PLA (Liard, 2021).

Debido a que el PLA es susceptible a la hidrólisis por enzimas, este polímero podría despolimerizarse usando cutinasas recombinantes de *A. nidulans* hasta obtener ácido láctico, para usarlo en sectores como el cosmético, el alimenticio, industria química o incluso para sintetizar PLA nuevo, dándole un valor agregado. De esta forma se evitaría el uso del proceso de fermentación que tiene un alto coste debido al uso de reactivos, mano de obra y energía, lo que podría impactar en la economía de producción de PLA como material de empaque. Se podría plantear un modelo de economía circular basado en empaques de PLA que han cumplido su ciclo de vida y su monómero que puede obtenerse por despolimerización enzimática.

3.18 Economía circular

Durante la última década, el consumo de materias primas ha alcanzado un ritmo que comprometerá la capacidad del planeta si no se consigue frenar o cambiar el actual modelo lineal de producción y consumo. Esta preocupación por la disponibilidad de los recursos y la calidad del medio ambiente no es nueva, ha sido ampliamente impulsada por ambientalistas como Rachel Carson desde los años 60 y por los gobiernos desde el final de los años 80 con el reporte de Brundtland, donde se definió por primera vez el concepto de desarrollo sostenible.

En 1987, el desarrollo sostenible se definió como: “satisfacer las necesidades de las generaciones presentes sin comprometer las posibilidades de las generaciones del futuro para atender sus propias necesidades”. Durante los 90 se entendía que la sostenibilidad se lograba combinando tres dimensiones: económica, social y ambiental. Sin embargo, la postura de Mebratu mostró que la sostenibilidad no se reduce a la combinación de estas tres

dimensiones, sino que la sostenibilidad económica depende de la sostenibilidad social, y estas dos dependen de la ambiental (Sandoval *et al.*, 2017).

El modelo económico lineal, vigente hoy día, consistente en «tomar, hacer, tirar», que confía en la disposición de cantidades baratas y fácilmente accesibles de materiales y energía, lo que ha generado un nivel de crecimiento sin precedentes que está alcanzando límites físicos, este modelo lineal no es sostenible (Steffen *et al.*, 2015), sin embargo, una economía circular es una alternativa atractiva y viable que en el ámbito empresarial ya se ha empezado a explorar (Cerdá *et al.*, 2016).

La economía circular es un modelo de producción y consumo que implica compartir, alquilar, reutilizar, reparar, renovar y reciclar materiales y productos existentes todas las veces que sea posible para crear un valor añadido. De esta forma, el ciclo de vida de los productos se extiende (Parlamento Europeo, 2015). Una economía circular es reconstituyente y regenerativa por diseño, y propone mantener los productos, componentes y materiales siempre en niveles de uso altos. El concepto distingue entre ciclos biológicos y ciclos técnicos, una economía circular es un ciclo de desarrollo continuo positivo que preserva y aumenta el capital natural, optimiza los rendimientos de los recursos y minimiza los riesgos del sistema, gestionando stocks finitos, flujos renovables y funciona de manera efectiva a cualquier escala (Cerdá *et al.*, 2016). Un diagrama que representa el ciclo de economía circular se muestra en la Figura 20.

La economía circular se apoya en 3 principios:

- Preservar y aumentar el capital natural, controlando los stocks finitos y equilibrando los flujos de recursos renovables. Cuando se necesitan recursos, el sistema circular los selecciona sabiamente y elige tecnologías y procesos que utilizan recursos renovables o del más alto rendimiento, siempre que sea posible. Una economía circular también aumenta el capital natural fomentando flujos de nutrientes en el sistema y creando las condiciones para la regeneración del suelo.

- Optimizar el rendimiento de los recursos, circulando siempre productos, componentes y materiales en su nivel más alto de utilidad, en los ciclos técnico y biológico. Lo expresado anteriormente significa diseñar para reelaborar, renovar y reciclar para mantener circulando en la economía los materiales y componentes, y contribuyendo a la misma. Los sistemas circulares utilizan bucles internos más ajustados siempre que sea posible (es decir, mantenimiento mejor que reciclaje), preservando la energía incorporada, así como otros valores. Estos sistemas procuran extender más la vida del producto y optimizar la reutilización. El hecho de compartir incrementa la utilización del producto.

- Promover la efectividad del sistema, haciendo patentes y proyectando eliminar las externalidades negativas. Ello incluye reducir el daño causado a sistemas y áreas que afectan a las personas, tales como alimentos, movilidad, casas, educación, sanidad o entretenimiento, y gestionar externalidades tales como la contaminación del aire, el agua, la tierra, y el ruido, las emisiones de sustancias tóxicas y el cambio climático.

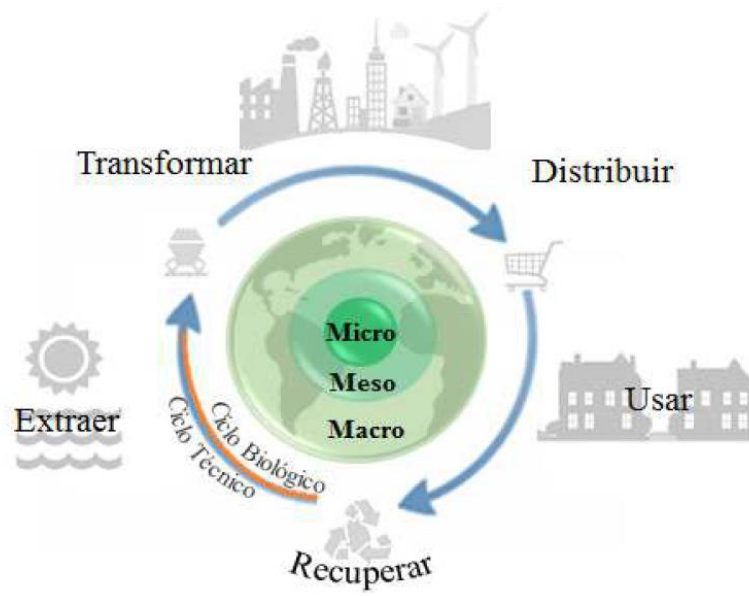


Figura 20. Diagrama del ciclo de economía circular (Sandoval et al., 2017).

4. JUSTIFICACIÓN

La conciencia sobre contaminación ambiental generada por plásticos ha tomado relevancia en años recientes debido a su acumulación, la cual se debe la gran cantidad demandada por diversos sectores (principalmente el de empaque) y por la resistencia a la degradación natural.

La introducción de plásticos biodegradables en el sector de empaque es parte de la solución. Sin embargo, aunque sean biodegradables, la gran demanda llevará a una posterior acumulación. En el grupo de trabajo se ha demostrado la degradación de ácido poliláctico (PLA) por cutinasas recombinantes de *A. nidulans*, demostrada por microscopía electrónica de barrido y pérdida de peso. Se propone aprovechar esta capacidad para acelerar la degradación natural para reducir la acumulación de desechos derivados de empaques de PLA.

Tomando como base los postulados de la economía circular, se propone realizar un modelo de este tipo basado en la obtención de los monómeros del PLA, para que éstos puedan usarse para una nueva síntesis del polímero o en otros ámbitos industriales como el alimenticio, o el médico. De esta forma se contribuye al reúso y reciclaje de materiales y productos existentes para reducir la formación de desechos y al mismo tiempo se reduce el uso de energía para la síntesis ácido láctico y se fomenta el reúso de los productos de hidrólisis de PLA.

Aunque el PLA es un polímero relativamente nuevo, muestra propiedades interesantes de barrera contra gases como el oxígeno y el vapor agua, así como propiedades mecánicas tales como tensión a la rotura y buena elasticidad que lo postulan como un candidato para sustituir a los envases de plástico convencional como el PET; por ejemplo, en Alemania, las empresas Dannon y McDonald's han usado PLA en vasos y cubiertos de yogurt (Auras *et al.* 2004).

Se emplearía como modelo de trabajo PLA, el cual se ha citado como un polímero que presenta propiedades óptimas para ser usado como como material de empaque.

En estudios los estudios de degradación de PLA, la mayoría se enfoca en análisis de degradación de PLA, pero dejan de lado la caracterización de los productos liberados de esta degradación. Este proyecto se enfocará en la liberación de ácido láctico por la degradación de PLA, en algunos estudios se reporta degradación de PLA por pérdida por peso, cambios morfológicos, pero pocos se enfocan en la cuantificación del monómero. En este proyecto se cuantificará el ácido láctico, basado en la obtención del monómero se propondrá un modelo de economía circular basado en el ácido láctico y sus múltiples usos en la industria.

Aunque en el grupo de trabajo se ha probado la degradación de ácido poli-L-láctico (PLLA), estos estudios están probados en un PLA de bajo peso molecular (Sánchez, 2015 y Llanos 2018) Sin embargo, el PLA que presenta propiedades adecuadas para ser usado como material de empaque es de alto peso molecular; en este trabajo se prueba la acción enzimática de las cutinasas recombinantes en PLLA de alto peso molecular.

Se propone probar una combinación entre las 3 cutinasas de *Aspergillus nidulans* para aumentar la liberación de ácido láctico, pues se ha reportado éstas liberan diferentes productos al degradar a su sustrato natural la cutina, lo que sugiere que cada una de ellas posee un mecanismo diferente de escisión (Bermúdez *et al.* en 2019).

5. HIPÓTESIS

Las cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* serán capaces de degradar poli(ácido L-láctico) de alto peso molecular y liberar su monómero, el ácido láctico.

6. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si la degradación de poli (ácido L-láctico) de alto peso molecular por cada una de las 3 cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* produce la liberación de ácido L-láctico.

Objetivos particulares

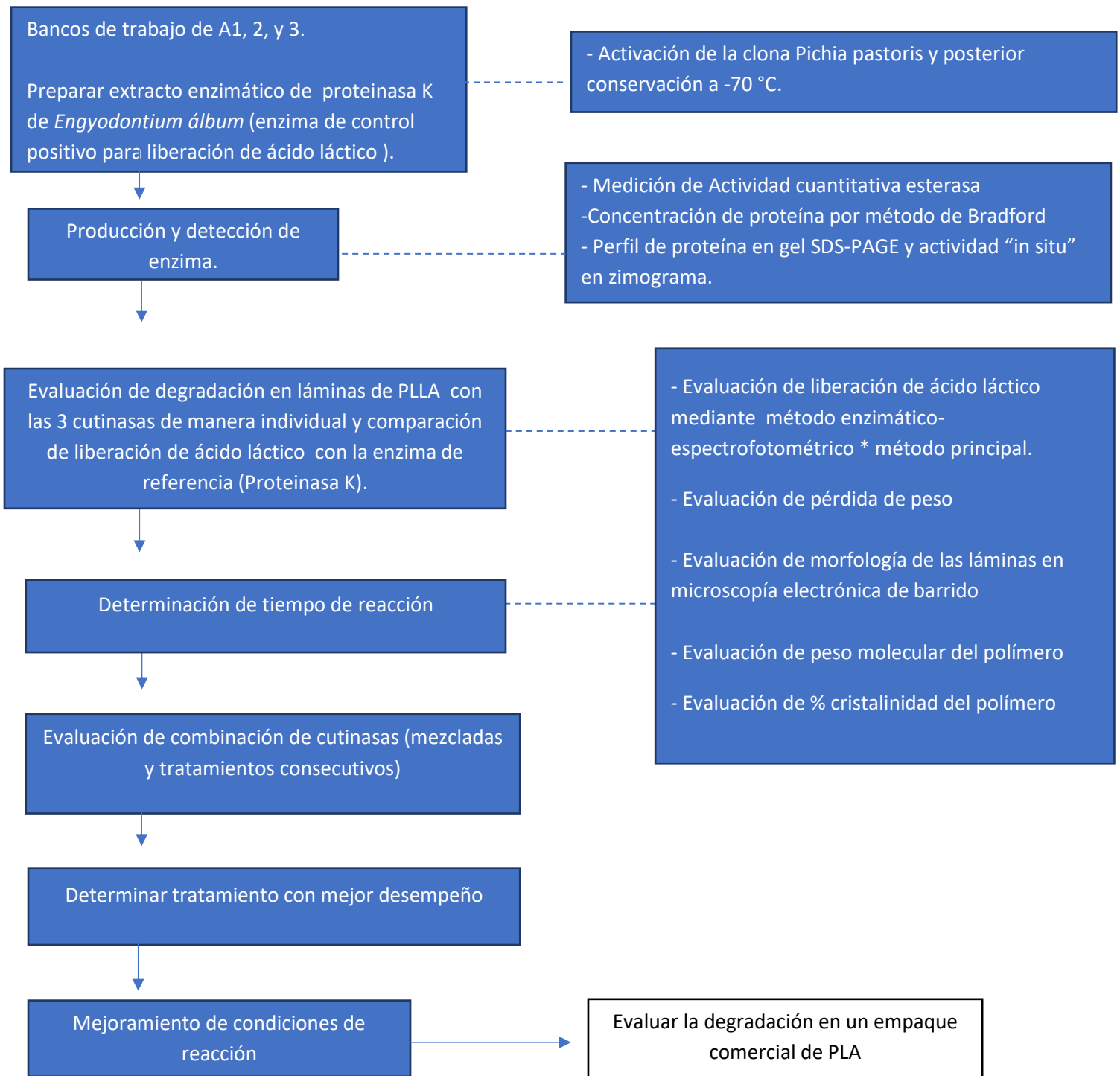
Determinar cuál de las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* logra una mayor liberación de ácido láctico.

Comparar la liberación de ácido láctico por las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* con la liberación del monómero por la proteinasa K (enzima que se ha reportado produce la liberación de ácido L-láctico al degradar PLLA y en este ensayo servirá como control positivo de degradación y liberación de ácido láctico).

Determinar si la combinación entre las cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans* aumenta la cantidad de ácido L-láctico liberado al medio de reacción (sinergia entre cutinasas recombinantes).

Mejorar las condiciones de reacción para aumentar la cantidad de ácido L-láctico liberado.

7. MATERIALES Y MÉTODOS



7.1 Reactivos

- Acetona, grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Acetato de α -naftilo, grado analítico, Sigma-Aldrich.
- Acetato de *p*-nitrofenilo, grado analítico Sigma-Aldrich.
- Ácido acético glacial, grado reactivo analítico, Baker.
- Ácido clorhídrico, grado reactivo analítico, Baker.
- Acrilamida/Bis, 30%, Bio-Rad.
- Alcohol etílico, grado reactivo analítico, Baker.
- Alcohol isopropílico, grado reactivo analítico, Baker.
- Agar, Bacto, Oxoid.
- Azida de sodio, grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Azul de bromofenol, Bio-Rad.
- Biotina, grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- β -mercaptoetanol, grado HPLC, Sigma-Aldrich.
- Carbonato de sodio, grado reactivo analítico, Baker.
- Cloruro de sodio, grado reactivo, Baker.
- Dextrosa, grado reactivo analítico, Baker.
- Empaque biodegradable, bimbo vital.
- Extracto de levadura, BD.
- Fast Red TR, grado reactivo analítico Sigma-Aldrich.
- Fosfato de potasio monobásico, grado reactivo analítico, Baker.
- Fosfato de sodio dibásico, grado reactivo analítico, Baker.
- Fosfato de sodio monobásico, grado reactivo analítico, Baker.
- Glicerol, grado reactivo analítico, Baker.
- Glicina, grado HPLC Bio-Rad.
- Hexano, grado reactivo analítico, Baker.
- Hidróxido de sodio, grado reactivo analítico, Baker.
- L-lactato kit de ensayo (L-Lactate Assay Kit), Sigma-Aldrich.
- Marcador peso molecular "Precisión plus protein standards", Bio-Rad.
- Metanol, grado reactivo analítico, Baker.
- Proteinase K (Fungal), Gibco BRL.
- Peptona, Bacto, Oxoid.
- Persulfato de amonio, Bio-Rad.
- Poli(ácido L-láctico) (HMW) (Poly L Lactic Acid – Biopolymer), Good Fellow
- Reactivo de Bradford "Quick Start Bradford 1x Dye reagent", Bio-Rad.
- SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), grado reactivo analítico, Bio-Rad.
- TEMED (N,N,N',N'-tetrametiletildiamina), grado reactivo analítico, Bio-Rad.
- Tolueno, grado reactivo analítico, Baker.
- Tris base (*tris*(hidroximetil)aminometano), grado reactivo analítico, Bio-Rad.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich

7.2 Equipos

- Autoclave, Yamato SM300.
- Balanza analítica, Ohaus.
- Balanza granataria, Adam.
- Cámara de electroforesis (MiniProtean II y IV, Bio Rad)
- Campana de flujo laminar Adler.
- Celda para ultraconcentrar, Millipore.
- Centrifuga, Biofuga, Heraeus.
- Congelador, Lab Line Instruments.
- Equipo de electroforesis Mini Protean, Bio-Rad.
- Equipo de ultrafiltración, Amicón.
- Espectrofotómetro para celda Thermo Scientific™ Biomate 3
- Espectrofotómetro para microplaca Epoch, Biotek.
- Espectro, Thermo Scientific.
- Estufa estática, BG.
- Estufa estática, Gravity Convection.
- Estufa estática, Riossa.
- Fuente de poder modelo 164-5070, Bio-Rad.
- Homogenizador Chico, Tekmar.
- Incubadora con agitación, Innova 40, New-Brunswick.
- Licuadora industrial
- Micropipetas, Gilson.
- Potenciómetro, Hanna.
- Refrigerados y congelador, Whirpool.
- Tanque de nitrógeno con manómetro y abrazadera.
- Transiluminador, Light box, model grande

7.3 Producción de enzimas recombinantes

Las enzimas usadas para llevar a cabo este trabajo fueron las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* PW1 A1, A2 y A3 expresadas en el sistema heterólogo *Pichia pastoris* X33.

7.3.1 Reactivación de la cepa

Las enzimas recombinantes se obtuvieron a partir del crecimiento e inducción con metanol usando como sistema de expresión a *P. pastoris*. Se usaron cepas clonadas previamente dentro del grupo de trabajo y que se encontraban almacenadas en glicerol a -70°C; se reactivaron en medio YPD/Zeocina.

Se colocaron 25 mL de medio YPD/zeocina (0.01%) estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se inocularon 200 μ L de la cepa *P. pastoris* que se encontraba almacenada a -70°C. El matraz se incubó por 24 horas a 29 °C y 300 rpm de agitación orbital (Innova 40, New Brunswick Scientific, USA).

7.3.2 Crecimiento de la cepa

Posterior a las 24 horas de incubación en medio YPD/zeocina 0.01% (reactivación de la cepa), el cultivo se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 7500 rpm y temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y se colocó en un recipiente para esterilizar. El botón celular se resuspendió en 2 mL de medio YP y se le determinó la DO_{600} .

Se colocaron 25 mL de medio BMGY estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se inoculó el volumen suficiente del resuspendido en medio YP para obtener una $DO_{600}=1$. El medio se incubó por 24 horas a 29 °C y 300 rpm de agitación orbital.

7.3.3 Expresión de la enzima

Después de 24 h de incubación en medio BMGY, el cultivo se colocó en un tubo Falcon de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 7500 rpm y temperatura ambiente. Se hicieron lavados del cultivo con 10 mL de medio YP, resuspendiendo las células con ayuda de un vórtex y se volvió a centrifugar con las mismas condiciones. Al final se desechó el sobrenadante en un recipiente para esterilizar y el botón celular se volvió a resuspender en 2 mL de medio YP y se le determinó la DO_{600} .

Se colocaron 25 mL de medio BMMY estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se inoculó el volumen necesario del resuspendido para obtener una $DO_{600}=1$. Se incubó por 24 h, a 300 rpm y 29°C, a las 24 horas se agregó como inductor metanol al 100 % para producir las enzimas y se incubó bajo las mismas condiciones.

Pasadas 24 horas de la inducción, el cultivo se centrifugó el medio en tubos Falcon de 50 mL estériles a 8500 rpm, 10 minutos a 4 °C en una Centrifuga Biofuge, Heraeus. Se desecharon las células y el sobrenadante se utilizó para determinar proteína total soluble por el método de Bradford y actividad enzimática.

7.4 Concentración del sobrenadante enzimático

Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió el cultivo a tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 8500 rpm por 10 min para separar las células del sobrenadante (extracto enzimático). Una vez centrifugado, se trabajó con el sobrenadante, midiendo el volumen obtenido al final de la producción, la cantidad de proteína y actividad de esterasa (6.3 y 6.4). Posteriormente, se realizó una concentración del extracto crudo en un sistema de ultrafiltración con membrana de 10 kDa como límite de corte nominal para la filtración de la muestra.

7.5 Preparación de proteinasa K

Se pesaron 15 mg de proteinasa K liofilizada (Proteinase K (fungal), GIBCOBRI, y se disolvieron en 5 mL de Regulador Tris-HCl 50 mM pH=8 con CaCl₂ 20 mM (recomendación del fabricante). Se determinó la concentración de proteína total soluble por el método de Bradford, así como la actividad de la esterasa.

7.6 Determinación de concentración de proteína en microplaca

Para determinar la cantidad de proteína se usó el método de Bradford (1976) en microplaca. Previamente se realizaron las diluciones pertinentes de la muestra para que la lectura de la absorbancia entrara en el intervalo de lectura de una curva patrón de albumina sérica bovina. Se colocaron en la microplaca 160 μ L de muestra diluida, 40 μ L del reactivo de Bradford (Bio Rad) y un blanco con 160 μ L de agua destilada y 40 μ L de dicho reactivo (el volumen final de reacción fue de 200 μ L). Las mezclas se homogeneizaron e incubaron 5 minutos a temperatura ambiente.

Se determinó la concentración en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 595 nm y utilizando el software Gen 5 1.10 con una curva patrón de albúmina sérica bovina con un intervalo de concentración de 1.6 μ g/mL a 10.2 μ g/mL.

7.7 Determinación de actividad cuantitativa esterasa en microplaca

La actividad de la esterasa se cuantificó usando como sustrato *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NFB). Se preparó una solución stock de *p*-NFB 10 mM, en etanol, de la cual se tomaron 100 μ L y se añadieron 900 μ L de etanol para preparar el sustrato a una concentración de 1 mM. En un pozo de microplaca se adicionaron para el blanco 180 μ L de Regulador de fosfatos 50 mM, pH=7; y en otro pozo para el caso de la muestra se colocaron 170 μ L del mismo Regulador y 10 μ L del sobrenadante del medio de cultivo BMMY. Antes de comenzar la medición, se añadieron 20 μ L del stock 1 mM de *p*-NFB y se monitoreó la reacción de hidrólisis a 420 nm durante 10 min, realizando mediciones cada minuto, según lo indicado en el protocolo del software Gen 5 1.10 del espectrofotómetro Epoch (Biotek).

Una unidad de actividad (U) se define como la conversión de 1 μ mol de sustrato a producto por minuto bajo las condiciones de ensayo. La cantidad de ésteres de *p*-nitrofenilo se interpoló en una curva patrón de *p*-NP.

7.8 Determinación de actividad enzimática en geles de poliacrilamida

7.8.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Se utilizó como detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (1970), utilizando un gel concentrador al 4% de *bis*-acrilamida y un gel separador al 12% de

bis-acrilamida. Las muestras de extracto crudo se trataron previamente con un Regulador de carga con β -mercaptoetanol. Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular (180 a 10 kDa, Thermo Fisher), las muestras se cargaron en los carriles asignados previamente. Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis (MiniProtean II y IV, Bio Rad) inicialmente a 80 Volts por 20 minutos y después se subió a 180 Volts a 4 °C con Regulador de corrida. Para observar el marcador de masa molecular y la masa de la proteína de interés, el gel fue teñido con azul de Coomassie.

7.8.2 Zimograma

Para observar la actividad esterasa de las enzimas se realizaron geles de poliacrilamida sin β -mercaptoetanol y sin calentar bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente. Para observar la actividad se prepararon zimogramas siguiendo la metodología planteada por Karpushova *et al.*, (2005). Una vez llevada a cabo la electroforesis el gel se incubó en una solución de Regulador de fosfatos 50 mM, pH=7, con Tritón X-100 al 0.5 % durante 30 min, para renaturalizar a la enzima. Pasado este tiempo, se cambió la disolución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (Solución A), durante 30 minutos en agitación, a temperatura ambiente. Posteriormente, se quitó la solución A, el gel se lavó con agua destilada y se le agregó la solución de Fast Red (Solución B) hasta que se observara la tinción de las bandas color marrón, que indican la presencia de actividad enzimática. Finalmente, se lavó con agua destilada.

7.9 Preparación de láminas de PLA

El poli (ácido L-láctico) de alto peso molecular fue adquirido de Good fellow, tiene una temperatura de transición vítrea de 55°C y un porcentaje de cristalinidad entre 60-70%. Está presentando en láminas de 300 x 300 mm y espesor de 0.05 mm, no se especifica el peso molecular del mismo.

Se procedió a cortar en cuadros de aproximadamente 10 x 10 mm, una vez cortados se lavaron 3 veces con metanol y posteriormente, con agua desionizada. Se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche antes de su uso.

7.10 Trituración de PLA

Se trituró el poli(ácido L-láctico) de Goodfellow presentando en láminas, 5 hojas del polímero (aproximadamente 25 g) se cortaron en trozos pequeños, se lavaron 3 veces con metanol y posteriormente con agua desionizada, se dejaron secar a temperatura ambiente toda la noche antes de su uso; lavados los trozos de lámina se colocaron en una licuadora industrial, se trituraron hasta alcanzar un polvo de tamaño homogéneo

El polvo de tamizó para separar los diferentes tamaños de partícula alcanzada y se probó la degradación del polvo de tamaño de partícula más grande que se pudo tamizar en el laboratorio (polvo tamiz 20).

7.11 Reacción de hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes

La reacción de hidrólisis enzimática se realizó colocando en un vial de 2 mL:

Aproximadamente, 10 mg de PLLA (en película o polvo tamiz 20), el volumen necesario del sobrenadante crudo concentrado para agregar 100 µg de proteína (1% de enzima respecto al peso del polímero) con las enzimas recombinantes y el volumen necesario de Regulador correspondiente hasta completar un volumen total de 1 mL. En los blancos se agregó Regulador con PLLA sin extracto enzimático (para observar si hay hidrólisis por el Regulador) y otro con extracto enzimático sin PLLA (para ver contribución del extracto concentrado). Los viales se incubaron de acuerdo con las condiciones de hidrólisis de PLLA reportadas (Sánchez, 2015; Llanos, 2018), a 37 °C, usando Regulador de fosfatos de sodio 50 mM, pH=7, para A1 y A2; y Regulador Tris-HCl 50 mM, pH=9, para A3. Se evaluó la degradación mediante la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción, monitoreándolo por 10 días, con el fin de determinar el tiempo máximo de reacción.

