



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Degradación enzimática de ácido poliláctico y recuperación de
productos de interés.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.A. Rafael Castro Sánchez

Doctora Amelia Farrés González Sarabia
FACULTAD DE QUÍMICA

Ciudad Universitaria, CD. MX., noviembre 2024



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Degradación enzimática de ácido poliláctico y recuperación de productos de interés.

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

P R E S E N T A

I.A, Rafael Castro Sánchez



Ciudad de México, Noviembre 2024

Jurado asignado

Presidente: Dra. Alejandra Hernández Santoyo Instituto de Química, UNAM

Vocal: Dr. Miguel Gimeno Seco Facultad de Química, UNAM

Vocal: Dra. Selena Gutiérrez Flores Facultad de Química, UNAM

Vocal: Dra. Carolina Peña Montes Tecnológico de Veracruz

Secretario: Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén Facultad de Química, UNAM

La tesis se realizó en: Conjunto E de la Facultad de Química UNAM, Departamento de Alimentos y Biotecnología, Laboratorio 312.

TUTOR DE TESIS

Dra. Amelia Farrés González Sarabia

Facultad de Química

Agradecimientos

Agradezco al CONAHCYT por el apoyo económico brindado mediante la beca de maestría CVU: 1204076, al financiamiento por el proyecto PAPIIT IT201921, el soporte por el proyecto PAIP-Facultad de Química 5000-9095 y el apoyo económico recibido por el PLAN ANUAL PAEP 2023 para la asistencia al XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.

Agradezco a la Dra. Amelia Farrés González Sarabia, mi tutora, por la guía, el espacio brindado en su grupo de trabajo, el apoyo incondicional, el aprendizaje y el tiempo brindado durante mi desarrollo en el programa de posgrado en Ciencias Químicas. Así como a los integrantes del Laboratorio 312 del edificio de Química ambiental y de Alimentos del Conjunto E de la Facultad de Química por su apoyo y contribuciones.

Agradezco, además, a los miembros del jurado, Dra Alejandra Hernández Santoyo, Dr. Miguel Gimeno Seco, Dra. Selena Gutiérrez Flores, Dra. Carolina Peña Montes, Dr. Gustavo Adolfo Zelada Guillén por el tiempo, la dedicación y los comentarios brindados para el desarrollo y mejora del presente trabajo.

Agradezco de manera especial a la Coordinación del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por su eficiente y constante atención durante toda mi estancia en el Programa.

Por último, agradezco a la Facultad de Química UNAM y en especial a la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme hacer uso de gran parte de sus instalaciones para continuar con mi desarrollo profesional y social, no cabe duda que es un orgullo formar parte de la universidad de la nación.

Dedicatoria

A mis padres Martha Sánchez y Rafael Castro, sin su apoyo y constante esfuerzo nada de esto sería posible, gracias por todo el amor y el apoyo incondicional.

A Andrés Castro y Enea Santiago por su guía, por regalarme su experiencia y por siempre tener para mí palabras de aliento en esta travesía.

A Julissa Gamboa, por el apoyo incondicional en las noches más oscuras y los momentos más complicados, gracias por la paciencia y todo tu amor. Por tus palabras certeras y motivarme día a día a mejorar.

A mis amigos, Daniel Luna, Denes Luna, Diego Ibarra, Óscar Rivera, Filiberto Martínez porque aún a la distancia han encontrado la manera de apoyarme y brindarme momentos de alegría.

A los nuevos colegas, Adriana Diego, Katya Ibarra, Francisco Franco, Augusto Castro, Yalith Arancibia, Marco Navarrete, Andrea Sabido por sus importantes comentarios y aportaciones en el desarrollo de este trabajo.

A los que ya no están, gracias por impulsarme con el recuerdo, los llevo en mi corazón.

“Ordo Ab Chao”

ÍNDICE

1. Resumen.....	11
2. Introducción	12
3. Marco teórico.....	14
3.1. Polímeros	14
3.2. Clasificación de los polímeros	15
3.3. Producción mundial de plásticos	16
3.4. Morfología y propiedades térmicas de los plásticos	16
3.5. Tipos de plásticos según su origen	17
3.6. Clasificación de los plásticos biodegradables.....	17
3.7. Nueva economía de los plásticos	17
3.8. Economía circular.....	18
3.9. Obtención del ácido láctico	18
3.10. Métodos de determinación y cuantificación de ácido láctico	19
3.11. Determinación y cuantificación de ácido láctico por métodos enzimáticos.....	21
3.12. Purificación de ácido láctico	22
3.13. Usos del ácido láctico	24
3.14. Poli(ácido láctico)	25
3.14.1. Aplicaciones del poli(ácido láctico).....	27
3.14.2. Obtención del poli(ácido láctico)	28
3.14.3. Propiedades del poli(ácido láctico)	29
3.14.4. Degradación de poli(ácido láctico).....	30
3.14.5. Mecanismo de reacción de la degradación hidrolítica del poli(ácido láctico)	33
3.15. Enzimas	34
3.15.1. Clasificación de las enzimas	35
3.15.2. Catálisis enzimática.....	35
3.15.3. Cutinasas	35
3.16. Expresión de proteínas heterólogas.....	37
3.16.1. Sistema de expresión <i>Komagataella phaffii</i> (<i>Pichia pastoris</i>)	38
3.16.2. Vector de expresión pPICZα	39
3.17. Efectos en la degradación de PLA con diversas enzimas	39
4. Antecedentes experimentales del grupo de trabajo.....	40
5. Justificación.....	41
6. Hipótesis	42
7. Objetivos	43
7.1. Objetivo general	43

7.2.	Objetivos particulares	43
8.	Metodología	44
8.1.	Producción de enzimas recombinantes.....	44
8.1.1.	Reactivación de la cepa y obtención de bancos de trabajo	44
8.1.2.	Inducción y producción de enzima.....	44
8.1.3.	Concentración del sobrenadante enzimático.....	44
8.1.4.	Determinación de la concentración de proteína en microplaca	45
8.1.5.	Cuantificación de la actividad de esterasa en microplaca.....	45
8.1.6.	Determinación de presencia de proteína por electroforesis y de actividad de zimograma	45
8.2.	Preparación de las muestras.....	46
8.2.1.	Preparación de las láminas de PLLA.....	46
8.2.2.	Preparación de los productos derivados de PLA.....	46
8.2.3.	Preparación de la muestra de PLLDA	47
8.3.	Reacción de hidrólisis de PLA con cutinasas recombinantes	47
8.4.	Cuantificación de ácido láctico producido en la reacción de degradación enzimática por método colorimétrico.....	47
8.5.	Determinación de pérdida de peso.....	48
8.6.	Diseño experimental para la evaluación de condiciones de reacción	48
8.6.1.	Evaluación de la cantidad de extracto enzimático	48
8.6.2.	Evaluación del amortiguador en la reacción	48
8.6.3.	Evaluación de la regulación del pH en la reacción	49
8.6.4.	Evaluación del efecto de la agitación comparado con una reacción estática	49
8.6.5.	Evaluación de pretratamientos	49
8.7.	Degradación por método químico de las muestras de PLA	49
8.8.	Recuperación de los productos de interés por extracción líquido-líquido.	50
8.9.	Determinación de ácido láctico mediante TLC.....	50
8.10.	Método de detección y cuantificación por cromatografía de fase reversa en un sistema HPLC	50
8.11.	Reacción de esterificación de ácido láctico	51
8.12.	Cinéticas de reacción	51
8.13.	Resonancia magnética nuclear y espectrometría de IR para la identificación del producto de esterificación	51
8.14.	Calorimétrica diferencial de barrido (DSC) para el cálculo de la cristalinidad del polímero	52
9.	Resultados y discusión	53
9.1.	Producción de enzima recombinante	53
9.2.	Determinación de la presencia de las cutinasas por electroforesis y comprobación de actividad enzimática por zimograma.	54
9.3.	Molienda de los productos derivados de PLA.....	55

9.4.	Evaluación del efecto de la cantidad de extracto enzimático en la eficiencia de la reacción.....	56
9.5.	Evaluación del efecto de la naturaleza del amortiguador en la reacción	59
9.6.	Evaluación del aumento en la temperatura de reacción.....	63
9.7.	Evaluación de los pretratamientos sobre el polímero	64
9.8.	Evaluación de las condiciones de incubación estáticas vs agitación.....	64
9.9.	Degradación de PDLLA en condiciones estáticas y con agitación	66
9.10.	Evaluación de pretratamiento sobre la mezcla de reacción.....	67
9.11.	Evaluación de las mejores condiciones de reacción sobre polímeros comerciales derivados del poli(ácido láctico).....	69
9.12.	Cinéticas de reacción de las tres cutinasas recombinantes.	70
9.13.	Degradación química de PLA	71
9.14.	Curva de calibración y cuantificación de PLA por cromatografía en fase reversa en un sistema HPLC.....	72
9.15.	Reacción de esterificación	73
9.16.	Caracterización del producto de esterificación por RMN y espectrometría de IR.....	73
9.17.	Obtención de la cristalinidad de las muestras de poli(ácido láctico) utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).	76
10.	<i>Conclusiones y perspectivas</i>	78
11.	<i>Bibliografía</i>	80
12.	<i>Trabajos generados a partir de esta investigación.</i>	90
13.	<i>ANEXOS</i>	91
13.1.	Indice de figuras	91
13.2.	Indice de tablas	91
13.3.	Equipos	92
13.4.	Reactivos.....	92
13.5.	Preparación de medios de cultivo utilizados para la producción de la cutinasa recombinante.....	94
13.6.	Preparación de soluciones amortiguadoras y soluciones stock	95

Abreviaturas

AL: Ácido láctico

ANCUT 1/A1: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A1"

ANCUT 2/A2: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A2"

ANCUT 3/A3: Cutinasa recombinante de *Aspergillus nidulans* "A3"

AOX: Alcohol oxidasa

DO: Densidad óptica

DSC: Calorimetría diferencial de barrido

GC/MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

kDa: Kilo Dalton

LDH: Enzima lactato deshidrogenasa

LOTO: Medio de cultivo desarrollado por Lovera y Torres (2019)

mM: Milimolar

Mw: Peso Molecular Promedio en Peso

NAD⁺: Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina de hidrógeno

nm: Nanómetros

ODM: Objetivos de Desarrollo del Milenio

ODS: Objetivos de Desarrollo Sostenible

p-NFB: p-nitrofenol butirato

PCL: Policaprolactona

PDLLA: Poli-D,L-(ácido láctico)

PLA: Poli(ácido láctico)

PLDA/DL: Poli-D-(ácido láctico)

PLLA: Poli-L-(ácido láctico)

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Rpm: Revoluciones por minuto

SDG: Objetivos de Desarrollo Sostenible

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

SDS: Dodecilsulfato de sodio

Tg: Temperatura de transición vítrea

Tm: Temperatura de fusión

Y: Medio de cultivo extracto de levadura.

YP: Extracto de levadura, peptona

YPD: Extracto de levadura, peptona y dextrosa

α -NA: Acetato de alfa-naftilo

μ g: Microgramo

μ L: Microlitro

1. Resumen

La acumulación de plásticos de un solo uso es uno de los grandes retos para la humanidad en la actualidad. Por lo tanto, este proyecto tiene la finalidad de lograr una mejor degradación del polímero poli(ácido láctico), un polímero biodegradable, el cual ha surgido como una de las mejores alternativas a los derivados de petróleo, ya que permite recuperar los productos generados en su hidrólisis para su aprovechamiento, contribuyendo a la economía circular.

En primer lugar, se trabajó en la degradación enzimática valiéndose de importantes herramientas biotecnológicas para el proceso, utilizando cutinasas aisladas de *Aspergillus nidulans* y clonadas en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). Además, se realizó la degradación química, la cual puede atender de manera más rápida la degradación del polímero haciendo que el problema de acumulación se vea disminuido en un menor tiempo, teniendo como desventajas su impacto ambiental.

Para el proceso de degradación enzimática se utilizaron las cutinasas identificadas por el grupo de trabajo (ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3) expresadas en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). Siendo las siguientes condiciones reconocidas como las mejores para el desempeño de la reacción: 10 mg de polímero, con 12,000 unidades de enzima por mL completando el volumen de reacción con amortiguador Tris-HCl pH 7 a 1 mL. Además, se determinó el pretratamiento de ultrasonido por 10 min a temperatura ambiente sobre la mezcla de reacción como el mejor para favorecer la interacción entre la enzima y el polímero para continuar con el desarrollo de la reacción durante 7 días a 40 °C en agitación a 800 rpm.

Por otra parte, para la reacción química se establecieron las siguientes condiciones de reacción: se agregaron masas iguales del polímero (30 g) y de hidróxido de sodio (30 g) al sistema de reacción con 100 mL de agua y 50 mL de etanol y se colocó en una parrilla de calentamiento a 250 °C con agitación en promedio de 1 a 2 h de reacción.

Para ambas reacciones de degradación se realizó la recuperación del producto de interés, el ácido láctico, por medio de una extracción líquido-líquido del medio de reacción empleando acetato de etilo. Con ayuda de un rotavapor se eliminó el solvente orgánico y se comprobó la presencia del ácido láctico realizando una cromatografía de capa fina.

El ácido láctico recuperado se sometió a una reacción de esterificación para la generación de lactato de etilo, el cual es un aditivo ampliamente utilizado en la industria, con lo que se comprobó que el poli(ácido láctico), puede seguir el modelo de la economía circular, contribuyendo a la disminución del volumen de desechos y de su aprovechamiento para la generación de nuevos productos de valor agregado. Sin embargo, resulta evidente que los rendimientos de la degradación enzimática no compiten con los obtenidos con el tratamiento químico.

2. Introducción

Los plásticos son productos químicos poliméricos, formados a partir de diversas estructuras químicas, que se introdujeron a la economía mundial a mitad del siglo XX gracias a los avances en química y petroquímica. Estos significaron una revolución en el modo de vida cotidiano, ya que facilitaron las actividades domésticas, la adquisición de productos, su transporte y conservación. El poli(ácido láctico), por ejemplo, se registró en 1932, y en su producción y desarrollo han participado las empresas Dupont y Cargill. Es considerado también como un bioplástico, por lo que el incremento en la demanda de estos biopolímeros ha llevado a que el poli(ácido láctico) sea uno de los más comercializados en la actualidad (Herryman y Blanco, 2005).

Los polímeros químicos poseen propiedades tan nobles como durabilidad, resistencia y flexibilidad, entre otras. Sin embargo, por aquellos años se dejó de lado el impacto ecológico que estos tendrían en los ecosistemas, ya que estas mismas características provocaron que en los años 80 se comenzara a tener un grave problema de acumulación de estos productos en los vertederos, generando contaminación y destrucción del entorno, llegando a formarse, incluso, las primeras islas de plástico en los océanos (Zia et al. 2007). Su eliminación representaba aún más problemas, porque el quemarlos representa la liberación de grandes cantidades de dióxido de carbono a la atmósfera, mientras que enterrarlos no ofrecía una solución viable pues su alta durabilidad hacía que los espacios ocupados por estos plásticos resultaran inutilizables por muchos (Ignatyev et. al, 2014).

Se estima que en 2023 se tuvo una producción anual de 675 mil toneladas de PLA representando un 31% de la producción actual de bioplásticos y se proyecta que para 2028 se tenga una producción anual de 3.2 millones de toneladas anualmente convirtiéndose este polímero en aproximadamente el 50% de la producción de bioplásticos a escala mundial (Shalem *et. al.* 2024). El problema radica en acumulación y la mala gestión de los desechos lo que genera graves problemas ambientales de alto impacto global, como son la contaminación de mares, ríos, suelos y el aire, daños a la fauna marina y la alteración de la cadena alimentaria. Estos graves efectos ambientales provocados por los plásticos de un solo uso como el PLA acaban poniendo en peligro nuestra salud una vez se liberan a la naturaleza, ya que existe evidencia de que se puede tener la presencia de microplásticos en los alimentos o incluso en nuestra propia sangre (Murphy *et al.* 2021).

