



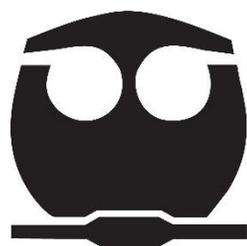
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO PRELIMINAR DE LA REACCIÓN DE
DEGRADACIÓN DE PET (POLIETILÉN TEREFALATO) EN
REACTOR DE 300 ML**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

PAULINA RUÍZ HERNÁNDEZ



CDMX

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Farrés González Sarabia Amelia María de Guadalupe

VOCAL: Profesora: Quirasco Baruch Maricarmen

SECRETARIO: Profesor: Hernández Meléndez Oscar

1er. SUPLENTE: Profesora: Rodríguez Alegría María Elena

2° SUPLENTE: Profesor: Donjuán Guerrero Edgar Axel

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN SE DESARROLLÓ EN EL LABORATORIO 312 DEL DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA DEL EDIFICIO E Y EN EL LABORATORIO 110 DEL EDIFICIO B DE LA FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO CON APOYO FINANCIERO DEL PROYECTO PAIP 5000-9095 Y PAPIIT IN201921.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Amelia Farrés González Sarabia

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. C. José Augusto Castro Rodríguez

SUSTENTANTE:

Paulina Ruíz Hernández

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Al proyecto PAIP 5000-9095 Facultad de química y al proyecto PAPIIT IN201921.por el apoyo económico brindado durante la realización del proyecto



ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	4
2. HIPÓTESIS	6
3. OBJETIVO GENERAL	7
4. OBJETIVOS PARTICULARES	7
5. ANTECEDENTES	8
5.1 PLÁSTICOS	8
5.1.1 Polimerización por adición.....	8
5.1.2 Polimerización por condensación.....	8
5.2 PET	10
5.3 LOS DESECHOS PLÁSTICOS EN MÉXICO.....	11
5.4 PRODUCCIÓN Y ACUMULACIÓN DE PLÁSTICO	12
5.5 BIODEGRADACIÓN	12
5.6 CUTINASAS.....	13
5.6.1 Aplicaciones de las cutinasas	16
5.7 REACTORES	18
5.7.1 REACTORES INTERMITENTES (BATCH).....	18
5.7.2 REACTORES DE FLUJO CONTINUO	19
5.7.2.1 Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR)	19
5.7.2.2 Reactor tubular (PFR)	20
5.7.2.3 Reactor de lecho empacado (PBR).	20
5.7.3 OTROS TIPOS DE REACTORES	21
5.7.3.1 Biorreactores	21
5.7.3.2 Reactores enzimáticos.....	21
5.7.4 DISEÑO DE REACTORES.....	21
5.7.5 ESCALAMIENTO DE PROCESO	22
6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	23
6.1 PRODUCCIÓN DE LAS DISOLUCIONES STOCK	23
6.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	24
6.2.1 Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)	24
6.2.2 Medio BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium).....	24
6.2.3 Medio YP (Yeast Extract Peptone).....	25
6.2.4 Medio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium).....	25
6.3 PRODUCCIÓN DE LA ENZIMA ANCUT1.....	25
6.3.1 Activación de la cepa <i>Pichia pastoris</i> X33 con ANCUT1	25
6.3.2 Producción de biomasa.....	26
6.3.3 Inducción de la enzima	26
6.4 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN MICROPLACA (P-NITROFENILACETATO)	26
6.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN MICROPLACA	27
6.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN GELES DE POLIACRILAMIDA	27
6.6.1 Electroforesis	27
6.6.2 Zimograma.....	27
6.7 PRETRATAMIENTO MECÁNICO DE LAS BOTELLAS DE PET.....	28
6.8 REACCIÓN DE DEGRADACIÓN DE PET EN REACTOR.....	28
6.8.1 Diseño de reactor.....	28
6.8.2 Efecto del buffer en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor	31
6.8.3 Efecto de la agitación en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor	31
6.8.4 Efecto del tamaño de partícula en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor.....	32
6.8.5 Efecto de la temperatura y de la concentración de enzima en la masa residual y pH en la degradación de PET en reactor.....	32
6.9 EVALUACIÓN DE LOS CAMBIOS POR LA DEGRADACIÓN DE PET	33



6.9.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa	33
6.9.2 Difracción de Rayos X (DFX) de polvos	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
7.1 PRODUCCIÓN DE ANCUT1	34
7.2 DEGRADACIÓN DE PET EN EL REACTOR	35
7.2.2 Efecto de la agitación en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor	37
7.2.3 Efecto del tamaño de partícula en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor	39
7.2.4 Efecto de la temperatura y de la concentración de enzima en la masa residual y pH en la degradación de PET en reactor	41
7.2.4.1 Estudio cinético de la enzima ANCUT1 a 60 °C	41
7.2.4.2 Efecto de la temperatura en la masa residual y el pH	42
7.2.4.3 Efecto de la concentración de enzima en la masa residual y el pH	43
7.3 PROPUESTA DE DISEÑO DE REACTOR CORREGIDA	44
8. CONCLUSIONES	46
9. PERSPECTIVAS A FUTURO	47
10. ANEXO	48
11. BIBLIOGRAFÍA	53



I. RELACIÓN DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Clasificación de polímeros.
- Figura 2. Reacción de síntesis de poli (etilen tereftalato).
- Figura 3. Mecanismo general de biodegradación de plásticos bajo condiciones aerobias.
- Figura 4. Unidad básica de la estructura de la cutina.
- Figura 5. Plegamiento de hidrolasas α/β . Este se compone de una hoja β centrales rodeada por α - hélices.
- Figura 6. Mecanismo catalítico de proteasas de serina.
- Figura 7. Monómeros y oligómeros obtenidos a partir de la degradación del PET por la PETasa.
- Figura 8. Diagrama de un reactor tipo Batch.
- Figura 9. Diagrama de un reactor tipo CSTR.
- Figura 10. Diagrama de un reactor tipo PFR.
- Figura 11. Diagrama de un reactor tipo PBR.
- Figura 12. Representación visual de las etapas comúnmente empleadas para el desarrollo de tecnología en procesos.
- Figura 13. Representación del reactor propuesto para el estudio de la degradación de PET.
- Figura 14. Fotografía del reactor utilizado durante las pruebas.
- Figura 15. Perfil de proteínas y zimograma de AN CUT1 recombinante.
- Figura 16. Difractograma de rayos X del PET con buffer Tris-HCl, con BFS y sin tratamiento.
- Figura 17. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación a diferentes velocidades de agitación.
- Figura 18. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación con diferentes tamaños de partícula.
- Figura 19. Actividad enzimática de AN CUT1 a 60 ° C.
- Figura 20. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación a diferentes temperaturas.
- Figura 21. Difractogramas obtenidos con rayos X del PET residual después de la reacción de degradación con diferentes concentraciones de AN CUT1.
- Figura 22. Esquema de la propuesta de reactor corregida.
- Tabla 1: Algoritmo para estimar tiempos de reacción en un reactor tipo Batch
- Tabla 2. Productos de degradación obtenidos con AN CUT1 con diferentes buffers.
- Tabla 3. Productos obtenidos al modificar la velocidad de agitación.
- Tabla 4. Productos obtenidos al modificar el tamaño de partícula.



II. ABREVIATURAS

ANCUT1: cutinasa 1 proveniente de *Aspergillus nidulans*
ANCUT2: cutinasa 2 proveniente de *Aspergillus nidulans*
ANCUT3: cutinasa 3 proveniente de *Aspergillus nidulans*
BHET: Bis (2-hidroxietil) tereftalato
CSTR: Reactor continuo de mezcla perfecta
DMSO: Dimetil sulfoxido
DMT: Tereftalato de dimetilo
EG: Etilenglicol
kDa: Kilo Dalton
mL: Mililitro
mM: Micromol
MHET: Mono (2-hidroxietil) tereftalato
PET: Polietilen tereftalato
PBS: Buffer de fosfatos de sodio
PBR: Reactor de lecho empacado
PFR: Reactor tubular
p-NFA: Para nitofenilacetato
ppm: Partes por millón
rpm: Revoluciones por minuto
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
Tg: Temperatura de transición vítrea
TPA: Ácido tereftálico
Tris-HCl: Tris (hidroximetil) aminometano
U: Unidades internacionales de actividad enzimática
VI: Viscosidad intrínseca
YNB: Bases nitrogenadas de levadura
YP: Extracto de levadura, peptona
YPD: Extracto de levadura, peptona y dextrosa
 α -NA: Acetato de alfa-naftilo
 μ m: Micrómetro



1. INTRODUCCIÓN

La búsqueda de materiales versátiles y de bajo costo de producción ha traído como resultado la invención de materiales sintéticos como los plásticos. Este tipo de materiales han tenido una amplia aplicación en diversas industrias, por lo que la producción se ha incrementado drásticamente durante las últimas décadas. En el mundo la producción y el consumo de envases plásticos tiene un gran impacto ambiental, de acuerdo con el informe titulado “Plastics the facts 2022”, publicado por Plastics Europe. en 2022, la producción de plásticos alcanzó casi los 390 millones de toneladas de las cuales América Latina aportó el 4%. Tan sólo en México se produjeron 3.6 millones de toneladas de plásticos en el año 2018 (SEMARNAT, 2020).

Es por lo mencionado anteriormente que se han buscado diferentes alternativas para combatir esta problemática. Una de las primeras es el reciclaje, en donde el material plástico es reprocesado mecánica o termoquímicamente para la manufactura de nuevos productos. También se ha propuesto la alternativa de la elaboración de polímeros biodegradables buscando su facilidad de desintegración, pero incluso estos pueden persistir en el ambiente durante décadas, ya que su degradación depende de diversos factores ambientales. Finalmente, también se ha estudiado el uso de microorganismos o enzimas que usan como sustrato polímeros sintéticos o biodegradables, este es el caso de las cutinasas, para lograr su eliminación.

Las cutinasas son enzimas clasificadas como hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos cuyo principal sustrato es la cutina (componente lipídico de la cutícula de las plantas). Se ha demostrado que las cutinasas también son capaces de actuar sobre una amplia variedad de sustratos, incluyendo ésteres solubles de bajo peso molecular o triacilgliceroles de cadena corta o larga (Chen et al., 2013). En el grupo de trabajo se han encontrado y estudiado cuatro cutinasas codificadas en el genoma del hongo ascomiceto *Aspergillus nidulans*, y dos de estas enzimas han sido identificadas, purificadas y caracterizadas (Bermúdez, 2013; Vega, 2013). Los genes de estas dos enzimas se han aislado, clonado y expresado exitosamente en *Pichia pastoris* y se ha encontrado que pueden ser útiles en la obtención de biodiesel, así como la síntesis de compuestos químicos por transesterificación. (Ayala, 2011; Farrés et al, 2021 Morales, 2015; Solis, 2015; Vergara, 2010).



Del mismo modo, en el grupo de trabajo se ha llevado a cabo el estudio de la capacidad de hidrólisis de las cutinasas recombinantes ANCUT1 y ANCUT2 con diferentes polímeros (entre los cuales se encontraba el polietilén tereftalato) obteniendo resultados favorables evaluando la pérdida de masa (Morales, 2018; Sánchez, 2015).

Con base en lo anterior, el presente proyecto se enfocó en evaluar el efecto del buffer, la velocidad de agitación, el tamaño de partícula, la temperatura, el tipo y concentración de enzima, en la degradación del PET en un reactor de acero de 300 mL. Para ello, se cuantificaron por HPLC los productos TPA, DMT y BHET. También se evaluó la cristalinidad de las muestras tratadas y se analizaron los difractogramas de las muestras de PET al finalizar las reacciones para determinar modificaciones estructurales por difracción de rayos X.



2. HIPÓTESIS

Si las condiciones de reacción evaluadas previamente en el grupo de trabajo se llevan a cabo a una temperatura cercana a la temperatura de transición vítrea del poli(etilen tereftalato) y con la implementación de una agitación homogénea usando una propela en reactor. Entonces, se mejorará la degradación de PET produciendo ácido tereftálico y disminuyendo el tiempo de reacción.



3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las condiciones de reacción para la degradación del PET en un reactor PARR de acero de 300 mL, utilizando la enzima ANCUT1.

4. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar la producción de la enzima ANCUT1 en la cepa recombinante *Pichia pastoris* X33.
2. Estudiar el efecto de la modificación de condiciones de degradación en un reactor de acero de 300 mL mediante la variación de los siguientes parámetros:
 - Velocidad de agitación 50, 100 y 200 rpm.
 - Naturaleza del buffer (PBS y Tris-HCl).
 - Tamaño de partícula de PET (300 y 180 μm).
 - Temperatura en la reacción (35 y 60°C)
3. Determinar la eficiencia de la reacción observando los cambios en la cristalinidad del PET, la pérdida de peso y la concentración de subproductos.



5. ANTECEDENTES

5.1 Plásticos

La palabra plástico proviene del griego “plastikos” que significa “que puede ser moldeado o formado”. La escasez de recursos no sostenibles como el hueso, el marfil o el carey dieron nacimiento a los plásticos. En la fabricación de este material se pueden obtener diferentes formas como láminas, fibras, tubos, botellas, entre otros (PlasticsEurope, 2018) lo que facilita diversidad de usos.

Los plásticos son materiales de origen orgánico ya que para su producción se utilizan productos naturales como la celulosa, el carbón, el gas natural, la sal, y el petróleo. Estos materiales forman parte de una gran familia de moléculas conocidas como polímeros sintéticos. Para la fabricación de plástico se utilizan dos procesos principales: la polimerización por adición y la policondensación.

5.1.1 Polimerización por adición

La polimerización por adición consiste en añadir monómeros de uno en uno al polímero en formación. Estos monómeros se unen mediante enlaces ya sean sencillos, dobles o triples así se va alargando la molécula en una sola dirección. La formación de polímeros por adición consiste básicamente en tres etapas: la iniciación donde se utiliza una molécula iniciadora que desata la polimerización (puede ser un radical libre, un catión, un ion o un complejo organometálico), la propagación, donde se van añadiendo más monómeros a la molécula mediante una reacción en cadena y la terminación cuando la molécula iniciadora se elimina y la propagación se detiene. Algunos ejemplos de polímeros obtenidos mediante esta ruta son el poli(etileno), el poli (cloruro de vinilo) y el poli(estireno).

5.1.2 Polimerización por condensación

Este tipo de polimerización se da cuando dos moléculas se unen para formar una más grande y liberan una molécula pequeña, generalmente de agua. Para que comience la formación del polímero; los monómeros deben tener dos grupos reactivos que sean capaces de condensarse. Muchos de los polímeros de condensación se forman cuando reacciona un ácido carboxílico con un alcohol y generan el correspondiente grupo éster

(Barón et al., 2009). Los poliésteres y las poliamidas son algunos de los plásticos que se sintetizan por este proceso.

Aunque el tipo de polimerización permite clasificar de manera general a los polímeros, existen muchas otras clasificaciones que se basan en sus propiedades físicas y químicas. Por ejemplo, de acuerdo con su estructura molecular, los polímeros pueden ser clasificados en tres grupos generales: termoplásticos, elastómeros y fibras. Los termoplásticos son separados a su vez en cristalinos y amorfos (no cristalinos) como se muestra en la Figura 1. Los termoplásticos son comúnmente referidos como plásticos únicamente y son polímeros lineales o ramificados que se vuelven líquidos al aplicarles calor, pueden ser moldeados y remodelados en casi cualquier forma mediante el uso de técnicas de proceso como moldeo por inyección y extrusión. Generalmente los termoplásticos no cristalizan en fase sólida fácilmente a través de enfriamiento, ya que esto requiere el ordenamiento de las macromoléculas que se encuentran altamente enroscadas y enredadas en estado líquido. Aquellas que sí logran cristalizar, no forman materiales perfectamente cristalinos sino materiales semicristalinos con ambas fases, la cristalina y la amorfa (Krevelen & Nijenhuis, 2009).