Resultado de la monitorización del ácido láctico, posteriormente se hizo una reacción de hidrólisis a 7 días de reacción, la reacción se hizo de la misma manera, pero el ácido láctico liberado al medio de reacción se cuantificó transcurridos 7 días.

7.12 Reacción de hidrólisis de PLLA con proteinasa K

La reacción de hidrólisis enzimática se realizó colocando en un vial de 2 mL:

10 mg de PLLA (en película o polvo tamiz 20), el volumen necesario de la enzima preparada en Regulador para agregar 100 µg de proteína (1% de enzima respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de Regulador Tris-HCl 50 mM, pH=8, con CaCl₂ 20 mM hasta completar un volumen total de 1 mL. En el blanco se agregó Regulador sin extracto enzimático, los viales se incubaron a 37 °C. Se evaluó la degradación mediante la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción por 10 días.

Resultado de la monitorización del ácido láctico, posteriormente se hizo una reacción de hidrólisis a 7 días, la reacción se hizo de la misma manera, pero el ácido láctico liberado al medio de reacción se cuantificó transcurridos 7 días.

7.13 Diseño experimental para la combinación de cutinasas recombinantes

Se realizó un diseño experimental para evaluar la combinación de las 3 cutinasas A1, A2 y A3.

El diseño para evaluar la combinación de enzimas se muestra a continuación (nomenclatura en tabla 9 y diseño en la tabla 10), sin embargo, en este diseño no se consideró la influencia del Regulador en la combinación usada. En el caso de A1 y A2 el Regulador reportado por Sánchez, 2015, es el mismo (Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7), pero en el caso de A3 el Regulador reportado por Llanos, 2018 es (Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9).

Tabla 9. Enzimas y nomenclatura usadas para el diseño.

| Enzima | Valor | Leyenda |
|--------|--------------|---------|
| A1 | Sin enzima | 0 |
| | Enzima al 1% | 1 |
| A2 | Sin enzima | 0 |
| | Enzima al 1% | 1 |
| A3 | Sin enzima | 0 |
| | Enzima al 1% | 1 |

Tabla 10. Diseño experimental para la combinación de las 3 cutinasas recombinantes de *A. nidulans*.

| A1 | A2 | A3 | Repetición | |
|----|----|----|------------|---|
| 0 | 0 | 0 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |
| | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | 2 |
| | | | | 3 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | | | | 2 |
| | | | | 3 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |
| 1 | 0 | 0 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |
| | 0 | 1 | 1 | 1 |
| | | | | 2 |
| | | | | 3 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | | | | 2 |
| | | | | 3 |
| 1 | 1 | 1 | 1 | |
| | | | 2 | |
| | | | 3 | |

Para evaluar la influencia del regulador en las combinaciones de enzimas, se usó el mismo diseño, sin embargo, dos corridas para las combinaciones en las que se necesitara evaluar el efecto del Regulador de acuerdo con la tabla 11. Obtenidos los datos, se hicieron dos análisis estadísticos y en cada evaluación se usaron los datos de cada combinación en el Regulador probado.

Tabla 11. Combinación de enzimas para probar en los respectivos reguladores.

| Combinación | Regulador para probar en la combinación |
|-------------|---|
| A1/A3 | Fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Tris HCl 50 mM pH9 |
| A2/A3 | Fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Tris HCl 50 mM pH9 |
| A1/A2/A3 | Fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Tris HCl 50 mM pH9 |

De las combinaciones mostradas en la tabla 11, se obtuvieron los datos de cada regulador evaluado, para la combinación se hizo la evaluación estadística correspondiente del diseño.

7.13.1 Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL:

10 mg de PLLA (en polvo tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 1% de enzima respecto al peso del polímero (100 µg de proteína) de cada enzima a probar en la mezcla (total 2% de enzima), y el volumen necesario de regulador correspondiente hasta completar un volumen total de 1 mL. En el blanco se agregó regulador sin extracto enzimático. Los viales se incubaron a 37°C, sin agitación. A los extractos enzimáticos y regulador de reacción se les agregó azida de sodio (0.05%) para evitar crecimiento microbiano, se dejó la reacción de hidrólisis por 7 días y se procedió a cuantificar el ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.13.2 Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL:

10 mg de PLLA (en polvo tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 1% de enzima respecto al peso del polímero (100 µg de proteína) de cada enzima a probar en la mezcla (total 3% de enzima), y el volumen necesario de regulador correspondiente hasta completar un volumen total de 1 mL. En el blanco se agregó regulador sin extracto enzimático. Los viales se incubaron a 37 °C, sin agitación. A los extractos enzimáticos y regulador de reacción se les agregó azida de sodio (0.05%) para evitar crecimiento

microbiano, se dejó la reacción de hidrólisis por 7 días y se procedió a cuantificar el ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.14 Mejoramiento de las condiciones de hidrólisis de PLLA con la enzima A1

Después de probar la combinación de cutinasas recombinantes, se eligió a la enzima A1 para mejorar las condiciones de reacción (que fue la que liberó mayor cantidad de ácido láctico después de 7 días de reacción), y aumentar la cantidad del monómero liberado al medio de reacción. Se probó la influencia de algunos factores para determinar cuáles incrementan la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción: temperatura, pH inicial del medio de reacción, concentración de enzima, tamaño de partícula, y agitación.

7.14.1 Influencia del tamaño de partícula

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL: 10 mg de PLLA (de cada uno de los tamaños de partícula a evaluar), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 100 µg de proteína de A1 (1% respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7 para completar un volumen total de 1 mL. Los viales se incubaron sin agitación y a 37 °C. Se evaluó el tamaño de partícula tamiz 20, 30, 40, 50 y 60, la reacción de hidrólisis se llevó por 7 días y posteriormente se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.14.2 Influencia de la concentración de enzima (respecto al peso del polímero)

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL

10 mg de PLLA (en polvo tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar la cantidad de proteína de A1 a evaluar (0.5, 1, 3, 5 y 10% de enzima respecto al peso del polímero, correspondiente a 50, 100, 300, 500 y 1000 µg de proteína de A1 respectivamente) y el volumen necesario de Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7 para completar un volumen total de 1 mL. Los viales se incubaron sin agitación y a 37°C, la reacción de hidrólisis se llevó por 7 días, y posteriormente, se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.14.3 Influencia de la temperatura

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL

10 mg de PLLA (en polvo tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 100 µg de proteína de A1 (1% respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7 para completar un volumen total de 1 mL. Los viales se incubaron sin agitación y se evaluaron

las temperaturas 37, 40, 45, 50, 55 y 60 °C, la reacción de hidrólisis se llevó a cabo por 7 días, y posteriormente, se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.14.4 Influencia del pH del regulador del medio de reacción

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL 10 mg de PLLA (en polvo tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 100 µg de proteína de A1 (1% respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de Regulador de fosfatos de sodio 50 mM con el pH a probar (pH=6, pH=7, pH=8 y pH=9) para completar un volumen total de 1 mL. Los viales se incubaron sin agitación a 37 °C, la reacción de hidrólisis se llevó por 7 días y posteriormente se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

7.15 Reacción de hidrólisis de PLLA con A1 y las mejores condiciones determinadas

Después de observar la influencia de la temperatura, pH inicial del medio de reacción, concentración de enzima, tamaño de partícula, y agitación, en la degradación con la enzima recombinante A1, se eligió la mejor condición de cada factor que logró una mayor cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción; posteriormente se hizo una reacción de hidrólisis con las mejores condiciones de cada factor evaluado, la reacción se escaló 10 veces para obtener cantidad necesaria de polímero para posteriores análisis, de esta forma se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 2 mL 100 mg de PLLA (en polvo tamiz 40), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 3 mg de proteína de A1 (3% respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=9 para completar un volumen total de 10 mL. Los viales se incubaron sin agitación y a 40 °C, la reacción de hidrólisis se llevó por 7 días y posteriormente se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción, se evaluó la pérdida de peso y una inspección física para identificar cambios en el polímero.

7.16 Reacción de hidrólisis de empaque comercial de PLA con A1 y las mejores condiciones determinadas

Después de hacer una reacción de hidrólisis con A1 con las mejores condiciones determinadas y observar mejoría en la liberación de ácido láctico, y observar pérdida de peso y cambio físico en el polímero tratado; se procedió a hacer una reacción de hidrólisis de un empaque comercial que contiene PLA (no se sabe la composición exacta del empaque).

Primero el empaque se cortó en trozos pequeños y se colocaron en una licuadora industrial, se trituraron hasta observar una disminución de tamaño de partícula, el polímero triturado no alcanzó una disminución de tamaño considerable, pues no alcanzó a pasar por la malla 20.

La reacción se escaló 10 veces para obtener cantidad necesaria de polímero para posteriores análisis.

Se procedió a realizar la reacción de hidrólisis agregando en un vial de 15 mL 100 mg de empaque (en partícula homogénea mayor a tamiz 20), el volumen necesario del extracto enzimático correspondiente para agregar 3 mg de proteína de A1 (3% respecto al peso del polímero) y el volumen necesario de regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=9 para completar un volumen total de 10 mL. Los viales se incubaron sin agitación y a 40 °C, la reacción de hidrólisis se llevó por 7 días y posteriormente se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción, se evaluó la pérdida de peso y una inspección física para identificar cambios en el polímero.

7.17 Cuantificación de ácido láctico por método colorimétrico

Para la cuantificación del ácido láctico, se usó el L-lactate Assay kit de Sigma Aldrich (MAK-329). Se prepararon diluciones de un estándar de ácido láctico 2mM de acuerdo con la tabla 12:

Tabla 12. Diluciones realizadas para cuantificar ácido láctico por el método colorimétrico.

| Diluciones | | |
|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Volumen (L-lactato 2mM) (μL) | Volumen de Agua desionizada (μL) | Concentración [L-lactato] final (mM) |
| 100 | 0 | 2 |
| 80 | 20 | 1.6 |
| 60 | 40 | 1.2 |
| 40 | 60 | 0.8 |
| 30 | 70 | 0.6 |
| 20 | 80 | 0.4 |
| 10 | 90 | 0.2 |
| 0 | 100 | 0 |

Posteriormente, se hizo una mezcla de reacción con los reactivos proporcionados empleando los siguientes volúmenes especificados en la tabla 13.

Tabla 13. Mezcla de reacción para cuantificar ácido láctico.

| Mezcla de reacción | |
|---------------------|------------------|
| Reactivo | P/1 muestra (μL) |
| Regulador de ensayo | 60 |
| Enzima A | 1 |
| Enzima B | 1 |
| NAD | 10 |
| MTT | 14 |
| Total | 86 |

Se transfirieron 20 μL de cada dilución a una celda y se agregaron 80 μL de la mezcla de reacción. Se determinó la absorbancia inicial a 565 nm, se incubó 20 minutos a temperatura ambiente y se determinó absorbancia final a 565 nm. Se construyó una curva de calibración graficando las diferencias de Abs (Abs final-Abs inicial) contra la concentración. Las muestras se procesaron de la misma manera, y si se salían del intervalo de la curva de

calibración se diluyeron o concentraron según el caso. El límite de detección y linealidad del método fue de 0.05 mM a 2 mM.

7.18 Determinación de pérdida de peso

Una vez transcurrido el tiempo de reacción de degradación enzimática, las películas se lavaron con etanol y se secaron en estufa a 37 °C durante toda la noche. Se pesaron en balanza analítica y se registró el peso. La pérdida de peso se determinó como:

$$\text{Pérdida de peso (\%)} = \frac{(\text{Peso de material sin degradar} - \text{Peso del material degradado})}{\text{Peso del material sin degradar}} \times 100$$

7.19 Evaluación de cambios físicos del polímero y del empaque por observación a contraluz.

A los polvos de PLA, así como del empaque comercial tratados con A1 y las mejores condiciones, se les observó a contraluz con ayuda de un transiluminador Lightbox, modelogrande.

Después de la reacción de hidrólisis, las películas y el empaque fueron lavados con etanol y secados en estufa estática a 37°C durante 1 semana. Las películas se colocaron y se extendieron en una caja Petri con el fin de observar cambios en la cantidad y tamaño de las partículas de cada material. Los materiales sin tratamiento enzimático se consideraron como control negativo. AL PLA tratado con A2 y A3 no se le hizo esta evaluación pues al observar el material, no hubo cambios perceptibles a simple vista.

7.20 Evaluación del cambio morfológico del polímero y el empaque comercial por microscopía electrónica de barrido (SEM)

A los polvos de PLA de las reacciones de hidrólisis con A1 y mejores condiciones, con A2, con A3, así como al empaque comercial con A1, se les hizo una observación por microscopía electrónica de barrido para observar cambios morfológicos antes y después del tratamiento enzimático.

Después de la reacción de hidrólisis, las películas y el empaque fueron lavados con etanol y secados en estufa estática a 37°C durante 1 semana. La morfología de las películas se examinó usando microscopia electrónica de barrido (SEM) (JSM-5900LV de JEOL) a alto vacío a un voltaje de aceleración de 20 kV. Las películas fueron recubiertas con una capa fina de oro (10 Å) antes de ser observadas. Los polvos sin tratamiento enzimático se consideraron como control negativo.

7.21 Evaluación del cambio de cristalinidad por Difracción de Rayos X (XRD)

Se midió la cristalinidad del polímero PLA y del empaque previo u posterior a la degradación, para identificar cambios en los valores de cristalinidad, la cual se observó mediante patrones de difracción de rayos X (XRD) (Difractómetro de Rayos X, Modelo D8 Advance Davinvi, Configuración Theta-Theta Marca Bruker AXS).

7.22 Determinación del peso molecular del PLLA por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC)

Se determinó el peso molecular promedio del ácido poli-L-láctico de Goodfellow, empleando cromatografía por exclusión de tamaño, con ayuda del equipo Waters. Modelo 2695, detector de índice de refracción modelo Waters 2414, bajo las siguientes condiciones: tiempo de análisis 26 min, volumen de inyección: 50 μ L. El ensayo fue realizado disolviendo el PLLA en THF y usando estándares de poliestireno.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Producción de las enzimas recombinantes de *Aspergillus nidulans*

Las clonas recombinantes de *P. pastoris*, después de reactivarse en el medio YPD/zeocina 0.01%, se crecieron en medio YP para posteriormente expresar cada enzima en medio de cultivo BMMY. Estos últimos fueron centrifugados, se cuantificó la actividad enzimática y la cantidad proteínica, tanto de los extractos enzimáticos crudos como de los extractos concentrados para cada enzima cutinasa producida (Tabla 14).

Tabla 14. Actividad esterasa y concentración de proteína de los extractos enzimáticos crudos y concentrados de las cutinasas recombinantes.

| Muestras | Factor de concentración | Concentración de proteína (mg/mL) | Actividad volumétrica (U/mL) | Actividad específica (U/mg) | |
|--------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------|
| Sobrenadante crudo | A1 | - | 0.180 | 1716.23 | 17015.30 |
| | A2 | - | 0.152 | 6974.90 | 64486.00 |
| | A3 | - | 0.168 | 180.92 | 3664.10 |
| Sobrenadante concentrado | A1 | 1:46 | 3.44 | 5011.50 | 34693.90 |
| | A2 | 1:33 | 1.469 | 14047.60 | 80073.16 |
| | A3 | 1:33 | 1.433 | 676.60 | 4285.5 |

8.2 Preparación de proteinasa K

La enzima liofilizada y pesada se disolvió en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=8 con CaCl₂ 20 mM (recomendación del fabricante), al extracto enzimático se le cuantificó la actividad enzimática esterasa, así como la cantidad de proteína por el método de Bradford. Los resultados de cada caracterización del extracto se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Actividad esterasa y concentración de proteína del extracto enzimático de proteinasa K.

| Muestras | Volumen de muestra (mL) | Concentración de proteína (mg/mL) | Actividad volumétrica (U/mL) | Actividad específica (U/mg) | |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|----------|
| Enzima disuelta | Proteinasa K | 5 | 1.283 | 32316.76 | 25188.43 |

8.3 Perfil de proteína en gel SDS-PAGE y actividad “*in situ*” en zimograma

Para corroborar que se obtuvo la enzima de interés se realizó un perfil proteico en geles SDS-PAGE con el sobrenadante crudo, comparado con un marcador de peso molecular conocido de proteínas. Se realizó un zimograma para verificar la actividad de la enzima “*in situ*”. Al revelar los geles de perfil proteico y actividad esterasa (Figura 21 y 22, respectivamente) se aprecia que los en sobrenadantes obtenidos de cada enzima recombinante (A1, A2 y A3) se presentan bandas entre los pesos moleculares reportados en el grupo de trabajo (Ancut1, 24.8 kD; Ancut2, 33 kD y Ancut3, 29.4 kD) Morales, 2018 y Llanos, 2018), así como para el caso de la proteinasa K (75 kD).

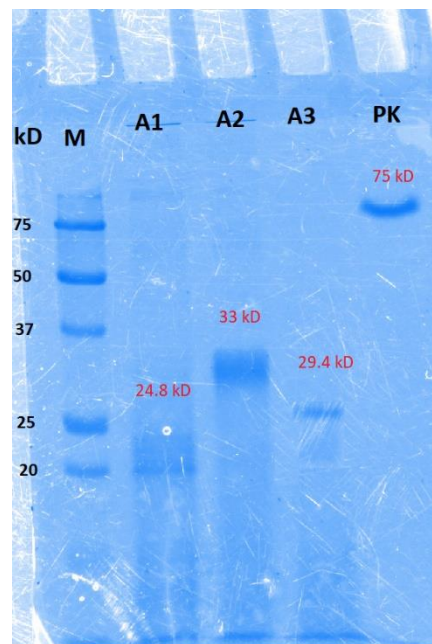


Figura 21. Perfil de proteínas de los sobrenadantes crudos de *P. pastoris* con A1, A2 y A3, y el extracto enzimático de Proteinasa K; en SDS-PAGE teñidos con azul de comassie (M: marcador molecular, A1: A1, A2: A2, A3:A3 PK: Proteinasa K); los pesos moleculares esperados para cada enzima están marcados en color rojo.

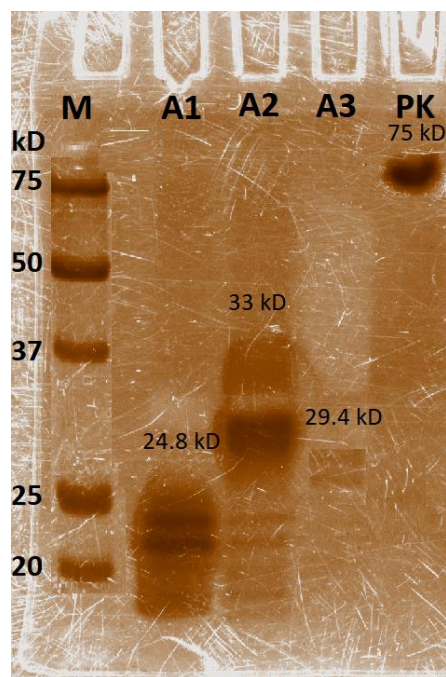


Figura 22. Zimogramas de los sobrenadantes crudos de *P. pastoris* con A1, A2 y A3, y el extracto enzimático de Proteinasa K; se muestra actividad esterasa usando α -Naftil acetato como sustrato (M: marcador molecular, A1: A1, A2: A2, A3:A3 PK: Proteinasa K). Los pesos moleculares esperados para cada enzima están en color negro sobre cada banda.

8.4 Evaluación inicial de la degradación de PLLA por cuantificación de ácido láctico

Los sobrenadantes crudos y concentrados de A1, A2 y A3, así como el extracto de proteinasa K, se utilizaron para llevar a cabo reacciones de hidrólisis sobre PLLA en lámina, con el fin de observar si las cutinasas recombinantes producían la liberación de ácido láctico. El control positivo fue la proteinasa K, que se ha reportado hidroliza al polímero, produciendo la liberación de su monómero (Ohkita *et al.*, 2006; Hegyesi *et al.*, 2019; Kawai, 2010; Carbios, 2019).

En la Figura 23 se observa que después de 24 de comenzar la hidrólisis del PLLA, se puede cuantificar ácido láctico en el medio de reacción de la proteinasa K. La concentración hallada en este estudio coincide con la concentración reportada en un estudio de Carbios en 2019, (que después de 7 días de reacción reporta una concentración de 8.67 mM de ácido láctico). En el caso de la cutinasa A1 hay una concentración de \sim 1.5 mM de ácido láctico después de 24 h, para la cutinasa A2 se observa liberación de ácido láctico hasta las 48 h de reacción. Esto indica que estas dos enzimas tienen acción sobre PLLA de alto peso molecular (HMW) además de PLLA de bajo peso molecular (LMW) (Sánchez, 2015). En el caso de A3 no se pudo cuantificar ácido láctico, aunque se ha reportado que esta enzima si degrada PLLA de bajo peso molecular (Llanos, 2018). Con la enzima A1 se alcanza una mayor concentración de ácido láctico liberado al medio de reacción, casi de 30 mM a las 240 h de reacción, el doble de lo producido por la proteinasa K que alcanza un máximo de casi 15 mM a las 240 h. En el caso de A2 se alcanza un máximo de concentración de casi 5 mM a las 48 h, y después disminuyó, probablemente debido al crecimiento de microorganismos que consumen al ácido láctico del medio de reacción (Sheng, 2015).

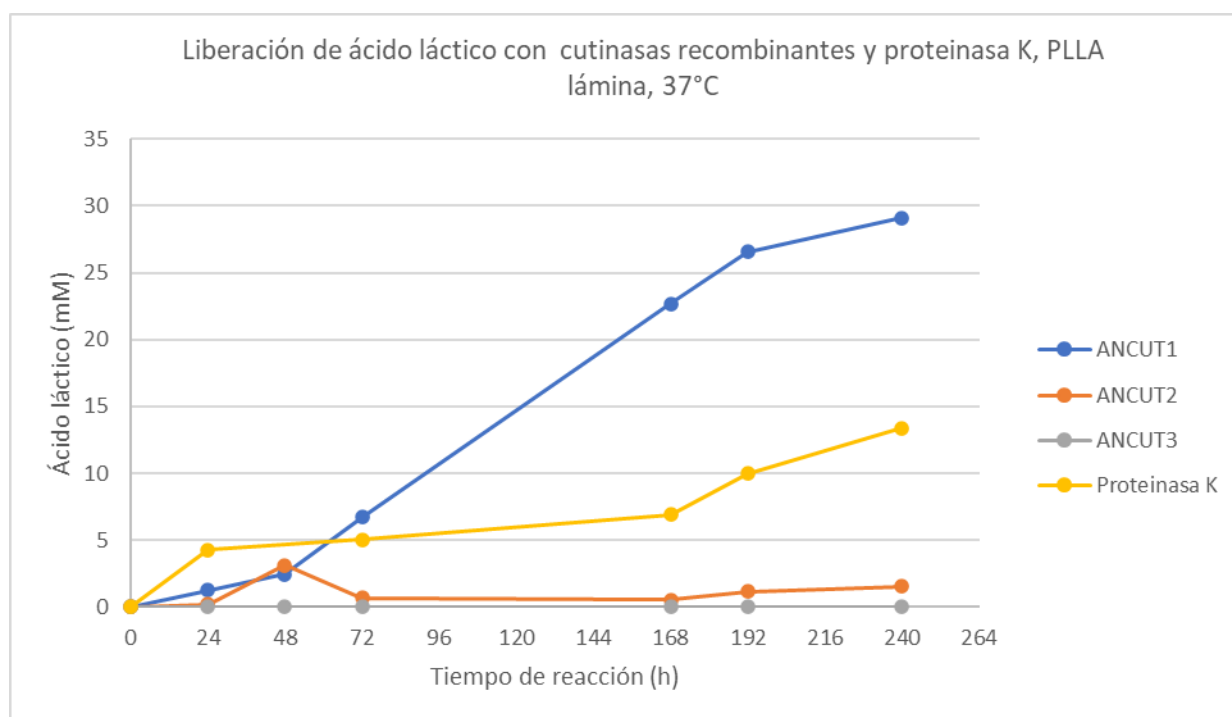


Figura 23. Monitoreo de ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteinasa K, PLLA lámina (10 mg), 37°C, 1% enzima, Regulador reportado para cada enzima, sin agitación.

También, se hizo una hidrólisis sobre PLLA pulverizado, partícula tamiz 20, para probar si al disminuir el tamaño de partícula mejorara la degradación, incrementando el ácido láctico liberado al medio de reacción. En la Figura 24 se puede ver que para el caso de A2 y A3, los resultados son similares a los obtenidos en la hidrólisis de PLLA en lámina; en el caso de la proteínasa K (control positivo), también degrada al PLLA liberando su monómero, y la concentración de este alcanza un máximo de 10 mM, menor al alcanzado con el PLLA en lámina (~ 15 mM).

En el caso de A1 se alcanza un máximo de ácido láctico que supera ligeramente los 30 mM a las 192 horas, tiempo menor comparado con la hidrólisis de PLLA en lámina, donde la concentración máxima de casi 30 mM se alcanza en 240 h. Se destaca que a las 240 h de reacción hay una disminución de ácido láctico, que se podría atribuir a una contaminación del medio. Aunque esta prueba no se hizo por triplicado, puede sugerir que, al disminuir el tamaño de partícula, se libera más ácido láctico. De estas pruebas iniciales, se puede fijó un tiempo máximo de reacción, que es en el que se alcanza la mayor concentración de ácido láctico, este tiempo fue de 7 días (168 h), pues se observó que en un tiempo mayor de reacción la contaminación por algún microorganismo podría disminuir la concentración de ácido láctico. Para prevenirlo, en las pruebas posteriores se usó azida de sodio al 0.005% como conservador, para evitar el crecimiento de microorganismos.