Al tratarse de un problema global, a medida que se adentraba en el siglo XXI, surgió una agenda global de desarrollo centrada en la lucha contra la pobreza humana desde una perspectiva multidimensional, incluido el cuidado del medio ambiente. En respuesta, la Asamblea General de las Naciones Unidas aprobó en el año 2000 la Declaración del Milenio y en 2001, el Secretario General propuso los Objetivos de Desarrollo del Milenio (ODM), con el año 2015 como fecha límite para su cumplimiento (NNUU, 2000). Se crearon grupos de trabajo para proponer soluciones. Sin embargo, al agotarse el tiempo y sin grandes resultados, se generó

un nuevo plan de acción, en el que se redactaron los nuevos objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS). Este se aprobó el 25 de septiembre de 2015, con el respaldo de 150 jefes de Estado y de Gobierno y de los 193 miembros de las Naciones Unidas (SDGs, 2015). El plan de acción se extendió a 2030 (Sanahuja y Vázquez, 2017) y fue aprobado también por la Conferencia de las Partes (COP) de la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre Cambio Climático (CMNUCC). El reemplazo de productos fósiles es una prioridad para alcanzar los SDG, por lo que se explora la incorporación de residuos y desechos agrícolas para su aprovechamiento en la generación de nuevos polímeros, es debido a esto que se considera a los procesos biotecnológicos como una alternativa viable para la eliminación de residuos, amigable con el medio ambiente y que permite aprovechar los productos generados de dicha degradación, adoptando un modelo económico surgido en los años 80: la economía circular, un modelo que se centra en el aprovechamiento y reincorporación de las materias primas con la finalidad de disminuir la acumulación y generación de desechos (Campozano y Riera, 2022).

Las herramientas biotecnológicas incluyen el uso de microorganismos y de diversas enzimas para la degradación de plásticos. En este trabajo nos centraremos específicamente de los poliésteres, los cuales son polímeros ampliamente utilizados, entre los que destacan el tereftalato de polietileno (PET) y el poli(ácido láctico), siendo de uso extendido para la manufactura de productos desechables, empaques y embalajes. Las investigaciones han destacado que distintos microorganismos se caracterizan por la producción de enzimas esterases, por lo que los poliésteres fueron los primeros en ser considerados para estos procesos de degradación ya que el enlace éster que conforman las cadenas del polímero es susceptible a romperse por acción de estas enzimas. En el grupo de las esterases podemos encontrar a las lipasas, proteasas y cutinasas (Pérez, 2020). Las cutinasas son el objeto de estudio de este grupo de trabajo, el cual ha logrado identificar tres cutinasas denominadas ANCUT 1, ANCUT 2 Y ANCUT 3 aisladas de *Aspergillus nidulans* y expresadas en el sistema *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), para una mejor y mayor obtención de extracto enzimático.

En el uso biotecnológico de las cutinasas, el poli(ácido láctico) resalta como un polímero biodegradable, amigable con el medio ambiente y candidato idóneo para integrarse a una economía circular. Su producción fue de 0.46 millones de toneladas métricas en 2021, a nivel mundial y se espera que para el 2026 se alcancen 0.79 millones de toneladas a escala industrial. En EE. UU. se encuentra la planta con mayores volúmenes de producción, NatureWorks, con 150.000 toneladas, en tanto Total y Corbion, de Tailandia, alcanza 70.000 toneladas y diversas plantas chinas producen más de 20.000 toneladas. Se espera que en el año 2025 la utilización de ácido láctico como materia prima para la fabricación de poli(ácido láctico) corresponda al 50% del total de ácido láctico disponible en el mercado por lo que es necesario buscar alternativas en su producción (Nova-Institute, 2022).

En el presente trabajo se evaluaron las tres enzimas (ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3) bajo nuevas condiciones de reacción con respecto a las presentadas por Alvarado (2023), con el fin de obtener una mayor cantidad de ácido láctico tras el

proceso de hidrólisis y favorecer su recuperación, para esto se propuso, además, la implementación de pretratamientos en beneficios del proceso de degradación y que se consideran dentro de la química verde para contribuir a una reacción sostenible que más allá de resolver una problemática no contribuya en la creación de otra. Es así como se propuso un nuevo proceso de degradación que fuera sustentable, sencillo y requiera un mínimo consumo energético permitiendo, además, recuperar y aprovechar los productos generados para integrarlos en un ciclo de economía circular. Los resultados se compararon con el proceso químico de degradación, el cual también se presenta como una alternativa para la disminución y aprovechamiento de los residuos plásticos para generar nuevos reactivos de valor agregado.

3. Marco teórico

“Por su impacto en la vida diaria, me inclino a pensar que la contribución más importante de la química ha sido quizás el gran desarrollo en las ciencias y la tecnología de la polimerización”

Importancia de los polímeros sintéticos según Lord Todd, presidente de la Royal Society (1980).

3.1. Polímeros

El término de polímero tiene como significado “muchas partes” y muy probablemente fue propuesto por Berzelius en 1830. Sin embargo, a lo largo de la historia hemos convivido y utilizado una infinidad de polímeros naturales, como alimentos, como herramientas o materiales de almacenamiento y construcción para citar algunos ejemplos como la lana o la madera (Ravve, 2013). En nuestros días resulta muy complicado imaginar nuestro estilo de vida sin los polímeros sintéticos, los cuales contribuyeron a mejorar las condiciones en las que se desarrollan una infinidad de actividades, mejorando costos, accesibilidad, creando materiales más resistentes y maleables, entre muchos otros beneficios. Sin embargo, su prolongada durabilidad, aunada a su bajo nivel de degradación de manera natural, los ha convertido en un problema al acumularse en los vertederos y diversos espacios naturales lo que los ha convertido en un foco importante de contaminación ambiental (Rivas y Garelli, 2021).

Los polímeros son macromoléculas constituidas por monómeros que se encuentran unidos mediante enlaces covalentes por medio de un proceso químico denominado polimerización que conduce a la formación de moléculas de altos pesos moleculares. Los monómeros pueden ser de uno o más tipos, por lo que se pueden encontrar homopolímeros y copolímeros con diferentes longitudes y ramificaciones en sus cadenas, que se vuelven evidentes en sus masas moleculares y, por supuesto, en sus propiedades químicas. Por esta razón, se ha desarrollado un sinnúmero de aplicaciones de estos materiales, desde fibras, llantas, empaques, polímeros de ingeniería hasta implantes, suturas, lentes de contacto, matrices para cultivo de tejidos, entre muchas otras (López *et al.* 2015).

Dentro de los polímeros sintéticos podemos identificar diferentes productos, como los termoplásticos, los termorrígidos, las gomas, las fibras, los adhesivos y las pinturas. Todos estos polímeros se encuentran en constante evolución, ya que se busca crear materiales de alta durabilidad pero que a la vez sean amigables con el medio ambiente, siguiendo principios de sustentabilidad (Hermida, 2011).

Se tiene registro del uso de polímeros comerciales desde 1868, con el nitrato de celulosa empleado para la fabricación de marcos de anteojos. El desarrollo de polímeros comenzó con más fuerza en 1900 pero es hasta la década de los 50's donde surgen, entre otros, los poliésteres termoplásticos junto con el termoplástico polietileno, los cuales revolucionaron el mercado, y han tenido una producción tipo exponencial, siendo los más utilizados hasta nuestros días (Meira y Gugliotta, 2019).

3.2. Clasificación de los polímeros

La clasificación de los polímeros se realiza dependiendo de su estructura, el estado físico, la composición química, el uso final o su comportamiento con el ambiente.

- Con respecto a la estructura se puede decir si el polímero es una masa de moléculas separables o se trata de una red macroscópica, si es lineal o cuenta con ramificaciones o si se trata de una sucesión de unidades orientadas aleatoriamente o cuentan con una orientación preferente.
- El estado físico se refiere a la disposición de las moléculas ya que estas pueden ser completamente ordenadas identificadas como cristalinas o completamente desordenadas, influyendo en la resistencia y en la flexibilidad del polímero.
- Por la composición química, en esta clasificación influyen los grupos químicos presentes (etileno, éter, éster, hidroxilo, entre otros) así como la manera de la síntesis del polímero, como la propagación en cadena o la apertura de anillos.
- El uso final: se denominan fibras, adhesivos, cauchos, plásticos o recubrimientos, aunque cada uno puede ser adaptable a todas esas aplicaciones.

Por su parte para los plásticos se puede tener la siguiente clasificación la cual tiene en cuenta el comportamiento que estos tienen a temperaturas elevadas dividiéndose en termoestables y en termoplásticos.

- Los materiales termoestables, una vez calentados, reaccionan irreversiblemente, de manera que las aplicaciones posteriores de presión y calor no los ablandan ni los hacen fluir, esto se debe a su alto grado de entrecruzamiento y que poseen masas moleculares sumamente elevadas. Un ejemplo es la bakelita, que se encuentra en las asas de las cacerolas, la cual no se deforma, sino que se quema (Saldívar y Vivaldo, 2013).
- Por otro lado, los termoplásticos son materiales que son rígidos a temperatura ambiente, pero que se pueden deformar o volver más flexibles a mayores temperaturas. Se derriten al recibir calor y se endurecen al enfriarse. Son

cadenas por lo regular lineales de altos pesos moléculas, estas cadenas sufren interacciones entre sí mediante diversas fuerzas intermoleculares como son las fuerzas de Van der Waals para el polietileno, interacciones fuertes dipolo-dipolo en el policloruro de vinilo (PVC) o enlaces intermoleculares, fuertes como lo son los puentes de hidrógeno en poliamidas.

Cabe recalcar que los plásticos más utilizados en el día a día, los termoplásticos, se identifican con los siguientes códigos por lo que para facilitar su reciclaje:



Figura 1. Código de identificación de resinas plásticas. Fuente: Beltrán y Marcilla, 2012.

3.3. Producción mundial de plásticos

La producción de plásticos pasó de 1.7 millones de toneladas en 1950 a más de 300 millones de toneladas hoy en día. Se fabrican de forma continua en plantas con diseños de ingeniería que permiten la optimización de procesos y de los productos para la generación de nuevos polímeros de alto valor agregado y que, además, estos sean más amigables con el medio ambiente (Buteler, 2019). La tendencia es tan fuerte que en el año de 1988 la producción mundial de plásticos superó a la producción mundial del acero (Plastics Europe, 2022). El éxito de los plásticos se debe a los bajos costos, a sus bajas densidades, su capacidad como aislantes de calor y electricidad, así como su versatilidad en la creación y producción de objetos de uso cotidiano con un sinnúmero de formas y piezas estables que exhiben comportamientos requeridos para diversas funciones, además de que se les puede añadir una gran variedad de pigmentos (WEF, 2016).

3.4. Morfología y propiedades térmicas de los plásticos

Los polímeros exhiben morfologías amorfas y semicristalinas. En las estructuras semicristalinas los materiales correspondientes presentan microcristales dispersos en una matriz amorfa. Al calentar polímeros amorfos solo se muestra una temperatura de ablandamiento, a la cual se le denomina temperatura de transición vítrea o T_g , mientras que para el caso de los polímeros más cristalinos se muestran dos temperaturas de ablandamiento: la primera es la T_g de la fase amorfa y luego podemos encontrar la temperatura de fusión o T_m para la fase cristalina (Alonso y Méndez, 2010) A una $T < T_g$ todos los polímeros son rígidos y quebradizos. Mientras que para una $T > T_m$ se tiene una alta energía cinética de los átomos con la cual se puede lograr la fusión de los microcristales (Odián, 2004).

3.5. Tipos de plásticos según su origen

Estos se dividen en tres grandes categorías, de acuerdo a Weber (2000)

- Plásticos convencionales: No biodegradables, degradación solar, no sirven como alimentos y generan microplásticos.
- Plásticos convencionales con un toque verde: son plásticos a los cuales se les agregan aditivos, plásticos oxodegradables que también generan microplásticos.
- Plásticos biodegradables: Se definen como aquellos que se pueden convertir en gas carbónico y agua bajo ciertas condiciones en un periodo no mayor a 30 días, es decir, es aquel polímero que puede reintegrarse al ciclo de carbono. Sin embargo, el período puede variar dependiendo de la definición y la legislación a la cual está sometido. El desarrollo de este tipo de polímeros se oferta como una solución para la conservación del medio ambiente. Actualmente se han desarrollado comercialmente diversos tipos de poliésteres alifáticos biodegradables como el poli(ácido láctico), poli(butileno succinato) (PBS), poli(butilén adipato-co-tereftalato) (PBAT) y la policaprolactona (PCL) (Zapata et al. 2012).

3.6. Clasificación de los plásticos biodegradables

De acuerdo con su origen, los biopolímeros se clasifican de la siguiente manera:

- Elaborados a partir de petróleo.
- Elaborados a partir de recursos renovables (plantas, animales o totalmente sintetizados de recursos completamente renovables).
- Elaborados a partir de fuentes mixtas.

3.7. Nueva economía de los plásticos

Se busca crear un sistema de plásticos funcionales por medio de la economía circular y reusar materias primas de interés para rediseñar el futuro de los plásticos. Esto para reducir drásticamente la pérdida de los plásticos en sistemas naturales y que estos generan otros efectos negativos (ANIPAC, 2020).

Esta se guía de tres principios fundamentales:

1. Regenerar los sistemas naturales
2. Mantener los productos y materiales en uso.
3. Diseñar los residuos y evitar contaminación de los ecosistemas.

Presentando las siguientes características:

- Los residuos no existen y se eliminan en el diseño.

- La energía debe ser de carácter renovable, para reducir la dependencia de los recursos finitos.
- Extraer un valor adicional a los productos y materiales una vez que estos hayan cumplido con su propósito.

3.8. Economía circular

Este sistema económico busca cambiar el modelo lineal de fabricar, usar y tirar, por uno que imite los ciclos biológicos en la naturaleza, lo que favorece el máximo aprovechamiento de los productos y generando el mínimo desperdicio posible para evitar la sobresaturación de los vertederos (Steffen et al., 2015). Busca hacer uso de energías renovables disminuyendo de esta manera la dependencia de los combustibles fósiles. Además, busca que la producción también se aparte de estas materias primas fósiles y la eliminación de residuos mediante un diseño optimizado como el que se propone a continuación: fuentes renovables de materias primas vírgenes, diseño y producción, utilización, reciclaje (recuperación de productos de interés, compostaje, pérdida, nuevas aplicaciones), reutilización (Cerdá y Khalilova, 2016).

Con esto se pretende satisfacer 3 principios: preservar y aumentar el capital natural, asumiendo la existencia de recursos finitos y preservando un equilibrio en el flujo de recursos renovables. optimizar el rendimiento de los recursos, lo que significa diseñar procesos para reelaborar, renovar y reciclar para mantener en circulación la economía de los materiales y componentes, así como promover la eficiencia del proceso y con ello reducir el daño causado a los sistemas y áreas como los alimentos, movilidad, casas, educación entre otras (Sandoval et al., 2017).

3.9. Obtención del ácido láctico

El ácido láctico es un ácido orgánico con numerosas aplicaciones. Puede producirse por síntesis química o de manera biotecnológica. La producción química se basa en la reacción de acetaldehído con ácido cianhídrico (HCN) para generar lactonitrilo, el cual puede ser hidrolizado a ácido láctico. Otro tipo de reacción se basa en una reacción a alta presión de acetaldehído con monóxido de carbono y agua en presencia de ácido sulfúrico como catalizador. La síntesis química tiene como desventaja que se obtiene la mezcla racémica de los isómeros D y L (Litchfield, 1996).

En la producción biotecnológica se ha empleado la fermentación por microorganismos utilizando sustratos ricos en carbohidratos, lo que tiene como ventaja que se pueden formar enantiómeros D o L ópticamente activos. Con el uso de esta tecnología se buscan microorganismos que sean termófilos, de rápida fermentación y sustratos que sean baratos. Por ejemplo, se tiene la propuesta de aprovechar las más de 1,300 millones de toneladas de desperdicios en alimentos ya que se ha investigado que su composición puede resultar de la siguiente manera: 27% carbohidratos, 12% grasas, 11% azúcar monomérico, 6% de proteínas y 2% de fibras dietéticas. Este sustrato, además de cumplir con la demanda energética, es altamente fermentable. Este aprovechamiento de desechos contribuye en gran

medida a la reducción de costos, lo que favorece el uso del ácido láctico en la industria para la producción de sus derivados (Camacho y Lizarazo, 2021). Del tipo de microorganismos seleccionado dependerán el requerimiento del control de pH en condiciones ligeramente ácidas (5.5-6.5), la temperatura de incubación (entre 5 °C y 45°C), la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el método de fermentación empleado y la formación de los subproductos (Zuluaga, 2013). La mayoría de los microorganismos productores son Bacterias Ácido Lácticas (BAL). Estas son heterótrofas, carecen de algunas capacidades biosintéticas y por lo que se requiere la adición de nutrientes complejos, que pueden contribuir con la obtención de un ácido láctico más puro y con un mejor rendimiento, aunque esto repercute en el costo de producción (Rahman y Bhoi, 2021). Se han identificado diversos géneros que contienen bacterias productoras de ácido láctico entre los que encontramos: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Sin embargo, el género más importante es *Lacticaseibacillus*, este a su vez se subdivide en alrededor de ochenta especies que producen ácido láctico. Ninguno de los anteriores géneros tiene la capacidad de producción de ácido láctico enantioselectivo, siempre se encontrará en mayor o menor medida la mezcla enantiomérica (Zaini *et al.*, 2019).