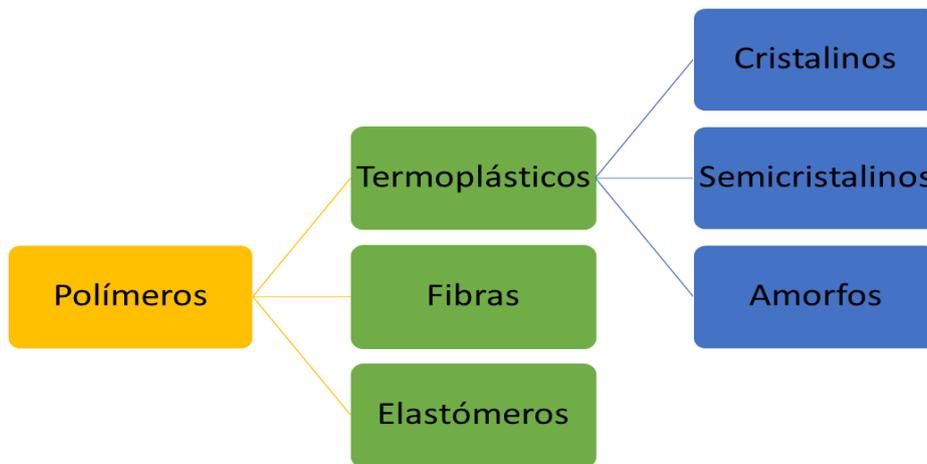


Figura 1. Clasificación de polímeros (Krevelen & Nijenhuis, 2009).

Los polímeros amorfos se caracterizan por tener una temperatura de transición vítrea (T_g), la cual está definida como la temperatura a la cual se pasa abruptamente del estado vítreo (duro) al estado gomoso (suave). Esta transición corresponde al movimiento en bloques de las cadenas debajo de la T_g las cadenas de polímero no pueden moverse y se



encuentran en posición fija. Ejemplo de un polímero que se sintetiza de esta manera es el poli (etilen tereftalato) (PET).

5.2 PET

El poli (etilen tereftalato) (PET) es un polímero sintético derivado del petróleo que se encuentra junto con otros polímeros sintéticos en la mayoría de los plásticos. Es un termoplástico formado por la polimerización del ácido tereftálico (TPA) con etilenglicol, eliminando agua (Figura 2) o mediante la esterificación de tereftalato de dimetilo (DMT) con etilenglicol, eliminando metanol (Figura 2). El TPA es un derivado de xileno producido a partir de nafta de petróleo, mientras que el etilenglicol se produce a través de la oxidación de etileno, el cual es un derivado petroquímico común. Por lo visto anteriormente se puede clasificar entonces como un producto de polimerización por condensación por etapas (Scheirs & Long, 2005).

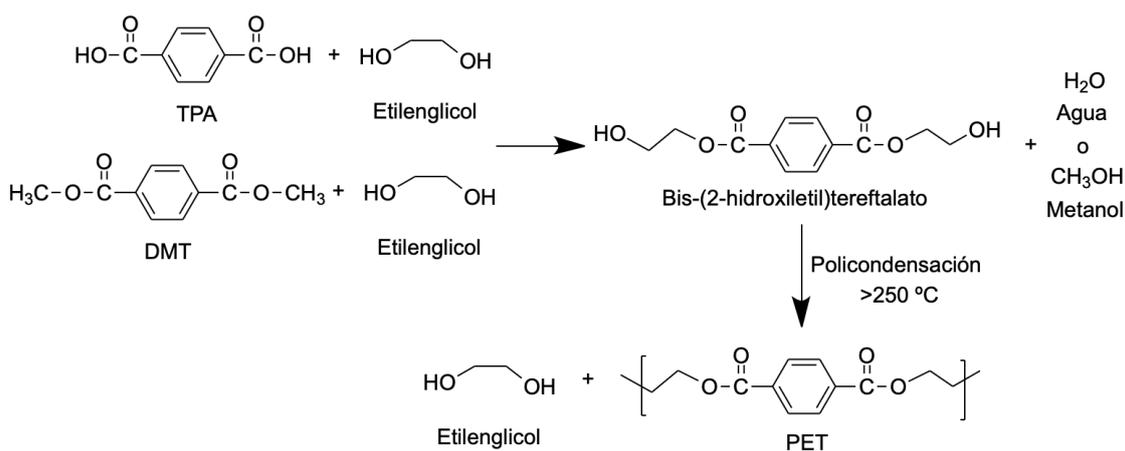


Figura 2. Reacción de síntesis de poli (etilen tereftalato).

Los diferentes tipos de resina de PET se distinguen en el mercado por su viscosidad intrínseca (VI), una medición de la ingeniería que se relaciona con la longitud media de las cadenas poliméricas (Culbert & Christel, 2005). Las resinas de PET con una mayor viscosidad intrínseca (VI) tienden a ser más rígidas y tienen una mayor resistencia a la tracción, así como un mayor valor económico. La VI del PET puede incrementarse a través de un proceso llamado polimerización de estado sólido, en el que las hojuelas de PET se llevan a una temperatura cercana a su punto de fusión durante un período de tiempo prolongado (Chang et al., 1983; Kim et al., 2003).



Las fibras de este polímero aromático son materia prima de un gran número de áreas de aplicación, tales como ropa, muebles para el hogar y textiles de interior, higiene y textiles médicos. Dependiendo del procesado al que se someta el polímero, se puede hilar para formar fibras (dacrón) para fabricar telas y cuerdas de llantas o bien como una película llamada mylar de la que se fabrican cintas magnetofónicas. El PET también se moldea a presión para fabricar las botellas que se usan en la actualidad para el empaquetamiento de bebidas (López, 2004). Se estima que por cada habitante mexicano se producen alrededor de 200 botellas de PET al año, en el año 2022 la producción de este plástico alcanzó los 3.8 millones de toneladas (Plastics Technology México).

5.3 Los desechos plásticos en México

Al igual que en muchos países del mundo México enfrenta un gran reto para atender los numerosos problemas que se han causado en el medio ambiente, ya que estos pueden conducir a la pérdida de ecosistemas terrestres y acuáticos, así como a la aceleración de los efectos del cambio climático. No se debe olvidar la estrecha relación existente entre estos problemas con el bienestar social y el desarrollo económico.

La generación de residuos sólidos urbanos contribuye en gran parte a los problemas medioambientales. Tan solo en México en el año 2015 se produjeron alrededor de 53.1 millones de toneladas de residuos sólidos, de los cuales el 10% correspondía a los desechos plásticos, que son los principales residuos inorgánicos que se generan (SEMARNAT, 2015). La recolección y separación de dichos desechos para su posterior reciclaje contribuye a disminuir el impacto medioambiental reduciendo el número de desechos y el consumo de materia prima, electricidad, agua, entre otros recursos.

Sin embargo, esta situación se vio seriamente afectada con la llegada de la pandemia provocada por el COVID-19, ya que se registró un aumento de hasta 300 por ciento en la generación de desechos, entre los cuales se encuentran los plásticos de un solo uso como botellas de agua, guantes, material sanitario. No fue hasta agosto del 2019 que se logró que todos los estados del país tuvieran una prohibición en cuanto al consumo y comercialización de productos plásticos de un solo uso, en especial de las bolsas plásticas, lo cual se plasmó en la ley hasta 2021 (DOF). Lamentablemente, durante la pandemia se incrementó el uso de plásticos como medida de protección sanitaria y cambios de costumbres como compras a domicilio. (Silva et al, 2021).

5.4 Producción y acumulación de plástico

Desde la invención del plástico su producción ha ido en aumento de manera abismal pues tan solo en 2015 alcanzó un total de 381 millones de toneladas que sumándose a lo acumulado en años anteriores dio un total de 7,800 millones de toneladas, es decir más de una tonelada de plástico por cada habitante vivo del mundo (SEMARNAT, 2020)

5.5 Biodegradación

La biodegradación abarca la pérdida de características estructurales y masa de un material (Zapata, et al, 2007). Este proceso implica la acción de bacterias, hongos, levaduras y sus enzimas que degradan el polímero principal, ocasionando alteraciones significativas en la estructura química del material. Se define como la transformación total de las moléculas del material en dióxido de carbono, agua, sales inorgánicas y otros productos derivados de los procesos metabólicos de microorganismos.

El desarrollo de polímeros o compuestos biodegradables se presenta como una solución a la conservación del medio ambiente. Los poliésteres aromáticos, tales como el PET, son materiales que exhiben excelentes propiedades, como ser casi totalmente resistentes al ataque microbiano.

Debido a la insolubilidad en agua y el tamaño de las moléculas de polímero, los microorganismos no son capaces de interiorizar los polímeros directamente en las células. Primero tiene que excretar enzimas extracelulares que sean capaces de despolimerizar los polímeros fuera de la célula (Figura 3).

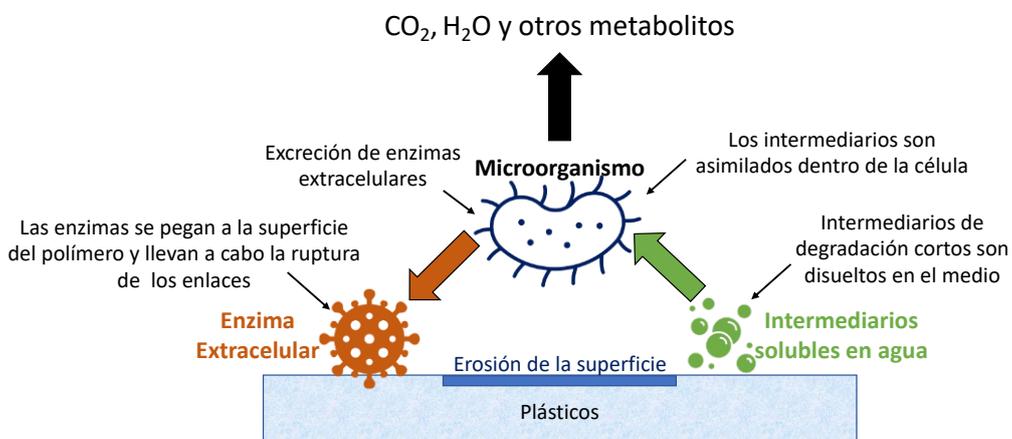


Figura 3. Mecanismo general de biodegradación de plásticos bajo condiciones aerobias (Mueller, 2006).



Durante la degradación, las enzimas extracelulares de los microorganismos descomponen polímeros complejos que producen cadenas cortas o moléculas más pequeñas, proceso conocido como despolimerización (Gu, 2003).

Estos intermediarios pueden ser transportados hacia los microorganismos e introducirse en las vías metabólicas ya que son lo suficientemente pequeños para pasar las membranas semi permeables del microorganismo. Como resultado final, estas moléculas de cadena corta generan nueva biomasa y productos finales como agua, dióxido de carbono, metano (en el caso de la degradación anaeróbica), etc. A estos procesos metabólicos de las cadenas cortas de polímeros se les conoce como mineralización.

Puesto que las enzimas extracelulares se enfrentan al impedimento estérico con la estructura del material, sólo pueden actuar en la superficie del polímero haciendo de la biodegradación de plásticos un proceso clásico de erosión de superficie (Mueller, 2006).

La biodegradabilidad está influenciada por diversos factores, entre los que se incluyen las propiedades del polímero, como su masa molecular, cristalinidad, variedad de grupos funcionales y la presencia de plastificantes o aditivos (Artham & Doble, 2008; Gu, 2003). En general, la degradación de plásticos es comúnmente un proceso de desgaste superficial del polímero.

En este contexto, las cutinasas, enzimas extracelulares que secretan los hongos fitopatógenos para degradar un biopolímero complejo (cutina) que protege a las plantas que atacan, representan una herramienta útil para la degradación de polímeros sintéticos complejos contenidos en los residuos plásticos.

5.6 Cutinasas

Las cutinasas son enzimas de la clase de las serino esterasas que presentan el plegamiento característico de las α/β hidrolasas (Chen et al., 2008). Estas enzimas llevan a cabo la hidrólisis de los enlaces tipo éster que existen en el polímero de cutina (Figura 4), su sustrato natural. Comúnmente están conformadas por alrededor de 200 residuos de aminoácidos en una molécula compacta de un dominio con un tamaño de 45 x 30 x 30 Å, tienen un peso molecular de alrededor de 22 kDa con sus residuos

altamente conservados, que incluyen cuatro cisteínas invariantes, formando dos enlaces disulfuro.

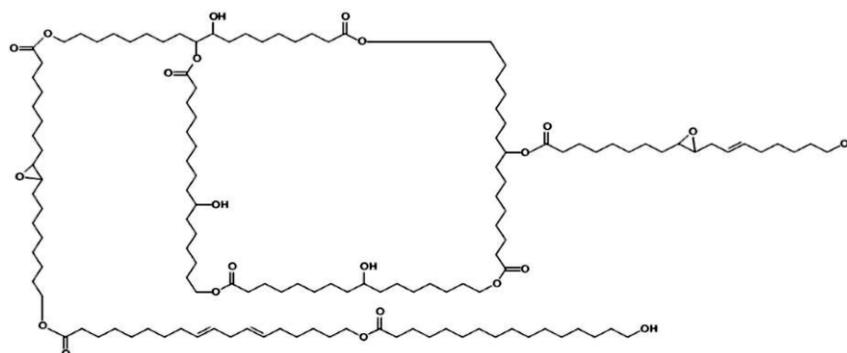


Figura 4. Unidad básica de la estructura de la cutina (Kolattukudy, 1980).

Las particularidades distintivas de las cutinasas se encuentran detalladas en el artículo de Martínez et al. (1994). En su mayor parte, las cutinasas se diferencian de las lipasas por la ausencia de activación interfacial. Esto significa que su unión al sustrato no ocasiona una reorganización en la cadena principal, sino únicamente una realineación de algunas cadenas laterales. Esto se debe a que los lazos (80-87 y 180-188), que contienen aminoácidos hidrofóbicos, podrían constituir el sitio de unión interfacial. Otra característica distintiva es la presencia de una cavidad oxianiónica preformada, la cual no es encontrada en esterasas ni lipasas. Esta cavidad proporciona un entorno electrofílico que estabiliza la carga negativa generada durante el ataque nucleofílico al enlace hidrolizable del sustrato (Castro-ochoa, 2010).

El plegamiento α/β hidrolasa consiste principalmente de una hoja β central paralela de ocho hebras, con la segunda hebra antiparalela. Las hebras paralelas ($\beta 3$ a $\beta 8$) están conectadas por α hélices que rodean por ambos lados a la hoja β central (Jaeger et al., 1999).

El sitio activo de las enzimas con plegamiento α/β hidrolasa, consiste en 3 residuos catalíticos: un residuo nucleofílico un residuo ácido catalítico y un residuo de histidina (Figura 5). La triada catalítica está conformada por los residuos His, Asp y Ser (localizado en el extremo carboxílico de $\beta 5$) (Jaeger et al., 1999).