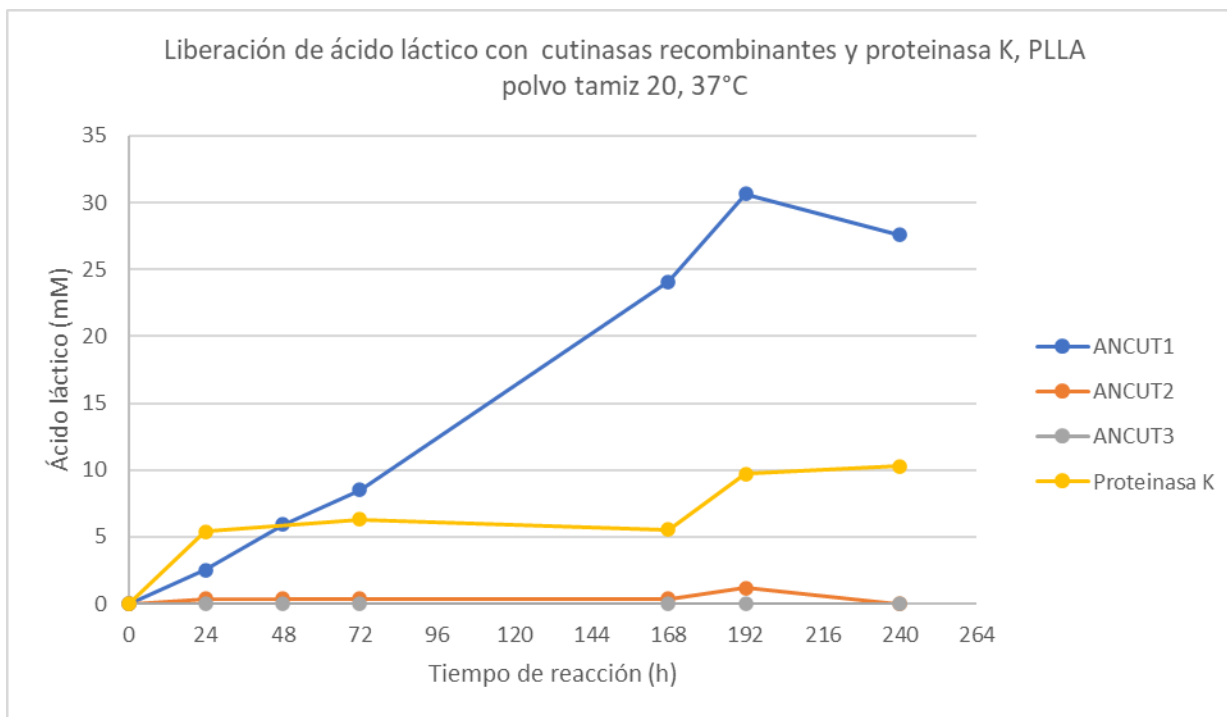


Figura 24. Monitoreo de la liberación de ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteinasa K, PLLA polvo tamiz 20 (10 mg), 37°C, 1% enzima, Regulador reportado para cada enzima, sin agitación.

8.5 Reacción de hidrólisis de PLLA a 7 días.

Después de la evaluación inicial de la degradación de PLLA por liberación de ácido láctico, se hizo una hidrólisis de PLLA con cada enzima de manera individual (cutinasas recombinantes y la proteinasa K) a 7 días como tiempo máximo de reacción, debido a que en el monitoreo de ácido láctico para Ancut1 y Ancut2 y Proteinasa K, a tiempos mayores a 7 días, la concentración de nuestro compuesto de interés comienza a disminuir. Transcurrido el periodo de 7 días se cuantificó el ácido láctico liberado al medio y los resultados (Figura 25) muestran claramente que A1 tiene un mejor desempeño, pues liberó 25.86 mM de ácido láctico, seguida de A2 (que liberó 11.49 mM). En el caso de A3, así como en la prueba inicial, no se detectó liberación de ácido láctico, sin embargo, al observar el medio de reacción después de 7 días, se aprecian fibrillas liberadas (resultados no mostrados), indicando que, aunque no hay liberación del monómero con esta enzima, sí hay degradación y se modifica la estructura del PLLA, pero probablemente se liberan otro tipo de productos (por ejemplo, oligómeros de bajo peso molecular del PLLA, o alquil lactatos). Esta degradación con A3 se reforzó al mostrar que con esta enzima hay pérdida de peso (Tabla 16). En el caso de la proteinasa K (control positivo), la liberación del ácido láctico coincide con lo reportado por Carbios, 2019 (que fue de 8.67 mM) pero esta concentración es menor respecto a A1 y A2, se puede concluir que las enzimas A1 y A2 son mejores para liberar ácido láctico que la proteinasa K.

Aunque A3 no liberó ácido láctico, hay otras evidencias que muestran que esta enzima hidroliza al PLLA, tales como la pérdida de peso y cambios físicos en el medio de reacción. Sin embargo, al igual que en el caso del de la cutina, A3 podría tener un mecanismo de escisión distinta a A1 y A2 (Bermúdez, 2019), por ello podría

liberar otro tipo de productos, habría que caracterizar los productos del medio de reacción de PLLA con A3 para identificar el mecanismo de hidrólisis que esta realiza.

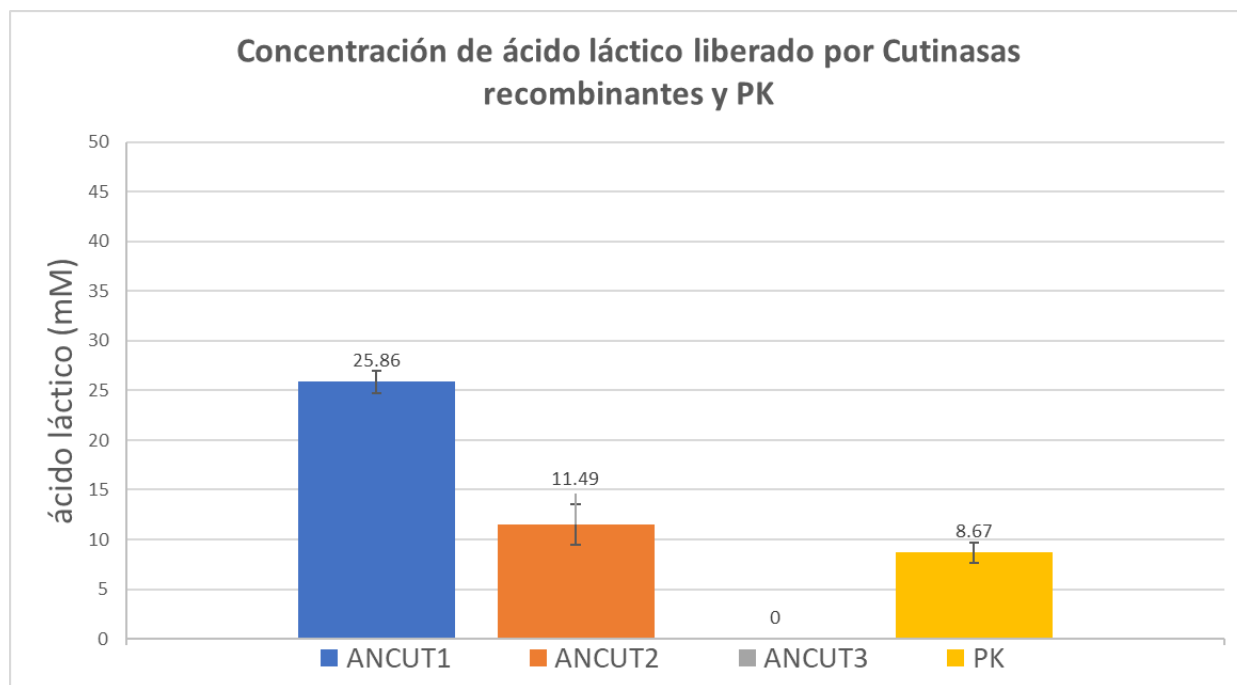


Figura 25. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con cutinasas recombinantes y proteínasa K después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20 (10 mg), 37 °C, 1% enzima, Regulador reportado para cada enzima, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

Con estas pruebas se verificó que las enzimas hidrolizan PLLA, posteriormente se hicieron pruebas donde se combinaron las cutinasas, para evaluar una posible sinergia entre las cutinasas al hidrolizar al PLLA.

8.6 Combinación de cutinasas recombinantes.

8.6.1 Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes.

Los ensayos de la combinación de 2 cutinasa recombinantes se dividieron en dos partes para la combinación de A1 con A3 y A2 con A3, esto con el fin de evaluar también el efecto del regulador en la reacción de hidrólisis, pues A3 tiene un regulador adecuado diferente (regulador Tris-HCl, pH=9, 50 mM) respecto al regulador adecuado de A1 y A2 regulador de fosfatos de Sodio, pH=7, 50 mM).

Los resultados (Figura 26) muestran que la combinación con un mejor desempeño es A1/A3 en regulador Tris-HCl pH=9, ya que con esta se alcanzó una concentración de ácido láctico de 31.41 mM, lo que sugiere que probablemente hay una sinergia entre ellas. Se podría explicar que los productos que libera A3 son hidrolizados por A1 y convertidos en ácido láctico, sin embargo, en el regulador Tris-HCl pH=9 esto no es factible por dos

razones, la primera es que antes de cumplirse los 7 días de reacción, en el regulador se comienza a tener crecimiento microbiano, aún con azida de sodio 0.005%, el otro inconveniente es el económico, pues elaborar regulador Tris-HCl es más caro respecto al de fosfatos de sodio 50 mM, pH=7.

Las demás combinaciones de dos enzimas mostraron una liberación menor de ácido láctico, aunque la combinación A1/A3 en regulador de fosfatos de sodio pH=7 50 mM es la segunda mejor combinación (alcanzando una concentración de ácido láctico de 19.49 mM), no supera a la concentración lograda con A1 sola (25.86 mM). Las combinaciones A1/A2 y A2/A3 liberaron ácido láctico, pero sus concentraciones son menores (8.22 mM para A1/A2, 0.49 mM para A2/A3 en regulador de fosfatos y 13.53 mM para A2/A3 en regulador), por lo que estas enzimas no tienen sinergia al hidrolizar PLLA HMW.

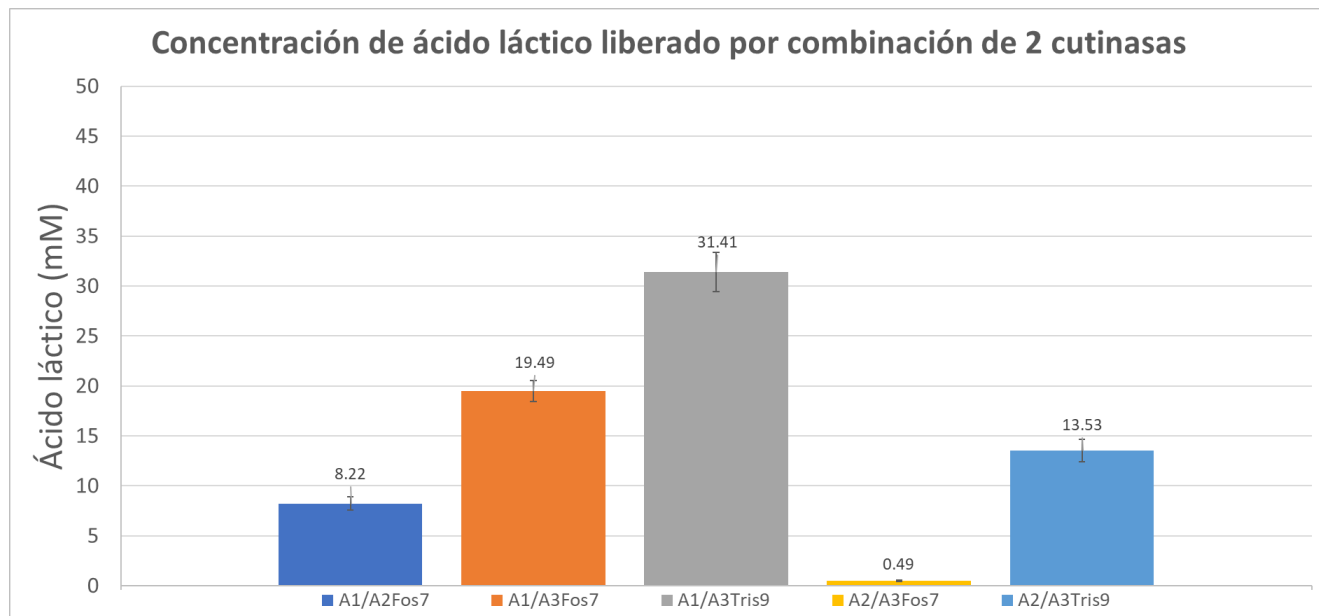


Figura 26. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con la combinación de 2 cutinasas recombinantes después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20 (10 mg), 37°C, 1% de cada enzima (total 2%), regulador reportado para cada enzima, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

8.6.2 Reacción de hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes.

El ensayo para evaluar la combinación de 3 cutinasas recombinantes también se dividió en dos partes para evaluar el efecto del regulador de reacción. Los resultados (Figura 27) no mostraron mejoría en la liberación de ácido láctico al medio de reacción, que fue 15.66 mM en regulador Tris-HCl, pH=9, 50 mM, cantidad que no supera a la alcanzada únicamente con A1 (25.86 mM). Este resultado indica que las 3 enzimas tampoco tienen sinergia al hidrolizar PLLA HMW.

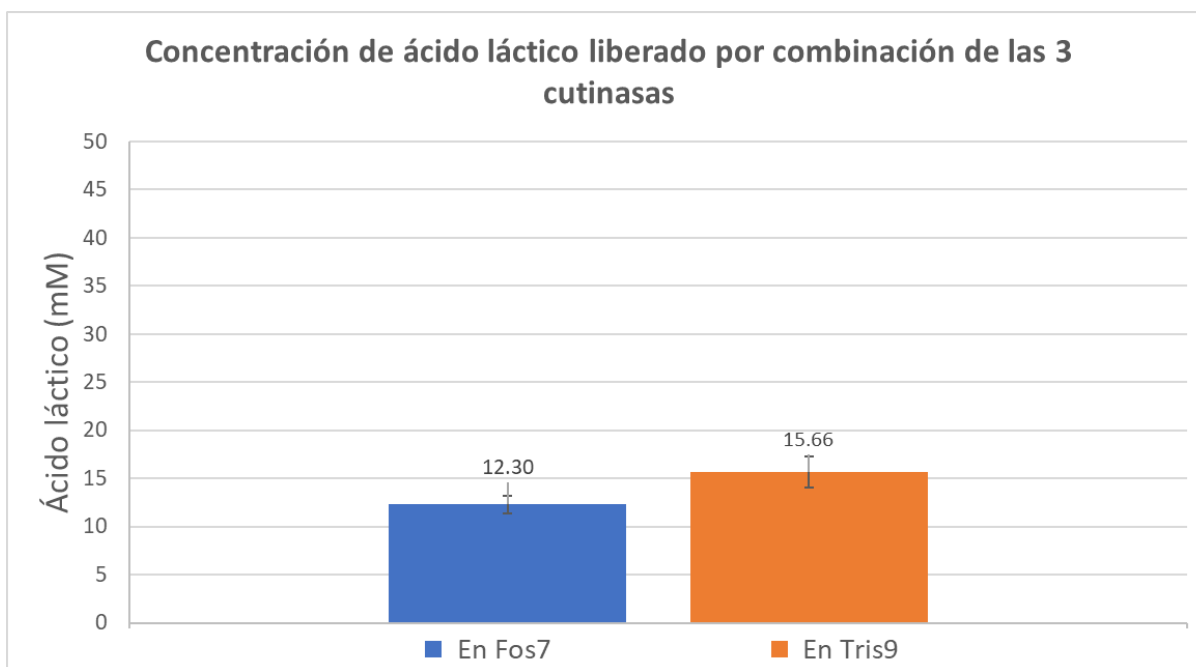


Figura 27. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con la combinación de 3 cutinasas recombinantes después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20 (10 mg), 37°C, 1% de cada enzima (total 3%), Regulador reportado para cada enzima, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

8.7 Mejora de las condiciones de hidrólisis de PLLA con la enzima A1

Los resultados de la degradación individual de cada enzima (Figura 25) muestran que A1 es la enzima que libera más ácido láctico, en el caso de la combinación de cutinasas recombinantes (Figuras 26 y 27), A1/A3 en regulador Tris-HCl, pH=9, 50 mM libera mayor cantidad de ácido láctico (31.41 mM) que A1 sola (25.86 mM). Hay que considerar que la producción de una sola enzima es más práctica. Por otra parte, el uso del regulador empleado para la combinación A1/A3 no es viable económicamente para un escalamiento, y se contamina fácilmente aún con conservador. En conclusión, se decidió que las condiciones de reacción fueran mejoradas para A1.

8.7.1 Influencia del tamaño de partícula

Se investigó el efecto del tamaño de las partículas de PLLA HWM en la liberación de ácido láctico por hidrólisis con A1. Las partículas de PLLA triturado se tamizaron y separaron en 5 fracciones. Cada una se sometió a una reacción de hidrólisis con A1 por 7 días, los resultados de la concentración de ácido láctico liberado se muestran en la Figura 28. Es posible observar una mejoría en la concentración de ácido láctico para los tres primeros tamaños de partícula (#20, #30 y #40), con la partícula tamiz 40 se alcanza la mayor concentración de ácido láctico (29.46 mM). Este efecto puede atribuirse a un aumento superficie disponible para la acción enzimática, puesto que a menor tamaño de partícula se aumenta el área superficial del polímero tratado enzimáticamente (De Castro *et al.*, 2019).

Para tamaños de partícula menores (#50 y #60), se observa una disminución en la concentración de ácido láctico, sin embargo, el análisis de varianza correspondiente (tabla 25), muestra que no hay diferencia significativa en las concentraciones de ácido láctico obtenidas para los tamaños de partícula #20, #30, #50 y #60. En tamaños menores de partícula (#50 y 60), la cantidad de ácido láctico no aumenta, probablemente debido a que la enzima A1 se satura, es decir que toda la enzima A1 está hidrolizando PLLA. La única manera de observar y estudiar con mayor exactitud el efecto del tamaño de partícula sería agregando más enzima. Disminuir el tamaño de partícula del sustrato para aumentar la superficie disponible del mismo sí mejora algunas reacciones enzimáticas, hay que tomar en cuenta el consumo de energía para triturar todas las partículas para obtener el tamaño deseado, así como las pérdidas durante el proceso.

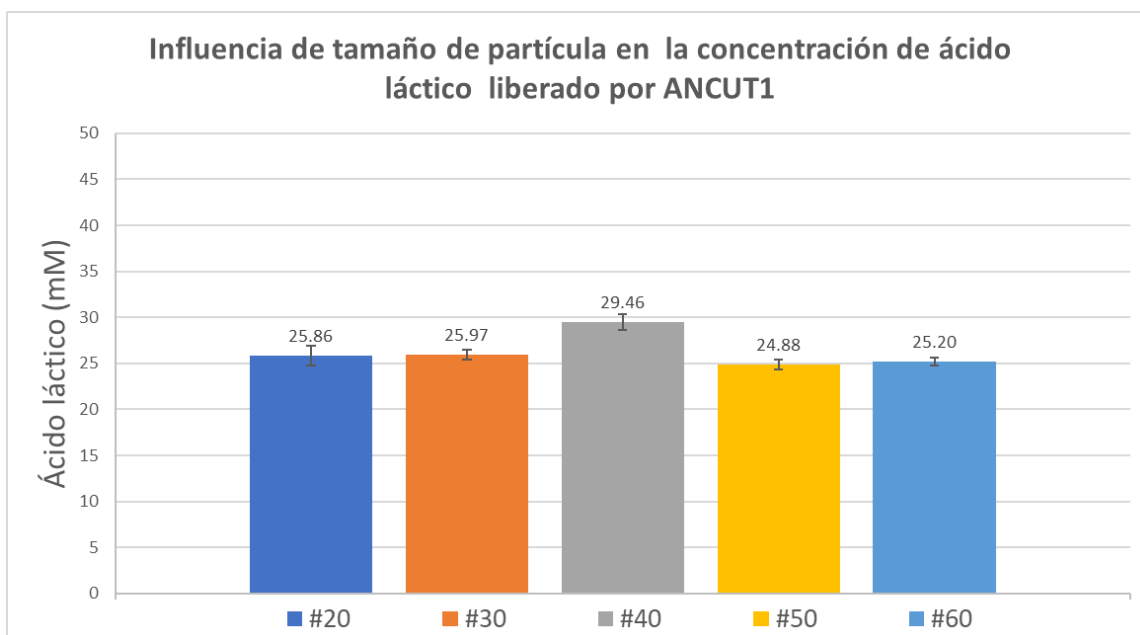


Figura 28. Influencia del tamaño de partícula de PLLA en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días, PLLA (10mg), 37°C, 1% enzima, regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

8.7.2 Influencia de la concentración de enzima

Se evaluó el efecto de la concentración de enzima en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1, en sustratos sólidos se ha reportado que la cantidad de enzima es importante, pues se ha observado que en reacciones donde la cantidad y área superficial de un sustrato se mantienen constantes, la actividad de una enzima puede disminuir, aunque la concentración de enzima sea mayor, esto ocurre porque el sustrato está saturado por la enzima. Al agregar más enzima, la adsorción entre esta y el sustrato se vuelve más lenta debido a un exceso de enzima (Liu, 2020).

Se probaron 5 diferentes concentraciones de enzima sobre una cantidad fija de PLLA. Los resultados (Figura 29) muestran que para las 3 primeras concentraciones de enzima (0.5, 1 y 3 %) se cumple que al agregar más enzima hay más cantidad de producto generado, mientras que para concentraciones mayores (5 y 10% de enzima), se obtiene menos ácido láctico, coincidiendo con Liu, 2020. Para este caso particular, la concentración de enzima con la que se alcanzó una mayor concentración de ácido láctico fue con 3% de A1, alcanzando una concentración de 27.26 mM de ácido láctico, a concentraciones superiores de enzima la concentración de ácido láctico disminuye, esto probablemente a que al haber un exceso de enzima, las partículas de PLLA están saturadas de enzima, haciendo más lento el proceso de adsorción que hay entre las demás moléculas de enzima A1 con las partículas de PLLA. Aunque este ensayo muestra una concentración de enzima óptima, hay que tomar en cuenta que se hizo con una superficie de sustrato constante (PLLA tamiz #20), habría que estudiar más a fondo el efecto de concentraciones mayores de enzima cuando la superficie del sustrato aumenta con tamaños de partículas menores a tamiz #20).

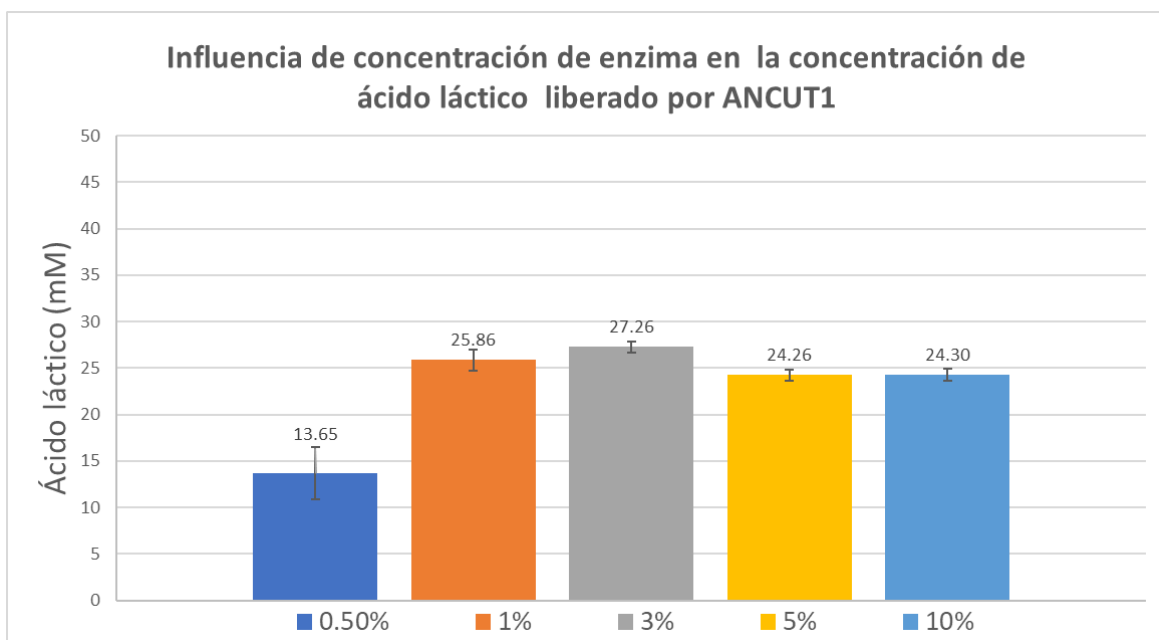


Figura 29. Influencia de la concentración de enzima (respecto al peso del polímero) en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20, 37°C, regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

8.7.3 Influencia de la temperatura

Hay varios factores importantes que afectan la biodegradabilidad de los polímeros. Algunos son factores asociados con la estructura de orden, como la temperatura de transición vítrea (T_g) (Vroman, 2009) (T_g del PLA $\sim 60^\circ\text{C}$). En la T_g y por encima de ella se producen cambios drásticos en la movilidad de las cadenas que conforman el polímero (Auras, *et al.*, 2004; Farah *et al.*, 2016; Tanjung *et al.*, 2020), esto afecta directamente a la degradación enzimática del polímero, porque acercarse a la temperatura de transición vítrea favorece la

movilidad enzimática través de las cadenas poliméricas (de Castro *et al.*, 2019), de manera que se favorece la interacción de la enzima con las cadenas, y por lo tanto, la reacción de hidrólisis por parte de la enzima. Sumado a esto, a mayor temperatura, aumenta la energía cinética en las moléculas haciendo más probable una reacción química, esto aumenta velocidad de la reacción enzimática.