En el método industrial al sustrato se le tienen que agregar una fuente de vitaminas y cofactores en la cual se utiliza una mezcla de 10 a 15% de glucosa, 10% de CaCO₃, bajas cantidades de fosfato de amonio y extracto de levadura. El medio se inocula y se agita sin aireación para optimizar la neutralización del ácido formado. La fermentación dura de 2 a 4 días y termina cuando toda la fuente de carbono se ha agotado esto con la finalidad de facilitar la purificación. Al final de la fermentación el pH se ajusta a 10 y el producto se calienta para solubilizar el lactato de calcio y favorecer la coagulación de las proteínas que se encuentren en el medio de reacción. El medio de reacción se filtra para remover tanto las sustancias que no son solubles como la biomasa. Se concentra por evaporación y una vez que se encuentre concentrado se adiciona ácido sulfúrico para realizar una filtración para remover el sulfato de calcio formado y de esta manera obtener el ácido láctico con un determinado grado de pureza, dependiendo de la eficiencia del proceso (Es *et al.*, 2018).

3.10. Métodos de determinación y cuantificación de ácido láctico

Es esencial mejorar la determinación, cuantificación y purificación del ácido láctico, asegurando que la técnica analítica utilizada tenga un rango de linealidad y una respuesta reproducible y confiable. En la actualidad, tenemos un amplio abanico de métodos a utilizar con la finalidad de tener diversas opciones de costos, así como del tiempo de análisis y de recuperación del producto. La tabla 1 muestra un condensado de los mismos.

Tabla 1. Descripción de diversos métodos para la determinación y cuantificación de ácido láctico.

Método	Descripción	Referencia
Gravimétricos	<p>Se propone que la reactividad que tiene el ácido láctico con sales de bario permite su identificación como lactato de bario realizando una relación estequiométrica para calcular la cantidad de ácido láctico en el medio, por medio de la siguiente reacción:</p> $2 C_2H_6O_3 + BaCl_2 \cdot 2H_2O \rightarrow (C_3H_5O_3)_2Ba + 2HCl + 2H_2O$	Torres y Gómez, 2019
Colorimétricos	<p>Planta oxidar el ácido láctico con H₂SO₄ a acetaldehído para posibilitar la reacción con p-hidroxifenilo en presencia de iones de cobre, se obtendrá una relación lineal entre absorbancia y concentración del analito. La absorbancia se mide a 560 nm por lo que se tiene que construir una curva de calibración que permita la cuantificación.</p>	Borshchevskaya <i>et al.</i> , 2016
Resonancia magnética nuclear (RMN)	<p>La RMN identifica moléculas particulares a partir del spin de los átomos presentes en las mismas (típicamente ¹H y ¹³C). Es una técnica altamente sensible, lo que permite diferenciar la contribución de diferentes ácidos orgánicos con pesos moleculares muy cercanos</p>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2010
Cromatografía de gases acoplada a masas (CG/MS)	<p>Se requiere para cuantificar ácido láctico un detector de ionización de llama y una columna DB wax (30m x 0,25 mm i.d. x 0.25 mm) con temperatura de horno de 50 °C durante 5 min y posterior aumento hasta 190 °C, en una rampa de 3 °C /min y un tiempo de residencia en la temperatura final de 10 min. La temperatura del inyector se fija en 230 °C mientras que en el detector fue de 240 °C. El gas de arrastre fue N₂ con flujo de 1.2 mL/min. Los compuestos volátiles se identifican de acuerdo con sus tiempos de retención y de esta manera se pueden diferenciar el ácido láctico del acético, propiónico y succínico, entre otros</p>	Evangelista <i>et al.</i> , 2014
Cromatografía de intercambio iónico por HPLC	<p>En el caso de detección de ácido láctico en vinos y en mostos se utiliza una columna de intercambio catiónico (Aminox HPx87-H; 300 mm y 7.8 mm) operada a 65 °C, eluida con una fase móvil de H₂SO₄ 0.013 N, con un flujo</p>	Schneider <i>et al.</i> , 1987

	de 0.8 mL/min y monitoreada con un detector de UV a 210 nm	
Enzimáticos	Estos métodos acoplan la reacción del analito con una enzima y el producto puede detectarse por métodos espectrofotométricos o con fluorescencia. Este método se explicará a fondo en el siguiente punto debido a que fue el que se empleó en este trabajo para la cuantificación del ácido láctico.	

3.11. Determinación y cuantificación de ácido láctico por métodos enzimáticos.

Los métodos espectrofotométricos emplean la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y el dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidada (NAD⁺) como coenzima. Ocurre la oxidación del lactato a piruvato al tiempo que la coenzima es reducida a NAD-H, y este producto se detecta por absorbancia a 340 nm. Se plantea una determinación indirecta considerando que la concentración de NADH es equimolar a la de lactato. Se debe trabajar en un rango de 7.72-6.10mM. Esta técnica es altamente específica permitiendo diferenciar entre isómeros, que en el caso del ácido láctico son el L y el D. Para esto se requiere una enzima altamente purificada y una minuciosa determinación. Uno de los factores de desventaja es que para realizar la reacción se utilizan kits que llegan a tener un costo elevado (Marbach y Weil, 1967).

La misma enzima puede emplearse para cuantificar lactato por excitación a 535 nm y emisión a 587 nm. El problema que presenta la LDH es que en ocasiones la oxidación de la coenzima a altos voltajes puede convertir la reacción en reversible y consecuencia reducir el pico de NADH. Se ha introducido una nueva metodología con el empleo de la enzima lactato oxidasa (Lox) que, en presencia de oxígeno, tiene la capacidad de oxidar al ácido láctico y producir H₂O₂ y, como en el caso anterior, se establece una correlación equimolar (Sigma-Aldrich, 2014).

La misma enzima Lox funciona como catalizador en la oxidación aeróbica de lactato con la liberación de H₂O₂ puede permitir la cuantificación de otros cromógenos. Por ejemplo, en contacto con 4-aminoantipirina y otra enzima (peroxidasa-HRP), genera un cromógeno que se identifica a 565 nm y que es directamente proporcional a la cantidad de lactato en la muestra. Este ensayo puede hacerse en microplaca para reducir el consumo de los reactivos (Lin *et al.*, 1999).

Las enzimas descritas anteriormente han permitido la implementación de biosensores para la detección del lactato, así como parejas moleculares de reconocimiento constituidas por Lox/LDH, citocromo b2/LDH entre otras (Suman *et al.*, 2005).

3.12. Purificación de ácido láctico

Una vez llevada a cabo la producción de ácido láctico por medio fermentativo o su recuperación después de una reacción de hidrólisis, química o enzimática, puede resultar en un proceso complicado, costoso y de bajos rendimientos. Nuevamente la complejidad de la matriz será el factor determinante para lograr una buena purificación del reactivo de interés. Las técnicas para lograrlo no son nuevas, sin embargo, se pueden modificar según las características de la muestra y el proceso, la biotecnología por ejemplo es una de las áreas que ha comenzado a destacar en la purificación ya que esta busca generar procesos más relacionados con la química verde los cuales tengan un menor efecto en el medio ambiente procurando a su vez procesos más sostenibles. A continuación, en la tabla 2, se exponen algunas de las técnicas más prácticas y con mejores eficiencias (Olszewska *et al.*, 2019).

Tabla 2. Técnicas para el aislamiento y purificación del ácido láctico.

Técnica	Descripción	Referencia
Precipitación	La precipitación, proceso de separación convencional, es una opción viable para la purificación de ácido láctico. Se logra adicionando en exceso hidróxido o carbonato de calcio al medio para obtener la sal de calcio o lactato de calcio al cual se le agrega ácido sulfúrico precipitando sulfato de calcio para filtrar la solución y recuperar ácido láctico libre y puro.	Din <i>et al.</i> , 2021
Destilación	Se utiliza para moléculas que tienden a ser inestables térmicamente, como lo es el ácido láctico. Es necesario el uso de rotavapores que permitan modificar el flujo de alimentación, la agitación, la temperatura del condensador y del evaporador para favorecer el porcentaje de recuperación. Otra opción puede ser la separación en columna de destilación fraccionada, sin embargo, la complejidad de la muestra podría crear dificultades para separar las fracciones.	Komesu <i>et al.</i> , 2014
Extracción con solventes	Proceso conocido también como extracción líquido-líquido. Es un método en el que uno o más solutos son removidos de una mezcla líquida, la que muestra una diferencia en la solubilidad al adicionar un solvente.	Komesu <i>et al.</i> , 2017

	Algunos factores para considerar podrían ser la fácil separación de las fases al añadir el solvente, la selectividad del solvente y la selección del solvente. Solventes como el éter etílico, acetato de etilo, hexano, alcohol isoamílico y furfural presentan una alta afinidad al ácido láctico.	
Proceso de membranas	Consiste en la transferencia de solutos a través de una barrera física permeable que separa dos fases, restringiendo el paso de componentes de una fase a otra. Estas membranas pueden ser de diversos materiales, homogéneos o heterogéneos, simétricos o asimétricos, sólidos o líquidos, con carga o neutros. Se debe identificar si el transporte de moléculas se genera por fenómenos de convección o difusión y si puede ser provocado por diferenciales en los campos eléctricos, por diferencias en concentración, presión o temperatura.	Phanthumchida <i>et al.</i> , 2018
Microfiltración	Se utiliza una membrana porosa para la separación de partículas con un diámetro de 0.1 a 10 mm. Resulta una tecnología eficiente para la separación de coloides, emulsiones, suspensiones y microorganismos con presiones entre 0.5 y 3 bar. Sin embargo, para el ácido láctico se tienen que hacer algunas adaptaciones como utilizar una membrana de cerámica, la cual resulta más tolerante a las condiciones de extracción como temperatura, presión y al ácido	Lu <i>et al.</i> , 2012
Ultrafiltración	Las membranas de este tipo de técnica se clasifican según el peso de las moléculas que se desean separar en un rango de 1,000 Da hasta los 10,000 Da. La composición de las membranas es anisotrópica ya que los poros en la membrana varían de tamaño. También, hay que considerar las interacciones electrostáticas entre la matriz y la membrana a ciertos pH. Esta técnica suele emplearse para la separación de	Li <i>et al.</i> , 2006

	biomoléculas como proteínas, polisacáridos, polímeros entre otros.	
Nanofiltración	La membrana es semipermeable y la separación se ve reflejada por el peso de las moléculas entre 200 Da a 1,000 Da contando con un tamaño de poro de aproximado de 1.5 nm a 2.5 nm. Al ser membranas muy densas se requiere el uso de presiones elevadas que van de los 3 a los 20 bar. Es importante tener en cuenta los efectos en las cargas entre la membrana y la solución a filtrar	Dey <i>et al.</i> , 2012
Electrodialisis	Utiliza membranas de intercambio catiónico y aniónico. Dichas membranas se reorganizan alternativamente entre el ánodo y el cátodo por la aplicación de un potencial eléctrico entre los electrodos, en donde los cationes migran al cátodo y los aniones al ánodo.	Datta y Henry, 2006
Cromatografía de intercambio iónico	La separación se da por el intercambio iónico entre las moléculas debido a las propiedades de carga eléctrica y presenta dos fases, la fase estacionaria o intercambiador iónico, que puede variar en términos de fuerza, y la móvil. Se deben considerar el flujo y el volumen de muestra así, como sus propiedades. En este tipo de cromatografía se da una competencia entre moléculas que difieren en su carga superficial por grupos con carga opuesta, sobre un absorbente de intercambio iónico. Las interacciones hidrofóbicas reversibles entre los solutos son controladas para favorecer la unión o elusión de moléculas	Mayolo <i>et al.</i> , 2012

3.13. Usos del ácido láctico

El ácido láctico y sus derivados se aplican en las siguientes industrias:

- Industria de alimentos: se utiliza como acidulante y conservador.
- Producción animal: alimento.

- Industria química: agente solubilizador y como control de pH.
- Industria farmacéutica: formación de sales de hierro y calcio para la producción de diversos medicamentos.
- Industria de los plásticos: se utiliza como un precursor del poli(ácido láctico).
- Industria textil: agente auxiliar en el teñido e impresión.

3.14. Poli(ácido láctico)

El poli(ácido láctico) o PLA es miembro de la familia de los poliésteres alifáticos, conformada por ácidos α -hidroxilos, donde se incluyen el ácido poliglicólico y el ácido polimandélico, considerados biodegradables y compostables (Hujanem y Linko, 1996).

El PLA es un termoplástico con gran fuerza y conformado por grandes módulos, sintetizado a partir de materiales renovables convirtiéndolo en un polímero de gran relevancia en el tema de preservación ambiental, marcando la diferencia de los polímeros con orígenes en el petróleo. Es utilizado en la industria del empaque y embalaje, y se considera como “generalmente reconocido como seguro” o por sus siglas en inglés como GRAS. Cuenta con diversas aplicaciones en contacto con los alimentos, además, de mostrar propiedades de biocompatibilidad y absorción en el área médica, siendo utilizado para prótesis, implantes e incluso la restauración de tejidos dañados (Zhang *et al.*, 2020).

El PLA tiene una baja solubilidad en una amplia gama de disolventes líquidos, como el agua, el alcohol y la parafina, por lo que puede ser empleado de manera segura en el envasado de alimentos sin causar efectos adversos para la salud. En contraste, se disuelve en cloroformo, cloruro de metilo, dioxano, acetonitrilo, tricloroetano y ácido dicloroacético, además, de tolueno, acetona, etilbenceno y tetrahidrofurano (THF) (Rahman y Bhoi, 2021).

Es uno de los pocos polímeros cuya estructura puede ser modificada dependiendo de la mezcla estereoquímica con la que cuente, ya que este polímero puede tener dos isómeros, el L y el D. Dependiendo del porcentaje que se cuente de cada uno sus propiedades se irán modificando, disminuyendo su cristalinidad, su fuerza, resistencia y la termoestabilidad con la que cuente. Sin embargo, a nivel industrial se ha encontrado que sus mejores propiedades se obtienen cuando se cuenta con los dos isómeros presentes en la estructura, siendo el isómero L el que se encuentra en un mayor porcentaje que el isómero D (Garlotta, 2001). Esto influye directamente en el grado de cristalinidad que tiene el polímero de la que depende su máxima temperatura de utilidad del polímero y su tiempo de degradación, pues el PLA cristalino tiende a ser más resistente (Castillo, 2015). Su vida media en el ambiente está entre 6 y 24 meses, dependiendo de factores como tamaño y la forma del objeto, la relación de los isómeros y la temperatura (Farah *et al.*, 2016).

El éxito del PLA radica también en su versatilidad, ya que las propiedades del material se pueden modificar de varias maneras. Se puede ajustar mediante la adición de plastificantes adecuados para mejorar su procesabilidad y flexibilidad. También puede ser mezclado con otros polímeros, biodegradables o no, como el polietileno, polipropileno, quitosano, poliestireno, tereftalato de polietileno y policarbonatos mediante la fabricación de materiales compuestos por la adición de nanotubos de carbono, nanopartículas cerámicas, fibras naturales y celulosa. A continuación, se muestra una tabla con las ventajas y desventajas que se han recopilado del uso de PLA.

Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de PLA.

Ventajas	Desventajas
Biocompatibilidad: su principal producto de degradación es el ácido láctico, un compuesto que no es tóxico y que es metabolizado por el propio organismo.	Tasa de degradación lenta: el PLA puede llegar a degradarse de manera natural a través de la hidrólisis. Sin embargo, depende de muchos factores como son la cristalinidad y el peso molecular.
Procesabilidad: el PLA tiene una mejor procesabilidad térmica que otros biopolímeros. Se puede procesar mediante moldeo por inyección, extrusión de película, moldeo por soplado, termoformado, hilado de fibras y formación de películas.	Hidrofobicidad: el PLA es un material relativamente hidrófobo, que tiene aproximadamente un ángulo de contacto de 80°, lo que hace que tenga una baja afinidad celular y provoca una respuesta inflamatoria al entrar en contacto directo con fluidos biológicos.
Ahorro de energía: la formación del polímero requiere entre un 25 a un 55% menos de energía que los polímeros derivados del petróleo.	Falta de grupos reactivos en la cadena lateral: el PLA es químicamente inerte, lo que hace que su funcionalización de la superficie y la modificación en masa se convierta en tareas desafiantes.
Respeto al medio ambiente: el PLA se puede producir a partir de fuentes renovables como el maíz, trigo, arroz, es biodegradable, reciclable y compostable lo que lo vuelve un excelente candidato para participar en procesos de economía circular.	Baja tenacidad: llega a ser un material muy frágil por lo que sus aplicaciones necesitan considerar que no se necesite una deformación plástica a niveles elevados de tensión.