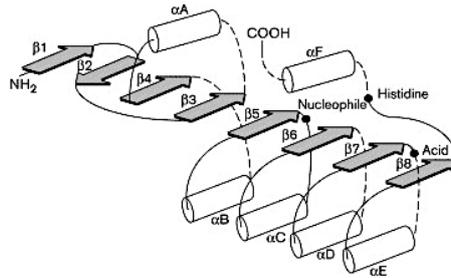


Figura 5. Plegamiento de hidrolasas α/β . Este se compone de unas hojas β centrales rodeada por α -hélices (Jaeger et al., 1999).

El mecanismo de hidrólisis se basa en el residuo de His funcionando como una base y el oxígeno de Ser es quien realiza el ataque nucleofílico al carbonilo del enlace éster del sustrato, que da como resultado un intermediario tetraédrico, estabilizado por medio de puentes de hidrógeno que se forman con los residuos de la cavidad oxianiónica. La histidina sigue actuando como base y provoca la ruptura del enlace éster causando la liberación de alcohol y la formación de la enzima acilada. Posteriormente se realiza la hidrólisis de la enzima acilada, la cual genera como productos ácido graso y enzima libre (Neves Petersen et al., 2001). El mecanismo catalítico se resume en la Figura 6.

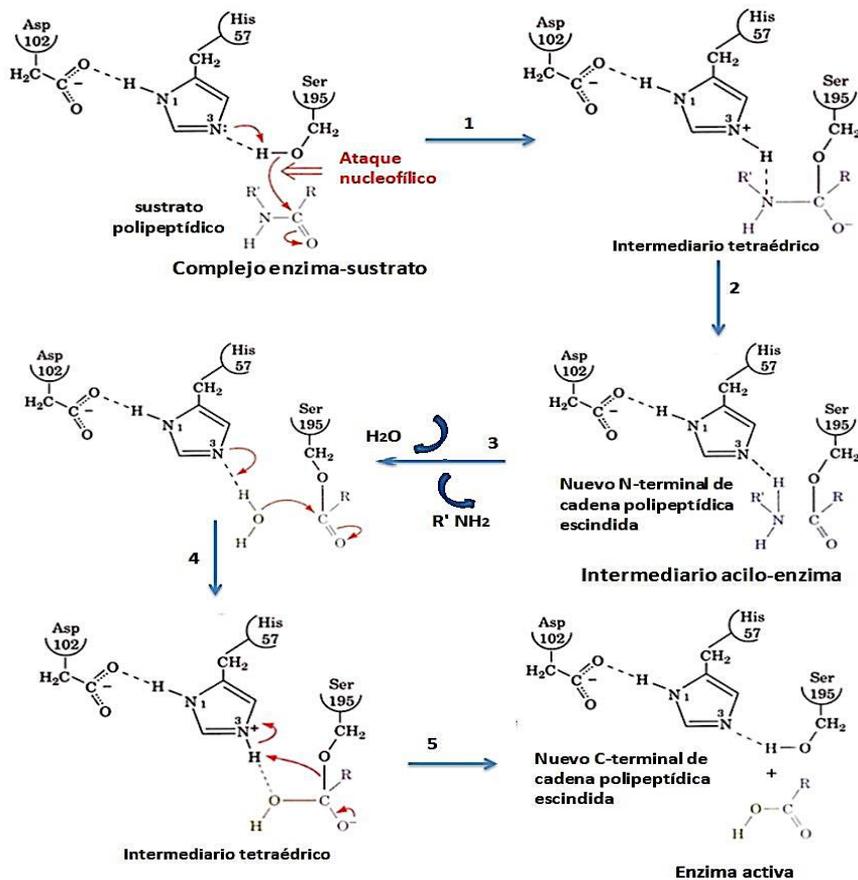




Figura 6. Mecanismo catalítico de serino-proteasas. La reacción comprende 1) el ataque nucleofílico de la Ser del sitio activo en el átomo de carbono carbonilo del enlace peptídico escindible, para formar el intermediario tetraédrico; 2) descomposición del intermediario tetraédrico en el intermediario acilo-enzima mediante catálisis ácida general por el sitio activo His polarizado por Asp; 3) seguido de la pérdida del producto amino y su remplazo por una molécula de agua; 4) la reversión del paso 2 para formar un segundo intermediario tetraédrico y 5) la inversión del paso 1 para obtener el producto carboxilo de la reacción y la enzima activa (Voet et al., 2013).

Además de degradar cutina, se ha demostrado que las cutinasas también son capaces de actuar sobre una amplia variedad de sustratos, incluyendo ésteres solubles de bajo peso molecular o triacilgliceroles de cadena corta o larga (Chen et al., 2013). En medios no acuosos o con baja actividad acuosa pueden catalizar reacciones de síntesis, como esterificación y transesterificación de diferentes sustratos (Bordusa, 2002).

5.6.1 Aplicaciones de las cutinasas

Las reacciones de hidrólisis y síntesis presentadas por las cutinasas tienen uso potencial en productos y procesos industriales.

El uso de las cutinasas está presente en la industria diaria en la hidrólisis de grasas de leche, detergentes, industria oleoquímica, síntesis de triglicéridos, polímeros y surfactantes, síntesis de ingredientes para productos de cuidado personal, síntesis de productos farmacéuticos y agroquímicos (Carvalho et al., 1998).

Las cutinasas tienen una aplicación adicional en la síntesis de biodiesel, que representa una alternativa crucial en comparación con los métodos tradicionales de obtención de combustible. Esto cobra relevancia en vista del aumento de los precios del petróleo y los beneficios ambientales asociados. Se ha llevado a cabo un ejemplo de esta síntesis con una cutinasa extraída de *F. solani pisi* (Badenes et al., 2010).

Las cutinasas han mostrado recientemente su potencial en la modificación de superficies y la degradación de poliésteres alifáticos y aromáticos, con especial énfasis en el poli(etileno) tereftalato (PET). Algunos de los monómeros y oligómeros que se obtienen son el ácido tereftálico (TPA), el etilenglicol (EG), el mono-(2-hidroxietil) tereftalato (MHET), y el bis-(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) figura 7 (Maurya et al., 2020).



Figura 7. Monómeros y oligómeros obtenidos a partir de la degradación del PET por la PETasa.

En el grupo de trabajo se han investigado a nivel laboratorio las condiciones de degradación del PET con diferentes cutinasas. Por ejemplo, Lovera y Torres (Lovera & Torres, 2019) estudiaron las condiciones de reacción de las enzimas ANCUT1 y ANCUT3. Las variables estudiadas fueron: tamaño de partícula, pH y tipo de buffer (Fosfatos de potasio, Fosfatos de sodio y Tris-HCl), concentración de la enzima, combinaciones entre enzimas, temperatura y presencia de sales inorgánicas (KCl, ZnCl₂, NaCl, FeSO₄ y MgSO₄), obteniendo como productos de degradación: TPA y BHET, con rendimientos que van desde 0.035 % a 1.33 % para el TPA y 0.12 % de BHET. Por su parte Llanos (Llanos, 2018) estudió la degradación con ANCUT3 y obtuvo una pérdida de peso de 49.7 % a un pH = 9 (Buffer de Tris-HCl 0.1 M) y a una temperatura de 37 ° C. Mientras que Sánchez (Sánchez, 2015) obtuvo una pérdida de peso del 0.29 % a los 3 días de reacción utilizando un Buffer de fosfatos 50 mM con un pH = 7, una temperatura de 37 ° C y una agitación de 225 rpm.

En general estas reacciones ya han sido estudiadas a nivel laboratorio y se conocen algunas condiciones de reacción en donde la enzima logra descomponer ciertas cantidades de PET. Sin embargo, su estudio en reactores se encuentra todavía en

desarrollo, por ello, el presente trabajo se centrará en estudiar el comportamiento de la enzima en diversas condiciones dentro de un reactor, para posteriormente poder generar el escalamiento a una planta piloto.

La degradación del PET puede observarse mediante diferentes maneras, midiendo el pH del sobrenadante ya que en la degradación se puede dar la liberación de TPA que disminuirá el pH del medio; otra manera sería verificar el cambio de la cristalinidad del polímero ya que al ser atacado por la enzima dependiendo que región del PET (amorfa o cristalina) se hidrolice se verá reflejado en el aumento o disminución de la cristalinidad; la degradación también puede observarse cuantificando la concentración de subproductos formados este estudio puede llevarse a cabo mediante HPLC; también se puede realizar un estudio de microscopia de barrido electrónico (SEM) para observar el PET y verificar si existen indicios de degradación con la disminución del tamaño de partícula.

5.7 Reactores

Un reactor es un equipo diseñado para que en su interior se lleven a cabo una o varias reacciones para la obtención de productos. En general existen dos tipos de reactores: intermitentes (Batch) y de flujo continuo. A continuación, se da una breve explicación de cada uno de ellos.

5.7.1 Reactores intermitentes (Batch)

Un reactor intermitente es un reactor en el cual no existe flujo de entrada y salida (Figura 8), este tipo de reactores son utilizados para procesos a pequeña escala que no han sido desarrollados en su totalidad o para procesos difíciles de tener en operaciones continuas. Su funcionamiento consiste en llenar una sola vez el reactor y dejar que la reacción se lleve a cabo. (Fogler, 2008)

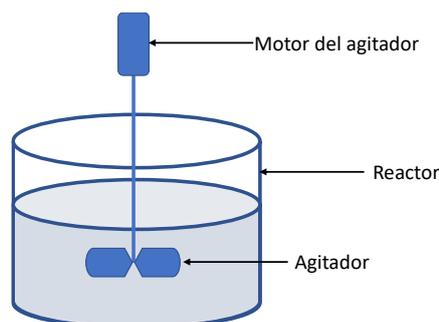




Figura 8. Diagrama de un reactor tipo Batch.

Si se considera la reacción donde A (reactivo) se convierte en B (producto), el cambio en la concentración del reactivo en función del tiempo puede expresarse de la siguiente forma:

$$\frac{dN_A}{dt} = r_A V$$

En donde “ N_A ” son los moles del reactivo, “ r_A ” es la velocidad de reacción del reactivo en $\text{mol L}^{-1} \text{seg}^{-1}$, y “ V ” es el volumen. Haciendo un análisis matemático es posible obtener el tiempo que necesitaría el reactor para convertir la especie A en B (Fogler, 2008).

Este tipo de reactores permite tener una alta conversión, debido a que el reactivo puede permanecer largos periodos dentro del reactor, lo cual se considera una ventaja, sin embargo, este tipo de reactores presentan un alto costo de mano de obra por lote, la variabilidad en la obtención de productos de un lote a otro y la dificultad para una producción industrial (Fogler, 2008).

5.7.2 Reactores de flujo continuo

Este tipo de reactores pueden subclasificarse en 3 categorías: reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR), reactor tubular (PFR) y reactor de lecho empacado (PBR).

5.7.2.1 Reactor continuo de mezcla perfecta (CSTR)

Este tipo de reactor trabaja de manera continua manteniendo una agitación y un flujo constante de entrada de reactivos y salida de productos (Figura 9). Se emplea comúnmente para reacciones en estado líquido, ya que se asume que su contenido se mezcla de manera homogénea, por ello, la temperatura, la concentración, y la velocidad de reacción son iguales en cualquier punto dentro del reactor (Fogler, 2008).

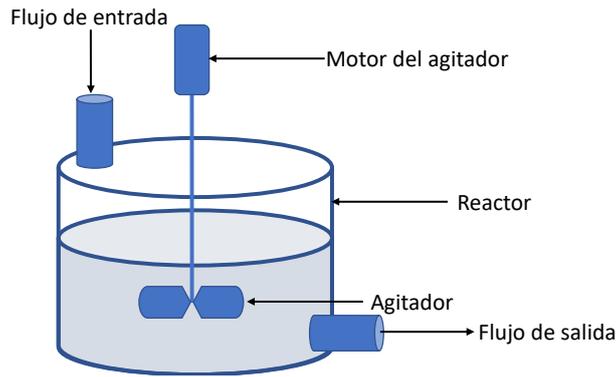


Figura 9. Diagrama de un reactor tipo CSTR.

5.7.2.2 Reactor tubular (PFR)

Este tipo de reactores se emplean con mayor frecuencia para reacciones en estado gaseoso, un reactor tubular consta de un tubo cilíndrico en el cual se adicionan los reactivos en un punto y se obtienen los productos en el otro extremo (Figura 10). Los reactivos se consumen de manera continua a lo largo del reactor y algunas variables como la velocidad y la concentración no dependen del radio del tubo (Fogler, 2008).



Figura 10. Diagrama de un reactor tipo PFR.

5.7.2.3 Reactor de lecho empacado (PBR).

Este tipo de reactores se utilizan comúnmente para reacciones heterogéneas entre un fluido y el catalizador (sólido). Su configuración es muy semejante a la del reactor tubular, con la única diferencia de que en su interior se encuentra “empacado” el catalizador (Figura 11). Durante su funcionamiento los reactivos y productos se cargan y descargan continuamente, teniendo una variación de temperatura, presión y composición con respecto al tiempo (Fogler, 2008).

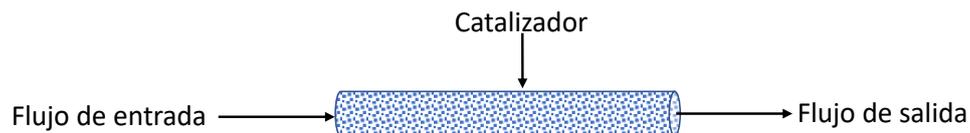


Figura 11. Diagrama de un reactor tipo PBR.



5.7.3 Otros tipos de reactores

Como se mencionó anteriormente, en general existen dos tipos de reactores, los intermitentes y los continuos. Sin embargo, existen otros reactores que se pueden clasificar en función de la reacción que se lleva a cabo, como los reactores enzimáticos, o si producen o soportan algún tipo de microorganismo, como los biorreactores.

5.7.3.1 Biorreactores

Un biorreactor es un dispositivo utilizado para procesos bioquímicos y/o biológicos, producción de enzimas, fermentación, síntesis de proteínas mediante el cultivo de células, bacterias, levaduras u otros microorganismos. Tiene la capacidad de mantener en su interior células vivas o cultivos de tejidos. Este tipo de reactores han tomado importancia ya que muchos productos de la industria química, agrícola y alimenticia se obtienen por biosíntesis (Fogler, 2008).

Se componen principalmente de un recipiente que contiene a los microorganismos vivos, así como los nutrientes necesarios para su crecimiento, el reactor puede estar equipado para monitorear y controlar la temperatura, el pH, la agitación y la aireación. Existen biorreactores Batch y de flujo continuo, y su uso dependen del proceso que se requiera llevar a cabo.

5.7.3.2 Reactores enzimáticos

Un reactor enzimático puede ser cualquier tipo de reactor que utilice una enzima para la obtención del producto deseado, sin embargo, además de las variables antes mencionadas, en estos tipos de reactores se deben considerar otras variables como: la presencia de un intermediario activo, el pH, la desnaturalización de la enzima, la presencia de iones metálicos, la estabilidad del complejo enzima-sustrato, el cambio en la conformación, el mecanismo, la actividad de la enzima, la inhibición, entre otras (Fogler, 2008).