Por estas razones, se decidió estudiar el efecto de la temperatura en la reacción de hidrólisis por A1. La temperatura ideal para llevar a cabo la degradación enzimática de un polímero es la temperatura de transición vítrea del material o lo más cercano posible, que para el caso de este PLLA se consideró como temperatura máxima a probar 60 °C. El estudio de este efecto requirió encontrar una temperatura máxima ideal sin que se comprometiera la estabilidad de la enzima. Los resultados (Figura 30), mostraron que hay un mejor desempeño de la enzima a 40 °C, donde se obtuvo una concentración de 29.64 mM de ácido láctico. A 45 °C la concentración de ácido láctico tendió a disminuir y hasta llegar a cero para temperaturas superiores. Esto puede deberse a que la enzima está desnaturalizada a temperaturas de 45 °C y superiores, perdiendo toda su acción catalítica porque se desnaturaliza, ya no hidroliza al PLLA y no libera ácido láctico.

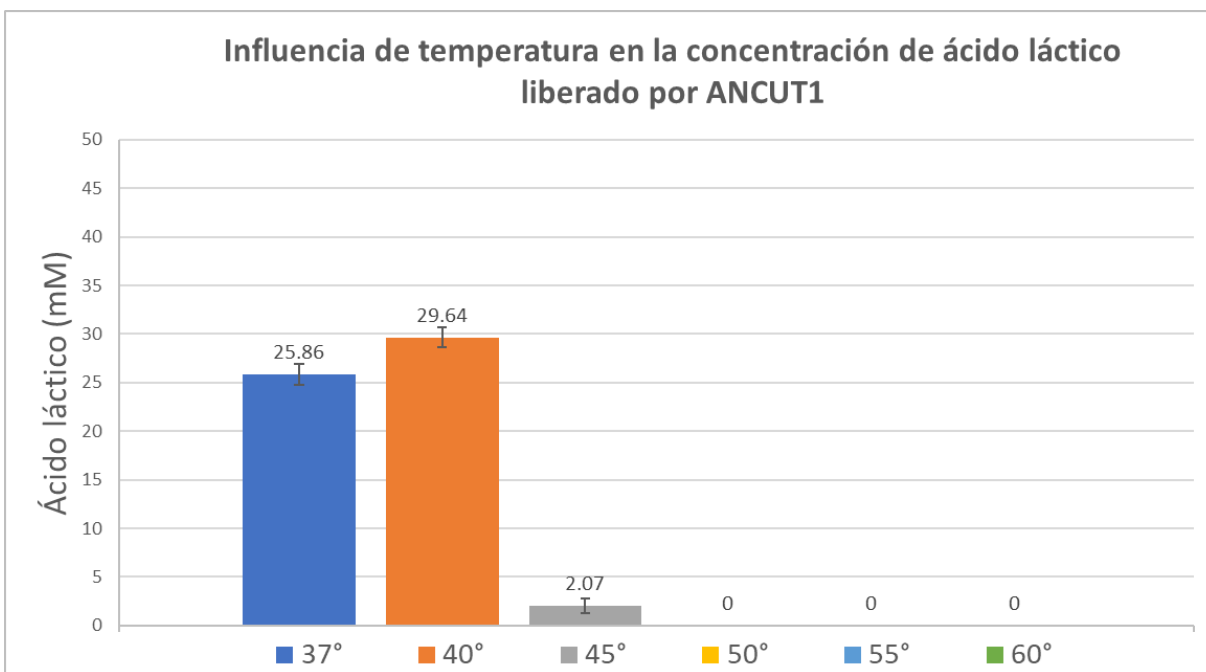


Figura 30. Influencia de la temperatura del medio de reacción en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20 (10 mg), regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7, sin agitación, azida de Sodio 0.005%.

8.7.4 Influencia del pH del regulador del medio de reacción

Se procedió a evaluar la influencia del pH del Regulador del medio de reacción, la elección del intervalo de pH con los que se trabajó se realizó por los resultados obtenidos de Sánchez en 2015. Los resultados de este análisis

(Figura 31) muestran que a mayor pH se consigue una mayor liberación de ácido láctico, siendo el pH 9 la mejor condición con este se alcanzó una concentración de 30.96 mM, superior al encontrado inicialmente a pH 7 (25.86 mM). Hay que destacar que a menor pH la acción hidrolítica de A1 disminuye a la par que el pH, pues a pH 6 se registró la menor concentración de ácido láctico (10.20 mM). La mayoría de las cutinasas trabaja óptimamente a pH neutro o alcalino (7-9.5), aunque hay algunos reportes de cutinasas que trabajan mejor a pH 4, 5 y 6 (Nikolaivits *et al.*, 2018). En el caso de A1 parece que la tendencia de aumentar la liberación el ácido láctico a la par con el pH del regulador coincide con lo reportado para la mayoría de cutinasas, esto probablemente se debe a la composición de la triada catalítica de las cutinasas (Ser-His-Asp), la cual necesita a una serina activa para comenzar la reacción de hidrólisis. Hay un paso previo, que consiste en activar a la serina, que se logra gracias a que la histidina funciona como una base fuerte a pH alcalino y logra desprotonar a la serina (Jaegger *et al.*, 1999; Bornscheuer y Kazlauska, 2006), y la activa volviéndola un nucleófilo que puede atacar el enlace éster presente en el PLLA, por lo que a pH alcalino la enzima está más activa para realizar la hidrólisis del PLLA.

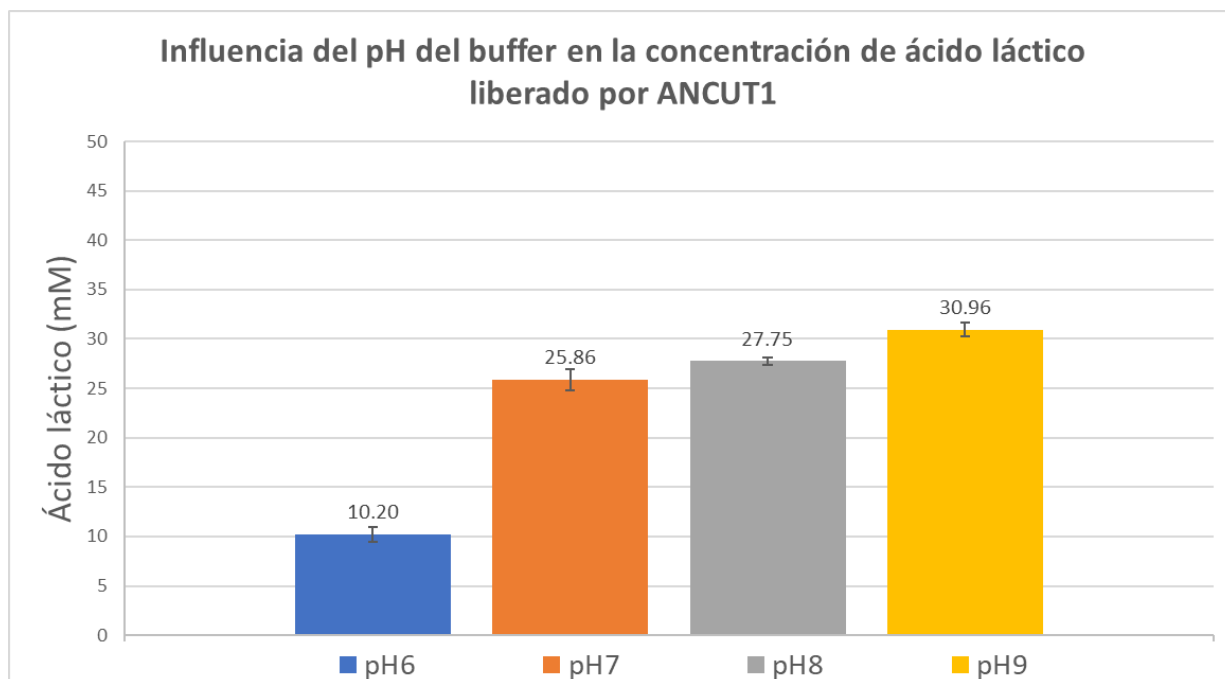


Figura 31. Influencia del pH del Regulador de reacción en la liberación de ácido láctico por la hidrólisis de PLLA con A1 después de 7 días, PLLA polvo tamiz 20 (10mg), 37 °C, regulador de fosfatos de sodio 50 mM, sin agitación, azida de sodio 0.005%.

8.8 Reacción de hidrólisis de PLLA usando A1 y combinando las mejores condiciones

Posterior a la evaluación en forma independiente del efecto de algunos factores (tamaño de partícula, concentración de enzima, temperatura y pH del regulador de medio de reacción) sobre la cantidad de ácido láctico liberado al medio, se realizó un experimento en el que se seleccionaron las condiciones que dieron los

mejores resultados para ver si la combinación de estos resultaba en un incremento en la liberación de ácido láctico. Los resultados (Figura 32) muestran que la combinación de los valores de cada factor definidos previamente como mejores (PLLA partícula #40, 3% de enzima A1, 40 °C de temperatura y regulador de fosfatos 50 mM, pH=9), incrementan la liberación de ácido láctico al medio de reacción alcanzando una concentración de 41.84 mM, comparado con la concentración de ácido láctico alcanzada por A1 y las condiciones iniciales que fue de 25.86 mM. Este valor representa un incremento de 61.8% en la concentración de ácido láctico. Se considera que a futuro se debe realizar un diseño experimental que incluya tanto los factores como diferentes niveles de cada uno.

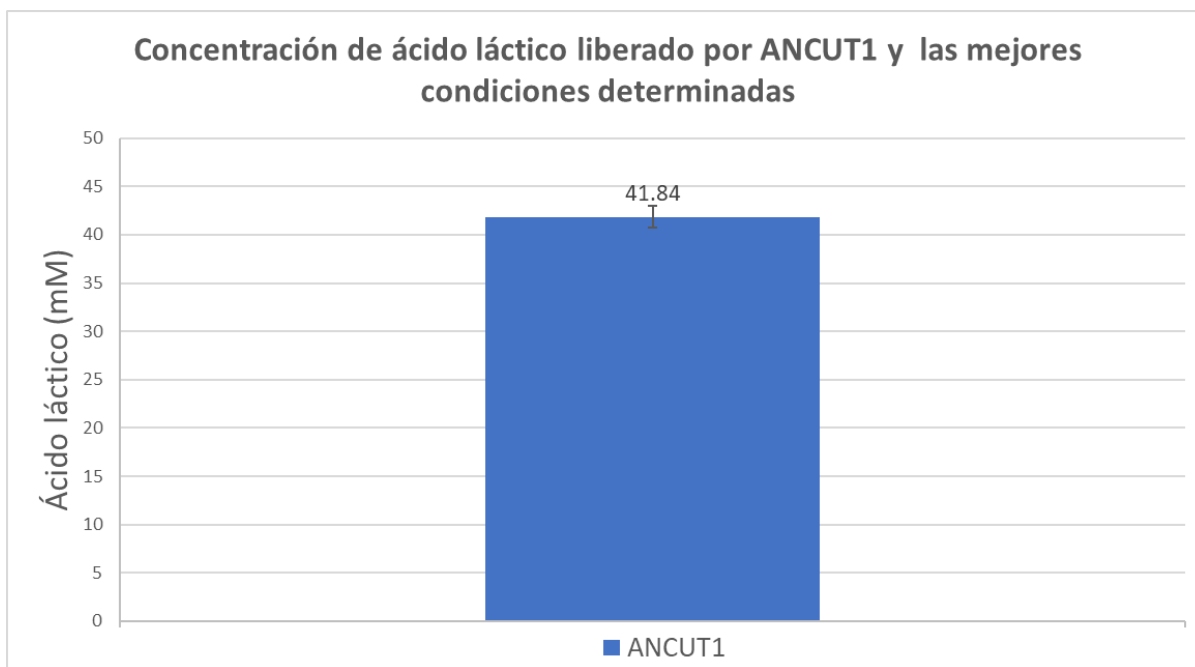


Figura 32. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de PLLA con A1 y mejores condiciones determinadas después de 7 días, PLLA polvo tamiz 40 (10 mg), 40 °C, regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=9, sin agitación, azida de sodio 0.005%.

8.9 Reacción de hidrólisis de empaque comercial con PLA, usando A1 y las mejores condiciones determinadas

Optimizadas las condiciones de degradación enzimática de PLLA HMW con A1, se procedió a probar estas condiciones mejoradas de reacción sobre un empaque comercial biodegradable, cuya composición detallada es desconocida pero que se sabe contiene PLA, con el fin de evaluar si la enzima A1 tiene potencial para degradar bajo condiciones no controladas del material degradado. El empaque elegido fue uno de la marca Bimbo®, de su línea de pan Vital®, que presume en las leyendas del empaque contar con un empaque biodegradable. El empaque se separó del producto alimenticio que contenía y se colocó en una licuadora industrial y se trituró

hasta alcanzar un tamaño de partícula homogéneo, como se muestra en la Figura 33. Posteriormente el empaque triturado se colocó en una reacción de hidrólisis con A1, las condiciones usadas para degradar este empaque comercial fueron las mismas que con el PLLA HMW degradado bajo mejores condiciones de la sección 7.8 (3% de enzima A1, 40° de temperatura y regulador de fosfatos 50 mM pH=9) a excepción del tamaño de partícula que, por las características del empaque, no se pudo triturar a tamaños de partícula tan pequeños como tamiz #40.

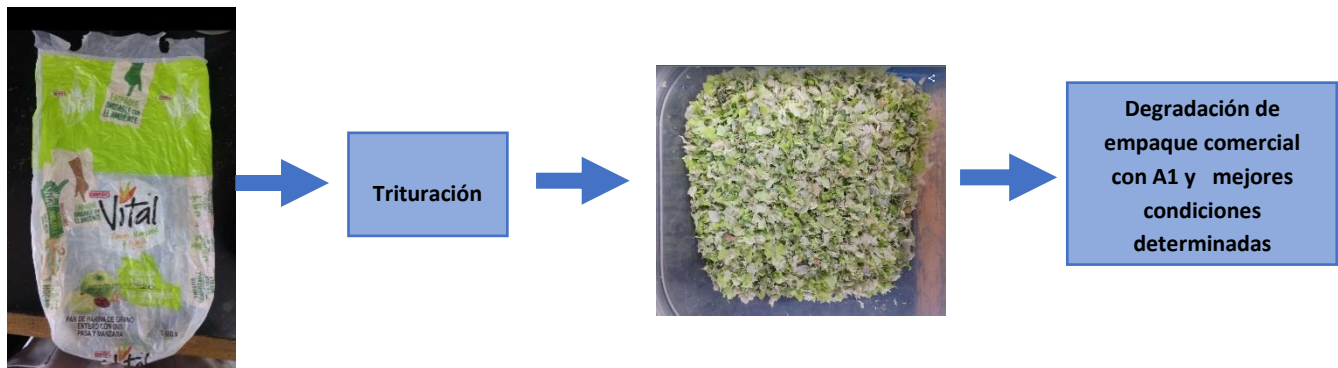


Figura 33. *Empaque comercial recién usado y triturado antes de someterlo al tratamiento enzimático con A1 y las mejores condiciones determinadas.*

Pasados 7 días de reacción de hidrólisis con A1 se procedió a cuantificar la concentración de ácido láctico liberado al medio de reacción. Los resultados (Figura 34) mostraron que la concentración de ácido láctico que se obtuvo después de la hidrólisis del empaque no corresponde con lo esperado si la mayoría de la composición del empaque fuera PLLA, pues la concentración alcanzada fue de 1.94 mM, mucho menor a la alcanzada con PLLA HMW y las mismas condiciones (41.84 mM). Esto puede ser probablemente a que dentro de la composición del empaque sí hay PLLA, pero este está combinado con algún otro polímero(s) que está(n) en mayor proporción. No obstante, se observó claramente la desintegración del empaque. Estos resultados muestran que la enzima además de PLLA puede degradar a otro tipo de polímeros biodegradables en empaques comerciales, esto es importante porque algunas enzimas pueden tener potencial de degradación en materiales bajo condiciones controladas, pero en condiciones reales el desempeño es menor, como el caso de la enzima proteinasa K que sirvió como referencia, que, aunque degrada PLLA HMW, no pudo liberar ácido láctico de este mismo empaque comercial y tampoco mostró evidencia de degradación alguna (resultados no mostrados).

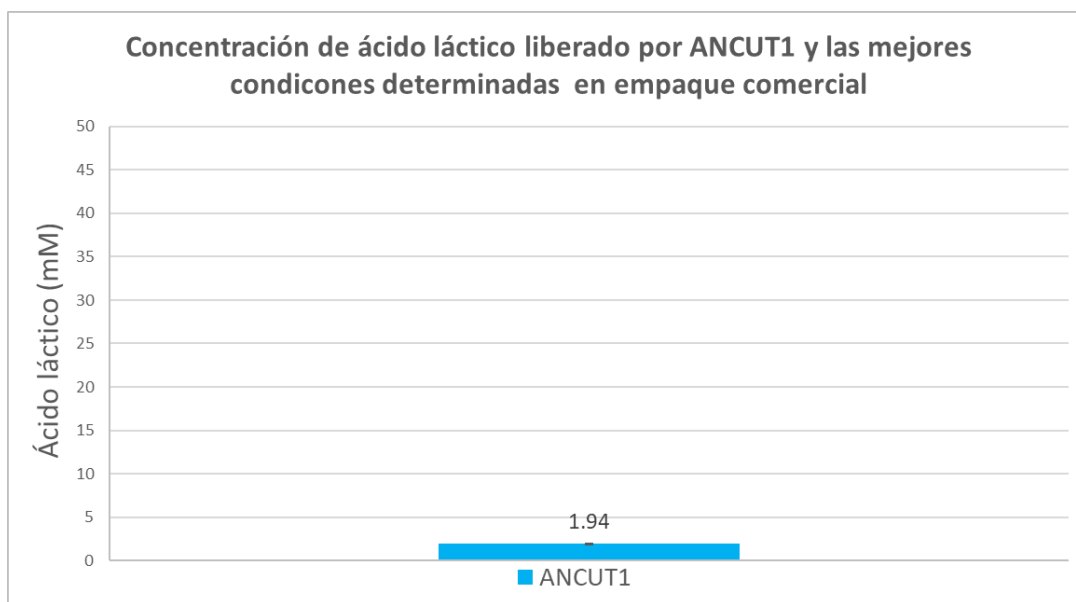


Figura 34. Ácido láctico liberado por la hidrólisis de empaque comercial con A1 y mejores condiciones determinadas después de 7 días, Empaque triturado, 40 °C, regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=9, sin agitación, azida de sodio 0.005%.

8.10 Determinación de pérdida de peso

Se hizo un escalamiento de la reacción a 7 días con las enzimas A2 y A1 (punto 7.11), con el fin de obtener PLLA suficiente para hacer algunos análisis de pérdida de peso, a las reacciones de PLLA HMW y del empaque degradados con A1 bajo mejores condiciones también se les evaluó este parámetro.

Los resultados (Tabla 16) muestran que para el caso de A2 y A3, aunque no liberan tanto ácido láctico como A1, aun así, degradan al PLLA HMW, provocando una pérdida de peso. La enzima A3, aunque no liberó ácido láctico alcanzó un 6.93 % de pérdida de peso, menor que A2 que alcanzó un 7.43 % de pérdida de peso, lo que podría sugerir que la hidrólisis con A3 libera otro tipo de productos al medio de reacción. Para el caso de A2 que sí libera ácido láctico, pero no tanto como A1, bajo este parámetro muestra que también degrada al PLLA HMW; esto refuerza lo explicado por Bermúdez-García *et al.* en 2019, que muestra un diferente mecanismo de escisión de cada cutinasa de *A. nidulans* al degradar a la cutina, en el caso del PLLA sería de importancia caracterizar los sobrenadantes para identificar los productos de reacción de A2 y A3, para ver si puede haber algún producto de interés económico similar al ácido láctico.

En el caso del PLLA HMW degradado con A1 y las mejores condiciones, además de alcanzar una liberación de ácido láctico de 41.84 mM, también alcanzó una pérdida de peso de 45.96%, lo que refuerza los resultados de degradación obtenidos al cuantificar el ácido láctico. Una manera de relacionar la pérdida de peso y la concentración de ácido láctico obtenido sería calcular el porcentaje de degradación basado en la cantidad teórica de ácido láctico que se puede sacar del PLLA HMW tratado con A1.

El empaque degradado con A1 y las mejores condiciones mostró una pérdida de peso de 49.7 %, esta no coincide con la concentración de ácido láctico obtenido del medio de reacción (1.94 mM), es muy baja comparada con la cantidad de ácido láctico que se obtuvo del PLLA HMW tratado A1 y las mejores condiciones (41.84 mM) donde también se tuvo una pérdida de peso de 45.96%. Con esta comparación podríamos decir que la concentración de ácido láctico obtenida es muy baja para la cantidad de empaque tratado, esto refuerza que el empaque contiene PLLA en una proporción muy baja, y debe estar mezclado con otro tipo de poliéster biodegradable que también es susceptible a la hidrólisis por A1.

Tabla 16. % de pérdida de peso después de 7 días de reacción, se muestran los resultados para cada tratamiento enzimático, así como para los blancos de reacción sin tratamiento enzimático.

| Tratamiento | Pérdida de peso (%) |
|--|---------------------|
| PLLA sin enzima (blanco) | 0 |
| PLLA con A2 después de 7 días de reacción | 7.43 ± 0.53 |
| PLLA con A3 después de 7 días de reacción | 6.93 ± 0.35 |
| PLLA con A1 y mejores condiciones después de 7 días de reacción | 45.96 ± 1.13 |
| Empaque sin enzima (blanco) | 0 |
| Empaque tratado con A1 y mejores condiciones después de 7 días de reacción | 49.7 ± 1.5 |

8.11 Evaluación de cambios físicos del polímero y del empaque por observación a contraluz.

Después de los 7 días de degradación del PLLA y del empaque con A1 y las mejores condiciones, se observó el polímero tratado a contraluz para observar cambios físicos. Los resultados del PLLA HMW tratado con A1 (Figura 35), muestran una disminución en la cantidad del polímero inicial, además también se apreció un cambio en el

tamaño de las partículas de PLLA tratado, aunque por la concentración de ácido láctico obtenido así como la pérdida de peso ya se sabía que estas condiciones provocan una mejor degradación del PLLA, los cambios físicos observables demuestran que la enzima no sólo causa cambios a nivel molecular, sino también a nivel físico del polímero.

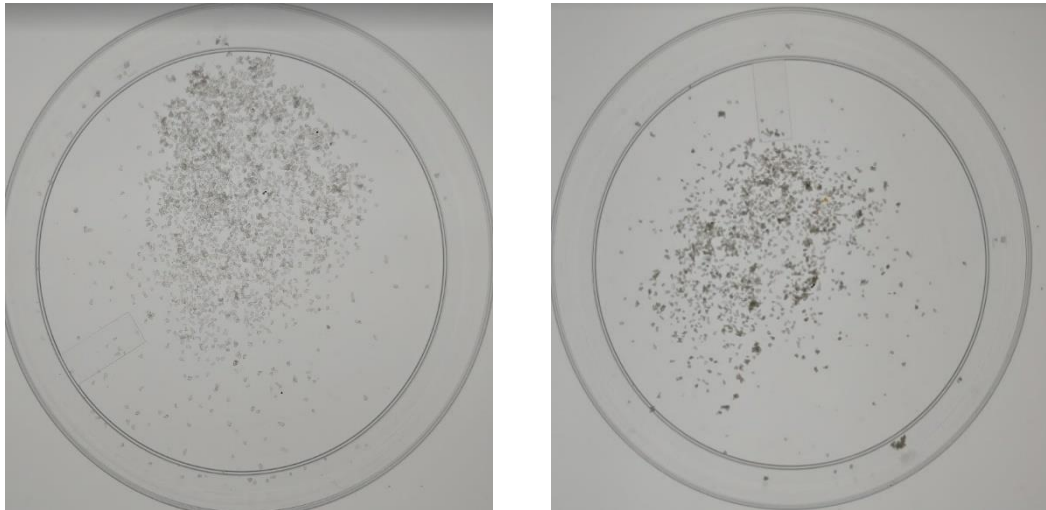
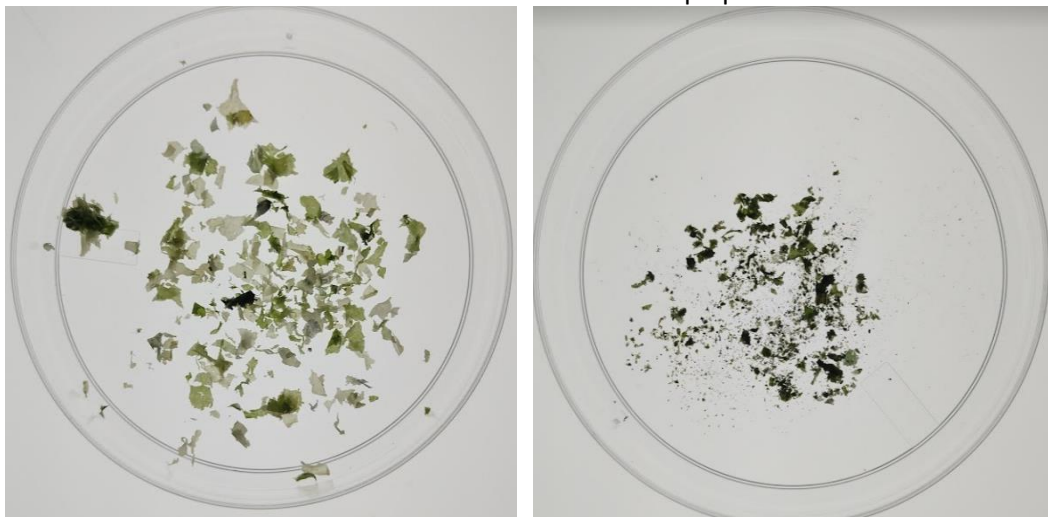


Figura 35. Fotografía de inspección a contraluz de PLLA tratado con A1 después de 7 días de reacción.

Imagen de la izquierda: Blanco de reacción sin enzima

Imagen de la derecha: PLLA tratado con A1, se aprecia una disminución en cantidad y tamaño de partícula

Para el empaque tratado con A1 (Figura 36), los cambios físicos del material tratado son más evidentes a simple vista, de igual manera se muestra una disminución en la cantidad de empaque tratado enzimáticamente, en este



caso la disminución en el tamaño de partícula se nota más debido a que el tamaño del empaque triturado no disminuyó tanto hasta llegar a partículas tamiz #40, estos cambios más perceptibles a simple vista demuestran que la enzima A1 con mejores condiciones es capaz de cambiar la estructura física del material tratado, mostrando una funcionalidad al degradar empaque biodegradables.