Fuente: Campaña *et al.*, 2022

3.14.1. Aplicaciones del poli(ácido láctico)

El polímero tiene una amplia aplicación en diversas áreas. Presenta una muy buena biocompatibilidad, debido a que su producto intermedio es el ácido láctico este puede ser metabolizado por el cuerpo humano y no resulta tóxico por lo cual se ha empleado en la liberación de fármacos. Otro campo de la biomedicina es la ingeniería de tejidos, pues este producto resulta también hemocompatible (Li, 2020).

En los últimos años, con la finalidad de reducir el volumen de los utensilios de un solo uso en los servicios de alimentos se han producido un sin número de desechables degradables como son las tazas, platos, cubiertos y el uso en embalajes multicapa de rendimiento para productos lácteos perecederos en forma de revestimientos laminados (Flores, 2020).

- Industria de alimentos: La F.D.A concluyó que es una sustancia GRAS y que no hay migración de sus componentes al alimento, por lo que puede ser utilizado como material de empaque. Se puede utilizar puro o en mezcla con otros polímeros como la policaprolactona (PLC). En los empaques podemos encontrar que el polímero se encuentra en una proporción de 90-95% del isómero L mientras que el isómero D se encuentra entre el 5-10%. La diferencia en el porcentaje repercute directamente en las propiedades físicas del material (Pawar y Purwar, 2013).
- Industria automotriz: fabricación de piezas para lograr la reducción del peso del vehículo, mejorando los rendimientos del combustible.
- Industria textil: resulta un material eficiente para la lucha contra el denominado “fast fashion”, pues se han desarrollado fibras para los tejidos, los cuales cuentan con una mejor biodegradabilidad.
- Agricultura: Protección de suelos con el fin de mantener la humedad, esto a partir de lonas de recubrimiento.
- Industria médica: material innovador para suturación reabsorbible, material de cirugía ortopédica como implantes, tornillos, broches, placas y grapas, en la cirugía reconstructiva craneofacial maxilofacial como tejidos óseos y tejidos blandos, investigaciones recientes lo han utilizado para la creación de matrices de regeneración de tejidos de manera guiada como en piel, cartílagos, huesos, entre otros (Argáez, 2016).
- Industria farmacéutica: su fácil absorción por parte del organismo ha llevado a ser utilizado para microencapsular y nanoencapsulado medicamentos de liberación lenta como la insulina, el taxol en los tratamientos de cáncer, antiinflamatorios entre otros medicamentos.

3.14.2. Obtención del poli(ácido láctico)

Las reacciones entre los grupos hidroxilo y los ácidos carboxílicos, presentes en el ácido láctico permiten la formación del polímero de PLA. Inkinen (2011), reporta tres métodos para la síntesis de PLA de alto peso molecular.

- Condensación directa en masa.
- Condensación por deshidratación azeotrópica.
- Polimerización mediante apertura de anillo.

3.14.2.1. Obtención de PLA por condensación directa en masa

Se remueve el agua libre para evitar la formación de algunos oligómeros lineales. Se emplean catalizadores (como ácidos fuertes o compuestos organometálicos), y se logra la obtención de oligómeros (Espezúa y Ponce, 2014). A continuación, se lleva a cabo el proceso de polimerización en estado fundido para la obtención de elevados pesos moleculares. Aquí se debe vigilar el nivel de agua y se obtiene una mezcla con una alta viscosidad por lo que es necesario emplear reactores que suministren una fuerte agitación para tener una buena homogeneización y, además, renovar la capa límite que permita la fácil difusión de agua. En esta parte del proceso se recomienda usar vacío en presencia de atmósferas inertes. Se obtienen polímeros con pesos moleculares menores a 100,000 g/ mol. Técnicas diferentes permiten incrementar estos tamaños, como la polimerización en estado sólido (Espezúa y Ponce, 2014). Para ello, se cristaliza el polímero y con una mezcla de catalizadores y control de temperatura se alcanzan los tamaños deseados.

3.14.2.2. Obtención de PLA por condensación por deshidratación azeotrópica

El proceso sigue las mismas condiciones que las descritas en el punto anterior pero no ocurre la formación de la mezcla con alta viscosidad, ya que el proceso ocurre en una disolución. El solvente formará un azeótropo con el agua y ambos se retirarán por destilación. Al finalizar se deberá agregar un agente secante para retirar el agua del solvente. Este proceso permite obtener PLA de alto peso molecular a un costo de producción elevado (Hwang *et al.* 2012).

3.14.2.3. Obtención de PLA por polimerización por apertura de anillo

A nivel industrial es el proceso más utilizado en la producción de PLA, se lleva a cabo en tres etapas: policondensación, catalizada o no, para la obtención de PLA de muy bajo peso molecular en el orden de 2,500 g/mol. Despolimerización del PLA obtenido en la primera etapa para la formación de la lactida tras calentar a temperaturas que van de 130-230 °C y a una disminución de presión en presencia de 0.05-1% en peso de polvo de estaño. La lactida, dímero deshidratado cíclico del AL, se purificará por destilación o recrystalización con solventes como el acetato de etilo o el tolueno que posteriormente se eliminarán por secado en vacío (Drumright, 2000). A partir de la lactida, por un proceso de polimerización en masa en estado fundido, se obtiene el PLA, con catalizadores alcóxidos metálicos como el estaño o

el aluminio. Este tipo de polimerización destaca sobre las otras debido a que permite la obtención de diversas microestructuras.

3.14.3. Propiedades del poli(ácido láctico)

Debido a la naturaleza quiral del ácido láctico el poli(ácido láctico) presenta diversas formas. El PLLA y PDLA son polímeros cristalinos debido a la pureza enantiomérica de los monómeros y a su estereorregularidad. Cuentan con las mismas propiedades y su temperatura de transición vítrea (T_g), que ronda entre los 50-70 °C, mientras que la temperatura de fusión (T_m) se encuentra en los 170-190 °C (Auras, 2010). La T_g del PLA se estudia con técnicas como la calorimetría adiabática diferencial, la calorimetría de barrido (DSC) o DSC con temperatura-modulada (TMDSC). La temperatura de transición vítrea determina muchos factores importantes en el polímero, tales como el envejecimiento físico, la cristalinidad, la morfología y las impurezas.

Sin embargo, en el PLA comercial se encuentra conformado por una mezcla de la polimerización de los enantiómeros del ácido láctico L y D, dando como resultado el poli-L-(ácido láctico) (PLLA) y el poli-D-(ácido láctico) (PDLA). Los polímeros derivados de estos isómeros resultan en un material semicristalino. Cuando contamos con un PLA con más del 90% de PLLA tiende a ser más cristalino, mientras que en porcentajes inferiores se tiene un polímero con una menor cristalinidad aumentando las regiones amorfas.

Cuenta con propiedades mecánicas muy similares al PET, sin embargo, presenta una baja elongación. En la siguiente tabla se muestran algunos valores reportados de sus propiedades:

Tabla 4. Propiedades mecánicas del poli(ácido láctico).

	Mínimo	Máximo	Unidades
Resistencia a flexión	0.89	1.03	MPa
Resistencia al impacto	0.16	1.35	J/cm
Elongación	1.5	380	%
Resistencia a la tracción	10	60	MPa
Módulo de Young	350	2800	MPa

Fuente: Perego y Domenico, 2010

La estereoquímica también tiene un impacto relevante en las propiedades del material, el PLLA es un polímero semicristalino, mientras que el PDLLA es un polímero amorfo con un punto de fusión variable, además, la tasa de degradación del PLLA es significativamente más lenta que la del PDLLA, debido a que la primera presenta mayores regiones cristalinas.

3.14.4. Degradación de poli(ácido láctico)

El PLA puede degradarse en el ambiente con el paso del tiempo, proceso en el que se deben conjuntar distintos factores para lograr su completa reintegración al ciclo del carbono. En muchas ocasiones no sucede y se propicia la acumulación y la formación de microplásticos, los cuales han comenzado a representar un problema grave (Luo *et al.*, 2019). Por esa razón se han estudiado distintos procesos que influyen en la degradación del PLA y se tratarán en la siguiente tabla:

Tabla 5. Diferentes procesos de degradación de poli(ácido láctico).

Proceso	Descripción	Referencia
Hidrólisis	La degradación del PLA en agua puede describirse como una escisión de cadena no enzimática provocando la disminución del peso molecular. La hidrólisis de PLA se produce preferentemente en regiones amorfas, lo que conduce a un aumento de la cristalinidad del polímero. Es una reacción auto catalizada, ya que los grupos terminales de ácido carboxílico del PLA y sus oligómeros pueden catalizar la ruptura de los enlaces éster sufriendo un fenómeno de sustitución nucleofílica. Está influenciada por la temperatura, el pH y la capacidad de sustancias ácidas y básicas (NaOH) de adentrarse entre los poros del polímero.	Moreno, 2020.
Degradación térmica	El PLA cuenta con una limitada estabilidad térmica, especialmente a temperaturas superiores a los 190 °C. Esto se debe a que sus enlaces éster son térmicamente inestables, por lo que se reduce su peso molecular e influye en su cristalinidad, variando según las propiedades del polímero. Esta reacción se produce en presencia de oxígeno por lo que se conoce como termo-oxidativa	Van Krevelen y Te Nijenhuis, 2009.

Fotodegradación	<p>La radiación solar es la principal causa natural de degradación en los polímeros, principalmente provocada por la luz ultravioleta. En el PLA, la fotodegradación se produce en los enlaces C=O por lo que una exposición prolongada provoca la alteración. Los nuevos productos han optado por agregar aditivos oxo degradables como el D2W el cual acelera la ruptura de los polímeros, sin embargo, crea únicamente la disminución en el tamaño de partícula, convirtiéndose en una fuente importante de microplásticos.</p> <p>Una combinación de humedad relativa y la luz ultravioleta puede acelerar la pérdida de peso molecular, la disminución de la Tg, la disminución en el % de elongación y la disminución en la cristalinidad</p>	<p>Sakai y Tsutsumi, 2010.</p> <p>Nampoothiri <i>et al.</i>, 2010.</p>
Degradación microbiana	<p>La degradación de polímeros en un entorno natural como el suelo es un proceso que combina la degradación fisicoquímica y microbiológica. Se ha reportado que uno de los factores cruciales en el deterioro microbiano de PLA es la temperatura. Conocida como degradación biótica o biodegradación, ocurre de manera natural por acción de microorganismos como bacterias, hongos o algas, por lo que los productos de degradación son la generación de dióxido de carbono, metano y agua. La presencia o no de oxígeno definirá los productos de las reacciones.</p>	<p>Calabia <i>et al.</i>, 2010</p>
Biocatálisis	<p>Esta se perfila como una herramienta cada vez más atractiva para la hidrólisis de la superficie y la funcionalización de polímeros sintéticos. La degradación enzimática de los polímeros por hidrólisis es un proceso de dos pasos: primero, la enzima se une al sustrato para posteriormente realizar una escisión hidrolítica, en el caso del PLA en el enlace éster del polímero.</p>	<p>Iwata <i>et al.</i>, 2010.</p>
Alcoholisis	<p>En este proceso además de la hidrolisis del polímero ocurre una reacción de transesterificación entre el alcohol</p>	<p>Jia <i>et al.</i> 2016</p>

(principalmente etanol y metanol) y el plástico a temperaturas entre 180-280 °C y altas presiones. La reacción se cataliza por un compuesto organometálico o un ácido fuerte. Obteniendo compuestos como el lactato de etilo o lactato de metilo

El producto de la degradación del poli(ácido láctico) es su unidad monomérica, el ácido láctico. Convirtiendo el proceso en una excelente plataforma que se puede transformar en una variedad de otras materias primas valiosas. Como ejemplo se presenta el siguiente esquema (figura 2), el cual propone una serie de reacciones a las que se comercial. En los siguientes párrafos se analizarán los procesos de degradación hidrolítica y la biocatálisis a profundidad ya que fueron los que se utilizaron en el desarrollo de esta investigación.

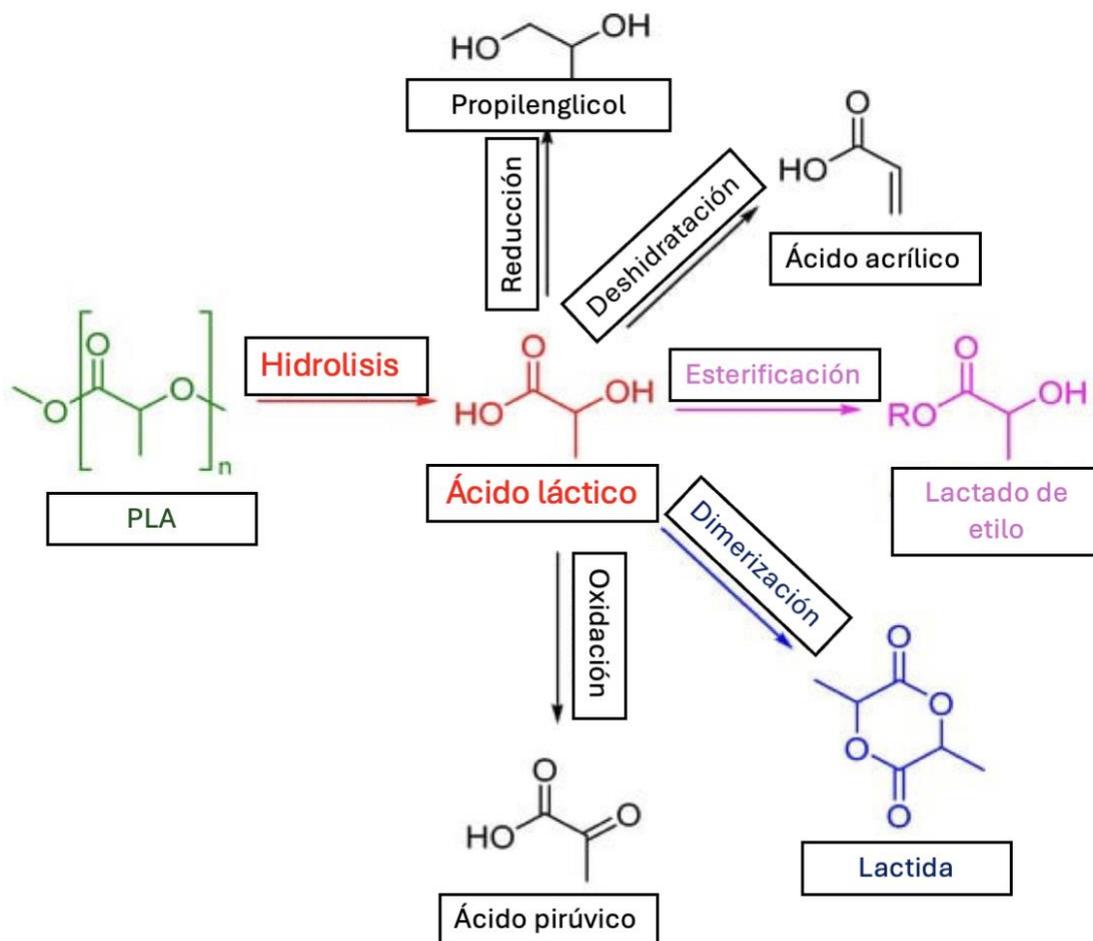


Figura 2. Poli(ácido láctico) como plataforma de obtención de nuevos productos (McKeown y Jones, 2020).

3.14.5. Mecanismo de reacción de la degradación hidrolítica del poli(ácido láctico)

Como se presentó en la tabla 2, la hidrólisis como uno de los procesos de degradación de PLA más utilizados y para el caso de este polímero se sigue el principio de una reacción de hidrólisis para ésteres, a continuación, se presenta un esquema (figura 3) el cual ofrece una idea de cómo se da esta hidrólisis, además, en las líneas siguientes se detallará el mecanismo dependiendo si la hidrólisis se da en condiciones ácidas o básicas (Tsuji, 2010).