5.7.4 Diseño de reactores

En forma general el diseño de reactores debe llevarse de la siguiente forma:

1. Elegir el tipo de proceso que se llevará a cabo.
2. Elegir el tipo de reactor a utilizar.



3. Especificar las características generales del reactor como: tipo de material, capacidad del reactor, condiciones de operación, etc.
4. Realizar los cálculos estequiométricos y de velocidad para poder determinar el tiempo de reacción (en el caso de reactores Batch) y/o el volumen del reactor.
5. Evaluar las ecuaciones resultantes de la cinética de reacción ya sea de forma analítica o gráfica.
6. Elegir el sistema de control que permita monitorear y ajustar los parámetros de operación.
7. Una vez que se cuente con el diseño, se debe verificar que se cumplen los requisitos de seguridad y operación establecidos.

Los pasos mencionados anteriormente, describen de forma general como debe llevarse un diseño de reactores, sin embargo, se hace necesario tener información documental de la reacción que se va a llevar a cabo o realizar los experimentos necesarios para determinar las constantes de velocidad de la reacción y poder realizar los cálculos pertinentes en el diseño de reactores (Fogler, 2008).

5.7.5 Escalamiento de proceso

En un principio el escalamiento se entendía como el simple hecho de hacer más grandes las cosas, sin embargo, ahora se sabe que ese proceso implica el desarrollo de criterios y reglas para llevar la operación o el objeto de un tamaño dado a otro tamaño ya sea a uno mayor o a uno menor. Escalar un proceso o equipo es convertirlo de su escala de investigación (laboratorio o piloto) a escala industrial (producción) (Anaya & Pedroza, 2008); por lo que a través de la obtención de datos de un trabajo a nivel laboratorio se pueden obtener los datos necesarios para que con una técnica adecuada se defina un proceso a nivel piloto y este a su vez sirva para definir una planta industrial (Figura 12), este último puede alcanzarse sin el uso de un escalamiento a nivel piloto simplemente mediante la cuantificación de los errores dados en los experimentos hasta llegar a una operación de proceso satisfactoria, pero el desarrollo de una planta piloto previo al escalamiento industrial genera una mayor certeza de un proceso productivo ya que permitirá la predicción del comportamiento del proceso a nivel industrial a un bajo costo. Por ello el proceso de escalamiento se puede definir como “la generación del conocimiento para transformar ideas en implementaciones exitosas”, y poder desarrollar criterios y reglas de asignación que determinen las unidades de medida significativas

para poder evaluar y reducir riesgos a niveles aceptables para la implementación exitosa a escala comercial (Anaya & Pedroza, 2008; Harmsen, 2013).

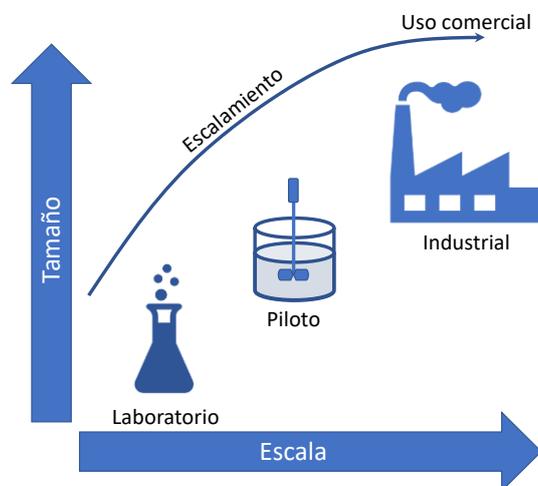


Figura 12. Representación visual de las etapas comúnmente empleadas para el desarrollo de tecnología en procesos (Esquema de elaboración propia).

Con respecto al proceso de degradación de PET enzimáticamente la información es muy escasa e inclusive alguna se encuentra protegida con patentes. Uno de los ejemplos más relevantes es la empresa de origen francés “Carbios” que desde mediados del 2011 se ha dedicado tanto a la innovación de productos plásticos biodegradables como a la degradación vía enzimática de botellas de PET usando enzimas que ellos mismos han producido.

Por lo mencionado anteriormente es que en este trabajo se pretende llevar a cabo una primera aproximación a la degradación enzimática de PET en reactor por lotes de 300 mL empleando la cutinasa recombinante ANCUT1 producida en *Pichia pastoris*. Se aprovechará el control de temperatura y se determinará el efecto de la agitación en la reacción.

6. Metodología experimental

6.1 Producción de las disoluciones stock

Las disoluciones stock se obtuvieron de la siguiente forma:

- YNB (Yeast Nitrogen Base) 10X: Se disolvieron 13.4 g de YNB en 100 mL de agua desionizada, se filtró y almacenó a 4°C.



- Biotina 500X: Se disolvieron 10 mg de Biotina en 50 mL de agua desionizada, se filtró y almacenó a 4 °C.
- Metanol 20X: Se agregaron 10 mL de metanol (99.8%) a 95 mL de agua desionizada, se filtró y almacenó a 4 °C.
- Dextrosa 10X: Se disolvieron 20 g de dextrosa (glucosa) con 100 mL de agua desionizada, se filtró y almacenó a 4 °C.
- Glicerol 10X: Se agregó 1 mL de glicerol a 90 mL de agua desionizada y se esterilizó por autoclave.
- Buffer de fosfatos de potasio 100 mM, pH = 6.0: Se pesaron 129.2100 g de Fosfato monopotásico (KH_2PO_4) y 10.27 g de Fosfato dipotásico (K_2HPO_4), se disolvieron en 700 mL de agua desionizada y se ajustó el pH a 6 con la adición de Hidróxido de potasio (KOH), una vez alcanzado el valor de pH la disolución se aforó a 1000 mL.
- Buffer Tris-HCl 50 mM, pH = 9: Se pesaron 6.0560 g de tris(hidroximetil)aminometano ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$) también conocido como Tris base, y se disolvieron en 700 mL de agua desionizada, se ajustó el pH a 9 con HCl concentrado y se aforó a 1000 mL.
- Buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 7 o 9: Se pesaron 0.1200 g de Fosfato de sodio monobásico y 13.2900 g de Fosfato de sodio dibásico, se disolvieron en 700 mL de agua desionizada, se ajustó el pH (7 o 9) con Hidróxido de sodio (NaOH) 2 M y se aforó a 1000 mL.

6.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados durante el proyecto fueron YPD, BMGY y BMMY, los cuales se prepararon de la siguiente forma:

6.2.1 Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

Para 1 L de medio se disolvieron 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa en agua desionizada, luego se esterilizó en autoclave.

6.2.2 Medio BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)

Para 1 L de medio BMGY se disolvieron 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 mL de agua. Posteriormente el matraz con la disolución se esterilizó en



autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez enfriado el matraz se agregaron las siguientes disoluciones:

- 100 ml de buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH = 6.
- 100 ml de medio YNB 13.4 % m/V.
- 2 ml de Biotina 0.2 % m/V.
- 100 ml de glicerol 10 % m/V

Se mezcló bien y se almacenó a 4 ° C.

6.2.3 Medio YP (Yeast Extract Peptone)

Para 1 L de medio se disolvieron 14.3 g de extracto de levadura y 28.6 g de peptona en agua desionizada, luego se esterilizó en autoclave.

6.2.4 Medio BMMY (Buffered Methanol-complex Medium)

Para 1 L de medio se disolvieron 10 g de extracto de levadura y 20 g de peptona en 700 mL de agua. Después el matraz con la disolución se esterilizó en autoclave y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez enfriado se agregaron las siguientes disoluciones:

- 100 ml de buffer de fosfato de potasio 100 mM, pH = 6.
- 100 ml de medio YNB 10X.
- 2 ml de Biotina 500X.

Se mezcló bien y se almacenó a 4 ° C.

6.3 Producción de la enzima ANCUT1

6.3.1 Activación de la cepa *Pichia pastoris* X33 con ANCUT1

Previo a la manipulación todo el material se esterilizó en una autoclave a 121 ° C durante 15 min con 1 atm de presión. Se prepararon los medios de cultivo (YPD, BMGY y BMMY) y las soluciones stock. Para activar la cepa se inocularon 200 µL de *Pichia pastoris* X33 con ANCUT1 en 25 mL de medio YPD. El matraz se dejó incubando a 300 rpm durante 24 h a 29 ° C.



6.3.2 Producción de biomasa

Una vez activada la cepa, se agregaron 25 mL del medio BMGY y se dejó el matraz con agitación a 300 rpm durante 24 h a 29 ° C para la producción de biomasa. Pasado el tiempo establecido, el contenido se colocó en un tubo Falcon y se centrifugó por 10 min a 7500 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento recuperado se resuspendió con 10 mL del medio YP en un vórtex.

La mezcla obtenida nuevamente se centrifugó por 10 min a 7500 rpm. Se desechó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 32 mL del medio YP.

6.3.3 Inducción de la enzima

De la suspensión anterior se tomó una alícuota de 500 μ L y se colocó en una celda de vidrio con un paso de 1 cm, al cual se le agregó posteriormente 1.5 mL de agua esterilizada. En un espectrofotómetro se determinó la densidad óptica a 600 nm. Con el valor de la absorbancia obtenida se realizó el cálculo para obtener una densidad óptica de 1 con 25 mL del medio BMMY y un volumen del medio YP de la sección anterior.

A la mezcla anterior se le agregaron 750 μ L de metanol (99.8 %) para inducir la producción de la enzima. La mezcla se incubó a 29 ° C con una agitación de 300 rpm durante 48 h. A la mitad del tiempo se adicionaron otros 750 μ L de metanol (99.8 %)

Al finalizar, el contenido se centrifugó a 7500 rpm por 10 min y se recuperó el sobrenadante en donde ya se encontraba la enzima de interés.

6.4 Cuantificación de la actividad enzimática en microplaca (p-nitrofenilacetato)

La actividad de esterasa se cuantificó usando como sustrato p-nitrofenilacetato (p-NFA), para el blanco se añadieron 180 μ L de buffer Tris-HCl 50 mM pH = 9 y 20 μ L de p-nitrofenilacetato 1 mM y para el caso de la muestra se colocaron 170 μ L del mismo buffer, 10 μ L de la muestra y 20 μ L de sustrato. La reacción se siguió durante 10 minutos tomando la lectura cada minuto en un espectrofotómetro Epoch (Biotek) a una absorbancia de 420 nm (Bornscheuer et al., 2005; Nawani et al., 2006).

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.



6.5 Cuantificación de proteínas en microplaca

La cantidad de proteína se determinó por el método de Bradford cuya sensibilidad es de 1-100 μg (Bradford, 1976; Whiteley & Lee, 2006). Se colocaron en la microplaca 160 μL de muestra, 40 μL del reactivo de Bradford (Bio Rad) y un blanco con 160 μL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM pH = 7 y 40 μL de dicho reactivo, todo se mezcló perfectamente y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. El color generado se cuantificó en el lector Epoch (Biotek) utilizando el software Gen5 1.10, a una longitud de onda de 595 nm.

Dependiendo de la cantidad de proteína presente, se realizaron las diluciones pertinentes para que la lectura de absorbancia entrara en un intervalo confiable de una curva estándar preparada con albúmina sérica.

6.6 Determinación de la actividad enzimática en geles de poliacrilamida

6.6.1 Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se utilizó como detergente dodecil sulfato de sodio (SDS) y como agente reductor el β -mercaptoetanol, siguiendo la técnica descrita por Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando un gel concentrador al 4 % y un gel separador al 14 %. Las muestras de extracto crudo se trataron previamente con un buffer de carga 4x con β -mercaptoetanol y se calentaron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Como referencia se utilizó un marcador de bajo peso molecular (97 a 14 kDa, Bio Rad). Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis a 80 V (MiniProtean II y IV, Bio Rad), después de 30 minutos se aumentó a 120 V y se disminuyó la temperatura a 4 °C con buffer 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 por 4 horas, después se lavaron con solución desteñidora (20 % de Metanol, 15 % de Ácido acético y agua desionizada) para retirar el exceso.

6.6.2 Zimograma

Para observar la actividad esterasa de las enzimas se realizaron geles de poliacrilamida sin β -mercaptoetanol bajo las mismas condiciones ya descritas anteriormente, pero sin



calentar. Para observar la actividad se prepararon zimogramas siguiendo la metodología planteada por Karpushova (Karpushova et al., 2005).

Una vez llevada a cabo la electroforesis, el gel se incubó durante 30 minutos en una solución de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 7, posteriormente se cambió la solución a buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 7 con Tritón X100 al 5 % y se dejó durante 30 minutos para renaturalizar la enzima. Pasado este tiempo se cambió la solución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (Solución A) durante 30 minutos en agitación, transcurrido el tiempo se retiró la solución, se lavaron los geles con agua destilada y finalmente se añadió la solución de Fast Red (Solución B) hasta que se observarán las bandas color marrón que presentan actividad enzimática.

- Solución A: Se pesaron 10 mg de α -Naftil acetato, se disolvieron en 2.5 mL de acetona y se llevaron a un volumen de 25 mL con buffer de fosfatos de sodio 50 mM a pH = 7.
- Solución B: Se pesaron 10 mg de Fast Red TR, se agregaron 10 μ L de Tritón X100 y se llevaron a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos de sodio 50 mM a pH = 7.

6.7 Pretratamiento mecánico de las botellas de PET

Se utilizaron botellas de la marca Epura ya que en su proceso de producción no le agregan colorantes, de diferentes presentaciones (10 L, 1 L, 500 mL y 350 mL). Estas fueron cortadas manualmente en pequeños cuadros, retirando la etiqueta, la boca y la base de la botella. Posteriormente se molió en una licuadora industrial (Oster) hasta la obtención de un polvo fino que fue tamizado para obtener un tamaño de partícula estandarizado de los tamices 50, 60 y 80.

6.8 Reacción de degradación de PET en reactor

6.8.1 Diseño de reactor

Con base en lo mencionado en la sección 5.7.4 la propuesta del reactor se llevó a cabo de la siguiente forma:

1. El tipo de proceso: reacción enzimática para la degradación del PET, dicha reacción ya se ha estudiado a nivel laboratorio con materiales de vidrio.



2. Con base en lo anterior se decidió proponer el uso de un reactor tipo Batch para estudiar los efectos de la temperatura, el tamaño de partícula, la agitación, el pH, concentración de enzima y medio de reacción.
3. Debido a que se estudiaría el efecto de la temperatura y la agitación, el reactor propuesto debía contar con un control de temperatura y agitación, además, el reactor debía estar hecho de vidrio o de acero inoxidable con una capacidad máxima de 1L.
4. En este paso no fue posible estimar el tiempo de reacción para una conversión total debido a la falta de información cinética de la reacción. Sin embargo, se presenta en la Tabla 1 un resumen de las ecuaciones que se podrían utilizar para un próximo diseño, en donde: t_R , es el tiempo de reacción, r_A , es la velocidad de reacción del reactivo A, V , es el volumen, N_A , es la cantidad inicial de A en mol, k , es la constante de velocidad de la reacción, C_A , es la concentración del reactivo A, y X , es el factor de conversión.
5. Por último, el reactor deberá cumplir con los requisitos de seguridad y control.(Fogler, 2008)

Tabla 1: Algoritmo para estimar tiempos de reacción en un reactor tipo Batch.