Figura 36. Fotografía de inspección a contraluz del empaque tratado con A1 después de 7 días de reacción.

Imagen de la izquierda: Blanco de reacción sin enzima

Imagen de la derecha: Empaque tratado con A1, se aprecia una disminución en cantidad y tamaño de partícula.

8.12 Evaluación del cambio morfológico de los polímeros y el empaque comercial por microscopía electrónica de barrido (SEM)

Los polvos de PLLA degradados por las cutinasas, A2 y A3, así como el polvo de PLLA y el empaque degradado con A1 y las mejores condiciones se analizaron por microscopía de barrido (JSM-5900LV de JEOL), con el objetivo de observar cambios físicos microscópicos generados por la degradación hecha por las cutinas. En algunos casos se observa gran diferencia en el polvo de PLLA y empaques tratados enzimáticamente con respecto a las películas control sin tratamiento enzimático.

En todos los casos de PLLA sin tratamiento enzimático, este material mostró una superficie homogénea y lisa sin imperfecciones. Para el caso del PLLA tratado con A1 y las mejores condiciones (Figura 37), los signos de hidrólisis por A1 son grietas que se pueden observar en prácticamente todo el material.

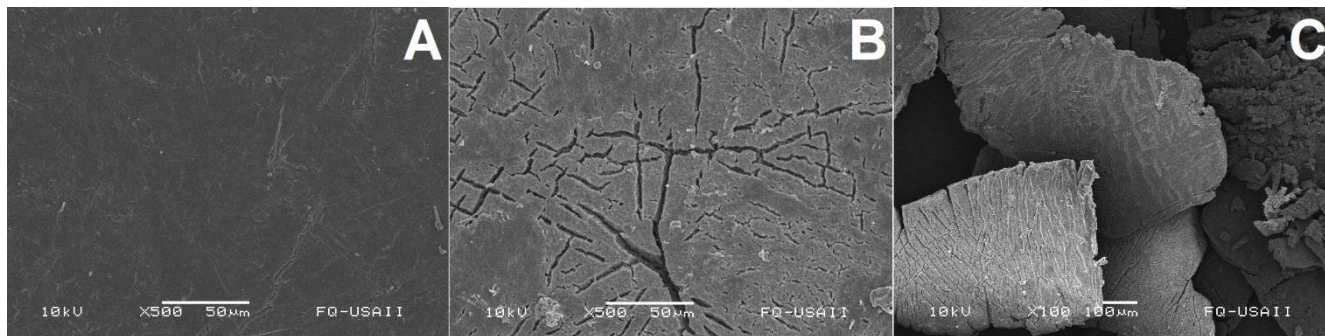


Figura 37. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X100) (C).

En el caso del PLLA tratado con A2 y A3 (Figura 38 y 39, respectivamente), aunque la pérdida de peso demostró que sí hay degradación, las observaciones microscópicas muestran pocas diferencias entre el polímero tratado respecto al polímero sin tratamiento. En el caso del PLLA tratado con A2 hay una aparición de unos pequeños puntos en la superficie del PLLA, que podrían ser signos de desgaste mínimo consecuencia de la hidrólisis por A2.

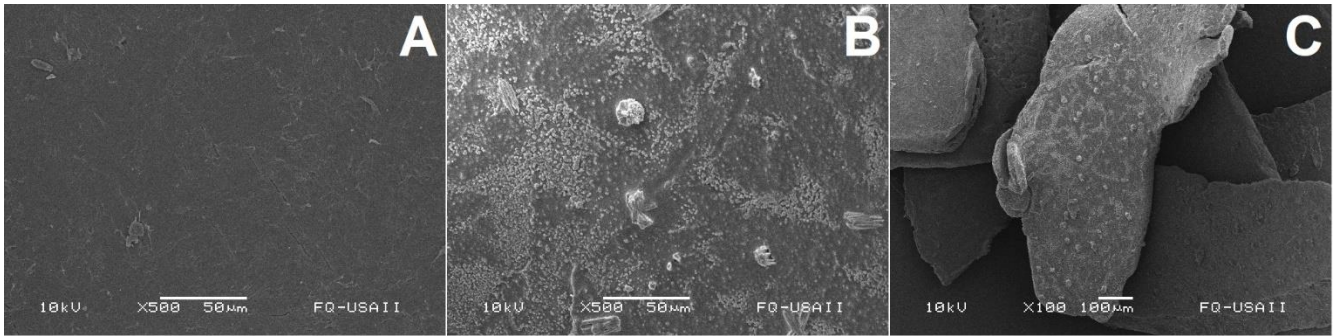


Figura 38. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A2, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A2, 7 días (X100) (C).

En el caso de A3 (Figura 39), el PLLA observado parece que no tiene cambio físico alguno en la superficie del PLLA, aunque los resultados de pérdida de peso mostraron que sí hay degradación con esta enzima, probablemente el mecanismo diferente de A1, así como la poca actividad que muestra A3 hacia PLLA HMW, apoyan que no hay cambio físico alguno sobre la superficie del polímero degradado.

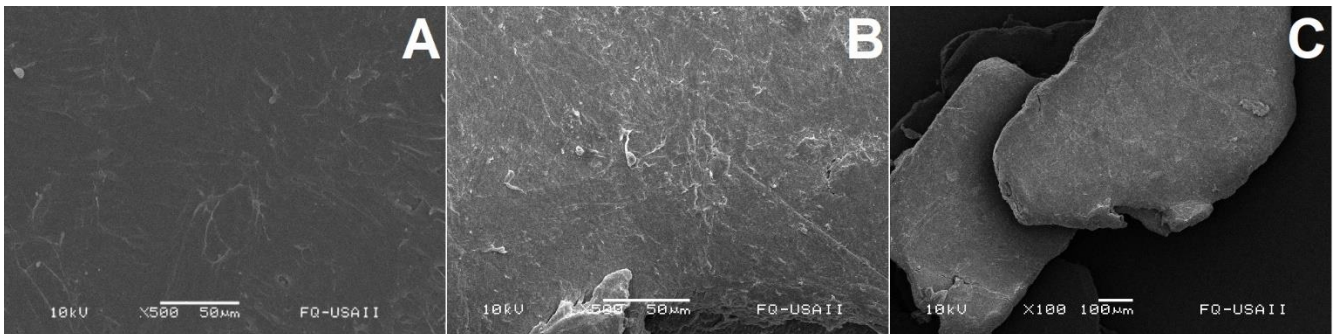


Figura 39. Morfología de PLA sin tratamiento enzimático (X500) (A). PLA tratado con A3, 7 días (X500) (B). PLA tratado con A3, 7 días (X100) (C).

El empaque sin tratamiento enzimático (Cuadro A, Figura 40) muestra una superficie irregular constante, al comparar con la primera observación del empaque tratado con A1 y las mejores condiciones (Cuadro B, Figura 40), hay grietas diferentes a la imperfección natural del empaque, demostrando signo de degradación del empaque; esto se refuerza con la segunda observación del empaque tratado con A1 (Cuadro C, Figura 40) donde se ve que hay una disminución en el tamaño de partícula del empaque por que el material se está fragmentando.

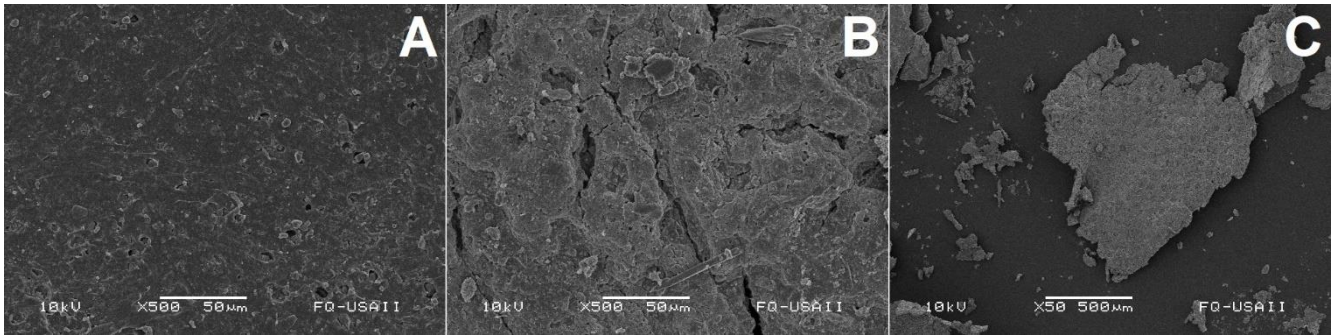


Figura 40. Morfología de empaque sin tratamiento enzimático (X500) (A). Empaque tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X500) (B). Empaque tratado con A1 y mejores condiciones, 7 días (X50) (C).

8.13 Evaluación del cambio de cristalinidad por Difracción de Rayos X (XRD)

Se observaron los patrones de difracción de rayos X del polímero PLA y del del empaque antes y después de la degradación para identificar cambios en la cristalinidad, se observó mediante (XRD) Difractómetro de Rayos X, Modelo D8 Advance Davinvi, Configuración Theta-Theta Marca Bruker AXS.

Los resultados para todos los casos de PLLA tratado con A1 y mejores condiciones, A2 y A3, muestran un cambio en la cristalinidad al compararlo con el blanco sin tratamiento enzimático. Los resultados de PLLA tratado con A1 (Figura 41) muestran que hay un aumento de cristalinidad donde el pico de difracción más alto aumentó hasta llegar a las 10 000 unidades, es decir que la enzima A1 está atacando a las regiones amorfas del PLLA, y por eso las zonas cristalinas aumentan después de la hidrólisis con la enzima.

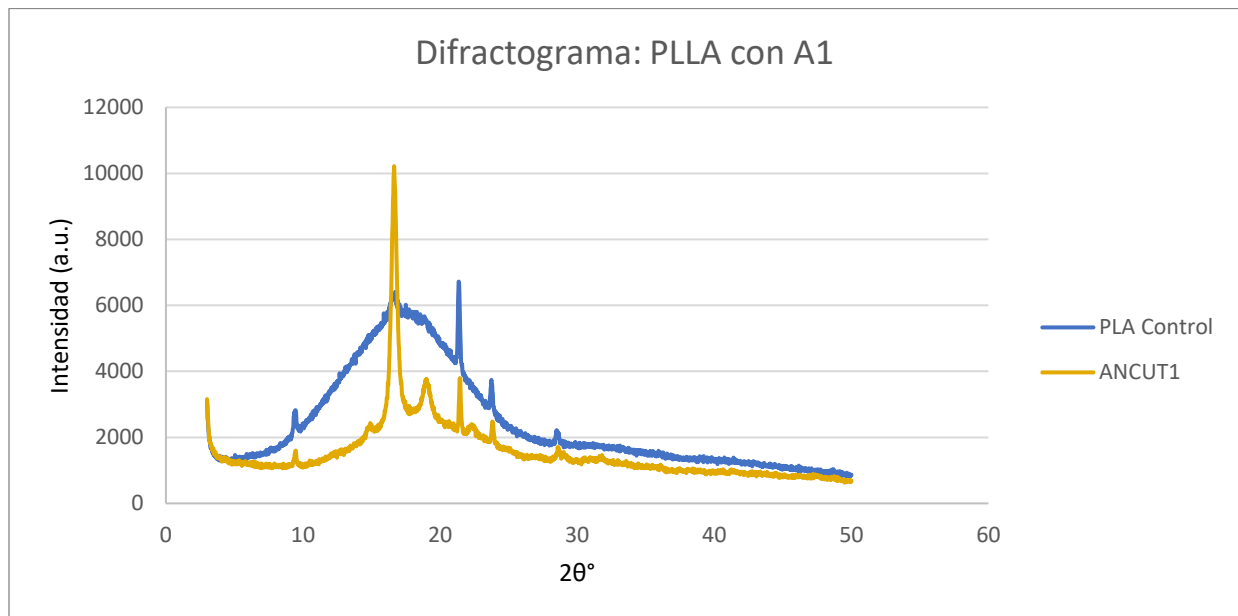


Figura 41. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A1 y mejores condiciones después de 7 días.

Para el caso de A2 y A3 (Figuras 42 y 43, respectivamente) se da un fenómeno similar, existe un aumento de cristalinidad del PLLA tratado con A2 y A3, sin embargo, los picos de difracción máximos que se obtienen del material alcanzan casi las 25 000 unidades para PLLA tratado con A2 y de casi 20 000 unidades para el PLLA tratado con A3, podría ser que estas dos enzimas también atacan a la región amorfa del PLLA. Al comparar el difractograma de A2 y A3 con A1, se puede observar que el pico de difracción máximo que se obtiene con A1, es menor que los obtenidos con A2 y A3, esto probablemente pueda deberse a que A1 además de degradar zonas amorfas del PLLA, podría estar facilitando que las zonas cristalinas sean más accesibles para ser hidrolizadas por la enzima, puesto que aunque las zonas cristalinas no son atacadas inicialmente por las enzimas, una vez que las zonas amorfas son hidrolizadas, las zonas cristalinas quedan más expuestas y son más susceptibles de una autohidrólisis promovida por productos ácidos de la degradación, por el agua que difunde a través de la zona cristaliza y por el aumento de grupos carboxílicos en los extremos de las cadenas poliméricas (Gorrasi, 2017; Craparo, 2015; Piemonte, 2013) provocando que la estabilidad de la zona cristalina vaya decreciendo a la par que el peso molecular del polímero disminuye (Quecholac-Piña *et al.*, 2020), haciendo a esa zona lábil a la hidrólisis enzimática. Por eso en el caso de A1 que se obtengan picos de difracción menos pronunciados debido a una disminución de la zona cristalina que es lábil a ser atacada por A1. Los resultados donde se ataca principalmente la zona amorfa de PLLA, coinciden con lo reportado por Bano *et al.*, 2017; Tokiwa *et al.*, 2004; Vroman *et al.*, 2009 y otros autores, quienes mencionan que las zonas amorfas de un polímero son las que se degradan primero debido a que esta tiene una mayor accesibilidad para la enzima, pues esta zona es más laxa ya que la movilidad de cadenas está menos restringida en este tipo de regiones de PLA (de Castro *et al.*, 2019). En el caso de las zonas cristalinas éstas suelen ser las últimas en atacarse, debido a que estas son menos accesibles.

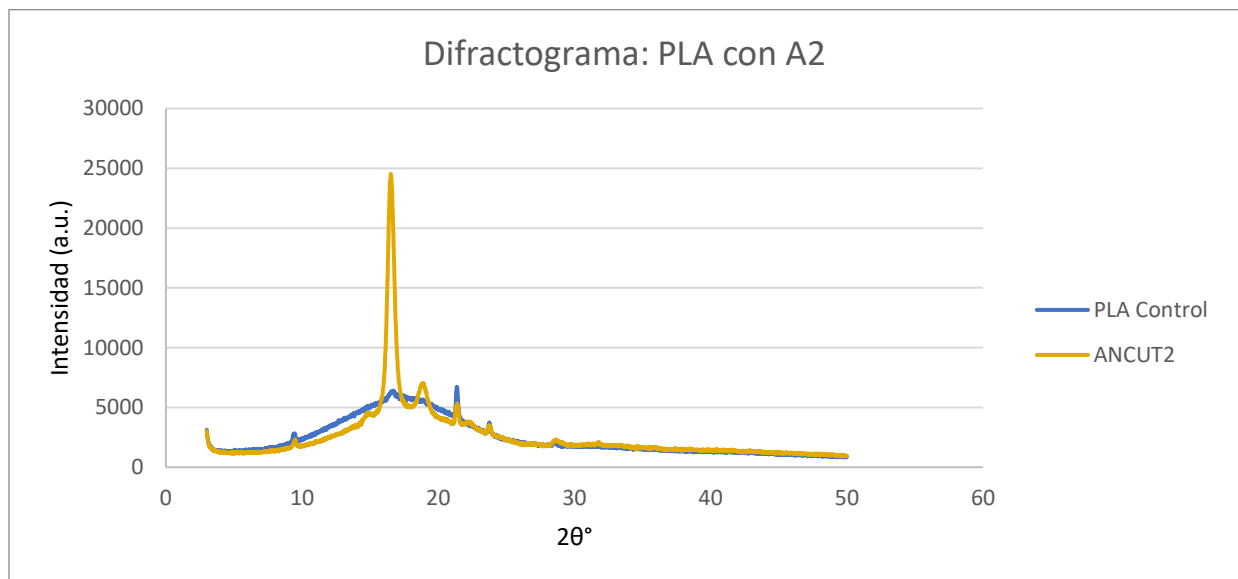


Figura 42. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A2 después de 7 días.

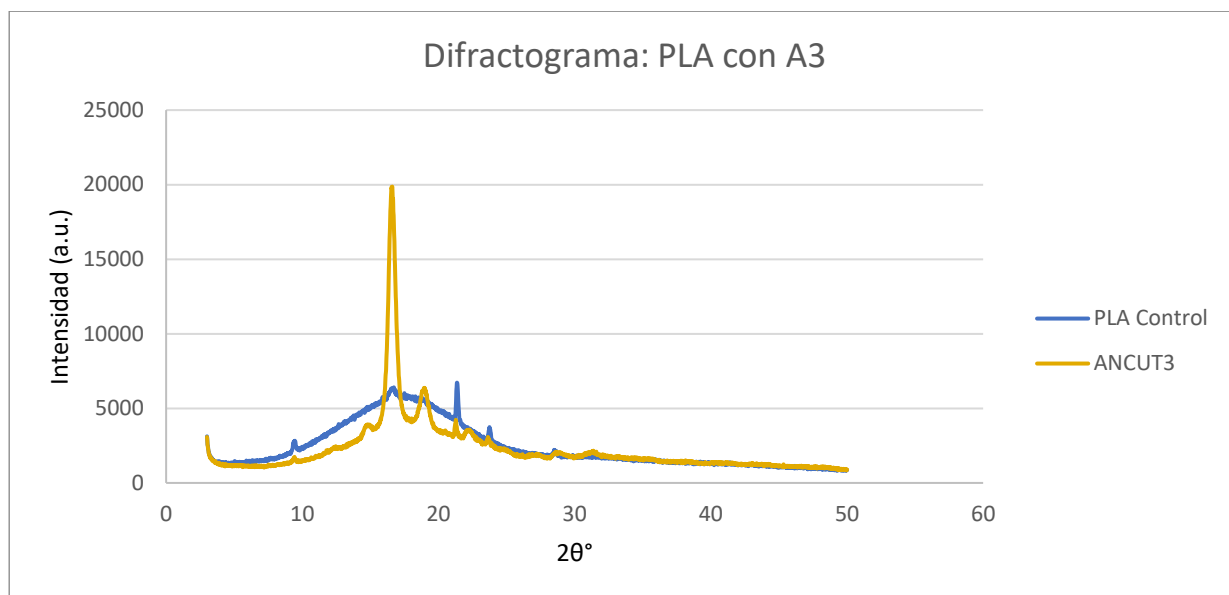


Figura 43. Difractograma de PLA sin tratamiento enzimático (PLA control) y PLA tratado con A3 después de 7 días.

Los resultados del empaque tratado con A1 y las mejores condiciones (Figura 44), muestran un comportamiento similar, donde la cantidad de picos de difracción de zonas cristalinas aumentan sin que se pierda el patrón original del difractograma del empaque sin tratamiento enzimático, el patrón de degradación de A1 sigue de la misma manera, debido a que A1 ataca las zonas amorfas del polímero provocando su erosión provocando que las zonas cristalinas aumenten respecto a las zonas amorfas (Gorrasi, 2017), de ahí que aparezcan más zonas cristalinas después del tratamiento enzimático con A1.

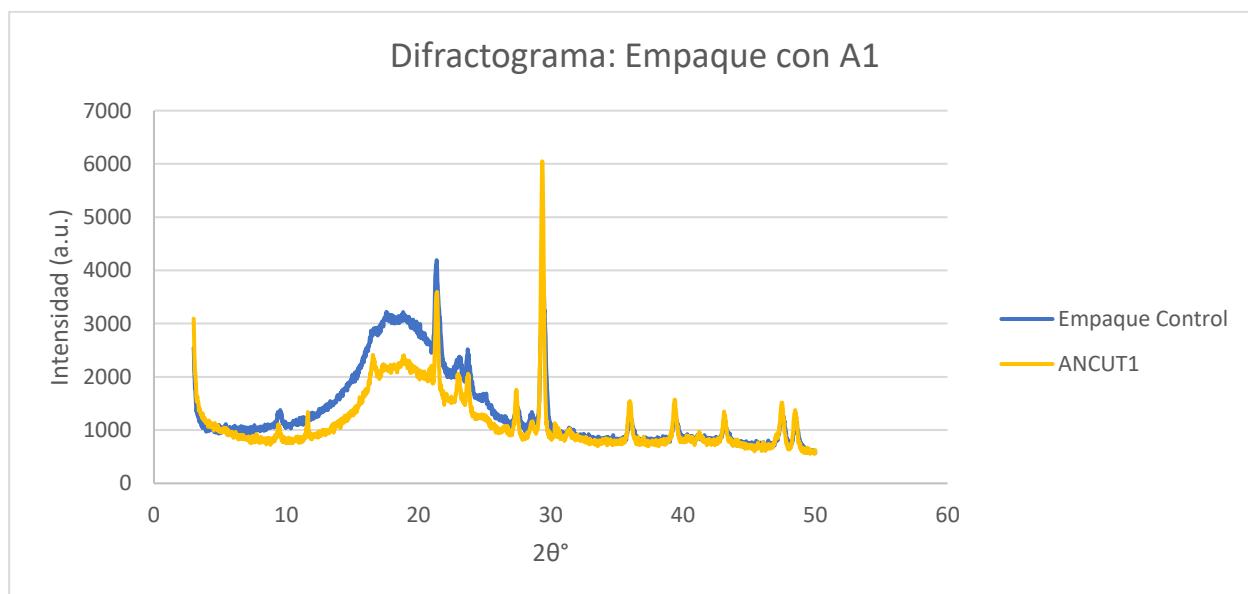


Figura 44. Difractograma de empaque sin tratamiento enzimático (Empaque control) y empaque tratado con A1 y mejores condiciones, después de 7 días.

8.14 Determinación del peso molecular del PLA por cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (HPSEC)

El peso molecular de las muestras de PLA se determinó por HPSEC, de acuerdo con la metodología mostrada en el apartado 7.22. El peso molecular se obtuvo de un promedio de un análisis por triplicado. Los resultados mostraron que el PLA sí es de alto peso molecular, con un peso cercano a 160 000 g/mol.

Tabla 17. Resultados de peso molecular promedio del análisis de PLLA por HPSEC.

* Se aumentó la concentración de PLA disuelto en THF

| Muestra | Tiempo de retención (min) | M_n | M_w |
|---------------|---------------------------|----------|---------|
| * PLA Puro 01 | 14.930 | 91,018 | 172,003 |
| PLA Puro 02 | 14.926 | 87,830 | 159,556 |
| PLA Puro 03 | 14.925 | 87,680 | 158,782 |
| | | Promedio | 163,447 |

Aunque se sabía que el PLLA con el que se trabajó es de alto peso molecular, no se sabía exactamente el peso molecular del mismo, es importante caracterizarlo y conocer este dato para saber sobre qué tipo de polímero está trabajando la enzima. El polímero tuvo problemas para ser caracterizado por cromatografía de exclusión de tamaño, pues el tetrahidrofurano (THF) (disolvente que puede usar el equipo) no pudo disolver completamente al PLLA debido a que este tiene un alto peso molecular y un alto grado de cristalinidad. Se usó calor para tratar de disolver mejor la muestra y dio resultado, aunque los pesos moleculares (Tabla 17) y las curvas de distribución de peso molecular promedio (Figura 45) determinados fueron un poco dispersos debido a que en algunos casos la solubilidad del PLLA no fue la adecuada para el equipo.

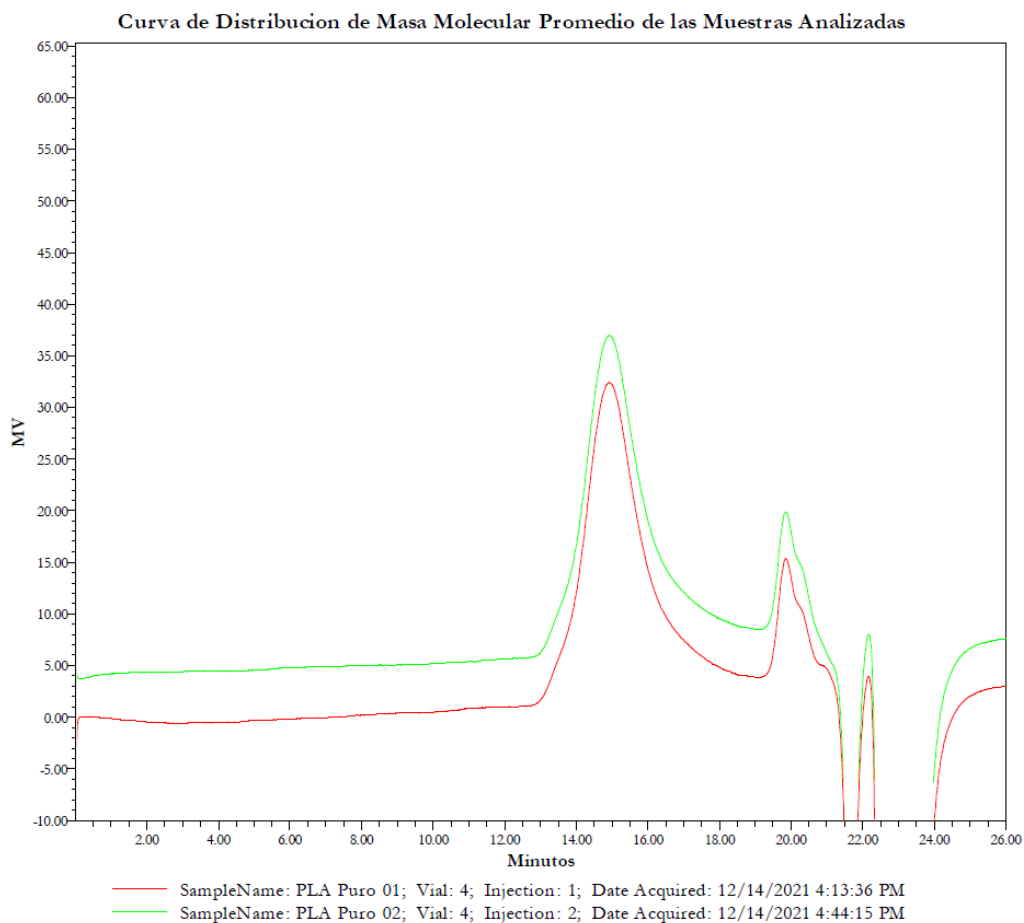


Figura 45. Curva de distribución de peso molecular promedio distribución de las muestras analizadas de PLA.