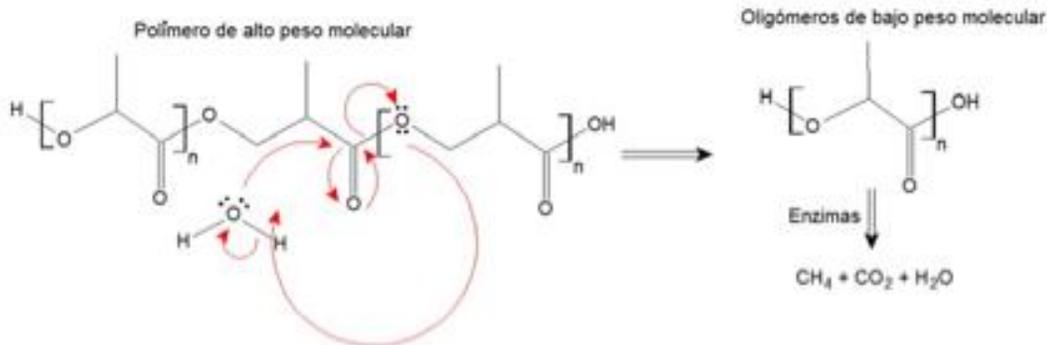


Figura 3. Reacción típica de hidrólisis del poli(ácido láctico) (Ohkita y Lee, 2006).

La escisión de la cadena durante la hidrólisis ácida libera grupos ácido H^+ . El ácido queda retenido en el material o en el medio de reacción, lo que resulta en una disminución en el pH y una aceleración en la velocidad de reacción. Durante la hidrólisis se producen diferentes fenómenos de difusión y transporte de agua, iones y productos de degradación como se describe a continuación:

1. En primer lugar, se presenta la reacción ácido-base en este caso, el agua se convertirá en el ion hidronio por acción del medio ácido actuando como un ácido mientras que el oxígeno del grupo carbonilo será la base por lo que se protonará. El ion hidronio neutralizará su carga y será liberado como una molécula de agua.
2. El intermediario de la reacción con el oxígeno protonado recibirá un ataque nucleofílico en el carbono del carbonilo, el cual cuenta con una carga parcial positiva, volviéndolo susceptible al ataque de los electrones del agua con ello se formará un enlace entre el oxígeno del agua y el carbono antes mencionado, el oxígeno se mantendrá protonado volviéndolo inestable.
3. Como el carbono no puede formar más de cuatro enlaces, los electrones pi del doble enlace carbono-oxígeno se deslocalizarán para neutralizar la carga del oxígeno, en esta estructura se mantiene un oxígeno protonado.
4. Al tratarse de un oxígeno protonado se comportará como un ácido para dar pie a una reacción ácido-base con una nueva molécula de agua, la cual tomará un hidrógeno regresando el equilibrio de carga a la molécula principal y formando un nuevo ion hidronio.
5. Este nuevo ion hidronio volverá a reaccionar con la molécula en una reacción ácido-base, en la que el oxígeno más básico tomará un hidrógeno del ion hidronio, adquiriendo una carga positiva.
6. Se dará el movimiento de los electrones para estabilizar las cargas en la molécula por lo que un par de electrones libres de los oxígenos no protonados

formarán un doble enlace con el carbono, nuevamente como el carbono no puede tener más de cuatro enlaces se dará la ruptura del enlace con el oxígeno protonado, de esta manera se conseguirá la fragmentación de la cadena principal, formándose el monómero de ácido láctico u oligómeros que continuarán en la reacción hasta romper todos los enlaces y quedé únicamente el monómero.

7. La otra parte de la molécula que formó el doble enlace con el carbono se mantendrá protonada por lo que actuará como un ácido y en una reacción ácido-base con el agua se formará nuevamente un ion hidronio el cual comenzará una nueva reacción de hidrólisis en las cadenas del polímero o en sus oligómeros es por eso por lo que se dice que se trata de una reacción auto catalizada.

Por su parte la hidrólisis básica presenta un mecanismo ligeramente diferente, analizando las estructuras de la reacción encontramos que el hidróxido de sodio es una sustancia iónica que en un medio acuoso se encuentra disociada. Por su lado, el respectivo éster de la cadena del poli(ácido láctico) tiene el carbono del carbonilo con una carga parcial positiva siendo susceptible a una sustitución nucleofílica como se describe en los siguientes pasos:

1. El nucleófilo OH^- del hidróxido de sodio ataca el carbono con carga parcial positiva que se trata del carbono del grupo carbonilo formando un enlace con este carbono, el oxígeno con doble enlace con el carbono del carbonilo libera un par de electrones π adquiriendo una carga formal negativa y formando un intermediario tetraédrico.
2. El sodio creará interacción iónica con el oxígeno con carga formal negativa, pero se mantendrán disociados en la solución acuosa.
3. Dos electrones del oxígeno con carga formal negativa formarán nuevamente el doble enlace con el carbono, rompiéndose el enlace del oxígeno que contiene la cadena de carbonos al ser un mejor grupo saliente. Resultando un ácido carboxílico (ácido láctico) y un alcohol terminal el cual será un extremo de la cadena del poli(ácido láctico) o en su caso de los oligómeros.

3.15. Enzimas

Las enzimas son polímeros biológicos que tienen por función catalizar las reacciones químicas que ocurren en los seres vivos. Aunque la función catalítica se ha encontrado en algunos ácidos nucleicos, la mayor parte la llevan a cabo proteínas, las cuales son macromoléculas complejas física y funcionalmente, ya que su función depende de mantener su estructura por lo que se debe tener especial cuidado en las condiciones en las que se encuentran. Son fundamentales para la desintegración de nutrientes a fin de que proporcionen energía o para obtener productos de interés en otras reacciones. Las enzimas catalizan uno o más compuestos conocidos como sustratos hacia uno o más compuestos aumentando los índices de la reacción por factores de al menos 10^6 . Es importante mencionar que las enzimas no se alteran ni se consumen en su participación en la reacción, tienden a ser catalizadores altamente selectivos y son específicas tanto para el tipo de reacción catalizada como para un sustrato único o un grupo reducido de sustratos que se encuentran estrechamente relacionados (DiTullio, 2022). Suelen ser estereoespecíficas y tener

varios puntos de contacto con sus sustratos e incluso tienen la capacidad de convertir sustratos no quirales en productos quirales (Ronner, 2019).

3.15.1. Clasificación de las enzimas

Las enzimas se clasifican por el tipo de reacción en el que intervienen y la gran mayoría de las enzimas en su nombre describen el tipo de reacción catalizada haciendo uso del sufijo -asa. El ejemplo más común se puede tratar de las enzimas deshidrogenasas las cuales eliminan átomos de hidrógeno. Sin embargo, para evitar ambigüedades la *International Union of Biochemists* (IUB) publicó un sistema de nomenclatura de enzimas en la cual cada una de las enzimas tiene un nombre y número de código singular que identifican el tipo de reacción catalizada y los sustratos comprendidos, por lo tanto, la clasificación queda de la siguiente manera: Oxidorreductoras: catalizan oxidaciones y reducciones (Rodwell *et al.* 2023).

- Transferasas: catalizan la transferencia de porciones, como grupos glucosilo, metilo o fosforilo.
- Hidrolasas: catalizan la división hidrolítica de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes.
- Liasas: catalizan la división de C-C, C-O, C-N y otros enlaces covalentes mediante la eliminación de átomos, dejando dobles enlaces.
- Isomerasas: catalizan cambios geométricos o estructurales dentro de una molécula.
- Ligasas: catalizan la unión de dos moléculas en reacciones acopladas a la hidrólisis de ATP.
- Translocasas: ayudan a mover moléculas o iones a través de una membrana celular.

3.15.2. Catálisis enzimática

A principios del siglo XX se descubrió que las enzimas en presencia de su sustrato adquirían una mayor estabilidad volviéndolas más resistentes a altas temperaturas. Fue entonces que el científico Emil Fischer propuso que las enzimas formaban un complejo de enzima-sustrato, y se propuso la analogía llave-cerradura, en la que la cerradura que está formada por una hendidura o bolsa en la superficie de la proteína que forma parte de una región muy importante nombrada, sitio activo, que es la región donde el sustrato interactúa con la enzima, y se logra la alineación óptima con los cofactores, grupos prostéticos y cadenas laterales de aminoácidos que se encargan de llevar a cabo la reacción catalítica (Plou, 2016).

3.15.3. Cutinasas

Las cutinasas son enzimas que se clasifican como hidrolasas de ésteres de ácidos carboxílicos o también conocidas como carboxilesterasas. Tienen como sustrato principal la cutina, poliésterlipídico de la cutícula de las plantas, que es la capa superior de las hojas y funciona como una capa protectora contra agentes externos (Carvalho *et al.*, 1999). Las cutinasas pueden degradar poliésteres, como el PLA, porque es un elemento común entre los dos tipos de moléculas (Casalini *et al.*, 2020).

Diversos hongos y bacterias fitopatógenos o saprófitos producen cutinasas para invadir los tejidos de los que obtendrán nutrientes. Entre ellos se encuentra el organismo que se maneja en el presente trabajo: *Aspergillus nidulans*. Se trata de un hongo ascomiceto que produce esporas sexuales y asexuales, perteneciente a la clase Eurotiomycetes y al orden Eurotiales. Tiene un crecimiento rápido en medio sólido o líquido dependiendo de las características de cultivo (Rittenour *et al.*, 2009). Es uno de los microorganismos que ha tomado gran importancia en la genética de los eucariotes y con él se han llevado a cabo trabajos que implican grandes avances en el desarrollo sexual y asexual de hongos, regulaciones metabólicas, control del ciclo celular, reparación del ADN entre otros (Galagan *et al.*, 2005). No es un microorganismo utilizado industrialmente y cuenta con un genoma de 30.07 MpB organizado en 8 cromosomas con 10,560 genes. Cuenta con una gran variedad de enzimas extracelulares con múltiples aplicaciones entre ellas, proteasas, esterases y cutinasas (Bermúdez, 2019).

Aspergillus nidulans posee cuatro cutinasas para la degradación de la cutina y la obtención de su fuente de carbono. El grupo de trabajo ha reportado, aislado, clonado, expresado y caracterizado los 4 genes que codifican para dichas cutinasas conocidas e identificadas como AN CUT 1, AN CUT 2, AN CUT 3 y AN CUT 4, de las cuales tres se han caracterizado de manera eficiente, presentando sus características en la siguiente tabla:

Tabla 6. Caracterización de las cutinasas de *Aspergillus nidulans*.

	ANCUT 1	ANCUT 2	ANCUT 3
Gen	AN05309	AN07541	AN07180
Peso	22.9 kDa	33 kDa	29.4 kDa
pH óptimo	9	7-9	9
Temperatura óptima	60 °C	40 °C	40 °C
Degradación de poliésteres	Poliésteres de cadena corta	Poliésteres de cadena corta y larga	Poliésteres de cadena corta
Disolvente	Isopropanol y hexano (30%)		Hexano y tolueno (30%)
Referencia	Solís, 2015	Morales, 2015	Llanos, 2018

Fuente: Alvarado, 2023

La estructura y las dinámicas moleculares están bien definidas con base en estudios de cristalografía de rayos X y RMN por lo que se tiene información general y clara de las cutinasas, por ejemplo, se sabe que cuentan con el sitio activo en el extremo terminal C de la cadena β , la enzima es una estructura comparta de 197 residuos dispuestos por un núcleo hidrofóbico conformado por una lámina central β rodeada por 5 α -hélices, y un único residuo de triptófano situado adyacente a un enlace disulfuro. El sitio catalítico, además, no se encuentra protegido sino preformado a diferencia de las lipasas el grupo de trabajo muestran que ANCUT 1 cuenta con una secuencia de seis cisteínas que forman tres puentes disulfuro que le confieren termoestabilidad a la estructura (Peña *et al.* 2024).

Este análisis computacional también ha permitido predecir el mecanismo de hidrólisis de los poliésteres, Las cutinasas, como lipasas y proteasas, tienen una tríada catalítica formada por histidina, serina y ácido aspártico. Su mecanismo de hidrólisis se basa en que el residuo de Histidina funciona como una base y el oxígeno de Serina se encarga del ataque nucleofílico al carbonilo del enlace éster del sustrato, produciendo un intermediario tetraédrico, estabilizado por la presencia de puentes de hidrógeno que se forman con los residuos de la cavidad oxianiónica. La Histidina continúa actuando como base y provoca la ruptura del enlace éster, causa la liberación del alcohol y la formación de la enzima acilada. Se realiza la hidrólisis de la enzima acilada, la cual tiene como resultado los productos ácido graso y enzima libre (Chen *et al.* 2013).

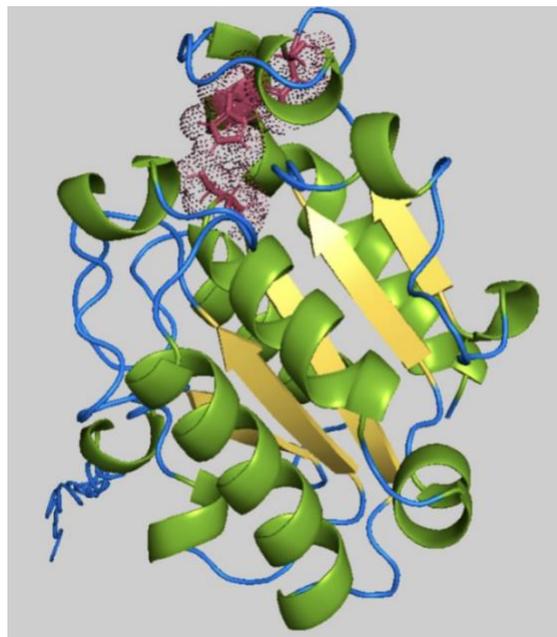


Figura 4. Modelo de la cutinasa de ANCUT 1 de *A. nidulans* obtenido por ColabFold. Se observa en magenta los residuos catalíticos de ANCUT 1 localizados en Ser127 Asp182 e His195. (Diego, trabajo en revisión)

3.16. Expresión de proteínas heterólogas

El uso de proteínas recombinantes se ha incrementado de manera exponencial y todo esto se debe a que son un mercado muy atractivo que se ve reflejado en los

bajos costos, la alta productividad y las velocidades de producción. En principio, todas las bacterias pueden ser usadas para la producción de proteínas heterólogas, pero en muchas especies se desconoce información sobre su regulación y, como son organismos procariotes, cuentan con sistemas más sencillos en la producción de proteínas, teniendo problemas con la glicosilación de las mismas. Es por ello que se han buscado organismos que cumplan con las características necesarias para obtener una buena expresión de la proteína de interés (Terpe, 2006).

Es por ello que se han buscado organismos que cumplan con las características necesarias para obtener una buena expresión de la proteína de interés (Terpe, 2006). Las levaduras tuvieron un comienzo lento en la producción heteróloga de proteínas, porque las producciones no resultaban como se esperaba y se trataba de una inversión mayor en tiempo y medios de cultivo (Romanos, *et al.* 1992). Sin embargo, solucionando los problemas que arrastraban este tipo de organismo han resultado una buena alternativa a los sistemas bacterianos, los cuales en ocasiones conducen a la síntesis de un mal plegamiento de la proteína provocando la inactivación de proteínas agregadas o cuerpos de inclusión (Cregg *et al.*, 2009). Se ha seleccionado a *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) como sistema de expresión ya que se trata de una levadura, eucariota, que, a diferencia de la expresión en sistemas bacterianos, cuenta con la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales de las proteínas, lo que se ve reflejado en un buen plegamiento, la formación de puentes disulfuro los cuales son fundamentales para mantener la estructura de la proteína haciéndola funcional (Sánchez, 2015).

3.16.1. Sistema de expresión *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*)

La expresión de las proteínas heterólogas en *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) requiere contar con vectores que posean promotores inducibles y que contengan marcadores de reconocimiento. Se han desarrollado diferentes sistemas y en este trabajo se ha seleccionado el sistema de *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) X33 con el vector pPIC-Z α . En este, la transcripción del gene clonado se encuentra bajo el control del promotor fuerte de la enzima alcohol oxidasa (AOX), necesaria en el metabolismo de metanol y que se produce cuando las células se encuentran en presencia de este alcohol haciendo a la levadura capaz de metabolizar metanol como única fuente de carbono.