Balance molar	$\frac{dX}{dt_R} = \frac{-r_A}{N_A} V$	
Ley de velocidad	de primer orden $-r_A = kC_A$	de segundo orden $-r_A = kC_A^2$
Estequiometria ($V = V_0$)	$C_A = \frac{N_A}{V_0} = C_{A0}(1 - X)$	
Combinación de las ecuaciones de la relación estequiométrica con la ley de velocidad y el balance molar	$\frac{dX}{dt_R} = k(1 - X)$	$\frac{dX}{dt_R} = kC_{A0}(1 - X)^2$
Evaluación de las ecuaciones resultantes en el paso anterior	$t_R = \frac{1}{k} \ln \frac{1}{1 - X}$	$t_R = \frac{X}{kC_{A0}(1 - X)}$

Con base en lo anterior la propuesta de reactor para estudiar la degradación de PET en escala piloto se muestra en la Figura 13. Se empleó un reactor existente en el laboratorio 110, Edif. B de la Facultad de Química, que contaba con las características planteadas en el diseño de reactor.

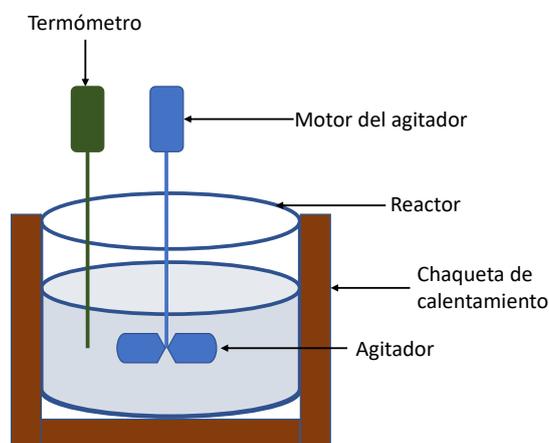


Figura 13. Representación del reactor propuesto para el estudio de la degradación de PET.

Se realizó la reacción de degradación de PET en un Reactor de presión PARR No. 4842 de 300 mL (Figura 14). El reactor estaba equipado con un sistema de control de temperatura digital, un agitador y un manómetro. Para iniciar se lavó y secó perfectamente el vaso del reactor, posteriormente se añadió el PET molido y tamizado previamente, después se incorporó el buffer (Tris-HCl o fosfatos de sodio), seguido de la disolución de cloruro de sodio.



Figura 14. Fotografía del reactor utilizado durante las pruebas.

Una vez agregadas las enzimas y los medios, el reactor se cerró y se colocó dentro de la camisa de calentamiento. Con un termostato se programaron las condiciones deseadas de temperatura y agitación. Las reacciones se llevaron a cabo por lotes modificando las condiciones que se estudiarían. A continuación, se describen las diferentes condiciones estudiadas.

6.8.2 Efecto del buffer en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor

Para estudiar el efecto del buffer en la degradación del PET con ANCUT1 se utilizaron los buffers de Tris-HCl 50 mM, pH = 9 y de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9. En ambos casos se agregaron al reactor 85 mL del buffer a estudiar, 10 mL de disolución de NaCl 1 mM, 5 g de PET obtenido con tamiz 50 y 5000 U de la enzima ANCUT1, el sistema se dejó reaccionando a 35 ° C, durante 7 días con agitación de 50 rpm. Al terminar las reacciones, se filtró y se pesó el PET residual, mientras que una alícuota del sobrenadante se envió a HPLC para la cuantificación de los productos (Sección 6.10.1). Las muestras de PET residual y del PET sin reaccionar se enviaron a Difracción de Rayos X (Sección 6.10.2).

6.8.3 Efecto de la agitación en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor

Debido a los resultados obtenidos en la sección anterior se estudió el efecto de la agitación en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor, para ello se colocaron 3



reacciones a diferentes velocidades de agitación (50, 100 y 200 rpm), en todos los casos se utilizaron 85 mL del buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9, 10 mL de disolución de NaCl 1 mM, 5 g de PET obtenido con tamiz 50 y 5000 U de la enzima ANCUT1, se dejó la reacción a 35 ° C durante 7 días. Al terminar las reacciones, se filtró y se pesó el PET residual, mientras que una alícuota del sobrenadante se envió a HPLC para la cuantificación de los productos (Sección 6.10.1). Las muestras de PET residual y del PET sin reaccionar se enviaron a Difracción de Rayos X (Sección 6.10.2).

6.8.4 Efecto del tamaño de partícula en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor

Para evaluar el efecto del tamaño de partícula en la degradación de PET con ANCUT1 se llevaron a cabo dos reacciones con PET de diferentes tamaños, el primero obtenido del tamiz 50 (300 μ m) y el segundo obtenido con el tamiz 80 (180 μ m); las cantidades utilizadas y las condiciones de reacción fueron: 85 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9; 10 mL de disolución de NaCl 1 mM; 5 g de PET y 5000 U de ANCUT1, la reacción se dejó a 35 ° C durante 7 días con una agitación de 50 rpm. Al terminar las reacciones, se filtró y se pesó el PET residual, mientras que una alícuota del sobrenadante se envió a HPLC para la cuantificación de los productos (Sección 6.10.1). Las muestras de PET residual y del PET sin reaccionar se enviaron a Difracción de Rayos X (Sección 6.10.2).

6.8.5 Efecto de la temperatura y de la concentración de enzima en la masa residual y pH en la degradación de PET en reactor

Debido a que la temperatura de transición vítrea del PET es de aproximadamente 80°C y de 60-65 °C cuando está en solución, se decidió realizar un estudio de cinética enzimática a 60 ° C con tres condiciones, en la primera se utilizaron 20 mL de extracto de la enzima ANCUT1, en la segunda se mezclaron 1 mL la enzima en 9 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9, y en el último caso se utilizaron 1 mL de la enzima y 19 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9, en todos los casos se adicionó 1 ml de NaCl 1mM; las mezclas se dejaron a la temperatura indicada previamente durante 96 h realizando muestreos para determinar la actividad enzimática (sección 6.4) cada 3 h las primeras 12 h, y después cada 12 h. Posteriormente se llevaron a cabo las reacciones a 35 y 60 ° C en el reactor. En cada caso se agregaron 85 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9; 10 mL de disolución de NaCl 1 mM; 5 g de PET



obtenido con la malla 50 y 5000 U de la enzima ANCUT1, ambas reacciones se dejaron durante 7 días con una agitación de 50 rpm.

Por otro lado, para estudiar el efecto de la concentración de la enzima, se llevaron a cabo 2 reacciones, en la primera se utilizaron 85 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9; 10 mL de disolución de NaCl 1 mM; 5 g de PET obtenido con la malla 50 y 5000 U de la enzima ANCUT1; en la segunda reacción se utilizaron 45 mL de buffer de fosfatos de sodio 50 mM, pH = 9; 10 mL de disolución de NaCl 1 mM; 5 g de PET obtenido con la malla 50 y 45000 U de la enzima ANCUT1; ambas reacciones se dejaron a 35 ° C durante 7 días con una agitación de 50 rpm.

En todos los casos se determinó únicamente la masa del PET residual y el pH final de la disolución.

6.9 Evaluación de los cambios por la degradación de PET

6.9.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa

Los estudios de HPLC se llevaron a cabo en un Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución Modelo 1200 acoplado a un Espectrómetro de Masas Triple Cuadrupolo Modelo 6410 ambos Marca Agilent Technologies con una columna Chromolith RP-18e, 50-4.6 mm, de Phenomenex + precolumna; Security Guard, PN; KJ0-4282 de Penomenex fase móvil agua:acetonitrilo (4:6) flujo:0.1 mL/min DAD a 244 nm.

El espectrómetro de masas tenía las siguientes características: Modo de Ionización por ESI (Ionización por Electrospray); MS Scan, MS/MS Product Ion Scan, MRM, MS/MS Neutral Loss, Gain scan, Precursor Ion Scan y SIM; Polaridad positiva y negativa; Intervalo de Masas de 0 a 1650 m/z.

Al término de la reacción, los sobrenadantes se trataron con una solución de acetato de amonio para precipitar la proteína. Se agitaron en el Vortex, hasta obtener una mezcla homogénea, se congelaron a -20 °C por una noche, se centrifugaron durante 10 minutos a 7500 rpm y se desechó el pellet formado.

Los tiempos de retención obtenidos por las muestras fueron comparados con los tiempos de retención obtenidos de estándares puros de TPA (Sigma 99%), BHET (Aldrich 87%) y el DMT (Sigma 99%). Las concentraciones de los productos se obtuvieron a partir de las curvas de calibración de cada uno de los estándares (Anexo 1).



Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación e Industria (USAII) por la Q.F.B Margarita Guzmán Villanueva.

6.9.2 Difracción de Rayos X (DFX) de polvos

Al término de las reacciones se filtraron al vacío los sobrenadantes para separar el PET residual. Para los estudios de DFX se envió 1 g de cada muestra junto con 1 g del PET utilizado en cada caso. Las muestras fueron evaluadas en un Difractómetro de Rayos X, modelo D8 Advance Davinvi con configuración Theta-Theta de la marca Bruker AXS. En todos los casos se utilizó una lampara de Cu ($k_{\alpha} = 1.5418 \text{ \AA}$) para la generación de los Rayos X.

Estos análisis fueron realizados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación e Industria (USAII) por la Q.I María Cecilia Salcedo Luna.

7. Resultados y discusión

7.1 Producción de ANCUT1

Siguiendo la metodología descrita en la sección 6 se logró producir la enzima ANCUT1 con una actividad promedio de 1000 U/mL y se confirmó su obtención con la ayuda de los geles de poliacrilamida. En la Figura 15 se muestra del lado izquierdo el marcador molecular utilizado para comparar la posición de la banda asociada con el peso molecular de la proteína de interés. Para la ANCUT1 se ha reportado un peso molecular teórico de 22.4 kDa (Bastida, 2018) por lo tanto se esperaba que la banda obtenida por electroforesis de la muestra apareciera cerca de la posición de 21.5 kDa del marcador molecular. En el centro de la Figura 15 se muestra el gel de electroforesis del extracto de ANCUT1 obtenido con la metodología de Laemmli, como se observa se presentó una banda alrededor de 22 kDa y que al realizar el zimograma con la metodología de Karpushova se observa una banda de color marrón oscuro intensa que indica la actividad esterasa de la proteína, por lo que con base en lo dicho anteriormente se puede decir que se obtuvo la enzima de interés.

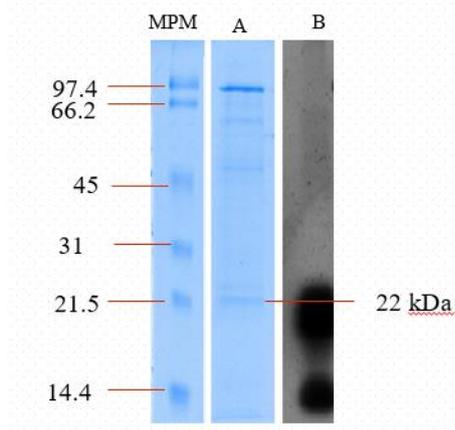


Figura 15. Carril A: Perfil de proteínas del extracto crudo de *P. pastoris* recombinante conteniendo ANCUT1 en SDS-PAGE teñido con azul de Comassie. Carril B: Zimograma con actividad de esterasa utilizando α -NA como sustrato. Carril MPM: Marcador de peso molecular (Low range, BioRad).

Los resultados mostrados anteriormente corresponden a uno de los lotes de producción realizados durante el proyecto. Estos lotes se obtenían cada vez que se estudiaban diferentes condiciones de reacción en el reactor, por lo que se omite los resultados de otros lotes.

7.2 Degradación de PET en el reactor

7.2.1 Efecto del buffer en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor

En la Tabla 2 se muestran las cantidades de TPA, DMT y BHET obtenidas después de las reacciones con los buffers de Tris-HCl y de fosfatos de sodio. Como se puede observar en ambos casos se pudieron obtener los productos esperados de la degradación del PET, sin embargo, al utilizar el buffer de fosfatos de sodio se obtuvieron cantidades mayores de productos de degradación. En el caso de la reacción con el buffer de Tris-HCl se observa una tendencia de la enzima a formar mayoritariamente TPA con respecto a BHET, con respecto al buffer de fosfatos de sodio, aunque la cantidad de BHET que se produce es mayor a lo obtenido con el Buffer Tris-HCl la cantidad de TPA que se produce es aproximadamente el doble.



Tabla 2. Productos de degradación obtenidos con ANCUT1 con diferentes buffers.

Buffer	[TPA] ppm	[BHET] ppm
Buffer Tris-HCl	6.74	0.47
Buffer de fosfatos de sodio	16.50	8.10

En cuanto a las masas recuperadas, en el caso de fosfatos de sodio se obtuvieron 4.5 g de PET residual que corresponden a una pérdida del 10 %, mientras que con el buffer de Tris-HCl se recuperaron 4.475 g, que corresponden a una pérdida del 10.5 %. En ambos casos se están perdiendo masas semejantes, sin embargo, no se están obteniendo cantidades de TPA y BHET similares, lo que sugiere que la presencia del buffer Tris-HCl hace que la enzima degrade el PET en otros oligómeros que no fueron cuantificados. Por otra parte, los valores de pH obtenidos al finalizar las reacciones fueron de 7.43 al utilizar el buffer de fosfatos de sodio y 7.98 con el otro buffer. Estos valores concuerdan con la presencia de TPA, ya que dicha molécula presenta un carácter ácido, por lo que a mayores concentraciones se esperaría un decremento del pH. Una mayor obtención de productos de degradación del PET utilizando el buffer de fosfatos de sodio puede deberse a la interacción de los iones de sodio que mejoran la afinidad de la cutinasa al sustrato, pero para poder obtener más datos se debería llevar a cabo la reacción sin adicionarle la solución de NaCl 1 mM.

Durante esta prueba que se realizó durante cuatro semanas se tomaron alícuotas cada 7 días a las cuales se les medía el pH y se determinaba la concentración de subproductos mediante HPLC, se visualizó que a partir de los 7 días el pH ya no cambiaba ni la concentración de los subproductos por lo que demás pruebas se fijaron a ese tiempo de reacción.

En la Figura 16 se muestran los difractogramas del PET residual obtenido con los dos buffers y del PET sin reaccionar utilizado en ambos casos. Como se puede observar el PET en el medio de reacción con el buffer de Tris-HCl disminuyó su cristalinidad, lo cual sugiere una afinidad de la enzima ANCUT1 hacía la fase cristalina en estas condiciones, mientras que en el caso del buffer de fosfatos de sodio se observa un ligero incremento en la cristalinidad de la muestra ya que la intensidad de los picos aumentó en los grados característicos de la estructura del PET, lo que sugiere una

afinidad a la fase amorfa. Con base en estos resultados se puede decir que la afinidad de la enzima hacía la fase cristalina o amorfa puede ser modulada cambiando el buffer, cabe resaltar que este cambio en la afinidad es debido probablemente a la presencia de ciertos iones ya que en ambos casos el pH es el mismo.