8.15 Cálculo del porcentaje de degradación del poli(ácido L-láctico) de acuerdo con el ácido láctico liberado por la degradación con A1 y las mejores condiciones.

Para calcular el porcentaje de degradación de acuerdo con el ácido láctico liberado al medio de reacción, primero se calcula la cantidad de ácido láctico teórica que hay en 10 mg de PLLA que fueron los que se pusieron en la reacción.

El grado de polimerización indica cuantas unidades repetitivas se encuentran en una sola cadena del polímero:

Grado de polimerización (DP) = # de unidades monoméricas en una cadena

También se define como:

$$\text{Grado de polimerización (DP)} = \frac{\text{Peso molecular promedio de polímero}}{\text{Peso molecular de monómero}}$$

Conocido el peso molecular del monómero (ácido láctico), y por medio del análisis por HPSEC también se conoce el peso molecular promedio del PLA (163 447 g/mol), por lo que se se puede obtener el grado de polimerización.

Peso molecular de ácido láctico= 90.08 g/mol

$$DP = \frac{163\,447\text{ g/mol}}{90.08\text{ g/mol}} = 1814.46\text{ unidades monoméricas}$$

Con se concluye que de 1 mol de poli (ácido L-láctico) con un peso molecular promedio de 163 447 g/mol, se puede obtener 1814.46 moles de ácido láctico.

Tomando en cuenta que en las reacciones se pusieron 10 mg de PLA, se saca la cantidad teórica de ácido láctico que hay en esos 10 mg (0.01 g) de PLA. Se inicia calculando a cuántos moles equivalen los 10 mg de PLA con peso molecular promedio de 163 447 g/mol:

$$(0.01\text{ g PLA}) * \left(\frac{1\text{ mol PLA}}{163\,447\text{ g}} \right) = 61.2 \times 10^{-9}\text{ mol de PLA}$$

Sabiendo los moles de ácido láctico que se pueden sacar de 1 mol de PLA, se obtienen cuántas moles de ácido láctico se pueden obtener de los 10 mg de PLA:

$$(61.2 \times 10^{-9}\text{ mol de PLA}) * \left(\frac{1814.46\text{ mol de ácido láctico}}{1\text{ mol PLA}} \right) = 111 \times 10^{-6}\text{ mol de ácido lactico}$$

De acuerdo con este último cálculo, se concluye que en 10 mg de PLA (163 447 g/mol), hay teóricamente 111×10^{-6} moles de ácido láctico.

Posteriormente, hay que calcular los moles de ácido láctico que se liberaron al medio de reacción, en este caso, se calcula la cantidad de moles liberados que hay en la reacción con A1 y las mejores condiciones determinadas:

En el medio de reacción con A1 y mejores condiciones, se alcanzó una concentración máxima promedio de 41.84 mM de ácido láctico en el medio reacción

$$41.84 \text{ mM} * \left(\frac{1 \text{ M}}{1000 \text{ mM}} \right) = 0.04184 \text{ M}$$

Se conoce el volumen de reacción, que es de 1 mL (0.001 L), por lo que se puede determinar las moles de ácido láctico en ese volumen de medio:

$$\text{Moles de ácido láctico} = 0.04184 \frac{\text{mol}}{\text{L}} * (0.001\text{L}) = 41.84 \times 10^{-6} \text{ mol ácido láctico}$$

De esto último se concluye que en el medio de reacción hay una cantidad de 41.84×10^{-6} moles de ácido láctico liberadas por la hidrólisis con A1.

Se tiene la cantidad teórica de moles de ácido láctico que se pueden obtener de 10 mg de PLA (163 447 g/mol), que es 111×10^{-6} moles de ácido láctico, la cual corresponde al 100% de moles de ácido láctico que se pueden obtener de esos 10 mg de PLA.

También se tiene la cantidad de moles de ácido láctico que hay en el medio de reacción (la concentración determinada fue determinada a 41.84 mM de ácido láctico) que es 41.84×10^{-6} moles de ácido láctico.

Finalmente, con los datos obtenidos se puede calcular a qué porcentaje corresponden los moles liberados respecto al 100% de moles de ácido láctico teóricos que se pueden sacar de 10 mg de PLA.

111×10^{-6} moles de ácido láctico----- 100 % de moles totales de ácido láctico

41.84×10^{-6} moles de ácido láctico----- ¿?

$$(41.84 \times 10^{-6} \text{ moles AL}) * \frac{100 \%}{111 \times 10^{-6} \text{ moles de AL}} = 37.69 \%$$

Por lo tanto, el porcentaje de degradación es 37.69%, respecto a la cantidad total de moles de ácido láctico que teóricamente hay presente en 10 mg de PLLA de peso molecular 163 447 g/mol.

Al comparar el porcentaje de degradación calculado a partir del ácido láctico obtenido (37.69%) calculado de con el porcentaje de pérdida de peso, con los de pérdida de peso (45.96%), se puede decir que son congruentes, aunque aproximadamente hay un 7% de diferencia al compararlos, esto se puede atribuir a que aunque el producto de hidrólisis mayoritario con A1 es el ácido láctico, puede haber otros subproductos en menor proporción que puedan estar en el medio de reacción y no pueden ser cuantificados, de ahí que haya un 7% faltante al calcular la degradación con el ácido láctico liberado.

Hay varios reportes de que los polímeros de alto peso molecular tienen una degradación más lenta a comparación de uno de bajo peso molecular (Vroman *et al.*, 2009; Balk *et al.*, 2016; Nampootheri *et al.*, 2010; Bano *et al.*, 2017), aunque en el grupo de trabajo hay precedentes de que las cutinasas recombinantes de *A. nidulans*, pueden degradar PLLA, estos estudios fueron llevados en PLLA de bajo peso molecular (LMW), sin embargo el PLLA de alto peso molecular es el material que ha mostrado un mejor desempeño para ser usado

como material de empaque, por lo que era importante probar el desempeño de las cutinasas en este tipo de PLLA. Los resultados muestran que las 3 enzimas probadas degradan al PLLA HMW, sin embargo, la enzima A1 es la que tiene un mejor desempeño para degradar al PLLA HMW y liberar al monómero (que es de interés económico).

Aunque se mejoraron las condiciones de reacción y se mostró una mejoría en la obtención de ácido láctico, hay que tener una referencia de comparación con otras enzimas, para ver la eficiencia de la enzima en estudio. En la Tabla 18 se puede ver una comparación de la enzima “A1”, con la “proteínasa K” (referencia) y la “PaCLE1”, donde el parámetro principal es la productividad de la enzima para ácido láctico, es decir, cuántas milimoles de ácido láctico puede producir 1 g de enzima en cada hora de reacción. Los resultados muestran que la productividad de A1 están por debajo de la proteínasa K y de PaCLE1, sin embargo hay que mencionar que durante los estudios para obtener esos resultados de las otras 2 enzimas, la enzima se purificó por métodos más selectivos, (en el caso de PaCLE1 se usó cromatografía de intercambio iónico, en el caso de la proteínasa K se usó una enzima purificada y liofilizada), de esta forma aunque la productividad puede parecer menor, A1 no está purificada, además de que la adición de la enzima se dio en términos de proteína total (cuantificada por el método de Bradford), por lo que no toda la proteína que se agregó es cutinasa A1. Sería importante para hacer una buena comparación someter a A1 a un proceso de purificación como cromatografía, y posteriormente hacer un nuevo ensayo para obtener un parámetro de productividad más confiable.

| Enzima | Cantidad de enzima (g) | Ácido láctico liberado (mmol) | Tiempo (h) | Productividad | |
|--|------------------------|-------------------------------|------------|--|---------------------------------|
| | | | | $\frac{\text{mmol ácido láctico}}{(\text{g enzima}) (\text{h})}$ | Referencia |
| PaCLE1 de <i>Pseudozyma antarctica</i> JCM 10317 | 132.3x10 ⁻⁹ | 2.88 x10 ⁻⁴ | 24 | 90.8639 | Shinozaki, <i>et al.</i> , 2013 |

| | | | | | |
|---|--------|-------------------------|-----|---------|---------------|
| Proteinasa K de <i>Tritirachium album</i> | 0.0002 | 29.35 x10 ⁻³ | 72 | 2.038 | Carbios, 2019 |
| A1 de <i>Aspergillus nidulans</i> | 0.003 | 459.6x10 ⁻³ | 168 | 0.91190 | Este trabajo |

Tabla 18. Comparación de productividad de enzimas para liberar ácido láctico a partir de PLLA.

Una propiedad que hace interesante a la enzima A1 con respecto a la proteinasa K es que sólo A1 pudo degradar un polímero comercial. A futuro será importante escalar este tipo de pruebas a nivel comercial.

9. CONCLUSIONES

- Las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* A1, A2 y A3 degradan ácido poli-L-láctico de alto peso molecular, sin embargo, la enzima A1 tiene mejor desempeño para degradar al PLLA y liberar ácido láctico (producto de interés); aunque A2 y A3 provocan pérdida de peso, A2 no libera tanto ácido láctico como A1, y A3 no libera al monómero.

-La mayoría de las combinaciones de las cutinasas recombinantes no aumentaron la concentración de ácido láctico, únicamente la combinación de A1 con A3 en el regulador Tris-HCl 50 mM pH9, aumentó la concentración de ácido láctico respecto A1 sola. Sin embargo, por razones de practicidad y costos se prefirió optimizar las condiciones de reacción para la enzima A1.

- Se mejoraron algunas condiciones de reacción (tamaño de partícula, concentración de enzima, pH del regulador y temperatura) para la hidrólisis de PLLA HMW con la enzima A1, los valores definidos como mejores (tamaño de partícula con el tamiz #40, 3% de enzima, regulador de Fosfatos de sodio 50 mM pH9, 40 °C) se combinaron en una corrida en la cual se obtuvo un 61.8% más de concentración de ácido láctico respecto a la reacción original sin condiciones mejoradas. Además del aumento en la concentración de ácido láctico, la enzima A1 con condiciones mejoradas logró una pérdida de peso del 45.96%, y provocó cambios físicos visibles a simple vista, así como cambios microscópicos, adicionalmente el análisis de difracción de rayos X mostró que A1 degrada a las zonas amorfas del PLLA HMW.

- Se degradó un empaque comercial biodegradable con la enzima A1 y en las mejores condiciones, después de 7 días de reacción, se pudieron observar cambios físicos a simple vista en el material tratado, mostrando evidentes signos de hidrólisis enzimática, se presentó la pérdida de peso y las observaciones por microscopía muestran que el empaque es degradado. Aunque la concentración de ácido láctico no fue la esperada, se demostró que la enzima hidrolizó el PLLA que contenía el empaque, mostrando su funcionalidad y versatilidad para degradar PLLA comercial aún en presencia de otros polímeros y aditivos propios de un empaque.

- Se calculó un porcentaje de degradación de acuerdo a la concentración de ácido láctico liberado al medio de reacción y al ácido láctico teórico que se puede obtener de una cantidad de PLLA HMW, los resultados mostraron que con A1 y las mejores condiciones de reacción, la mayoría del producto de la hidrólisis con A1 es ácido láctico, el cual es un producto de interés económico que puede aplicarse a sectores como el alimenticio, cosmético o de polímeros, sobre el cuál podría montarse un ciclo de economía circular.

- Este proyecto demostró que las cutinasas recombinantes A1, A2 y A3 además de degradar PLLA de bajo peso molecular, también degradan PLLA de alto peso molecular y se logró la obtención de un único producto de hidrólisis (el ácido láctico). La cutinasa A1 es la que provoca la liberación mayoritaria de este producto al hidrolizar al PLLA; si se implementa una estrategia de economía circular este producto de hidrólisis puede tener un valor agregado.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar los productos de degradación del PLLA HMW con las enzimas A2 y A3, para obtener un perfil de degradación de cada una y estudiar más el mecanismo de degradación de PLLA, para mejorar la obtención de ácido láctico o algún otro producto de interés.
- Optimizar las variables evaluadas, iniciando con un experimento factorial a varios niveles de las principales variables y escalar la degradación de PLLA HMW con A1 a biorreactor, para evaluar la degradación con condiciones más controladas y favorecer el rendimiento de ácido láctico.
- Probar la degradación de otros materiales de empaque o de un solo uso que se sepan en su composición hay PLLA, para así probar la degradación frente a otro tipo de empaques de composición variable y observar el desempeño de la enzima ante otro tipo de empaques.
- Determinar la composición del empaque para saber a qué tipo de polímero se enfrentan las enzimas, así considerar el potencial de la misma frente a los materiales evaluados.
- Probar el desempeño de las cutinasas recombinantes para hidrolizar al ácido poli-DL-láctico (PDLA), aunque este polímero no es usado comúnmente como material de empaque, se ha reportado que al polimerizar una pequeña proporción de este con PLLA, se obtienen un polímero con mejor desempeño para usarse como material de empaque.

11. BIBLIOGRAFIA

- Ahmazadeh, S., & Khaneghah, A. M. (2020). Role of Green Polymers in Food Packaging, Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials. Elsevier.
- Akutsu, Y., Nakajima-Kambe, T., Nomura, N., & Nakahara, T. (1998). Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(1), 62-67.
- Ali, Y. B., Verger, R., & Abousalham, A. (2012). Lipases or esterases: does it really matter? Toward a new biophysico-chemical classification. *Lipases and phospholipases: methods and protocols*, 31-51.
- Allied Market Research (AMR), 2015. Polylactic Acid (PLA) Market - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2014-2020. United States. Recuperado de www.alliedmarketresearch.com/polylactic-acid-market.
- Al-Tammar, K. A., Omar, O., Murad, A. M. A., & Bakar, F. D. A. (2016). Expression and characterization of a cutinase (A2) from *Aspergillus niger*. *Open Life Sciences*, 11(1), 29-38.
- Arikan, E. B., & Ozsoy, H. D. (2015). A review: investigation of bioplastics. *J. Civ. Eng. Arch*, 9(1), 188-192.
- Auras, R., Harte, B., & Selke, S. (2004). An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*, 4(9), 835-864.
- Auras, R., Singh, S. P., & Singh, J. J. (2005). Evaluation of oriented poly (lactide) polymers vs. existing PET and oriented PS for fresh food service containers. *Packaging Technology and Science: An International Journal*, 18(4), 207-216.
- Avérous, L. (2004). Biodegradable multiphase systems based on plasticized starch: a review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, 44(3), 231-274.
- Bano, K., Kuddus, M., Zaheer, M., Zia, Q., Khan, M., Gupta, A., & Aliev, G. (2017). Microbial enzymatic degradation of biodegradable plastics. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 18(5), 429-440.
- Bermúdez-García, E., Peña-Montes, C., Martins, I., Pais, J., Pereira, C. S., Sánchez, S., & Farrés, A. (2019). Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(9), 3863-3874.
- Billmeyer, F. W. (1975). *Ciencia de los polímeros*. Reverté, Barcelona. 610 pp.
- Bioplastics, E. (2019). Bioplastics Market Development Update 2019. European Bioplastics, Berlin, Germany.
- Biundo, A., Ribitsch, D., & Guebitz, G. M. (2018). Surface engineering of polyester-degrading enzymes to improve efficiency and tune specificity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(8), 3551-3559.
- Boonmee, M., Leksawasdi, N., Bridge, W., & Rogers, P. L. (2003). Batch and continuous culture of *Lactococcus lactis* NZ133: experimental data and model development. *Biochemical Engineering Journal*, 14(2), 127-135.

- Bornscheuer, U. T., & Kazlauskas, R. J. (2006). *Hydrolases in organic synthesis: regio-and stereoselective biotransformations*. John Wiley & Sons.
- Carbios, Saint – Beauzire. 2019. Method for recycling plastic products. (Patente de Estados Unidos 10, 124, 512 B2. United States Patent.
<https://patentimages.storage.googleapis.com/f5/d4/90/82e5631a15cb7f/US10124512.pdf>
- Carvalho, C. M., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*, 66(1), 17-34.
- Carraher Jr, C. E. (2017). *Carraher's polymer chemistry*. CRC Press, Boca Raton, Fla. 816 pp.
- Castro-Aguirre, E., Iniguez-Franco, F., Samsudin, H., Fang, X., & Auras, R. (2016). Poly (lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 333-366.
- Chamorro, C., & Verónica, V. (2011). *Acabado a base de microemulsión de silicona como retardante de fuego en las prendas de vestir* (Tesis de licenciatura).
- Chan-Blanco, Y., Bonilla-Leiva, A. R., & Velázquez, A. C. (2003). Using banana to generate lactic acid through batch process fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63(2), 147-152.
- Chang, H., Luo, J., Gulgunje, P. V., & Kumar, S. (2017). Structural and functional fibers. *Annual Review of Materials Research*, 47, 331-359.
- Cerdá, E., & Khalilova, A. (2016). Economía circular. *Empresa, medio ambiente y competición*, 401, 11-20.
- Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: characteristics, preparation, and application. *Biotechnology advances*, 31(8), 1754-1767.
- Coreño, J., & Méndez, M. (2010). Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación química*, 21(4), 291-299.
- Craparo, E. F., Porsio, B., Bondì, M. L., Giammona, G., & Cavallaro, G. (2015). Evaluation of biodegradability on polyaspartamide-poly(lactic acid) based nanoparticles by chemical hydrolysis studies. *Polymer Degradation and Stability*, 119, 56-67.
- Dauvergne, P. (2018). Why is the global governance of plastic failing the oceans? *Global Environmental Change*, 51, 22-31.
- De Castro, A. M., Carniel, A., Stahelin, D., Junior, L. S. C., de Angeli Honorato, H., & de Menezes, S. M. C. (2019). High-fold improvement of assorted post-consumer poly (ethylene terephthalate) (PET) packages hydrolysis using *Humicola insolens* cutinase as a single biocatalyst. *Process Biochemistry*, 81, 85-91.
- Department of Energy (DOE), 2004. Top Value-Added Chemicals from Biomass Volume I: Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. United States.
- Egmond, M. R., & de Vlieg, J. (2000). *Fusarium solani* piscicutinase. *Biochimie*, 82(11), 1015-1021.

- Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications—A comprehensive review. *Advanced drug delivery reviews*, *107*, 367-392.
- Fukuzaki, H., Yoshida, M., Asano, M., & Kumakura, M. (1989). Synthesis of copoly(D, L-lactic acid) with relatively low molecular weight and in vitro degradation. *European polymer journal*, *25*(10), 1019-1026.
- Garlotta, D. (2001). A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, *9*(2), 63-84.
- Gaviria-Acosta, E., Benítez-Benítez, R., Lenis, L., & Hoyos-Concha, J. L. (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of proteins present in seeds of guandul (*Cajanus cajan*). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, *13*(2), 114-122.
- Gorrasi, G., & Pantani, R. (2017). Hydrolysis and Biodegradation of Poly (lactic acid). *Synthesis, Structure and Properties of Poly (lactic acid)*, 119-151.
- Hegyesi, N., Zhang, Y., Kohári, A., Polyák, P., Sui, X., & Pukánszky, B. (2019). Enzymatic degradation of PLA/cellulose nanocrystal composites. *Industrial Crops and Products*, *141*, 111799.
- Henton, D. E., Gruber, P., Lunt, J., & Randall, J. (2005). Polylactic acid technology. In *Natural fibers, biopolymers, and biocomposites* (pp. 559-607). CRC Press.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, *26*(2-4), 87-107.
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *364*(1526), 2115-2126.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, *53*(1), 315-351.
- Ikura, Y., & Kudo, T. (1999). Isolation of a microorganism capable of degrading poly-(L-lactide). *The Journal of general and applied microbiology*, *45*(5), 247-251.
- Iwata, T. (2015). Biodegradable and bio-based polymers: future prospects of eco-friendly plastics. *Angewandte Chemie International Edition*, *54*(11), 3210-3215.
- Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M., & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *9*(5), 552-571.
- Jem, K. J., Tan, B. (2020). The development and challenges of poly (lactic acid) and poly (glycolic acid). *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*, *3*(2), 60-70.
- Jiang, L., Gonzalez-Diaz, A., Ling-Chin, J., Malik, A., Roskilly, A. P., & Smallbone, A. J. (2020). PEF plastic synthesized from industrial carbon dioxide and biowaste. *Nature Sustainability*, *3*(9), 761-767.

- Jiménez, A., Peltzer, M., & Ruseckaite, R. (Eds.). (2014). *Poly (lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications* (No. 12). Royal Society of Chemistry.
- Karpushova, A., Brümmer, F., Barth, S., Lange, S., & Schmid, R. D. (2005). *Cloning, recombinant expression and biochemical characterisation of novel esterases from Bacillus sp. associated with the marine sponge Aplysina aerophoba*. *Applied microbiology and biotechnology*, 67, 59-69.
- Kawai, F. (2010). Poly(lactic acid) (PLA)-degrading microorganisms and PLA depolymerases. In *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials* (pp. 405-414). American Chemical Society.
- Kawai, F., Nakadai, K., Nishioka, E., Nakajima, H., Ohara, H., Masaki, K., & Iefuji, H. (2011). Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly (L-lactic acid) and poly (D-lactic acid). *Polymer Degradation and Stability*, 96(7), 1342-1348.
- Kimura, Y. (2009). Molecular, structural, and material design of bio-based polymers. *Polymer journal*, 41(10), 797-807.
- Kolattukudy, P. E. (1980). Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, 208(4447), 990-1000.
- Kourkoutas, Y., Xolias, V., Kallis, M., Bezirtzoglou, E., & Kanellaki, M. (2005). *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. *Process Biochemistry*, 40(1), 411-416.
- Konkit, M., Jarerat, A., Khanongnuch, C., Lumyong, S., & Pathom-Aree, W. (2012). Poly(lactide) degradation by *Pseudonocardia alni* AS4. 1531T.
- Kumar, V., Kumar, R., Singh, J., & Kumar, P. (2019). *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation* (Vol. 1). Agro Environ Media, Publication Cell of AESA, Agriculture and Environmental Science Academy.
- Kwan, T. H., Pleissner, D., Lau, K. Y., Venus, J., Pommeret, A., & Lin, C. S. K. (2015). Techno-economic analysis of a food waste valorization process via microalgae cultivation and co-production of plasticizer, lactic acid and animal feed from algal biomass and food waste. *Bioresource Technology*, 198, 292-299.
- Kwan, T. H., Hu, Y., & Lin, C. S. K. (2016). Valorization of food waste via fungal hydrolysis and lactic acid fermentation with *Lactobacillus casei* Shirota. *Bioresource technology*, 217, 129-136.
- Kwan, T. H., Hu, Y., & Lin, C. S. K. (2018). Techno-economic analysis of a food waste valorization process for lactic acid, lactide and poly (lactic acid) production. *Journal of cleaner production*, 181, 72-87.
- Liard, K. (2021, 25 de octubre). Total Corbion introduces chemically recycled PLA. Sustainable Plastics. <https://www.sustainableplastics.com/news/total-corbion-introduces-chemically-recycled-pla>.
- Liu, S. (2020). *Bioprocess engineering: kinetics, sustainability, and reactor design*. Elsevier.
- Liu, Z., Gosser, Y., Baker, P. J., Ravee, Y., Lu, Z., Alemu, G., & Montclare, J. K. (2009). Structural and functional studies of *Aspergillus oryzae* cutinase: enhanced thermostability and hydrolytic activity of synthetic ester and polyester degradation. *Journal of the American Chemical Society*, 131(43), 15711-15716.

- Llanos-Reyes A. C., (2018). Aplicación de las cutinasas recombinantes A3 y A4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres, Tesis de maestría, Facultad de Química, México, Ciudad de México.
- López-Carrasquero, F. (2004). Fundamentos de polímeros. *Escuela Venezolana para la enseñanza de la Química. Mérida*, 49-51.
- López-Serrano, F., Mijares, E. M., & Gudiño, P. O. (2015). Introducción a la ciencia de los polímeros. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Universidad de Guadalajara, México. 155.
- Morales-García, S., L. 2015. Purificación y caracterización de la enzima recombinante ANCUT2 de *Aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México D.F. México.
- Morillas, A. V., Valdemar, R. M. E., Villavicencio, M. B., & Pérez, M. V. (2014). El reciclaje de los plásticos.
- Nampoothiri, K. M., Nair, N. R., & John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource technology*, 101(22), 8493-8501.
- Nikolaivits, E., Kanelli, M., Dimarogona, M., & Topakas, E. (2018). A middle-aged enzyme still in its prime: recent advances in the field of cutinases. *Catalysts*, 8(12), 612.
- Ohkita, T., & Lee, S. H. (2006). Thermal degradation and biodegradability of poly (lactic acid)/corn starch biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 100(4), 3009-3017.
- Pauer, E., Tacker, M., Gabriel, V., & Krauter, V. (2020). Sustainability of flexible multilayer packaging: Environmental impacts and recyclability of packaging for bacon in block. *Cleaner Environmental Systems*, 1, 100001.
- Picó, Y., & Barceló, D. (2019). Analysis and prevention of microplastics pollution in water: current perspectives and future directions. *ACS omega*, 4(4), 6709-6719.
- Piemonte, V., & Gironi, F. (2013). Lactic acid production by hydrolysis of poly (lactic acid) in aqueous solutions: an experimental and kinetic study. *Journal of Polymers and the Environment*, 21(1), 275-279.
- Pittaluga, L., & Pirrocco, D. (2021). Análisis de la cadena de valor del plástico y el caucho en el Uruguay.
- Plastics Insight, 2017. Polylactic Acid Properties, Production, Price, Market and Uses. Recuperado de <https://www.plasticsinsight.com/resin-intelligence/resin-prices/polylactic-acid/#forecast>.
- Pranamuda, H., Tokiwa, Y., & Tanaka, H. (1997). Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(4), 1637-1640.
- Pretula, J., Slomkowski, S., & Penczek, S. (2016). Polylactides—Methods of synthesis and characterization. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 3-16.
- Quecholac-Piña, X., Hernández-Berriel, M. D. C., Mañón-Salas, M. D. C., Espinosa-Valdemar, R. M., & Vázquez-Morillas, A. (2020). Degradation of plastics under anaerobic conditions: A short review. *Polymers*, 12(1), 109.