El promotor AOX1 ha sido el más utilizado. *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) tiene dos genes para la enzima alcohol oxidasa (AOX1 y AOX 2). La actividad de la enzima alcohol oxidasa es atribuida a la expresión del gen AOX1, ya que este se expresa en altos niveles y es sensible a la presencia de metanol, mientras que el gen AOX2 es indiferente. Al realizar la inducción con metanol su metabolismo se basa en la oxidación a formaldehído por la enzima alcohol oxidasa (AOX), usando oxígeno molecular, esta reacción genera peróxido de hidrógeno, para evitar la toxicidad generada por este último, el metabolismo del metanol ocurre en un organelo celular especializado, llamado peroxisoma, el cual es el encargado de secuestrar los productos tóxicos alejándose del resto de la célula. La enzima alcohol oxidasa tiene una baja afinidad por oxígeno molecular y *Komagataella phaffii* (*P. pastoris*) genera grandes cantidades de la enzima (Cereghino y Creeg, 2000).

3.16.2. Vector de expresión pPICZ α

Este vector tiene como marcador el gen que confiere resistencia a zeocina para selección de recombinantes. A el promotor AOX1 se induce con metanol y logra altos niveles de expresión de la proteína heteróloga, cuenta con una secuencia de polihistidina (6xHis) para una eficiente detección y que facilita la purificación de la proteína. Otra de las ventajas es que el vector también cuenta con una señal de secreción, a-factor, que se encarga de dirigir a las proteínas al medio extracelular, volviendo mucho más sencilla su recuperación (Lovera y Torres, 2019).

3.17. Efectos en la degradación de PLA con diversas enzimas

En la literatura podemos encontrar varios reportes de la degradación enzimática del PLA a partir del uso de otros tipos de enzimas, como pueden ser las lipasas, esterases y lacasas. Este grupo presentan un fenómeno de biodeterioro en la muestra, esto quiere decir que propician cambios en las propiedades físicas del material, lo que podría resultar favorecedor como un pretratamiento en la muestra, sin embargo, no han mostrado evidencia contundente de biodegradación, entendiéndose esta como la conversión total de los polímeros en CO₂ y H₂O y biomasa por la acción de microorganismos y enzimas. Además, las lacasas presentan reacciones incontroladas, lo que limita la recuperación de los reactivos de interés, impidiendo el establecimiento de la economía circular (Lee *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha reportado la degradación de PLA por parte de la proteinasa K, sin embargo, su obtención y purificación llega a ser muy costosa, lo que vuelve al proceso poco viable (Alvarado, 2023).

4. Antecedentes experimentales del grupo de trabajo

El grupo de trabajo han identificado cuatro cutinasas de *Aspergillus nidulans* y a la fecha se han caracterizado tres de ellas, identificadas como ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3. Estas se han clonado para su obtención de manera heteróloga en el organismo *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*), con el objetivo de tener una mayor eficiencia en la producción enzimática. Este organismo se ha estudiado ampliamente en el diseño de procesos biotecnológicos y ofrece la posibilidad de realizar un escalamiento a nivel reactor para un mayor rendimiento de la enzima (Castro, 2017).

Las cutinasas pueden realizar la ruptura de enlaces éster presentes en polímeros como el PET o el PLA. En 2023, Alvarado obtuvo un conjunto de condiciones de degradación del poli(ácido láctico) que incrementaron de manera importante los resultados obtenidos previamente utilizando las cutinasas del grupo de trabajo. En su trabajo Alvarado encontró que los mejores resultados se obtenían al realizar la degradación enzimática con el polímero pulverizado a un tamaño de partícula #40, empleando el 3% de extracto enzimático con respecto al peso del polímero, condiciones estáticas, a 40 °C, con un amortiguador de fosfatos 50 mM pH 9, un volumen de reacción de 1 mL y en presencia de 10 mg de polímero PLLA. Este conjunto de condiciones se denominará MEJORES CONDICIONES 1 y servirá de base para tratar de lograr el incremento en la liberación de ácido láctico con las enzimas disponibles en el presente trabajo.

5. Justificación

Es un hecho que la vida cotidiana depende de los plásticos, pues estos ofrecen muchos beneficios en diversos sectores de la sociedad. Desde su aparición han promovido un modo de vida más sencillo y dinámico. Casi cualquier pieza, instrumento o material se pueda fabricar a partir de estos polímeros, además, la velocidad con la que se puede conseguir su manufactura ha representado ganancias enormes a la industria. Aunado a esto, sus características físicas los han posicionado como un material primordial en la industria de los empaques y embalajes, volviendo el transporte y conservación de materias mucho más eficiente, sin embargo, su elevada producción, consumo aunado a una mala gestión de residuos se han convertido en un importante foco de contaminación ambiental a niveles sumamente preocupantes.

La biotecnología ha surgido como un baluarte para la remediación de muchas problemáticas sociales, siendo un área que tiene como objetivo la creación de tecnología sustentable, alineándose así a la agenda 2030, que propone adaptar muchos procesos para que estos puedan seguir satisfaciendo nuestras necesidades sin comprometer la posibilidad de las generaciones futuras de hacerlo. En este trabajo se hace uso de tres cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans*, las cuales han demostrado tener actividad degradativa sobre poliésteres como el PLA.

La degradación de poli(ácido láctico), un polímero biodegradable, va más allá de lograr su reintegración al ciclo de carbono; busca que su degradación sea aprovechada como un andamio para la generación de nuevos reactivos de valor agregado, y con ello crear la economía circular del material, lo que resultaría en la disminución de la huella de carbono y la energía consumida, reduciendo con ello también la generación de desechos y de gases de efecto invernadero. Teniendo como base el trabajo de Alvarado (2023), se busca incrementar la eficiencia del proceso de degradación, agregando técnicas de pretratamiento y evaluando nuevas condiciones de reacción, buscando con todo ello la reducción de los tiempos de reacción.

6. Hipótesis

La aplicación de pretratamiento y la incorporación de nuevas condiciones de reacción enzimática sobre muestras comerciales de poli(ácido láctico) favorecerán el proceso de degradación y la obtención del monómero de interés, el ácido láctico, para emplearlo como punto de partida en la generación de materias primas de interés industrial.

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Mejorar la eficiencia en la reacción de degradación enzimática del poli(ácido láctico) y aprovechar los productos generados de esta reacción para proponer un proceso que se adapte a la economía circular.

7.2. Objetivos particulares

- Probar el desempeño de las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* (ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3) para la hidrólisis del poli(ácido láctico) en productos derivados de este polímero.
- Aplicar pretratamientos de ultrasonido, microondas y sonicación a las muestras del poli(ácido láctico) para incrementar la eficiencia en la degradación del polímero.
- Caracterizar los residuos de productos comerciales de poli(ácido láctico).
- Cuantificar la producción de poli-L-(ácido láctico) y poli-D-(ácido láctico) generado a partir de la reacción enzimática.
- Identificar los productos generados en la reacción de degradación enzimática y en la degradación química por hidrólisis alcalina del poli(ácido láctico).
- Comparar la eficiencia de los procesos de degradación química y enzimática.
- Obtener un producto de valor agregado, el lactato de etilo, a partir del ácido láctico recuperado en las reacciones de degradación.

8. Metodología

8.1. Producción de enzimas recombinantes

Las enzimas utilizadas para llevar a cabo la degradación enzimática fueron las cutinasas de *A. nidulans*, denominadas como ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3, expresadas en el sistema heterólogo *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) X33. Para la reactivación, inducción y producción de la enzima se siguió el protocolo propuesto por Lovera y Torres (2019).

8.1.1. Reactivación de la cepa y obtención de bancos de trabajo

Se colocaron 25 mL de medio YPD/zeocina (0.01%) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL para inocular con 200 μ L de la cepa, la cual se encontraba contenida en medio YPD/glicerol 15% y almacenada a -70°C. Posteriormente se incubó por 24 h a 29°C con agitación a 300 rpm.

Para preparar el banco de trabajo el cultivo se colocó en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 10,034 g y a 4 °C. El sobrenadante se desechó en un recipiente para su esterilización y el botón se suspendió en 2 mL de medio YPD/glicerol 15% y se homogenizó con ayuda del vórtex. El resuspendido se dividió en alícuotas de 200 μ L y se colocó en tubos de 0.6 mL estériles que se refrigeraron por 30 min. Posteriormente se pasaron al congelador a -20 °C por otros 30 min y finalmente se almacenaron en el ultracongelador a -70 °C.

8.1.2. Inducción y producción de enzima

Tras las 24 h de reactivación el cultivo se colocó en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 10,034 g y temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó, el botón celular se resuspendió en 2 mL de medio Y; se le determinó la DO a 600nm para inocular un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de medio LOTO con glicerol al 1% para obtener una DO₆₀₀ con valor de 1. Se incubó por 24 h, con agitación a 300 rpm y 29 °C. Posterior el cultivo se colocó en un tubo falcon de 50 mL y se centrifugó por 10 min a 10,034 g y temperatura ambiente. Se realizó un lavado con 10 mL de medio Y, las células se suspendieron con ayuda de un vortex y se volvieron a centrifugar con las mismas condiciones. Se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 2 mL de medio para medirle la DO₆₀₀, y se inoculó con la cantidad necesaria para lograr una DO₆₀₀ de 1 en 25 mL de medio LOTO con metanol (el porcentaje de metanol en el medio dependerá de la cutinasa que se requiere producir, para la ANCUT1, 3% de metanol, ANCUT2, 1% de metanol y ANCUT3, 0.5% de metanol). Se incubó por 48 h a 300 rpm y 29 °C, para finalmente recuperar el extracto enzimático centrifugando por 15 min a 10,034 g a una temperatura de 4 °C. Se recomienda agregar azida de sodio al 0.015% con la finalidad de evitar la contaminación.

8.1.3. Concentración del sobrenadante enzimático

Una vez centrifugado, se midió el volumen final de la producción. La concentración del extracto crudo se realizó en un sistema de ultrafiltración Amicon con una membrana de 10 kDa como límite de corte nominal. Para realizar una concentración

más eficiente la muestra se pasó nuevamente por una membrana de 10 kDa, contenida en tubos de 25 mL Amicon tipo centrifugación.

8.1.4. Determinación de la concentración de proteína en microplaca

Para determinar la concentración de proteína presente en la muestra se utilizó el método de Bradford (1976) y un espectrofotómetro Epoch marca Biotek, a una absorbancia de 595 nm y acoplado al software Gen 5 1.10. Se empleó una curva patrón de albúmina sérica bovina con un intervalo de concentración de 1.6 mg/mL a 10.2 mg/mL.

Se colocaron en la microplaca 160 μ L de la muestra en una dilución que se adaptara al intervalo de lectura de la curva y se le adicionaron 40 μ L del reactivo de Bradford. Se incluyó un blanco preparado 160 μ L del amortiguador de fosfatos o Tris-HCl y se le adicionaron 40 μ L de reactivo de Bradford para tener un volumen final en placa de 200 μ L. Las mezclas se homogeneizaron y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente para posteriormente realizar la medición en el espectrofotómetro.

8.1.5. Cuantificación de la actividad de esterasa en microplaca

Se cuantificó la actividad esterasa usando como sustrato el *p*-nitrofenilbutirato (*p*-NFB). Se preparó una solución stock de *p*-NFB 10 mM, en etanol. De esta solución se tomaron 1 mL y se añadieron 9 mL de etanol para obtener un sustrato con una concentración de 1 mM. En cada pozo de la microplaca se adicionaron 170 μ L de amortiguador (Tris-HCl) y 10 μ L del sobrenadante del medio de cultivo, la reacción tiene que ir acompañada de un blanco que en este caso fueron 180 μ L de Tris-HCl 50 mM pH 9. Al final, antes de comenzar la cuantificación se adicionaron 20 μ L del stock 1 mM de *p*-NFB y se siguió la reacción de hidrólisis a 420 nm por 10 min, usando el protocolo que se programó en el software Gen 5 1.10 para tomar mediciones cada minuto.

8.1.6. Determinación de presencia de proteína por electroforesis y de actividad de zimograma

8.1.6.1. Electroforesis

Se prepararon geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) de 1 mm de grosor, con un gel concentrador de 4% de *bis*-acrilamida y un gel separador al 12% de *bis*-acrilamida. Se utilizó como detergente dodecilsulfato de sodio (SDS) y como agente reductor β -mercaptoetanol siguiendo el proceso puesto por Laemli (1970). Como referencia se utilizó un marcador de peso molecular (de 10 a 180 kDa, Termo Fisher). Los geles se corrieron en una cámara de electroforesis (MiniPreotean II y IV, Bio Rad) inicialmente a 80 Volts por 30 min y después se subió a 180 Volts, a temperatura ambiente y con amortiguador de corrida.

8.1.6.2. Zimograma

Este método se utilizó para observar la actividad esterasa de las enzimas, para ello se realizaron geles de poliacrilamida sin β -mercaptoetanol bajo las mismas

condiciones descritas en el punto anterior. Para el revelado de la actividad se prepararon los zimogramas siguiendo la metodología propuesta por Karpushova *et al.*, 2005. Una vez que se llevó a cabo la corrida de electroforesis el gel se incubó en una solución de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH=7, con Tritón X-100 al 0.5% durante 30 min, para renaturalizar la enzima. Pasado el tiempo, se cambió la disolución y el gel se dejó en una solución de α -naftil acetato (solución A), durante 30 min en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, la solución A se removió, se realizaron tres lavados con agua destilada y se le agregó la solución que contiene el Fast Red (solución B) hasta que se observa la tinción de las bandas en el gel en un color marrón, lo que indica la presencia de actividad enzimática. Se lavó con abundante agua destilada para detener la reacción y se procedió a colocar el gel con su respectivo marcador de peso molecular para corroborar que las bandas marcan el peso de nuestras proteínas de interés.

8.2. Preparación de las muestras

8.2.1. Preparación de las láminas de PLLA

Se utilizó la muestra adquirida de Goodfellow, que presenta una temperatura de transición vítrea de 55 °C y un porcentaje de cristalinidad de entre 60-70%, la cual fue tratada previamente por Alvarado (2023) siguiendo la siguiente metodología. Las láminas de 300 x 300 mm con un espesor de 0.05 mm se recortaron en cuadros de aproximadamente 10 x 10 mm y una vez cortados se lavaron 3 veces con metanol y posteriormente con agua desionizada para dejar que secaron a temperatura ambiente por una noche antes de su uso.

Los cuadros se colocaron en una licuadora industrial y se trituraron hasta alcanzar un polvo de tamaño homogéneo que se tamizó para separarlo en diferentes tamaños de partícula. Se seleccionó como el tamaño de partícula como ideal el tamiz #40.

8.2.2. Preparación de los productos derivados de PLA

Se trataron cuatro tipos de materiales recuperados de material de desecho:

- PLA de envases comerciales.
- PLA de envases de café de la marca Starbucks®.
- PLA proveniente de tapas de café.
- PLA proveniente de filamento para impresión 3D de color rojo.

Los materiales se recortaron a un tamaño aproximado de 10 mm, como cada uno presenta formas irregulares, se trató de realizarlo de la manera más homogénea posible. Una vez recortados se realizaron 3 lavados con metanol y posteriormente con agua desionizada para dejarlos secar toda la noche. Las muestras se pasaron a un molino de rotor de tres aspas marca IKA®, modelo Werke, para triturar a una velocidad de 3000 rpm. El molino cuenta con una lámina tamiz a la salida, por lo que las muestras se recuperaron con un tamaño homogéneo.

8.2.3. Preparación de la muestra de PLLDA

Se adquirió el polímero en mezcla de isómeros L y D con un peso molecular de 15,000 kDa (Sigma Aldrich), se molió en un mortero hasta obtener un polvo que se colocó en un recipiente ámbar para evitar su contacto directo con la luz y se selló para evitar su contacto con la humedad ambiental.

8.3. Reacción de hidrólisis de PLA con cutinasas recombinantes

La reacción de hidrólisis enzimática se realizó en tubos eppendorf de 2 mL con aproximadamente 10 mg de PLA (en todos los tipos de muestra). Se agregó el volumen necesario del extracto enzimático para alcanzar 10,000 unidades de enzima recombinante y completar con el volumen necesario de amortiguador para completar un volumen total de 1 mL. Para los blancos de reacción se agregó amortiguador con PLA sin extracto enzimático y extracto enzimático con amortiguador sin PLA para evaluar el comportamiento de la enzima. Los viales se incubaron de acuerdo con las condiciones encontradas previamente (Alvarado, 2023) 40 °C en condiciones estáticas sin ajuste de pH por 7 días de reacción. Además, se probaron condiciones con agitación a 800 rpm y con ajuste de pH cada dos días. Se utilizaron amortiguadores de fosfatos de sodio 50 mM, pH=7 y Tris-HCl 50 mM, pH=9. Se utilizó NaOH y HCl 1M para el ajuste del pH de las reacciones.