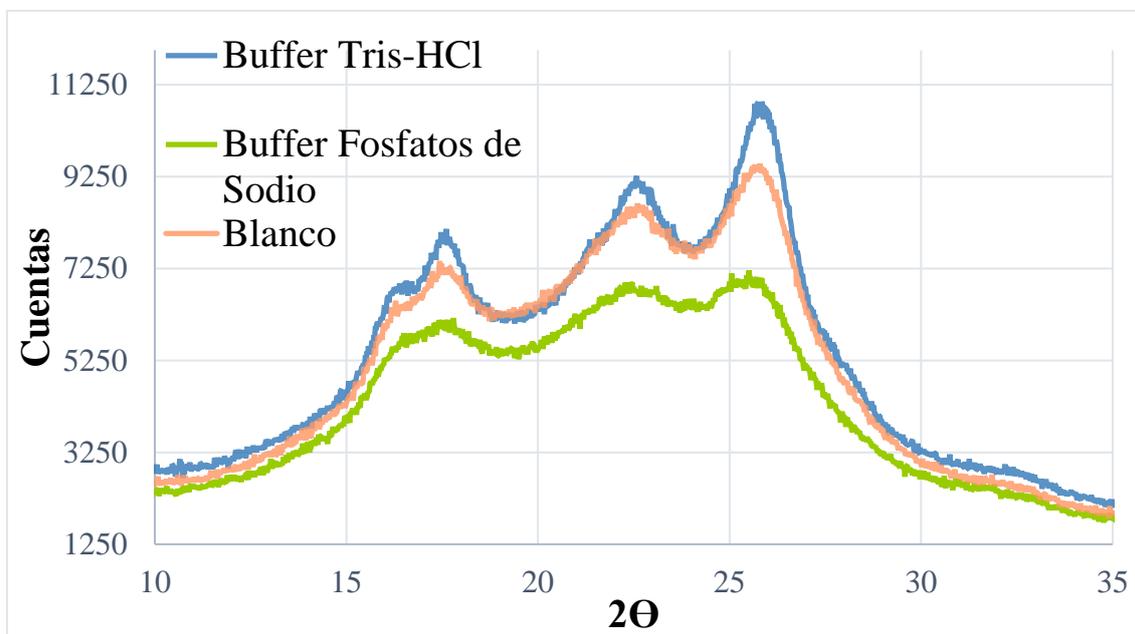


Figura 16. Diffractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación con BPS (verde); del PET residual después de la reacción de degradación con Buffer Tris HCl (azul) y del PET sin recibir tratamiento (rosa).

7.2.2 Efecto de la agitación en la degradación de PET con AN CUT1 en reactor

En la Tabla 3 se muestran las concentraciones de TPA y BHET al modificar la velocidad de agitación en la reacción de degradación. Como se puede observar al incrementar la velocidad de agitación las cantidades de productos de degradación disminuyen, esto debido probablemente a que la enzima no alcanza a acoplarse con el PET debido al movimiento de la disolución.

Las masas obtenidas de PET residual para 50, 100 y 200 rpm fueron de 4.5 g, 4.78 g y 4.87 g, respectivamente. Como se observa la cantidad de PET degradado es congruente con los datos de HPLC, en donde a una menor velocidad de agitación hay una mayor degradación de PET y por lo tanto una mayor pérdida de masa.



Los valores de pH al finalizar las reacciones fueron 7.43, 7.45 y 7.71, para 50, 100 y 200 rpm respectivamente, lo cual es coherente con lo descrito anteriormente.

Tabla 3. Productos obtenidos al modificar la velocidad de agitación.

Velocidad (rpm)	[TPA] ppm	[BHET] ppm
50	16.51	8.10
100	2.41	3.88
200	1.22	0.60

En la Figura 17 se observan los difractogramas del PET sin reaccionar y del PET residual obtenido con la enzima ANCUT1 a diferentes velocidades de agitación. Como se puede observar existe un cambio en la presencia de ciertas familias de planos. Para las familias (0-11) y (010) se observa un incremento de las cuentas al aumentar la velocidad de agitación, por otro lado, para las familias (1-10) y (100) se observa un aumento en las cuentas cuando la velocidad de agitación es de 50 rpm, mientras que para las otras velocidades se observa un decremento en función de la velocidad de agitación. Además, para las velocidades de agitación de 100 y 200 rpm se observa la aparición de un nuevo pico a 21.4° que se relaciona con la familia de planos (-111) proveniente de la estructura del PET (Mallick, 2015).

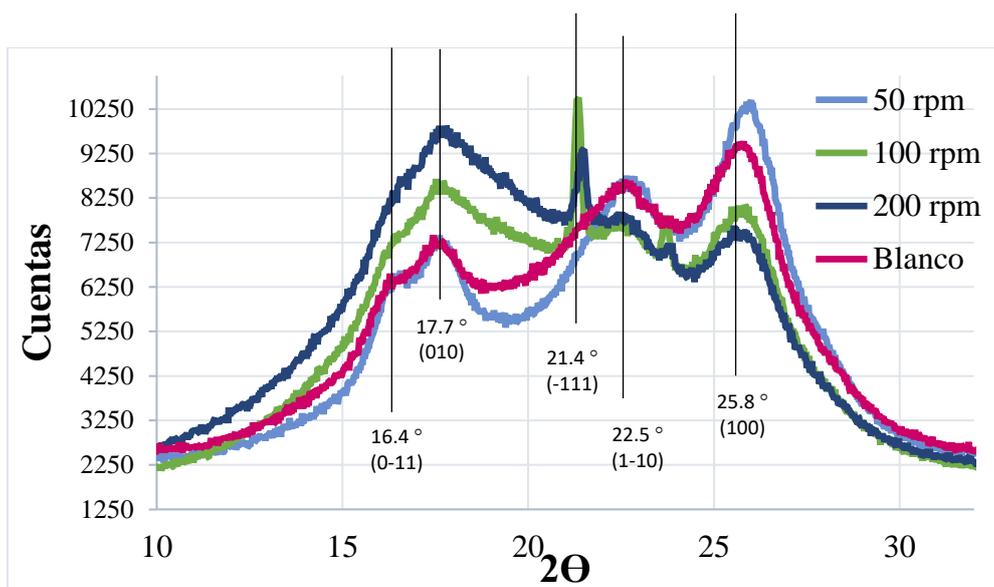


Figura 17. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación a 50 rpm (azul cielo); del PET residual después de la reacción de degradación a 100 rpm (verde); del PET después de la reacción de degradación a 200 rpm (azul marino) y del PET sin recibir tratamiento (magenta).

La variación de las cuentas en todos los casos puede estar relacionada con la actividad de la enzima y la disminución del tamaño de partícula debido al uso de una propela metálica para la agitación, ya que esta última puede estar generando partículas más finas y por lo tanto exponiendo las familias de planos mencionadas anteriormente.

7.2.3 Efecto del tamaño de partícula en la degradación de PET con ANCUT1 en reactor

En la Tabla 4 se muestran las concentraciones de los productos de degradación determinados por HPLC. Como se observa, al disminuir el tamaño de partícula hay un aumento en las cantidades de TPA y BHET obtenidas, lo que indica que al disminuir el tamaño aumenta el área superficial permitiendo de mejor manera la efectiva adsorción de la enzima aumentando el rendimiento catalítico de la misma para degradar al polímero. Sin embargo, obtener la fracción del tamiz #80, implica un gasto energético muy alto, además de obtener una cantidad minúscula con respecto a las demás, por consiguiente, el hecho de que la fracción del tamiz #50 no presente una gran diferencia en la obtención de productos de degradación resulta una ventaja ya que el manejar tamaños de partículas más grandes implica un pretratamiento menos costoso.



Tabla 4. Productos obtenidos al modificar el tamaño de partícula.

No. de tamiz	Tamaño (μm)	[TPA] ppm	[BHET] ppm
80	180	16.5	8.1
50	300	11.3	5.0

En cuanto a las masas de PET residual se obtuvieron 4.6 g con el PET del tamiz 50 y 4.5 g con el PET del tamiz 80. Las pérdidas en ambos casos fueron semejantes y congruentes con las cantidades de los productos de degradación. Por otra parte, los valores de pH al finalizar las reacciones fueron de 7.65 al utilizar el tamiz 50 y 7.43 con el otro tamiz, estos valores siguen siendo coherentes con lo mencionado en secciones anteriores.

En la Figura 18 se observan los difractogramas de las muestras de PET sin reaccionar y de las muestras de PET residual obtenidas con diferentes tamices. Como se observa, en el caso del tamiz 50 no existe un gran cambio en la cristalinidad de la muestra, por otra el difractograma del tamiz 80 muestra una ligera disminución de la cristalinidad, lo que indica una afinidad de la enzima hacia la fase cristalina cuando el tamaño de partícula es más pequeño, además se observa la aparición de otros picos alrededor de $2\Theta = 30.7$, 30.9 y 31 que podrían corresponder a cristales de TPA que podría haberse depositado en el PET residual.

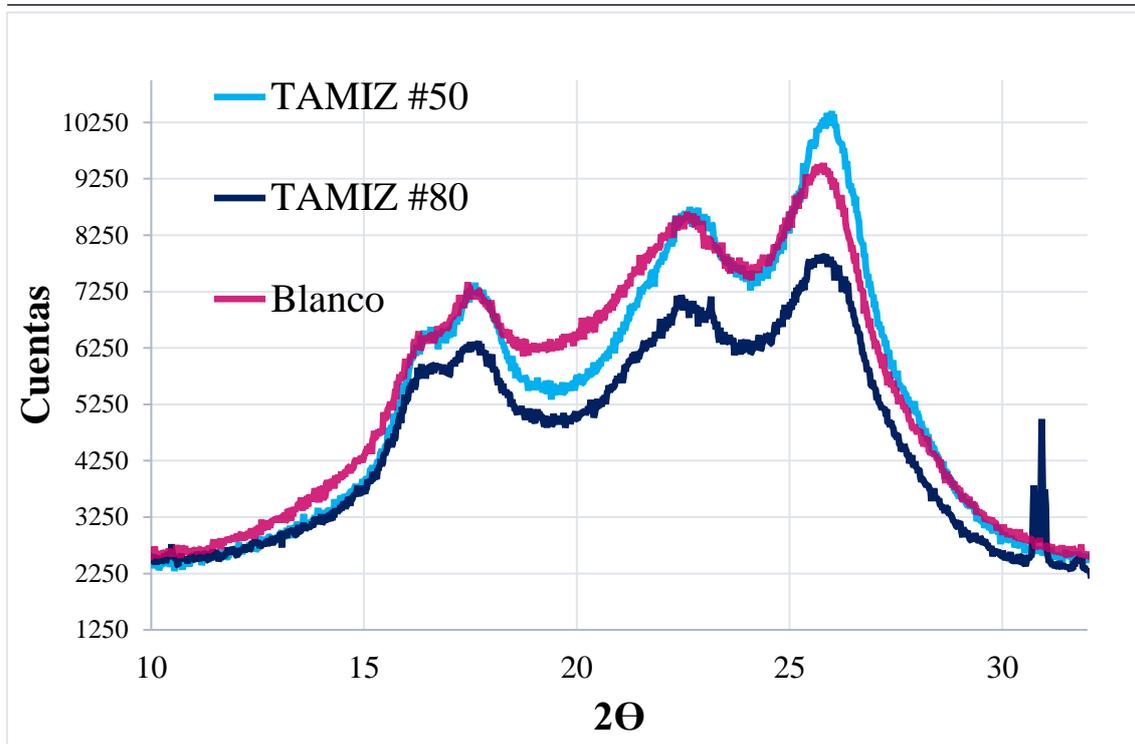


Figura 18. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación con partículas de 180 μm (azul marino); del PET residual después de la reacción de degradación con partículas del tamiz 300 μm (azul cielo) y del PET sin recibir tratamiento (magenta).

En ninguna de las muestras se evidenció la presencia de dimetil tereftalato (DMT). Este resultado era de esperarse ya que la cutinasa hidroliza enlaces tipo éster y suele producir principalmente los productos de degradación BHET, MHET y TPA, sin detectarse DMT como un compuesto intermediario. Sin embargo, el DMT se ha obtenido a través de la alcoholisis, un proceso en el cual el poliéster se descompone utilizando metanol. La despolimerización se lleva a cabo a temperaturas entre 200-300 $^{\circ}\text{C}$ y presiones de 2-300 atmósferas, lo que representa una desventaja en términos ambientales y económicos (Chen et al., 2013).

7.2.4 Efecto de la temperatura y de la concentración de enzima en la masa residual y pH en la degradación de PET en reactor

7.2.4.1 Estudio cinético de la enzima ANCUT1 a 60 $^{\circ}\text{C}$

En la Figura 19 se muestran los resultados obtenidos del estudio enzimático de ANCUT1 a 60 $^{\circ}\text{C}$. En el primer caso donde solo se colocó la enzima (línea verde) se observa un decremento en la actividad durante las primeras 12 h, pasado este tiempo la actividad aumenta hasta un máximo de 500 U/mL y después vuelve a caer desde las 36 h y hasta las 60 h, finalizando con un ligero incremento de la actividad hasta un máximo de 500 U/mL. En el segundo caso en donde se colocaron 1 mL de la enzima con 9 mL de buffer (relación 1:10, línea azul), se observa un decremento de la actividad durante

las primeras 12 h, posteriormente se observa un incremento constante de la actividad hasta llegar a un valor de 1750 U/mL (con una ligera disminución a las 72 h). Por último, en el tercer caso en donde se colocaron 1 mL de enzima con 19 mL de buffer (relación 1:20, línea amarilla), se observa una constante disminución de la actividad desde el inicio y hasta las 72 h con un leve incremento al final, quedando con una actividad de 600 U/mL.

Con base en los resultados anteriores, se puede decir que la enzima ANCUT1 es capaz de mantener su actividad cercana a los 600 ± 300 U/mL a 60°C , por ello se decidió utilizar esta temperatura para las pruebas en reactor. Así mismo, se concluyó que la concentración del buffer afecta la actividad enzimática de ANCUT1, ya que en condiciones 1:10 se observó una mejoría de la actividad, llegando a un valor máximo de 1750 U/mL.

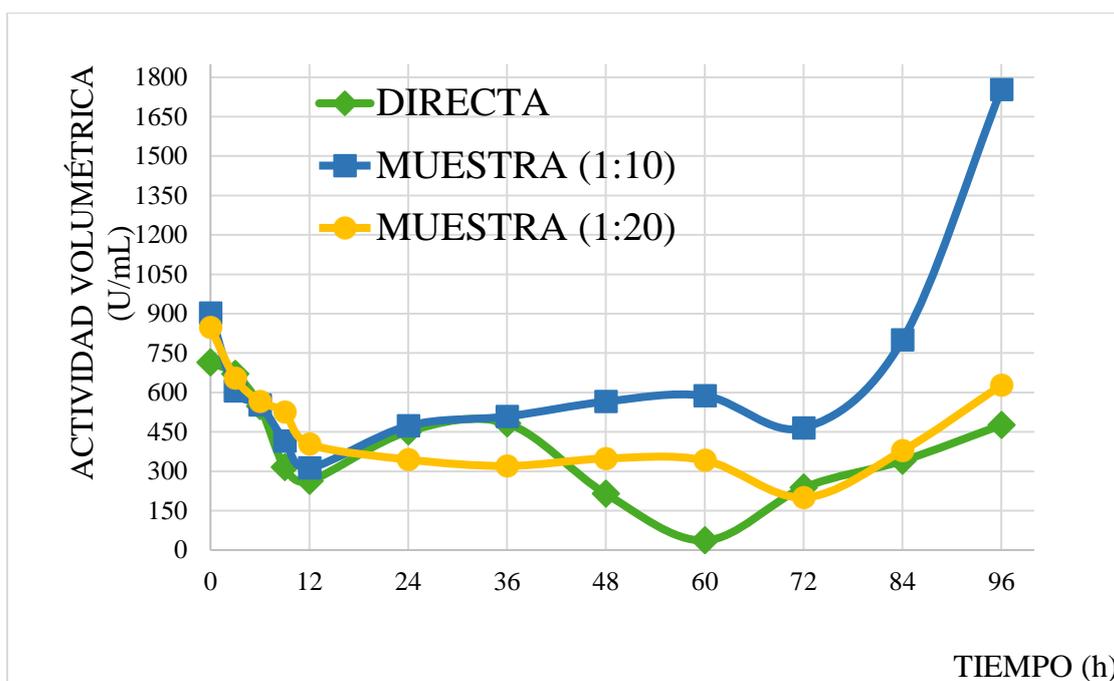


Figura 19. Actividad enzimática de ANCUT1 a 60°C , extracto crudo de ANCUT1 (verde); extracto crudo con BFS a una concentración 1:10 (azul); extracto crudo de ANCUT1 con BFS en una relación 1:20 (amarillo).