- Ritchie, H., & Roser, M. (2018). Plastic pollution. Publicado en línea en OurWorldInData.org. '<https://ourworldindata.org/plastic-pollution>'.
- Rujnić-Sokele, M., & Pilipović, A. (2017). Challenges and opportunities of biodegradable plastics: A mini review. *Waste Management & Research*, 35(2), 132-140.
- Sánchez- Sánchez M., (2015). Aplicación de las cutinasas A1 y A2 recombinantes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis de Licenciatura, UNAM, Facultad de Química, México.
- Sandoval, V. P., Jaca, C., & Ormazabal, M. (2017). Economía circular. *Ingeniería* 15, 85-95.
- Satti, S. M., & Shah, A. A. (2020). Polyester-based biodegradable plastics: an approach towards sustainable development. *Letters in Applied Microbiology*, 70(6), 413-430.
- Sengupta, S., Manna, S., Roy, U., & Das, P. (2018). Manufacturing of Biodegradable Poly Lactic Acid (PLA): Green Alternatives to Petroleum Derived Plastics.
- Serna-Cock, L., & Stouvenel, A. R. D. (2005). Producción biotecnológica de ácido láctico: estado del arte biotechnological production of lactic acid: state of the art producción biotecnológica de ácido láctico: estado do arte. *CYTA-Journal of Food*, 5(1), 54-65.
- Shen, M., Song, B., Zeng, G., Zhang, Y., Huang, W., Wen, X., & Tang, W. (2020). Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*, 114469.
- Sheng, B., Xu, J., Zhang, Y., Jiang, T., Deng, S., Kong, J., ... & Xu, P. (2015). Utilization of d-lactate as an energy source supports the growth of *Gluconobacter oxydans*. *Applied and environmental microbiology*, 81(12), 4098-4110.
- Shinozaki, Y., Morita, T., Cao, X. H., Yoshida, S., Koitabashi, M., Watanabe, Watanabe T., Suzuki K., Yamashita Y., Kambe, T., Fujii T., Kitamoto, H. K. (2013). Biodegradable plastic-degrading enzyme from *Pseudozyma antarctica*: cloning, sequencing, and characterization. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(7), 2951-2959.
- Shrivastava, A. (2018). Introduction to plastics engineering. Plastics Design Library, Elsevier William Andrew. 246 pp.
- Solis-Baez, I. 2015. Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante AN CUT1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. UNAM, Facultad de Química. México.
- Suriderp, C. (1995). Ullman's Encyclopedia of industrial chemistry: ácido láctico. Pp. 97-104, 5.
- Tanjung, F. A., Arifin, Y., & Husseinsyah, S. (2020). Enzymatic degradation of coconut shell powder–reinforced polylactic acid biocomposites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 33(6), 800-816.
- Tokiwa Y, Calabia BP (2006) Biodegradability and biodegradation of poly(lactide). *Applied Microbiology And Biotechnology* 72:244-251.
- Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., & Yadav, A. J. A. Y. (2014). Biopolymers potential biodegradable packaging material for food industry. *Polymers for packaging applications*, 153, 486-486.

Tsuji, H. (2016). Poly (lactic acid) stereocomplexes: A decade of progress. *Advanced drug delivery reviews*, 107, 97-135.

Urbanek, A. K., Mirończuk, A. M., García-Martín, A., Saborido, A., de la Mata, I., & Arroyo, M. (2020). Biochemical properties and biotechnological applications of microbial enzymes involved in the degradation of polyester-type plastics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1868(2), 140315.

Vink, E. T., & Davies, S. (2015). Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo™ polylactide production. *Industrial Biotechnology*, 11(3), 167-180.

Vroman, I., & Tighzert, L. (2009). Biodegradable polymers. *Materials*, 2(2), 307-344.

Wei, R., & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial biotechnology*, 10(6), 1308-1322.

Yang, S., Liu, M., Long, L., Zhang, R., & Ding, S. (2018). Characterization of a cutinase from *Myceliophthora thermophila* and its application in polyester hydrolysis and deinking process. *Process Biochemistry*, 66, 106-112.

12. ANEXOS

12.1 ANEXO 1: Preparación de medios de cultivo utilizados para la producción de las cutinasas recombinantes

Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%Dextrosa (glucosa) 2%

Para 1 L de medio disuelve 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa en 1000 mL de agua, esteriliza en autoclave.

Si vas a hacer medio YPD sólido, agrega 20 g de agar antes de esterilizar

Si vas a hacer medio YPD/zeocina 0.01 %, después de esterilizar en autoclave, deja enfriar (~60°C) y agrega 1 mL de un stock de zeocina (100 mg/mL) para obtener una concentración final de 100 µg/mL.

Medio BMGY (Reguladored Glycerol-complex Medium)

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Fosfatos de potasio 100 mM, pH 6.0

YNB 1.34%

Biotina 4×10^{-5} %

Glicerol 1%

Para 1L de medio, disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 ml de agua.

Esterilizar en autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente, posteriormente agregar:

100 ml de Regulador de fosfato de potasio 1M, pH6

100 ml de medio YNB 13.4%

2 ml de Biotina 0.2%

100 ml de glicerol 10%

Mezclar bien y almacenar a 4°C, la vida útil del medio es aproximadamente dos meses.

Medio BMMY (Regulador de Metanol-complex Medium)

Extracto de levadura 1%

Peptona 2%

Fosfatos de potasio 100 mM, pH 6.0

YNB 1.34%

Biotina 4×10^{-5} %

Metanol (% varía dependiendo la enzima)

Para 1L de medio, disolver 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 ml de agua.

Esterilizar en autoclave y dejar enfriar a temperatura ambiente, posteriormente agregar:

100 ml de Regulador de fosfato de potasio 1M, pH6

100 ml de medio YNB 13.4%

2 ml de Biotina 0.2%

Mezclar bien y almacenar a 4°C, la vida útil del medio es aproximadamente dos meses.

12.2 ANEXO 2: Preparación de Regulador y soluciones stock.

Medio YNB 13.4%: Disolver 134 g de base de nitrógeno para levadura (yeast nitrogen base YNB) en 1000 mL de agua, posteriormente esterilizar por filtración. La vida útil de esta solución es aproximadamente un año.

Biotina 0.2%: Disolver 20 mg de biotina en 100 ml de agua y esterilizar por filtración, almacenar a 4°C, la vida útil de esta solución es aproximadamente 1 año.

Glicerol 10%: Mezcla 100 ml de glicerol con 900 ml de agua y esteriliza por filtración o autoclave. Almacena a temperatura ambiente, la vida media de esta solución es un poco más de un año.

Regulador de fosfatos de sodio pH 6 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM: Disolver 0.1633 g de fosfato de sodio monohidratado y 0.0202 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 6 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

Regulador de fosfatos de sodio pH 7 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM: Disolver 0.426 g de fosfato de sodio monohidratado y 0.522 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

Regulador de fosfatos de sodio pH 8 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM: Disolver 0.3 g de fosfato de sodio monohidratado y 0.09178 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

Regulador de fosfatos de sodio pH 9 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$) 50 mM: Disolver 0.01084 g de fosfato de sodio monohidratado y 1.3284 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 9 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

Regulador de fosfatos de potasio pH 6 ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) 1M: Disolver 10.27 g de fosfato de potasio y 129.21 g de fosfato dibásico de potasio en 700 mL de agua desionizada, ajustar pH a 6 con NaOH y aforar a 1000 mL. Esterilizar en autoclave.

Regulador Tris-HCL pH 8, 50 mM/ CaCl_2 20 mM: Disolver 0.1514 g de tris y 0.05549 g de cloruro de calcio en 15 mL de agua desionizada, ajustar pH a 8 con HCl y potenciómetro, aforar a 25 mL.

Regulador Tris-HCL pH 9, 50 mM: Disolver 1.2114 g de tris en 150 mL de agua desionizada, ajustar pH a 9 con HCl y potenciómetro, aforar a 200 mL.

12.3 ANEXO 3: Curva de calibración de la concentración de proteína por el método de Bradford.

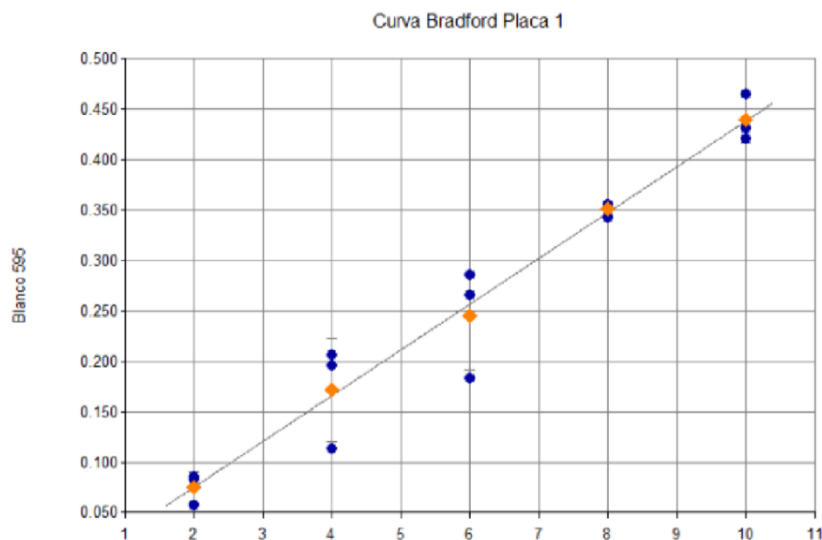


Figura 46. Curva patrón para cuantificar proteína por el método de Bradford.

| Curva | Formula de la curva | A | B | Coefficiente de correlación |
|----------------|---------------------|--------|---------|-----------------------------|
| Bradford (BSA) | $Y=A*X+B$ | 0.0454 | -0.0158 | 0.998 |

12.4 ANEXO 3: Curva de calibración de p-NP para medición de actividad cuantitativa.

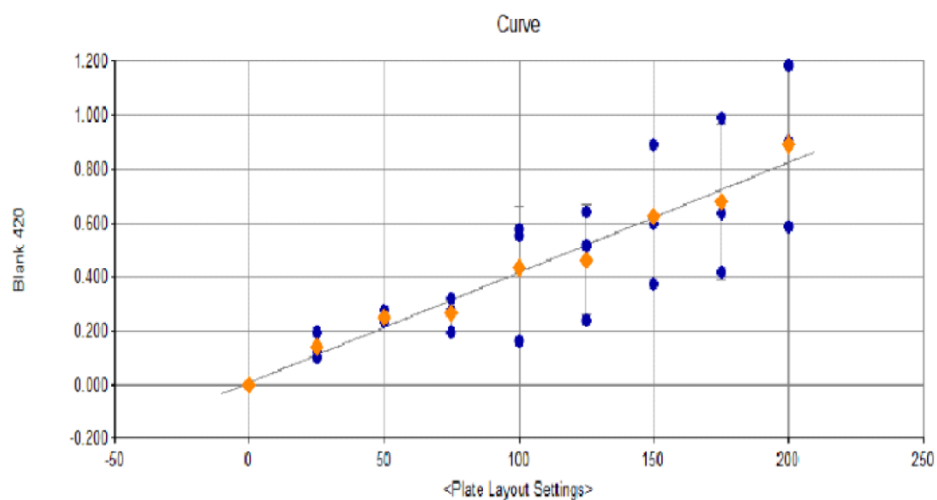


Figura 47. Curva patrón para cuantificar actividad esterasa con p-nitrofenol

| Curva | Fórmula de la curva | A | B | Coefficiente de correlación |
|--------------|---------------------|--------|---------|-----------------------------|
| p-Nitrofenol | $Y=A*X+B$ | 0.0056 | -0.0223 | 0.996 |

12.5 ANEXO 4: Curva de calibración de ácido láctico

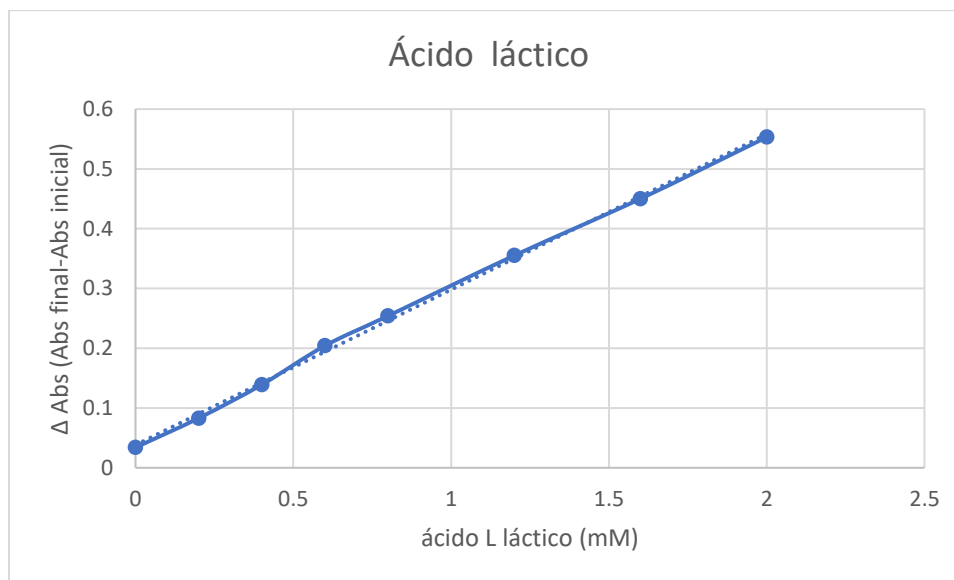


Figura 48. Curva patrón para cuantificar ácido láctico por método colorimétrico.

| Curva | Fórmula de la curva | A | B | Coefficiente de correlación |
|---------------|---------------------|--------|--------|-----------------------------|
| Ácido láctico | $Y=A*X+B$ | 0.2598 | 0.0381 | 0.998 |

12.6 ANEXO 6: Análisis de varianza (ANOVA) y diseño experimental de la combinación de las cutinasas recombinantes A1, A2 y A3

12.6.1 ANOVA de tratamiento enzimático con cutinasas recombinantes A1, A2 y A3

Se realizó un análisis de varianza para las enzimas, para determinar si hay diferencia significativa en la cantidad de ácido láctico liberado por la hidrólisis con cada cutinasa después de 7 días de reacción, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado por cada cutinasa después de 7 días de reacción; la hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado por cada cutinasa después de 7 días de reacción. Se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con cada cutinasa, se determinó la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

Tabla 19. ANOVA para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3.

| <i>Fuente de variación</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>Valor F_0</i> |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Enzima | 2 | 1007.25 | 503.625 | 281.04 |
| Del error | 6 | 10.75 | 1.792 | |
| Total | 8 | 1018.00 | | |

$$F_{0.05, 2, 6} = 5.143$$

$F_0 = 281.04 > 5.143$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia significativa en la liberación de ácido láctico en respuesta a la reacción de hidrólisis de PLA con las enzimas recombinantes A1, A2 y A3 después de 7 días.

Posteriormente, se hizo una prueba de Tukey, al hacer la comparación entre parejas se puede saber cuál valor de tratamiento enzimático es diferente.

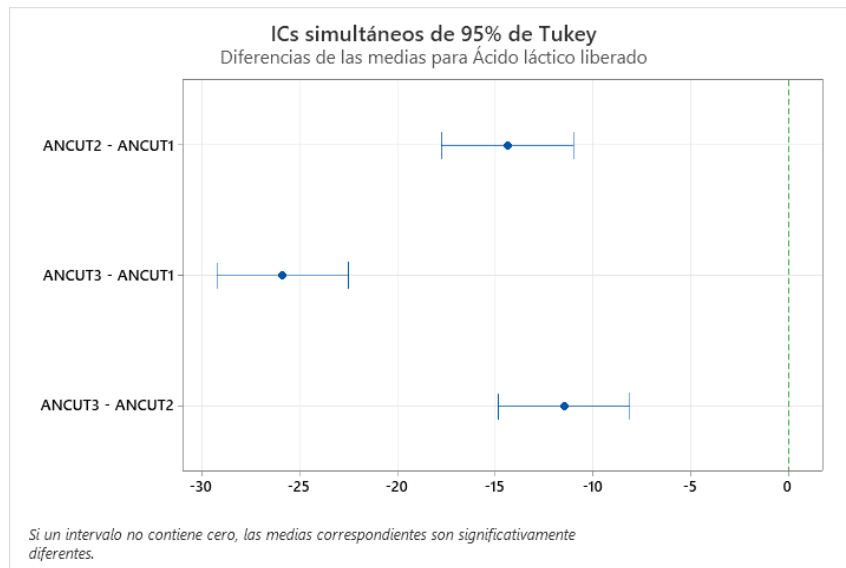


Figura 49. Prueba de Tukey para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3.

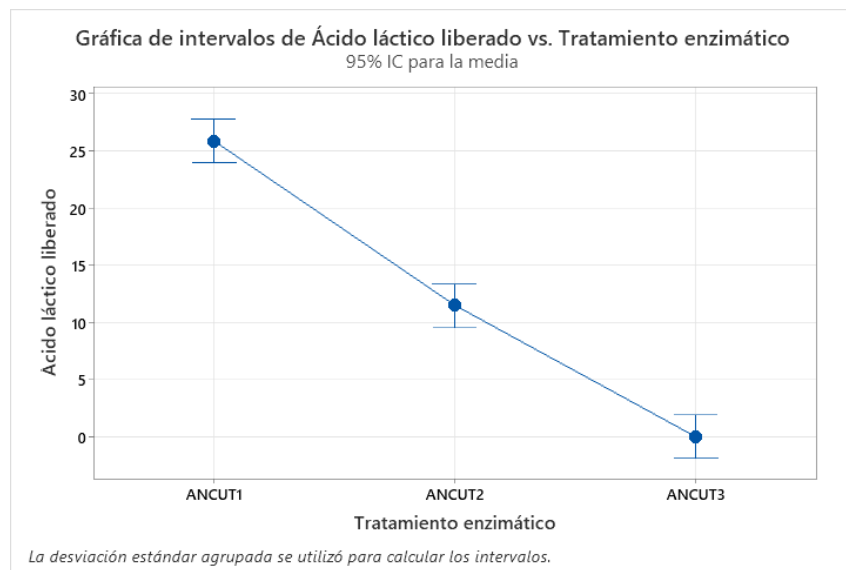


Figura 50. Gráfica de intervalos para degradación de PLA con enzimas A1, A2 y A3.

Al sacar los intervalos de confianza, compararlos unos entre otros y graficarlos de manera individual, se puede ver que todos los tratamientos enzimáticos son diferentes entre sí, sin embargo, con la enzima A1 se alcanza una mayor cantidad liberada de ácido láctico. Por lo que además de concluir que sí hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta a la enzima usada para la degradación, también se puede decir que la cutinasa A1 es la que libera una mayor cantidad de ácido láctico.

Hecho el ANOVA para determinar si hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado por la reacción de hidrólisis con las cutinasas recombinantes, se llegó a la conclusión que sí hay diferencia, además la evidencia experimental nos dice que la enzima cutinasa A1 es la que libera mayor cantidad de ácido láctico liberado. Después de evaluar el efecto individual, se hizo un diseño experimental para evaluar la combinación de las enzimas.

12.6.2 Diseño experimental de la combinación de enzimas recombinantes

Se realizó un diseño experimental para la combinación de las cutinasas con las que se trabajó: A1, A2 y A3, se realizó un diseño, sin embargo debido a que en este no se evalúa el efecto del Regulador del medio de reacción, pues en el caso de A1 y A2 el Regulador adecuado reportado en el mismo (Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7), pero para A3 el Regulador usado es diferente (Regulador Tris-HCL 50 mM pH=9), se decidió hacer dos corridas para las combinaciones en las que se necesitara evaluar el efecto del Regulador de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 20. Combinación de enzimas en los Reguladors a probar.

| Combinación | Regulador para probar en la combinación |
|-------------|--|
| A1/A3 | Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Regulador Tris HCl 50 mM pH9 |
| A2/A3 | Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Regulador Tris HCl 50 mM pH9 |
| A/A 2/A3 | Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH7 |
| | Regulador Tris HCl 50 mM pH9 |

Obtenidos los datos de cada Regulador evaluado, el diseño experimental se evaluó dos veces, usando los datos de la combinación en el Regulador evaluado, de manera que se hicieron dos ANOVAS, una cuando las combinaciones se probaron en Regulador Tris-HCL 50 mM y otra cuando las combinaciones se probaron en Regulador de Fosfatos de sodio 50 mM pH7.

Evaluación del diseño experimental usando Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9 para las combinaciones A1/A3, A2/A3 Y A1/A2/A3

En este diseño experimental se tomó en cuenta la combinación de enzimas A1/A3, A2/A3 Y A1/A2/A3 cuando se encuentran en el Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9 (Regulador adecuado para A3). En este caso las hipótesis alternas son que el factor o combinación de factores evaluados influyen en la liberación de ácido láctico; las hipótesis nulas son que factor o combinación de factores evaluados no influyen en la liberación de ácido láctico.

Tabla 21. Datos obtenidos de liberación de ácido láctico del diseño experimental de la combinación de enzimas (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9).

| A1 | A2 | A3 | Repetición | Ácido láctico liberado | |
|----|----|----|------------|------------------------|---------|
| 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| | | | 2 | 0 | |
| | | | 3 | 0 | |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | 2 | 0 |
| | | | | 3 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 9.4613 |
| | | | | 2 | 11.4627 |
| | | | | 3 | 13.5426 |
| 1 | | 0 | 1 | 1 | 13.7212 |
| | | | | 2 | 14.5612 |
| | | | | 3 | 12.3216 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 24.7565 | |
| | | | 2 | 25.8654 | |
| | | | 3 | 26.9576 | |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 33.3613 |
| | | | | 2 | 29.4615 |
| | | | | 3 | 31.4215 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 7.4621 |
| | | | | 2 | 8.5642 |
| | | | | 3 | 8.6413 |
| 1 | | 0 | 1 | 1 | 17.3095 |
| | | | | 2 | 14.1917 |
| | | | | 3 | 15.4639 |

Tabla 22. ANOVA para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9).

| <i>Fuente de variación</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>Valor F_0</i> |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| A1 | 1 | 1181.41 | 1181.41 | 707.91 |
| A2 | 1 | 26.29 | 26.29 | 15.76 |
| A3 | 1 | 84.75 | 84.75 | 50.78 |
| A1*A2 | 1 | 1279.86 | 1279.86 | 766.90 |
| A1*A3 | 1 | 44.89 | 44.89 | 26.90 |
| A2*A3 | 1 | 5.77 | 5.77 | 3.46 |
| A1*A2*A3 | 1 | 0.01 | 0.01 | 0.01 |
| Error | 16 | 26.70 | 1.67 | |
| Total | 23 | 2649.69 | | |

$$F_{0.05, 1, 16} = 4.494$$

La evidencia experimental muestra que para la mayoría de los casos se cumple la hipótesis alterna ($F_0 > F_{\text{tablas}}$), es decir que el factor o combinación de factores evaluados influyen en la liberación de ácido láctico. Solamente en el caso de la combinación de A2/A3 y la interacción de las 3 enzimas se observa que $F_{\text{tablas}} > F_0$, es decir que la interacción de las 3 enzimas no afecta la liberación de ácido láctico. Aunque si hay influencia de la mayoría de los factores y sus combinaciones en la liberación de ácido láctico, al analizar los datos se puede notar que no todos influyen de manera positiva, en el diagrama de Pareto se pueden ver graficados los efectos estandarizados, en los cuales se observa que la combinación A1/A2 es la combinación que tiene mayor influencia en la liberación de ácido láctico, sin embargo la combinación que libera mayor cantidad de ácido láctico en la de A1/A3 en Regulador Tris-HCL 50 mM pH=9.

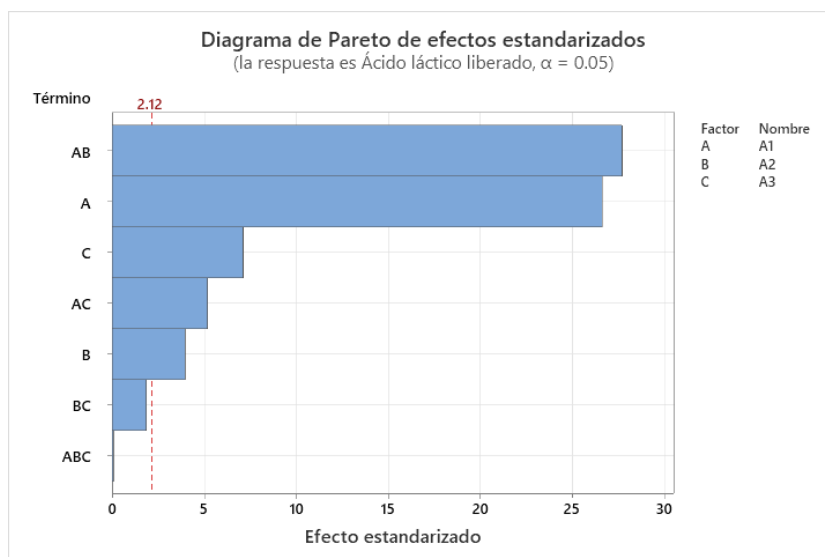


Figura 51. Diagrama de Pareto para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador Tris-HCl 50 mM pH=9).

Con la evidencia experimental apoyados del diseño experimental se concluye que la combinación A1/A3 es con la que se alcanza una mayor cantidad de ácido láctico.

Evaluación del diseño experimental usando Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7 para las combinaciones A1/A3, A2/A3 Y A1/A2/A3

En este diseño experimental se tomó en cuenta la combinación de enzimas A1/A3, A2/A3 Y A1/A2/A3 cuando se encuentran en el Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=7 (Regulador adecuado para A1 y A2). Las hipótesis alternas son que el factor o combinación de factores evaluados influyen en la liberación de ácido láctico; las hipótesis nulas son que el factor o combinación de factores evaluados no influyen en la liberación de ácido láctico.