8.4. Cuantificación de ácido láctico producido en la reacción de degradación enzimática por método colorimétrico

Para la cuantificación del ácido láctico se usó el L-lactate assay kit y el D-lactate assay kit de Sigma Aldrich (MAK-329). Se utilizó la curva de calibración elaborada por Alvarado (2023) en el equipo Epoch y el software Gen 5.1 1.10.

Para la cuantificación, se recomienda preparar una mezcla de reacción presentada en la tabla 7. Esta mezcla será la encargada de reaccionar con las muestras de interés para generar el viraje en el color para poder medir la concentración de ácido láctico.

Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada para la determinación colorimétrica de ácido láctico.

Reactivo	Para análisis de una muestra (µL)
Amortiguador de ensayo	60
Enzima A	1
Enzima B	1
NAD	10
MTT	14
Total	86

Se transfirieron 20 μ L de cada muestra, con su respectiva dilución para obtener valores dentro de la curva de calibración y se agregaron 80 μ L de la mezcla de reacción. El software se programó para determinar la absorbancia inicial a 565 nm, se incubó 20 min a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad. Se determinó la absorbancia final también a 565 nm.

8.5. Determinación de pérdida de peso

Antes de la reacción los tubos eppendorf se secaron y se llevaron a peso constante, se pesó, y colocó el polímero en el tubo.

Una vez transcurridos los siete días de reacción de degradación enzimática, los restos de polímero se lavaron con agua y, posteriormente, dos veces con etanol para colocarlos en la estufa de 37 °C por 24 h. Se pasaron a un desecador y se pesaron en una balanza analítica para el registro del peso. La pérdida de peso en % se determinó por la siguiente ecuación:

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

8.6. Diseño experimental para la evaluación de condiciones de reacción

Se evaluaron condiciones de reacción comparando los dos amortiguadores, la cantidad de extracto enzimático añadido a la mezcla de reacción, el pH y su ajuste así como las condiciones estáticas y con agitación. Por último, se realizó la comparación utilizando un método de pretratamiento de sonicación por 10 min en la muestra de reacción.

8.6.1. Evaluación de la cantidad de extracto enzimático

Según lo reportado por Alvarado, 2023, la mejor condición de reacción reportada con respecto al extracto enzimático fue agregar 3% en peso con respecto al peso del polímero. Se optó por estandarizar el proceso a 10,000 unidades de enzima por cada 10 mg de PLA y se llevó a cabo una reacción de 7 días en condiciones estáticas, a 40 °C, con amortiguador de fosfatos 50 mM a un pH de 7.

8.6.2. Evaluación del amortiguador en la reacción

La preparación de la mezcla de reacción consiste en agregar el volumen necesario para cumplir con la demanda de extracto enzimático concentrado, agregar los 10 mg de polímeros y completar la mezcla con amortiguador a 1 mL de reacción. Se decidió evaluar entonces cuál de los amortiguadores de pH mostraba mejor eficiencia al momento de cuantificar la concentración del monómero producido y la pérdida de peso generada.

8.6.3. Evaluación de la regulación del pH en la reacción

Se decidió monitorear el pH de la reacción cada 24 h y se buscó ajustarlo siempre que hubiera una variación. Se probaron condiciones de reacción a pH controlado de 7 y de 9, empleando solución amortiguadora Tris-HCl 50 mM pH=9.

8.6.4. Evaluación del efecto de la agitación comparado con una reacción estática

Las muestras se sometieron a condiciones de reacción en thermoblock de la marca Thermolyne® a 40 °C en condiciones estáticas por 7 días y se compararon con muestras que se colocaron en un thermoblock de la marca Thermo Scientific® a 40 °C con agitación a 800 rpm por 7 días (168 h).

8.6.5. Evaluación de pretratamientos

Se propusieron tres métodos de pretratamiento de la muestra para mejorar la eficiencia de la reacción.

El primero fue un tratamiento de ultrasonido en un sonicador de la marca Qsonica® con una longitud de onda de 30 kHz con pulsos de 30 segundos y descansos de 30 segundos por 5 min. Se colocaron 100 mg de muestra en 100 mL de agua destilada, la mezcla se agitó hasta lograr que el polímero se sumergiera por completo, ya que llega a presentar hidrofobicidad. La mezcla se colocó en un baño con hielo, para mantener una temperatura de 4°C.

El segundo método consistió en la aplicación de calor por microondas durante 3 min y posteriormente aplicar ultrasonido en un sonicador de la marca Qsonica® con una longitud de onda de 30 kHz con pulsos de 30 segundos y descansos de 30 segundos por 5 min. Se colocaron 100 mg de muestra en 100 mL de agua destilada, la mezcla se agitó hasta lograr la completa permeabilidad del polímero, eliminando la hidrofobicidad presentada por la muestra. Se colocó la muestra en un baño con hielo para evitar el sobrecalentamiento y lograr una temperatura de 4 °C.

El tercer pretratamiento se dio una vez preparada la mezcla de reacción, es decir los 10 mg de polímero, el extracto enzimático concentrado suficiente para reunir 10,000 unidades de enzima y el amortiguador necesario para completar 1 mL de reacción, el pH se ajustó a 7 y se procedió a realizar el tratamiento el cual consiste en colocar la muestra en un baño de agua y aplicar ondas de sonicación en un sonicador de la marca Cole-Parmer® de 40 kHz por 10 min a temperatura ambiente marca. Una vez transcurrido el tiempo se prosiguió a colocar la muestra en reacción a 40 °C.

8.7. Degradación por método químico de las muestras de PLA

Se pesaron las muestras de los productos derivados del PLA, en un matraz Erlenmeyer se colocaron 15 gramos de muestra y 15 gramos de NaOH a los cuales se agregaron 100 mL de agua con 50 mL de etanol. La reacción se calentó a 200 °C, con agitación constante por aproximadamente 2 h, y se detuvo cuando se obtuvo una solución traslúcida.

8.8. Recuperación de los productos de interés por extracción líquido-líquido.

La muestra se llevó a temperatura ambiente y se ajustó la solución a un pH de 3 añadiendo HCl concentrado para favorecer la precipitación de sustancias insolubles. En primera instancia la muestra de reacción se filtró utilizando papel filtro marca Whatman con ayuda de un matraz Kitasato y aplicación de vacío para eliminar las sustancias precipitadas. Una vez recuperada la muestra se pasó a un proceso de centrifugado a 10,034 g por 30 min a 4°C, para eliminar la mayor cantidad de impurezas suspendidas en la muestra de reacción. La solución se saturó con NaCl con el fin de favorecer la extracción. La extracción líquido-líquido se llevó a cabo con acetato de etilo en una proporción 1:1, en un embudo de decantación de 100 mL. La muestra se fue adicionando en alícuotas y después de una agitación vigorosa se recuperó la fase orgánica de la parte superior del embudo. Una vez realizada toda la extracción a la fase orgánica se le agregó sulfato de sodio anhidro para retirar el agua que aún pudiera estar presente y lograr una apariencia traslúcida. La fase orgánica se decantó en un matraz de bola para llevarlo a un rotavapor, el cual se operó a una presión de vacío de 80 mBar, agitación y un baño de agua a 30 °C y se recuperó el solvente (acetato de etilo) para quedarnos únicamente con el producto de las reacciones de degradación, provenientes tanto el método enzimático como el método químico.

8.9. Determinación de ácido láctico mediante TLC

Se utilizaron placas de gel de sílice de la marca Merck 60 F254 y se recortaron en medidas de 10 x 20 cm. Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetona, agua, cloroformo, etanol e hidróxido de amonio en una proporción 60:2:6:10:22. La solución estándar (ácido láctico) se diluyó al 10% con acetato de etilo al igual que todas las muestras a analizar. A aproximadamente 1 cm de la base de la placa se colocó la muestra de referencia es separadas por aproximadamente 0.5 cm se agregaron las muestras recuperadas de las reacciones de degradación, dependiendo de la concentración fue la cantidad de pulsos colocados, para el blanco fueron necesarios 3 pero para las muestras a analizar se colocó un promedio de 10 a 15 pulsos en la placa, dejando secar entre cada uno. El disolvente se dejó viajar a través de la placa de 6 a 7 cm (alrededor de 10 min) y se retiró de la cámara. Se elaboró una solución indicadora con 0.25 gramos de rojo de metilo y 0.25 g de azul de bromofenol en 100 mL de metanol al 70%. Una vez seca la fase móvil se agregó esta solución con ayuda de un atomizador hasta cubrir completamente la superficie de la placa. Una vez lograda una tinción homogénea se pasó a una parrilla de calentamiento a una temperatura aproximada de 165 °C y se mantuvo hasta revelar las muestras colocadas. Se procedió a tomar evidencia fotográfica, ya que con el paso del tiempo la coloración se va perdiendo.

8.10. Método de detección y cuantificación por cromatografía de fase reversa en un sistema HPLC

Se utilizó un equipo de HPLC de la marca Waters. Se utilizaron como fase móvil dos soluciones: la Solución A compuesta por Agua: Acetonitrilo en una proporción 90:10 y la solución B, de acetonitrilo al 100% se suministró con una bomba dual marca

Waters 1525 a un flujo de 0.7 mL/min. Al equipo se encuentra integrado un detector dual UV-VIS 2487 y se trabajó con una longitud de onda de 210 nm, un auto inyector 2707 y una columna C18 Hypersil Gold de Thermo Scientific como fase estacionaria. El tiempo de corrida fue de 21 min por muestra y se inyectaron 20 µL de la misma.

Se elaboró una curva de calibración del método inyectando siete concentraciones de estándar de ácido láctico marca Sigma Aldrich: 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2.5% y 5% v/v. Se obtuvieron las áreas y se graficaron para obtener la ecuación de la recta y el coeficiente de correlación de los valores obtenidos.

8.11. Reacción de esterificación de ácido láctico

Se agregaron 20 mL de ácido láctico recuperado de las reacciones de degradación en un matraz de balón, al cual se le agregó etanol en una proporción 1:1 y como catalizador de la reacción se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de 180 °C. Se montó un sistema de recirculación para favorecer la formación del producto (lactato de etilo). A la reacción se le dio un tiempo de 5 h y se dejó enfriar hasta temperatura ambiente. La mezcla de reacción se neutralizó y se llevó a destilación con ayuda del rotavapor para eliminar el etanol que no reaccionó. La muestra, una vez evaporada, se aplicó a una TLC con lactato de etilo de referencia.

8.12. Cinéticas de reacción

Una vez establecidas las mejores condiciones de reacción se llevaron a cabo cinéticas para conocer el comportamiento de la enzima a lo largo del tiempo. Para ello se colocaron en reacción las tres cutinas AN CUT 1, AN CUT 2 y AN CUT 3 con las mejores condiciones determinadas en este trabajo. La reacción se desarrolló por 7 días según lo establecido por Alvarado (2023). Se midió la actividad enzimática al inicio de la reacción y, posteriormente, cada 24 h para ver el comportamiento de la enzima. A su vez se realizó la determinación de la pérdida de peso, también cada 24 h. Se colocaron dos blancos: uno sólo contenía amortiguador y polímero para descartar pérdida de peso e hidrólisis por este medio. El otro consistió en colocar en el tubo extracto enzimático y amortiguador para observar la evolución de la enzima a lo largo del tiempo, pero en ausencia del polímero.

8.13. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de IR para la identificación del producto de esterificación

Se envió la muestra obtenida de la esterificación a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) para realizar las pruebas. En el caso de RMN se utilizó cloroformo deuterado como disolvente de la muestra para obtener el espectro de ¹H, el cual será comparado con un espectro de referencia. Para el caso de la espectrometría de IR se utilizó cloroformo como disolvente para la obtención del espectro, de igual manera, este será comparado con un espectro de referencia de lactato de etilo.

8.14. Calorimétrica diferencial de barrido (DSC) para el cálculo de la cristalinidad del polímero

Con apoyo de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) se enviaron las siguientes muestras de polímero para analizar: filamento de poli(ácido láctico), poli(ácido láctico) recuperado de envases de la marca Starbucks®, poli(ácido láctico) con pretratamiento de ultrasonido y el pretratamiento de ultrasonido con microondas, poli(ácido láctico) de la marca Goodfellow® antes y después de la reacción de degradación con y sin pretratamiento. Las condiciones a las que se llevó a cabo el experimento fueron en una atmósfera de nitrógeno con una rampa de calentamiento de 0 a 200 °C a una velocidad de 10 °C por minuto para la obtención de la entalpía de cristalización (ΔH_c) y la entalpía de fusión del polímero (ΔH_m).

Con esos datos se aplicará la siguiente ecuación para obtener el % de cristalinidad del polímero:

$$\%Cristalinidad = \frac{(\Delta H_m - \Delta H_c)}{\Delta H_m^\circ} \times 100$$

Donde ΔH_m es igual a la entalpía de fusión del polímero, ΔH_c la entalpía de cristalización del polímero y ΔH_m° es igual a la entalpía de fusión si el polímero fuera 100% cristalino, valor que para el PLA es de 93.6 J/g.

9. Resultados y discusión

9.1. Producción de enzima recombinante

La producción en *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) se realizó tras reactivar la cepa de interés en medio YPD/zeocina 0.01%. Posteriormente se llevó a cabo la generación de biomasa en medio LOTO con glicerol al 1% y la expresión de la enzima se dio en medio LOTO con metanol a distintos porcentajes, dependiendo de la cutinasa a expresar (ANCUT 1 3%, ANCUT 2 2%, ANCUT 3 0.5%). Todos los procesos se llevaron a cabo a una temperatura de 29 °C y agitación de 300 rpm. Las actividades volumétricas (U/mL) de las producciones realizadas, tanto sin concentrar como concentradas, junto con su factor de concentración, se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Actividad volumétrica de los extractos enzimáticos y su factor de concentración.

Enzima	Factor de concentración	Actividad Volumétrica sin concentrar (U/mL)	Actividad Volumétrica concentrada (U/mL)
ANCUT 1	1:24	2053.79	128361.86
ANCUT 2	1:31	2741.35	46454.77
ANCUT 3	1:38	663.11	15247.83

Como se puede observar la cutinasa de mayor actividad una vez concentrado el extracto enzimático es la ANCUT 1, seguida de la ANCUT 2 y por último la ANCUT 3, la cual es la cutinasa de menor actividad por lo que resultaría interesante buscar una nueva optimización de su producción, ya que las cutinasas son susceptibles a factores físicos y químicos locales, donde cambios en los valores de pH, temperatura, iones entre otros pueden generar impactos en la producción enzimática, además se tiene desconocimiento de la estructura real de las proteínas, pues únicamente se tiene acercamiento a la estructura por modelos por homología como el reportado por Castro (2023), sin embargo, el tener conocimiento de su estructura podría generar un panorama más claro de su comportamiento y de las condiciones a las cuales estas pueden tener un mejor desempeño pues hasta el momento se ha utilizado un protocolo general de producción enzimática propuesto por Lovera y Torres (2018) para las tres cutinasas modificando únicamente la concentración del inductor por lo que resultaría interesante realizar modificaciones en otras condiciones como el tiempo de inducción, la temperatura y el pH por ejemplo Altamar *et. al.* (2022) propone un rango de pH de crecimiento de 2 a 8 y el uso de iones metálicos para favorecer la estabilidad de la proteína y aumentar su actividad enzimática.

9.2. Determinación de la presencia de las cutinasas por electroforesis y comprobación de actividad enzimática por zimograma.

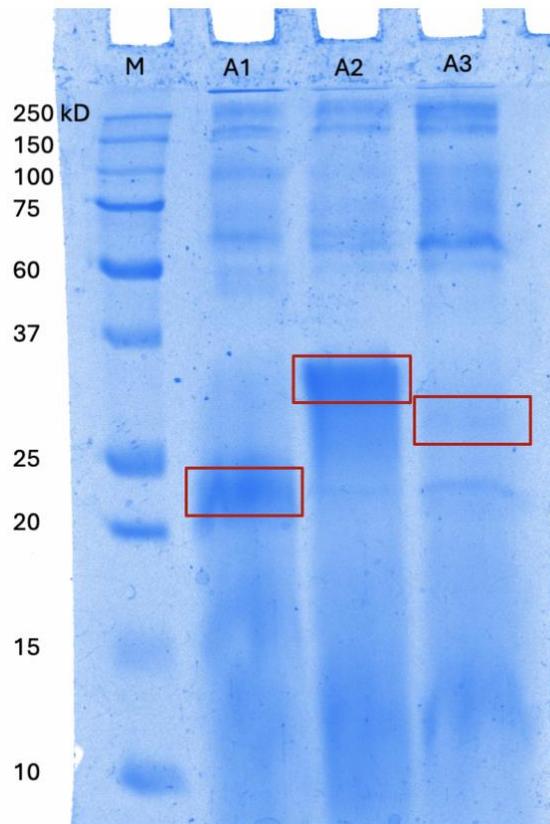


Figura 5. Perfil de proteínas obtenido por electroforesis (SDS-PAGE) teñido con azul de Coomassie, en el primer carril (M) se muestra el marcador de peso BioRad All Blue #161-0373, el segundo carril muestra la cutinasa ANCUT 1 (A1) en un peso aproximado de 22.9 kDa, el tercero la cutinasa ANCUT 2 (A2) con un peso de 33 kDa y por último la cutinasa ANCUT 3 (A3) con un peso de 29.4 kDa.