7.2.4.2 Efecto de la temperatura en la masa residual y el pH

Se trabajó con dos temperaturas y con las condiciones indicadas en la sección 6.9.5, las masas de PET residual obtenidas fueron de 4.06 g cuando se llevó a cabo la reacción a 60°C y 4.5 g cuando se trabajó con 35°C . Los valores de pH obtenidos fueron de 7.43

para la reacción a 35 ° C y 7.16 para la reacción a 60 ° C. Como se puede ver, el aumento de la temperatura contribuyó en la pérdida de masa de PET en la muestra, esta pérdida probablemente se debe a la generación de productos de degradación como el TPA, el cual puede disminuir el valor del pH. Hasta este punto, las condiciones utilizadas a 60 ° C generan una pérdida de PET del 18.8 %, valor que no se había conseguido a 35 ° C.

En la figura 20 se observan los difractogramas obtenidos después de la reacción de degradación a 35 ° C y a 60 ° C y se observa una disminución en la intensidad de los picos característicos del PET en $2\theta = 17.3^\circ$, 22.7° y 25.8° al reaccionar a una temperatura cercana a la Tg del PET ya que se asume que la disminución de la intensidad de dichos picos es directamente proporcional a la disminución de la cristalinidad del polímero y viceversa.

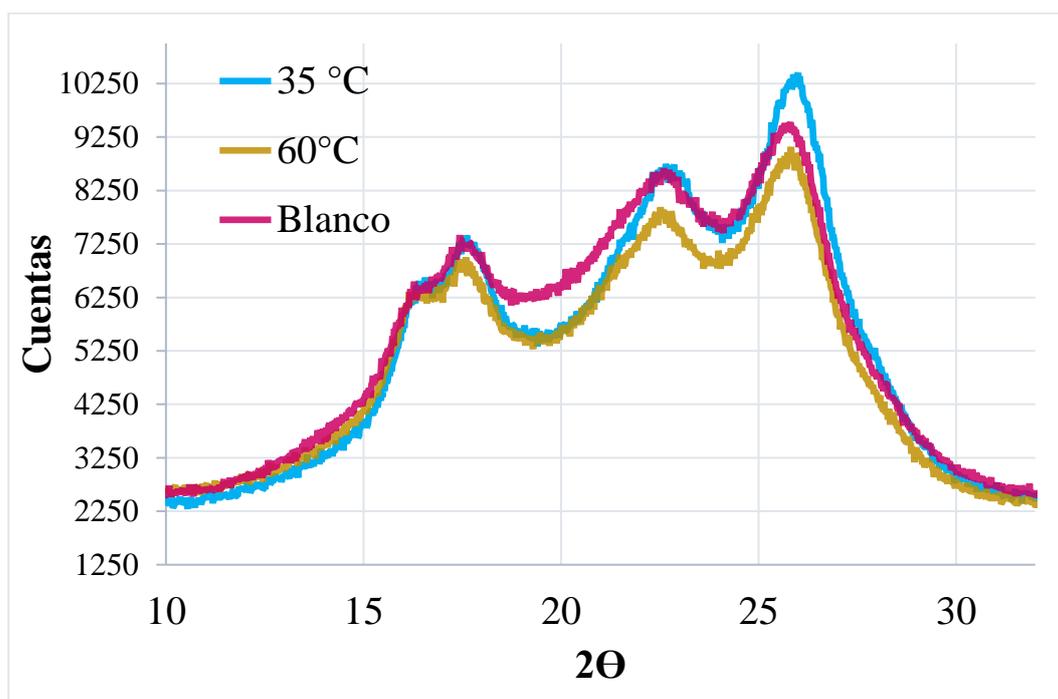


Figura 20. Difractograma de rayos X del PET residual después de la reacción de degradación a una temperatura de 30 ° C (azul); del PET residual después de la reacción de degradación a 60 ° C (dorada) y del PET sin recibir tratamiento (magenta).

7.2.4.3 Efecto de la concentración de enzima en la masas residual y el pH

Como se indicó en la sección 6.9.6, se evaluaron dos condiciones de reacción con diferentes concentraciones de enzima. En el primer caso se utilizó una relación 1:20 de enzima ANCUT1 y el medio de reacción, con estas condiciones se obtuvo una masa de PET residual de 4.5 g y un pH final de 7.43. En el segundo caso se utilizó una relación

de 1:2.2 de enzima ANCUT1 y el medio de reacción, con estas condiciones la masa de PET residual obtenida fue de 3.76 g y un pH final de 6.68. Como se puede observar, el incremento en la concentración de la enzima favorece la pérdida de masa y genera un mayor cambio en el pH, este efecto puede estar relacionado con la producción de TPA debido a la degradación.

En la figura 21 se observan los difractogramas obtenidos y se visualiza que el aumento de la concentración de la enzima tiene un efecto en la disminución de la intensidad de los picos característicos del PET que indica que la cristalinidad ha disminuido y por ende se ha llevado a cabo la degradación del polímero.

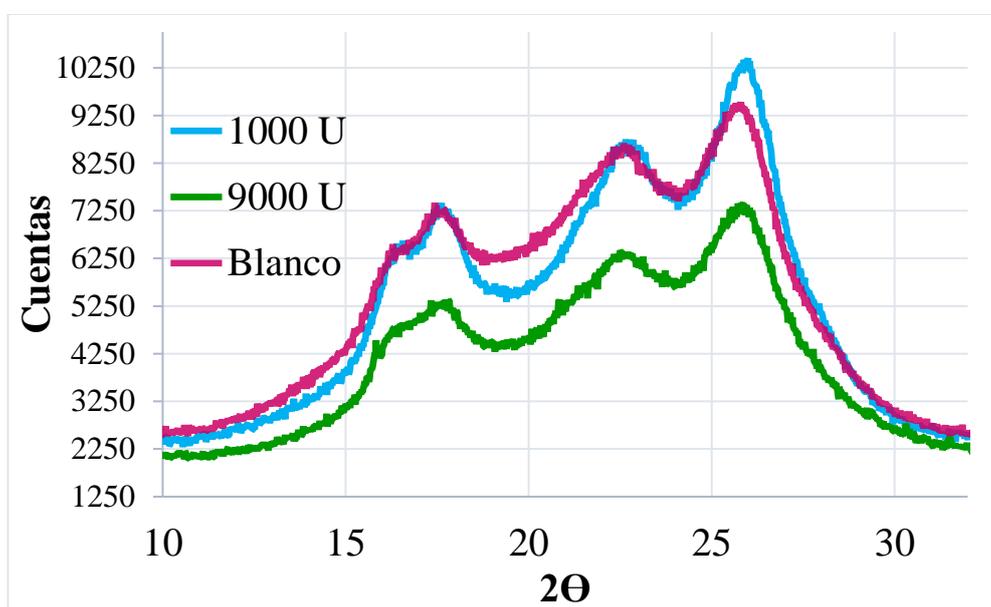


Figura 21. Difractogramas obtenidos con rayos X del PET residual después de la reacción de degradación con una concentración de ANCUT1 de 1000 U (azul); del PET residual después de la reacción de degradación con una concentración de ANCUT1 de 9000 U (verde) y del PET residual sin recibir tratamiento (magenta).

7.3 Propuesta de diseño de reactor corregida

Con base en lo observado anteriormente, se hizo necesario replantear el diseño del reactor, por ello, en la Figura 22 se muestra una propuesta corregida. En dicha propuesta se agregan al reactor un potenciómetro para monitorear el pH a lo largo del tiempo, una abertura de carga para poder adicionar cantidades adicionales de enzima y una válvula de drenado para coleccionar muestras y poder cuantificar los productos de degradación.

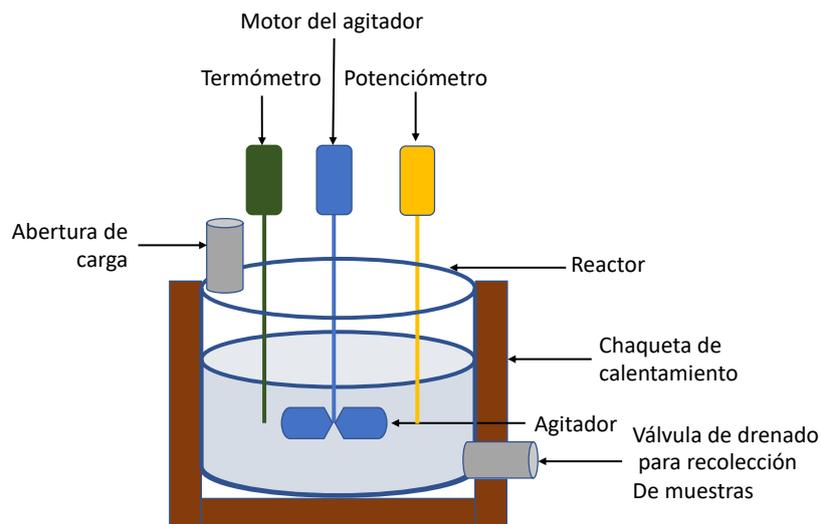


Figura 22. Esquema de la propuesta de reactor corregida.

Con estas modificaciones se podrían realizar nuevos experimentos con un mejor control de las variables de estudio.



8. Conclusiones

- Se logró la producción de la ANCUT1 con una actividad de 1000 U/mL y se confirmó su identidad mediante electroforesis y zimograma.
- El uso del reactor permitió reducir el tiempo de reacción a solo 7 días sin afectar la concentración de subproductos obtenidos al término de la degradación del PET.
- Las condiciones en las que se observó una mayor obtención de productos de degradación fueron una temperatura de 35 °C, con Buffer de fosfatos de sodio pH 9: 50 mM, tamaño de partícula del tamíz 50 y a una agitación de 50 rpm.
- El efecto de la temperatura es un factor importante en la degradación del PET, ya que al trabajar con 60 °C (por debajo del punto de T_g del PET) se observó una pérdida de peso de aproximadamente el 20%.
- Por otra parte, el aumento en la concentración de la enzima parece mejorar la reacción de degradación, ya que es con la que se observó una mayor pérdida de peso, sin embargo, se hace necesario un estudio más a fondo junto con un análisis de costos.
- Se hace necesaria la fabricación u obtención de un nuevo reactor para poder llevar un mejor control de los parámetros de reacción.



9. Perspectivas a futuro

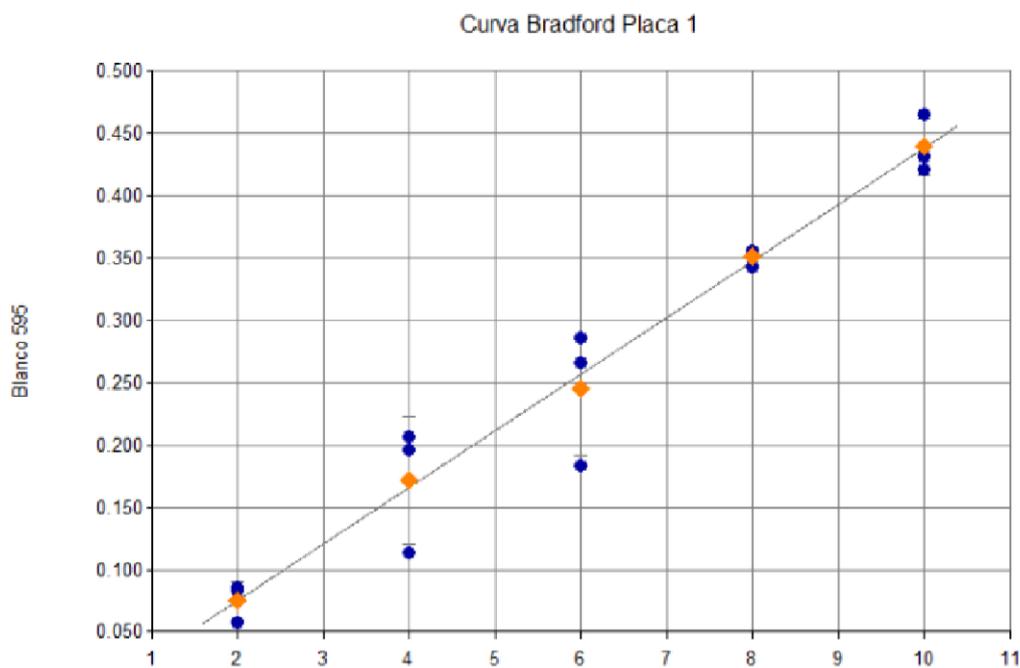
Los trabajos que deberían llevarse a cabo como parte complementaria de este proyecto son:

- Repetir las reacciones en reactor con las condiciones de la sección 6.9.6 y realizar el análisis por HPLC de los productos obtenidos.
- Realizar un estudio sobre el efecto del buffer en la afinidad de la AN CUT1 hacia la fase amorfa o cristalina del PET.
- Estudiar los rendimientos de la reacción en el reactor con otras temperaturas.
- Analizar la posible formación de etilenglicol como producto de degradación cuando se utiliza el buffer Tris-HCl.
- Cuantificar otros oligómeros cuando se utiliza el buffer Tris-HCl.



10. Anexo

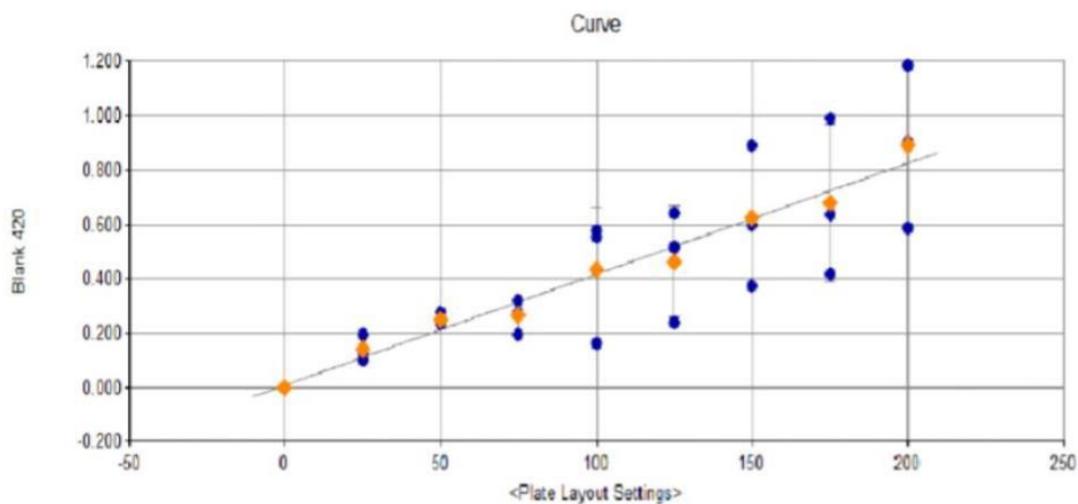
Curva de calibración de la concentración de proteína por el método de Bradford.