Tabla 23. Datos obtenidos de liberación de ácido láctico del diseño experimental de la combinación de enzimas (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7)

| A1 | A2 | A3 | Repetición | Ácido láctico liberado | |
|----|----|----|------------|------------------------|---------|
| 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | |
| | | | 2 | 0 | |
| | | | 3 | 0 | |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| | | | | 2 | 0 |
| | | | | 3 | 0 |
| | 1 | 0 | 0 | 1 | 9.4613 |
| | | | | 2 | 11.4627 |
| | | | | 3 | 13.5426 |
| 1 | | 1 | 0 | 1 | 0.4567 |
| | | | | 2 | 0.5664 |
| | | | | 3 | 0.4323 |
| 1 | 0 | 0 | 1 | 24.7565 | |
| | | | 2 | 25.8654 | |
| | | | 3 | 26.9576 | |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 20.5675 |
| | | | | 2 | 19.4479 |
| | | | | 3 | 18.4613 |
| | 1 | 0 | 1 | 1 | 7.4621 |
| | | | | 2 | 8.5642 |
| | | | | 3 | 8.6413 |
| 1 | | 1 | 0 | 1 | 12.4596 |
| | | | | 2 | 11.3049 |
| | | | | 3 | 13.1456 |

Tabla 24. ANOVA para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7)

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Valor F_0 |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| A1 | 1 | 1089.61 | 1089.61 | 1118.68 |
| A2 | 1 | 61.94 | 61.94 | 63.59 |
| A3 | 1 | 66.24 | 66.24 | 68.01 |
| A1*A2 | 1 | 507.84 | 507.84 | 521.39 |
| A1*A3 | 1 | 28.49 | 28.49 | 29.25 |
| A2*A3 | 1 | 0.12 | 0.12 | 0.12 |
| A1*A2*A3 | 1 | 172.57 | 172.57 | 177.18 |
| Error | 16 | 15.58 | 0.97 | |

| | | |
|-------|----|---------|
| Total | 23 | 1942.41 |
|-------|----|---------|

$F_{0.05, 1, 16} = 4.494$

La evidencia experimental muestra que para la mayoría de los casos se cumple la hipótesis alterna ($F_0 > F_{tablas}$), es decir que el factor o combinación de factores evaluados influyen en la liberación de ácido láctico. Únicamente en el caso de la interacción A2/A3 se observa que $F_{tablas} > F_0$, es decir que la interacción de estas 2 enzimas no afecta la liberación de ácido láctico.

Aunque si hay influencia de la mayoría de los factores y sus combinaciones en la liberación de ácido láctico, al analizar los datos se nota que no todos influyen de manera positiva, en el diagrama de Pareto se grafican los efectos estandarizados, aquí se observa que la enzima A1 es el factor que tiene mayor influencia y con la que se alcanza la mayor cantidad de ácido láctico.

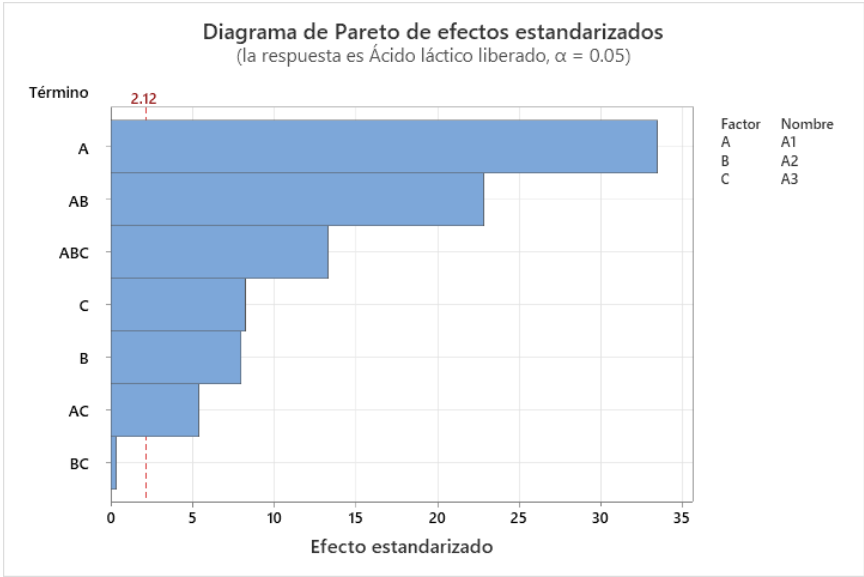


Figura 52. Diagrama de Pareto para el diseño experimental de la combinación de enzimas A1, A2 y A3 (combinación de enzimas en Regulador de Fosfatos de Sodio 50 mM pH=7)

Con la evidencia experimental apoyados del diseño experimental se concluye que la enzima A1 es la que mejor efecto tiene, con ella se alcanza una mayor cantidad de ácido láctico.

Aunque la evidencia experimental muestra que la combinación de A1/A3 en Regulador Tris-HCL 50 mM pH=9 es la combinación que libera mayor cantidad de ácido láctico, algunos factores técnicos y económicos determinaron a que se la enzima A1 se considerara como la mejor opción que libera mayor cantidad de ácido láctico hidrolizando PLA.

Usando a A1, se procedió a evaluar diferentes factores de reacción para observar si influyen en la cantidad de ácido láctico liberado al medio, los factores fueron: tamaño de partícula, concentración de enzima, temperatura

y pH del Regulador de medio de reacción. Se probaron diferentes valores para cada factor evaluado, posteriormente se hizo un ANOVA para cada factor con el fin de determinar si hay diferencia significativa entre los valores probados de cada factor.

12.6.3 ANOVA y prueba de Tukey del factor tamaño de partícula.

Se realizó un análisis de varianza para evaluar el tamaño de partícula del polímero degradado y determinar si hay diferencia significativa en la cantidad de ácido láctico liberado al degradar diferentes tamaños de partícula del polímero, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado en los diferentes tamaños de partícula probados; la hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado en los diferentes tamaños de partícula probados. Se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con la cutinasa A1, se probaron 5 tamaños de partícula diferentes, tamiz #20, #30, #40, #50 y #60.

Tabla 25. ANOVA para el tamaño de partícula del polímero PLA.

| <i>Fuente de variación</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>Valor F_0</i> |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Tamaño de partícula | 4 | 28.851 | 7.2129 | 10.77 |
| Error | 10 | 6.698 | 0.6698 | |
| Total | 14 | 35.549 | | |

$$F_{0.05, 4, 10} = 3.478$$

$F_0 = 10.77 > 3.478$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta al tamaño de partícula del polímero PLA.

Posteriormente, se hizo una prueba de Tukey, al hacer la comparación entre parejas se sabe cuál valor de tamaño de partícula es diferente.

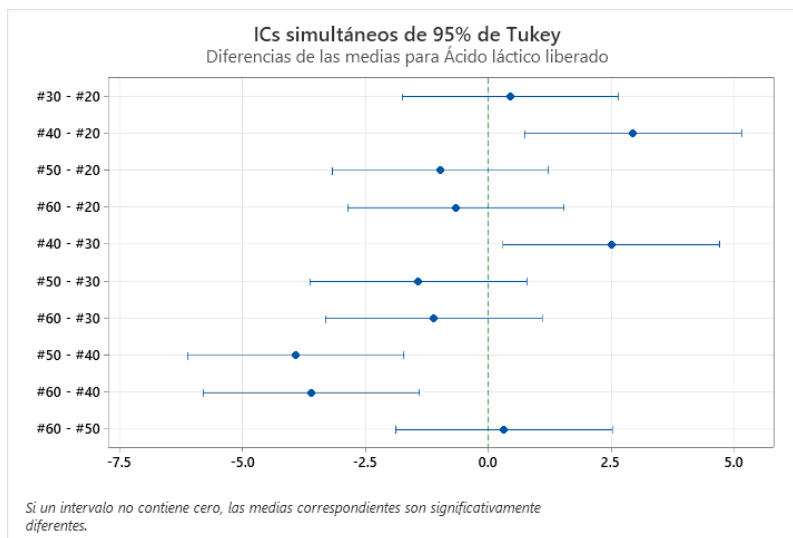


Figura 53. Prueba de Tukey para el tamaño de partícula del polímero PLA.

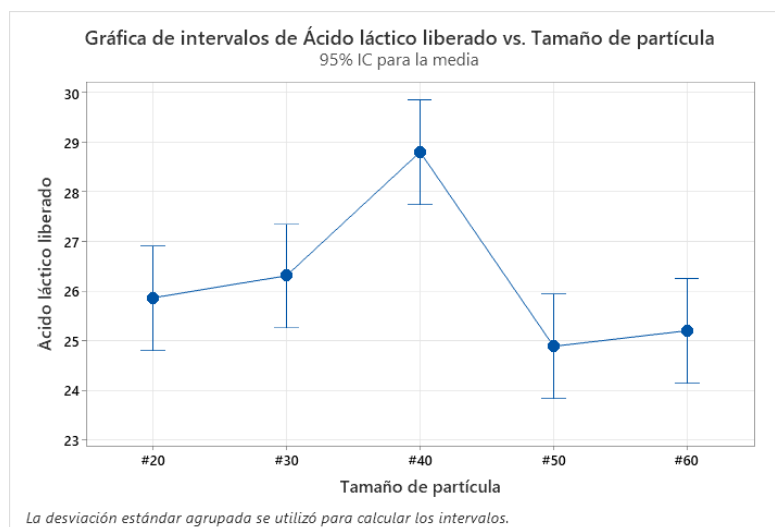


Figura 54. Gráfica de intervalos para el tamaño de partícula del polímero PLA.

Al sacar los intervalos de confianza, compararlos unos entre otros y graficarlos de manera individual, se observa que el valor diferente es el valor de ácido láctico liberado con el tamaño de partícula #40, siendo también este tamaño de partícula con el que se alcanza una mayor cantidad liberada de ácido láctico. Por lo que además de concluir que sí hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta al tamaño de partícula del polímero PLA degradado por la cutinasa A1, también se concluye que el tamaño de partícula con el que se alcanza una mayor cantidad de ácido láctico liberado es el tamaño #40.

12.6.4 ANOVA y prueba de Tukey del factor concentración de enzima

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la concentración de enzima A1 agregada para la hidrólisis y determinar si hay diferencia significativa en la cantidad de ácido láctico liberado en respuesta a diferentes cantidades de enzima al medio, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al agregar diferentes concentraciones de enzima A1; la hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al agregar diferentes concentraciones de enzima A1. Se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con la cutinasa A1, se probaron 5 concentraciones de enzima diferentes: 0.5%, 1%, 3%, 5%, y 10%.

Tabla 26. ANOVA para concentración de enzima A1.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Valor F_0 |
|-------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| Concentración de enzima | 4 | 351.11 | 87.777 | 42.91 |
| Error | 10 | 20.46 | 2.046 | |
| Total | 14 | 371.57 | | |

$F_{0.05, 4, 10} = 3.478$

$F_0 = 42.791 > 3.478$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta a la concentración de enzima A1 agregada al medio de reacción.

Posteriormente, se hizo una prueba de Tukey, al hacer la comparación entre parejas se sabe cuál valor de tamaño de partícula es diferente.

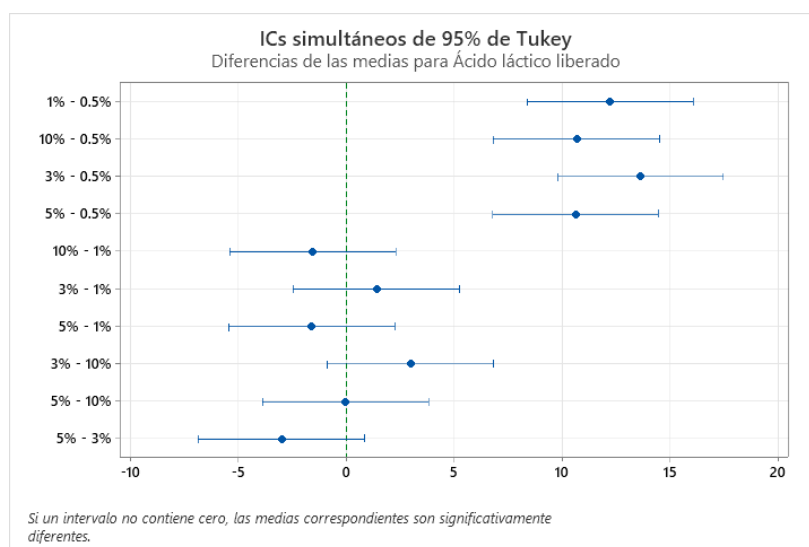


Figura 55. Prueba de Tukey para concentración de enzima A1

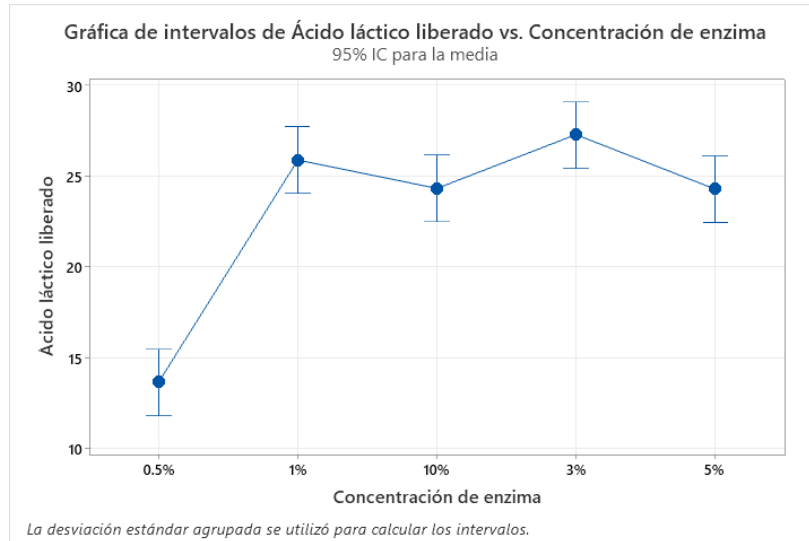


Figura 56. Gráfica de intervalos para concentración de enzima A1

Al sacar los intervalos de confianza, compararlos unos entre otros y graficarlos de manera individual, se observa que el valor diferente es el valor de ácido láctico liberado con una concentración de 0.5% de enzima A1, sin embargo, con esta concentración la cantidad liberada de ácido láctico es menor. Finalmente, la evidencia experimental muestra que sí hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta a la concentración de enzima A1, pero la cantidad de ácido láctico liberado es la menor, en el gráfico de intervalo de confianza se aprecia que la concentración de 3% de enzima es la que libera mayor cantidad de ácido láctico, pero no hay diferencia significativa al compararlo con las concentraciones 1%, 5% y 10%.

12.6.5 ANOVA y prueba de Tukey del factor temperatura del medio de reacción.

Se realizó un análisis de varianza para evaluar la temperatura del medio de reacción y determinar si hay diferencia significativa en la cantidad de ácido láctico liberado en respuesta a la temperatura del medio, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al someter a diferentes temperaturas al medio de reacción; la hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al someter a diferentes temperaturas al medio de reacción. Se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con la cutinasa A1, se probaron 6 temperaturas diferentes para el medio de reacción: 37°, 40°, 45°, 50°, 55° y 60°.

Tabla 27. ANOVA para la temperatura del medio de reacción.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Valor F_0 |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| Temperatura | 5 | 2998.05 | 599.610 | 1289.22 |
| Error | 12 | 5.58 | 0.465 | |
| Total | 17 | 3003.63 | | |

$F_{0.05, 5, 12} = 3.106$

$F_0 = 1289.22 > 3.106$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia en la liberación de ácido láctico en respuesta a la temperatura del medio de reacción.

Posteriormente, se hizo una prueba de Tukey, al hacer la comparación entre parejas se observa cuál valor de tamaño de partícula es diferente.

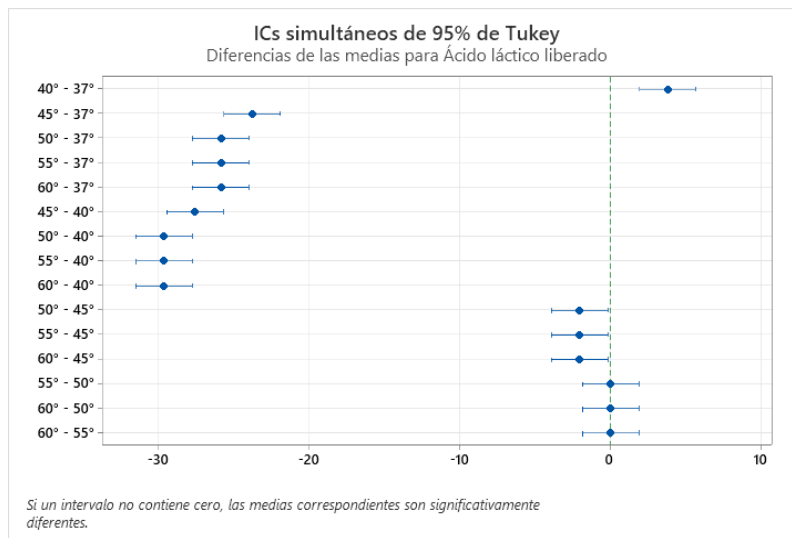


Figura 57. Prueba de Tukey para la temperatura del medio de reacción.

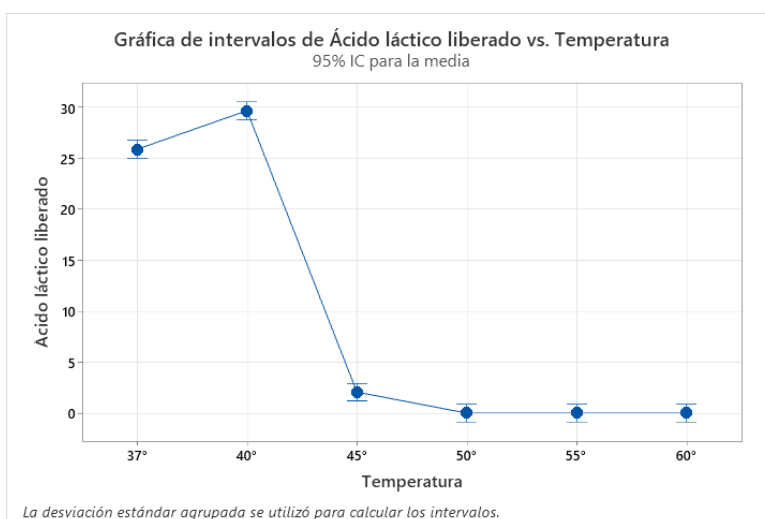


Figura 58. Gráfica de intervalos para la temperatura del medio de reacción.

Al sacar los intervalos de confianza, compararlos unos entre otros y graficarlos de manera individual, se observa que los valores diferentes en la cantidad de ácido láctico liberado son los que se alcanzan con temperaturas de 37° y 40°, sin embargo, con la temperatura de 40° se alcanza la mayor cantidad liberada de ácido láctico. LA evidencia experimental muestra que sí hay una diferencia a en la liberación de ácido láctico en respuesta a la temperatura del medio de reacción, en el gráfico de intervalos de confianza se nota que la temperatura de 40° es la que libera mayor cantidad de ácido láctico.

12.6.6 ANOVA y prueba de Tukey del factor pH del Regulador para el medio de reacción

Se realizó un análisis de varianza para evaluar el pH del Regulador del medio de reacción y determinar si hay diferencia significativa en la cantidad de ácido láctico liberado en respuesta al pH del Regulador del medio de reacción, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al probar diferentes pH del Regulador del medio de reacción; la hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado al probar diferentes pH del Regulador del medio de reacción. Se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con la cutinasa A1, se probaron 4 pH diferentes del Regulador del medio de reacción: 6, 7, 8 y 9.

Tabla 28. ANOVA para el pH del Regulador para el medio de reacción.

| Fuente de variación | Grados de libertad | Suma de cuadrados | Promedio de los cuadrados | Valor F_0 |
|---------------------|--------------------|-------------------|---------------------------|-------------|
| pH del Regulador | 3 | 727.239 | 242.413 | 695.00 |
| Error | 8 | 2.790 | 0.349 | |
| Total | 11 | 730.029 | | |

$F_{0.05, 3, 8} = 4.066$

$F_0 = 695.00 > 4.066$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia a en la liberación de ácido láctico en respuesta al pH del Regulador para el medio de reacción.

Posteriormente, se hizo una prueba de Tukey, al hacer la comparación entre parejas se sabe cuál valor de pH del Regulador es diferente.

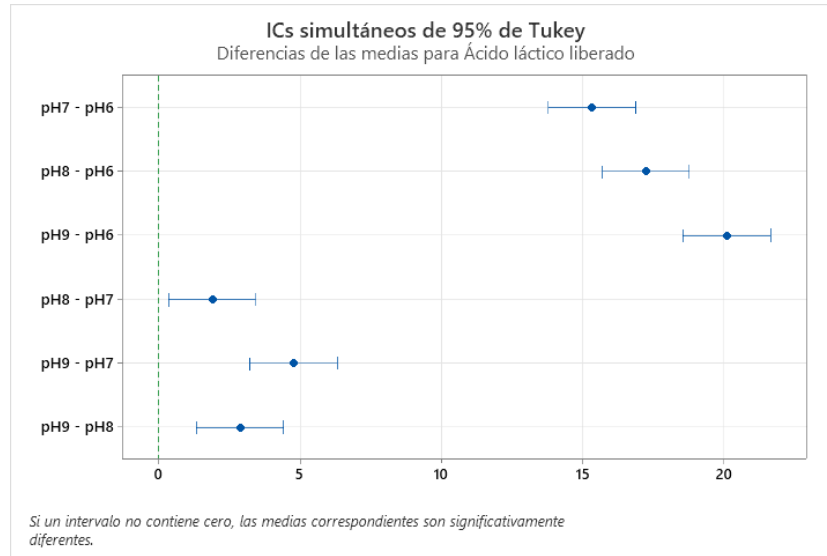


Figura 59. Prueba de Tukey para el pH del Regulador para el medio de reacción.

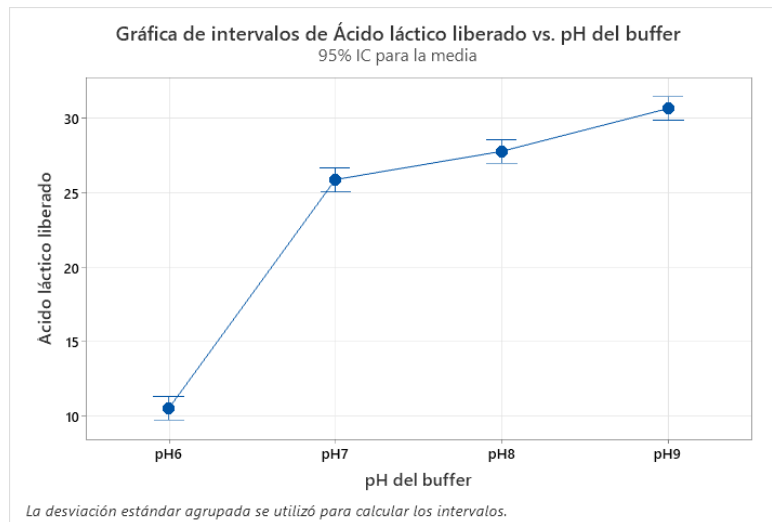


Figura 60. Gráfica de intervalos para el pH del Regulador para el medio de reacción.

Al sacar los intervalos de confianza, compararlos unos entre otros y graficarlos de manera individual, se observa que los valores diferentes en la cantidad de ácido láctico liberado son los que se alcanzan con pH=6 y pH=9, sin embargo, con un Regulador de pH=9 se alcanza la mayor cantidad de ácido láctico liberado al medio. La evidencia

experimental muestra que sí hay una diferencia a en la liberación de ácido láctico en respuesta al pH del Regulador para el medio de reacción, en el gráfico de intervalos de confianza se observa que el Regulador con pH=9 se libera una mayor cantidad de ácido láctico.

12.6.7 ANOVA para comparación de condiciones de reacción.

Finalmente, se decidió hacer un experimento para evaluar la combinación del valor de cada factor evaluado que liberó mayor cantidad de ácido láctico al medio de reacción, en la mayoría de los casos, la evidencia experimental demostró que hay diferencia significativa excepto para el factor de concentración de enzima, aunque el valor de 3% no es diferente significativamente de los valores se decidió usar ese valor para la el experimento de combinación, de modo que se realizó una reacción de hidrólisis durante 7 días con la cutinasa A1, usando las siguientes condiciones: polímero en polvo en polvo tamiz 40, A1 al 3% respecto al peso del polímero, como medio de reacción de usó Regulador de fosfatos de sodio 50 mM pH=9, la reacción se incubó sin agitación y a 40 °C, posteriormente se midió la cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

Al evaluar la combinación de los factores se involucra un diseño experimental, sin embargo, al analizar la cantidad de valores probados para cada factor, el diseño experimental se hace complejo, esto sumado a la limitación de recursos y tiempo para los análisis llevó a que sólo se evaluara la combinación de los valores de cada factor considerados como mejores, al final se comparó la liberación de ácido láctico inicial con A1 (sin condiciones mejoradas) contra la liberación de ácido láctico con A1 con las condiciones mejoradas, la hipótesis alterna es: Hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado obtenido con las condiciones probadas para A1. La hipótesis nula es: No hay diferencia en la cantidad de ácido láctico liberado obtenido con las condiciones probadas para A1

Tabla 29. ANOVA para la comparación de condiciones de reacción.

| <i>Fuente de variación</i> | <i>Grados de libertad</i> | <i>Suma de cuadrados</i> | <i>Promedio de los cuadrados</i> | <i>Valor F_0</i> |
|----------------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| Condiciones | 1 | 383.065 | 383.065 | 197.13 |
| Error | 4 | 7.773 | 1.943 | |
| Total | 5 | 390.837 | | |

$F_{0.05, 1, 4} = 7.709$

$F_0 = 197.23 > 7.709$. La evidencia experimental nos lleva a rechazar la hipótesis nula. Hay una diferencia a en la liberación de ácido láctico en las condiciones probadas para A1. Por lo que se concluye que con las mejores condiciones combinadas para A1 se logra una mayor cantidad de ácido láctico liberado al medio de reacción.

La prueba de Tukey no es necesaria, pues al ser una ANOVA de 2 niveles no se necesitan más comparaciones para saber cuál nivel es diferente.