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



Curva de calibración de p-NP para medición de actividad cuantitativa.



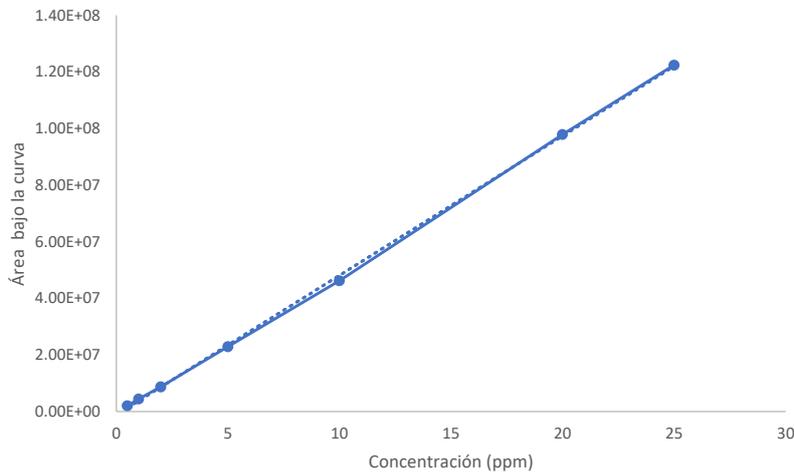
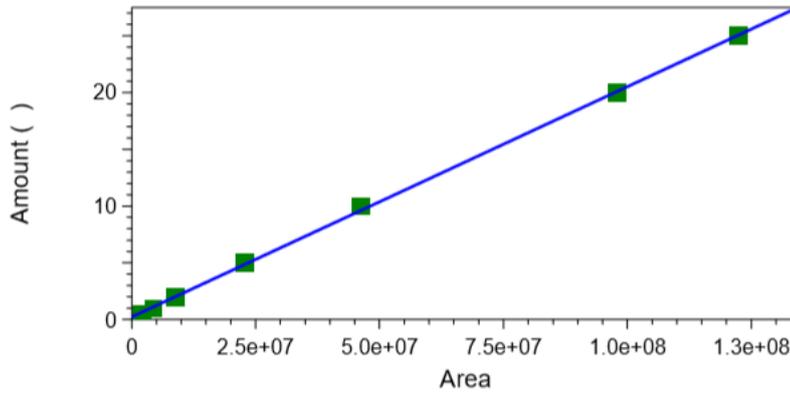
Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
p-NP	$Y=A*X+B$	0.0092	-0.0816	0.999



Curva de calibración para TPA

Info

Peak: TPA -- ESTD -- DAD: Signal A, 244.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 360.0 nm/Bw:100.0 nr



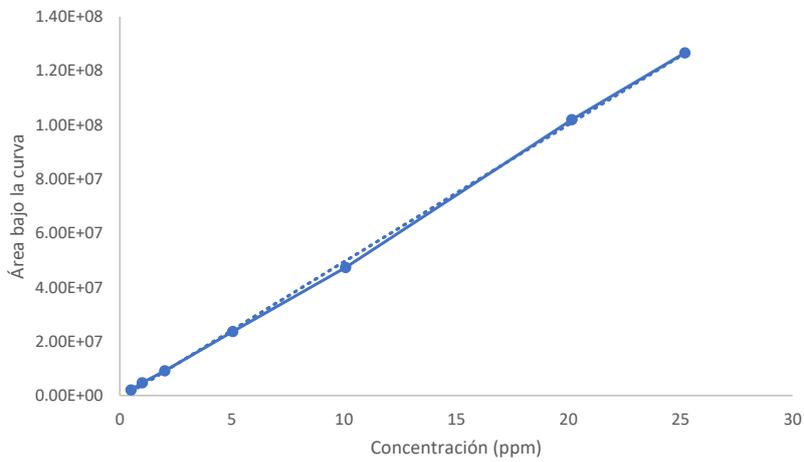
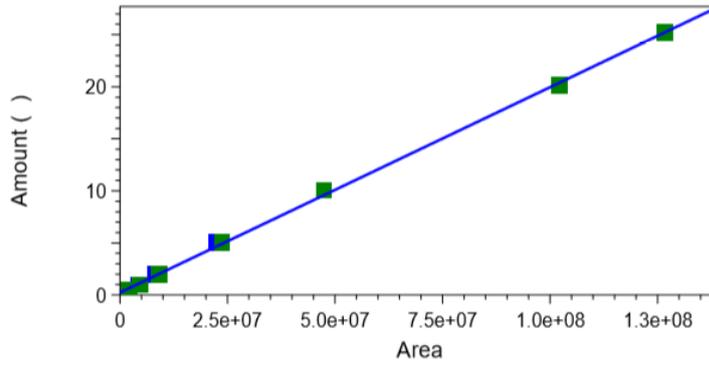
Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
TPA	$Y=A*X+B$	4.927×10^6	-1.190×10^6	0.9996



Curva de calibración para BHET

Info

pak: BHET -- ESTD -- DAD: Signal A, 244.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 360.0 nm/Bw:100.0 n



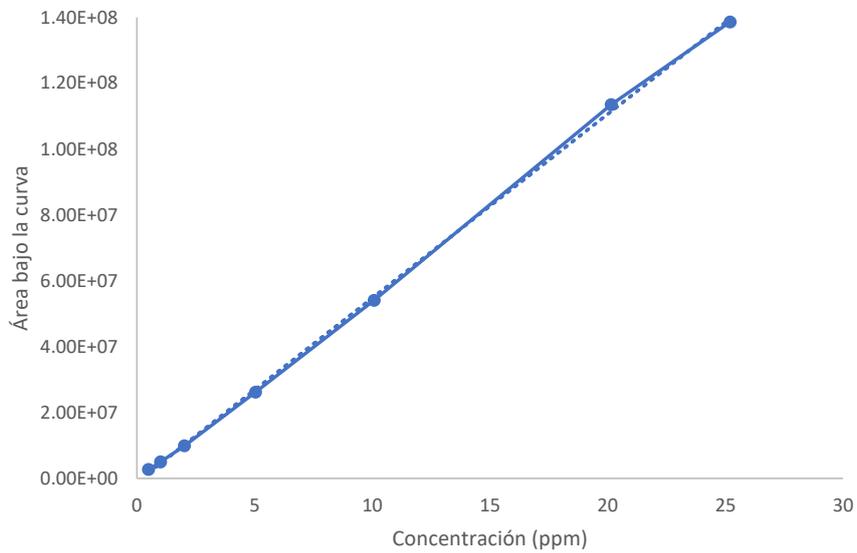
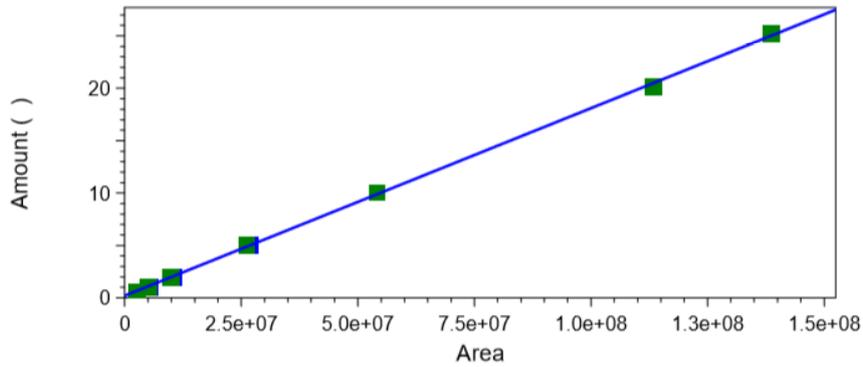
Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coefficiente de correlación
BHET	$Y=A*X+B$	5.06×10^6	-1.199×10^6	0.9994



Curva de calibración para DMT

Info

Peak: DMT -- ESTD -- DAD: Signal A, 244.0 nm/Bw:4.0 nm Ref 360.0 nm/Bw:100.0 nm



Curva	Fórmula de la curva	A	B	Coficiente de correlación
DMT	$Y=A*X+B$	5.581×10^6	-1.055×10^6	0.9995



11. Bibliografía

- Anaya, A., & Pedroza, H. (2008). Escalamiento, el arte de la ingeniería química: Plantas piloto, el paso entre el huevo y la gallina. *Ciencia Ed. (IMIQ)*, 23(1), 31–39.
- Artham, T., & Doble, M. (2008). Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience*, 8(1), 14–24.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200700106>
- Ayala, H. (2011). *Purificación e identificación de enzimas de Bacillus pumilus GMA1 con potencial en biocatálisis. Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Badenes, S. M., Lemos, F., & Cabral, J. M. S. (2010). Transesterification of oil mixtures catalyzed by microencapsulated cutinase in reversed micelles. *Biotechnology Letters*, 32(3), 399–403. <https://doi.org/10.1007/s10529-009-0172-5>
- Barón, M., Hellwich, K. H., Hess, M., Horie, K., Jenkins, A. D., Jones, R. G., Kahovec, J., Kratochvíl, P., Metanomski, W. V., Mormann, W., Stepto, R. F. T., Vohlídal, J., & Wilks, E. S. (2009). Glossary of class names of polymers based on chemical structure and molecular architecture (iupac recommendations 2009). *Pure and Applied Chemistry*, 81(6), 1131–1186. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-08-01-30>
- Bastida, C. (2018). *Detección e identificación de la cutinasa AN CUT4 de Aspergillus nidulans PW1. Tesis de Licenciatura*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bermúdez, E. P. (2013). *Bases moleculares y bioquímicas para el estudio del sistema cutinolítico de aspergillus nidulans. Tesis de Maestría*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Bordusa, F. (2002). Proteases in Organic Synthesis. *Chemical Reviews*, 102(12), 4817–4867. <https://doi.org/10.1021/cr010164d>
- Bornscheuer, U. T., Ordoñez, G. R., Hidalgo, A., Gollin, A., Lyon, J., Hitchman, T. S., & Weiner, D. P. (2005). Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 36(1–6), 8–13.
<https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2005.07.004>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Carvalho, C. M. L., Aires-Barros, M. R., & Cabral, J. M. S. (1998). Cutinase structure,



- function and biocatalytic applications. *Electronic Journal of Biotechnology*, 1(3), 160-173. <https://doi.org/10.4067/S0717-34581998000300006>
- Castro-ochoa, D. (2010). *Cutinasas*. 13(1), 16–25.
- Chang, S., Sheu, M., & Chen, S. (1983). Solid-state Polymerization of Poly(ethylene Terephthalate). *Journal of Applied Polymer Science*, 28, 3289–3300.
- Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31(8), 1754–1767. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.09.005>
- Chen, S., Tong, X., Woodard, R. W., Du, G., Wu, J., & Chen, J. (2008). Identification and characterization of bacterial cutinase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(38), 25854–25862. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800848200>
- Culbert, B., & Christel, A. (2005). Continuous Solid-State Polycondensation of Polyesters. In J. Scheirs (Ed.), *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters* (first, pp. 143–194). 21 June 2004.
- Fogler, H. S. (2008). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas* (Cuarta edi). Pearson Education.
- Gu, J. D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: Recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(2), 69–91. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00177-4](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00177-4)
- Harmsen, J. (2013). *Industrial Process Scale-up A Practical Guide from Idea to Commercial Implementation*. ELSEVIER.
- Jaeger, K. E., Dijkstra, B. W., & Reetz, M. T. (1999). Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Review of Microbiology*, 53, 315–351. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.315>
- 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(1), 59–69. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1780-6>
- Kim, T. Y., Lofgren, E. A., & Jabarin, S. A. (2003). Solid-state polymerization of poly(ethylene terephthalate). I. Experimental study of the reaction kinetics and properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 89(1), 197–212. <https://doi.org/10.1002/app.11903>



- Kolattukudy, P. E. (1980). *Biopolyester Membranes of Plants : Cutin and Suberin*. 208(4447), 990–1000.
- Krevelen, D. W., & Nijenhuis, T. K. (2009). *Properties of Polymers* (ELSEVIER (ed.); fourth edi). February 9, 2009.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*, 227, 680–685.
<http://www.mendeley.com/research/discreteness-conductance-chng-e-n-bimolecular-lipid-membrane-presence-certin-antibiotics/>
- Llanos, A. C. (2018). *Aplicación de las cutinasas recombinantes AN CUT3 y AN CUT4 provenientes de Aspergillus nidulans en la degradación de poliésteres*, Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- López, F. (2004). *Fundamentos de polímeros* (B. Fontal & R. Contreras (eds.); 2004th ed.). Escuela Venezolana para la Enseñanza de la Química (EVEQ).
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2573.0000>
- Lovera, D., & Torres, M. (2019). *Optimización de condiciones para mejorar la producción y degradación del tereftalato de polietileno (PET) por la cutinasa AN CUT3 expresada en Pichia pastoris*, Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mallick, B. (2015). X-ray diffraction analysis of polymeric solid using Bragg-Brentano geometry. *International Journal of Applied Glass Science of Materials Chemistry and Physics*, 1(3), 265–270.
- Maurya, A., Bhattacharya, A., & Khare, S. K. (2020). *Enzymatic Remediation of Polyethylene Terephthalate (PET)– Based Polymers for Effective Management of Plastic Wastes : An Overview*. 8(November), 1–13.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.602325>
- Morales, S. L. (2015). *Purificación y caracterización de la enzima recombinante AN CUT2 de aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Morales, S. L. (2018). *Degradación de polietilén tereftalato (PET) con las cutinasas recombinantes AN CUT1 y AN CUT2 de Aspergillus nidulans*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mueller, R. J. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41(10), 2124–2128. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.018>



- Nawani, N., Singh, R., & Kaur, J. (2006). Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(5), 559–565.
<https://doi.org/10.2225/vol9-issue5-fulltext-9>
- Neves Petersen, M. T., Fojan, P., & Petersen, S. B. (2001). J Biotechnol. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 85, Issue 2).
- PlasticsEurope. (2018). *Plastics the facts 2018*. 2019, 60.
- Sánchez, M. (2015). *Aplicación de las cutinasas AN CUT1 y AN CUT2 recombinantes de aspergillus nidulans en la degradación de poliésteres*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Scheirs, J., & Long, T. E. (2005). *Modern Polyesters: Chemistry and Technology of Polyesters and Copolyesters* (J. W. & Sons (ed.); first). 21 June 2004.
- SEMARNAT. (2015). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. 2016, 44.
- SEMARNAT. (2020). Panorama general de las tecnologías de el reciclaje de plásticos en México y en el mundo. 2021, 156.
- Solis, I. (2015). *Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante AN CUT1 producida en pichia pastoris*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vega, F. P. (2013). *Purificación y caracterización de la cutinasa anc ut1 de aspergillus nidulans*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vergara, A. M. del P. (2010). *Inmovilización de esterases a partir de un extracto crudo de Aspergillus nidulans PW1*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Voet, D., Voet, J. G., & Pratt, C. W. (2013). *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level* (Wiley (ed.); four).
- Whiteley, C. G., & Lee, D. J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3–4), 291–316.
<https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.010>