En la figura 5 se observa la presencia de otras proteínas a distintos pesos moleculares, pero esto se debe a que el extracto enzimático no se encuentra purificado, sin embargo, se identificaron las bandas de interés para las tres cutinasas en los pesos reportados con anterioridad en el grupo de trabajo, para ANCUT 1 ≈ 22.9 kDa (Solís, 2015), para ANCUT 2 ≈ 33 kDa (Morales, 2015) y para ANCUT 3 ≈ 29.4 kDa (Llanos, 2018). En la figura 6 se muestra el zimograma de actividad enzimática para las tres cutinasas donde se aprecia la intensidad de las bandas distinta para cada una de las cutinasas a pesar de haberse colocado la misma cantidad de proteína en cada uno de los pozos, esto se debe a que la cantidad de cutinasa producida es distinta para cada uno de los extractos como se especificó en la tabla 8, se señala con cuadros color rojo la ubicación de las proteínas en el peso esperado donde, además, se encuentra también la parte más ancha de la marca, sin embargo, para el caso de la ANCUT 1 (A1) y la ANCUT (A2), se puede observar un desplazamiento de las bandas lo cual se puede deber a un fenómeno de migración anómala de proteínas debida a factores como el

amortiguador, la temperatura a la cual se corrió el gel, el voltaje al cual se desarrolló el protocolo o la interacción con otras proteínas al tratarse de un extracto no purificado, sin embargo, se confirma la presencia de actividad esterasa pues esta técnica es específica para la enzima de interés.

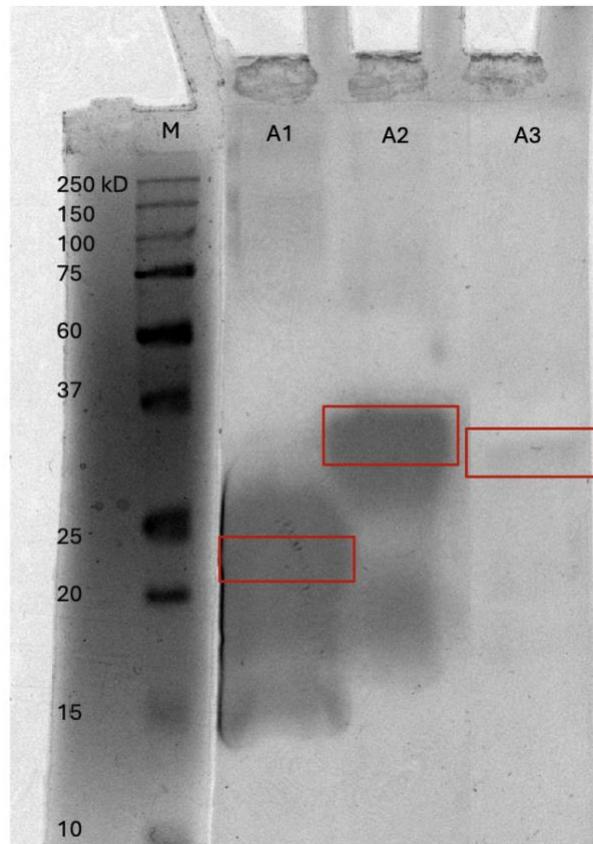


Figura 6. Zimograma de actividad enzimática, en el primer carril se muestra el marcador de peso BioRad All Blue #161-0373 (M), el segundo carril muestra la cutinasa ANCUT 1 (A1) con peso aproximado de 22.9 kDa, el tercero la cutinasa ANCUT 2 (A2) con un peso de 33 kDa y por último la cutinasa ANCUT 3 (A3) con un peso de 29.4 kDa.

9.3. Molienda de los productos derivados de PLA

Los productos se trituraron en un molino de alta velocidad, para ello se tuvo que realizar una reducción de tamaño previa de los materiales. Esto se realiza con la finalidad de aumentar la superficie de contacto entre la enzima y el sustrato como menciona Thumsorn *et. al.* (2011) donde a un menor tamaño de partícula se aumenta la difusión y por ende la degradación del polímero.

En un principio se colocaron las muestras a una velocidad de 3000 rpm y se comenzó a agregar la muestra, sin embargo, con el paso del tiempo la fricción generada entre las aspas y la muestra comenzó a calentar el rotor, lo que podría afectar en el grado de cristalinidad generando una nueva variable en el proceso. Además, las muestras de PLA Starbucks® fundieron un material de apariencia viscosa que endurecía rápidamente al regresar a la temperatura ambiente. Esta

sustancia fue retirada de la muestra y se realizó la molienda con normalidad. Esto nos lleva a suponer que las muestras cuentan con algún tipo de aditivo para darle mayor resistencia y termoestabilidad. Por ello, se decidió optar por realizar la molienda por intervalos de aproximadamente un minuto por un minuto de descanso, agregando hielo al eje principal para mantenerlo a una temperatura baja.

9.4. Evaluación del efecto de la cantidad de extracto enzimático en la eficiencia de la reacción.

Según lo reportado por Alvarado (2023), las mejores condiciones de reacción se dieron al agregar el 3% de enzima con respecto al peso del polímero, es decir, se agregaron 0.3 mg de enzima por cada 10 mg de polímero. En la tabla 9 se muestran las Unidades de extracto enzimático por mL agregadas al medio de reacción en la reacción de Alvarado y la cantidad de volumen requerido:

Tabla 9. Actividad volumétrica y volumen para las condiciones descritas por Alvarado, 2023.

Enzima	Actividad volumétrica (U/mL)	Volumen (µL)
ANCUT 1	437.05	87.21
ANCUT 2	2868.81	204.22
ANCUT 3	141.64	209.35

La reacción, que denominaremos como 1, y que consiste básicamente en repetir el experimento reportado por Alvarado (2023) como punto de partida, se llevó a cabo por 7 días (168 h), en condiciones estáticas a 40 °C, el volumen de la reacción se aforó a 1 mL con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 9. Se determinó la pérdida de peso, se cuantificó la liberación de ácido láctico y se monitoreó el pH. Los resultados se observan en la tabla 10 y en la gráfica de pH (fig. 7):

Tabla 10. Resultados obtenidos en la reacción 1.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
Blanco	10.70	10.20	0.20	1.87	0.21
ANCUT 1	10.37	9.80	0.57	5.47	4.62
ANCUT 2	10.40	10.20	0.20	1.92	0.21
ANCUT 3	10.27	10.05	0.22	2.09	0.59

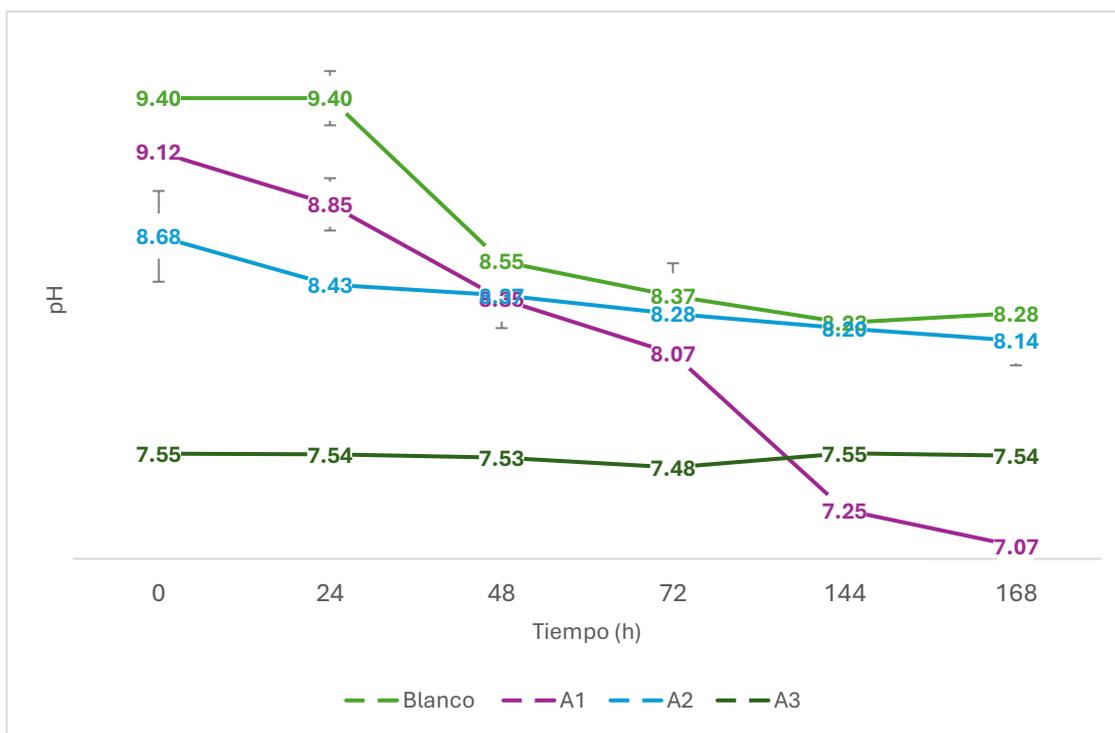


Figura 7. Disminución de pH en la reacción 1 con ANCUT 1 (A1), ANCUT 2 (A2) y ANCUT 3 (A3) a lo largo de 7 días (128 h).

Para las tres enzimas se observa una ligera disminución en el peso del polímero, los cuales incluso se pueden atribuir a errores en la medición, ya que al tratarse de pesos muy pequeños los sistemas de medición llegan a presentar un margen de error. Los datos de cuantificación del ácido láctico con ayuda del kit enzimático indican que la ANCUT 1 es la cutinasa con mejor desempeño, ya que la ANCUT 2 y ANCUT 3 presentaron valores similares al blanco. En cuanto al monitoreo del pH para la ANCUT 1, que obtuvo el mejor valor de concentración de AL, se nota la tendencia a la baja del pH, lo que se le atribuye a la liberación de los monómeros de ácido láctico al medio de reacción. Para la ANCUT 2 se tiene una baja disminución del pH, de alrededor de 0.5 y para la ANCUT 3 no se presentó variación en el pH. Por su parte el blanco de reacción presentó una caída, lo que nos hace pensar que su poder amortiguador disminuye con el tiempo, por lo que podría estar sucediendo el mismo fenómeno para la ANCUT 1 y la disminución del pH en realidad no se deba a la liberación de ácido láctico. Esta disminución del pH, además, puede influir en la eficiencia de la reacción.

No se pudo contar con reproducibilidad en el experimento, obteniendo valores diez veces más bajos que los reportados anteriormente, por lo que se tuvieron que realizar ajustes en la reacción enzimática, dando pie a una segunda reacción.

Los valores obtenidos en este experimento corresponden a lo reportado por Alvarado (2023) en el sentido de que los mejores resultados de liberación de AL se obtienen

con la ANCUT 1. Sin embargo, el rango de valores es diferente, aunque está en el mismo orden de magnitud. Por lo tanto, se decidió repetir el experimento con enzimas producidas recientemente, cuyos valores se encuentran en la tabla 11. A este experimento se le denomina reacción 2.

Tabla 11. Actividad volumétrica (U/mL) y volumen de extracto (μL) para lote 2 de Extractos enzimáticos.

Enzima	Actividad volumétrica (U/mL)	Volumen (μL)
ANCUT 1	3444.31	223.50
ANCUT 2	12892.47	302.10
ANCUT 3	157.16	314.70

La reacción 2 siguió las mismas condiciones: 7 días de reacción, condiciones estáticas, 40 °C, volumen de reacción de 1 mL aforado con amortiguador de fosfatos pH 9 y también se monitoreó el pH. La tabla 12 y la figura 8 muestran los resultados obtenidos:

Tabla 12. Pérdida de peso y liberación de ácido láctico con lote 2 de las tres cutinasas de interés.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
Blanco	10.20	10.10	0.10	0.98	0.21
ANCUT 1	10.70	9.90	0.80	7.48	10.41
ANCUT 2	10.47	10.30	0.17	1.59	5.58
ANCUT 3	10.63	10.52	0.11	1.07	0.44

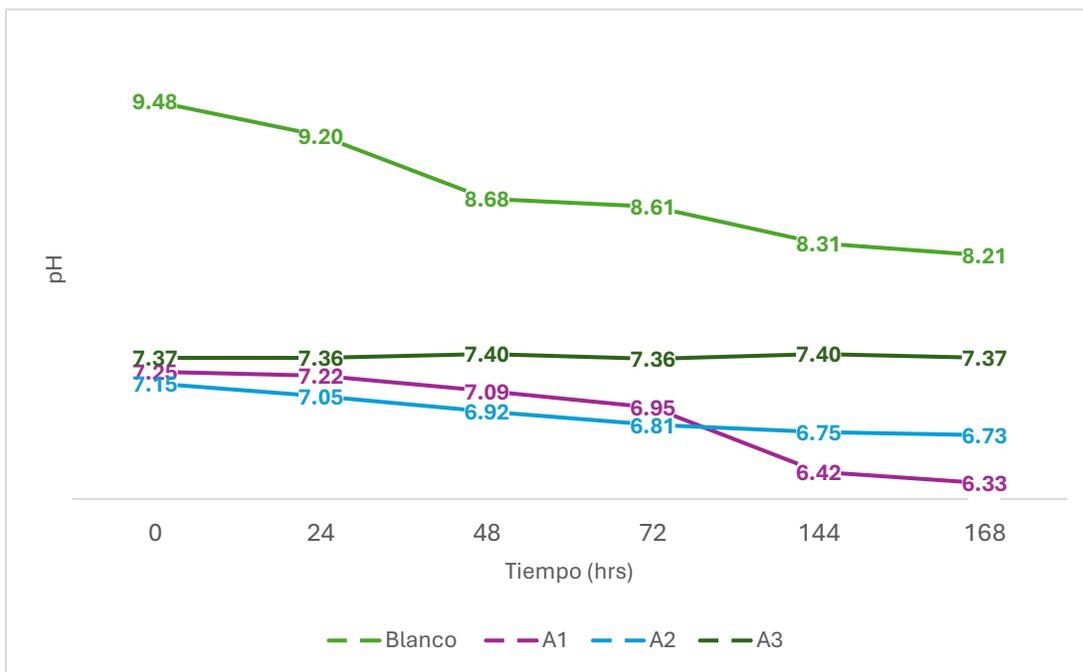


Figura 8. Disminución del pH en reacción de degradación con lote 2 de producción de ANCUT 1 (A1), ANCUT 2 (A2) y ANCUT (A3) a un tiempo de 7 días (168 h).

La tendencia se mantiene y es la ANCUT 1 la cutinasa que presenta mayor pérdida de peso, liberación de ácido láctico y disminución del pH de reacción, sin embargo, en el blanco la disminución del pH mantiene una tendencia similar. Por otro lado, bajo estas condiciones, se observa una mayor producción de AL para la ANCUT 2 en comparación al primer ejercicio, notándose también la disminución en el pH. Para el caso de la ANCUT 3 la situación se mantiene similar al experimento anterior. Se puede notar que el pH inicial de las reacciones es diferente, debido a que se agregó una mayor cantidad de extracto enzimático, el cual influye en el pH de la reacción. La disminución de pH en el blanco de reacción se debe a que para el amortiguador de fosfatos se tiene un rango de amortiguamiento de 5.6 a 8 (Felfel, *et. al.*, 2015) y al exceder ese rango se disminuye la eficiencia presentando una disminución considerable.

Los valores obtenidos en este segundo experimento son consistentes con lo obtenido previamente por Alvarado (2023) e ilustran la necesidad de conservación de la enzima obtenida en las mejores condiciones.

9.5. Evaluación del efecto de la naturaleza del amortiguador en la reacción

Debido a la disminución del pH incluso en el blanco de reacción presentada en las dos reacciones anteriores, se decidió evaluar si la tendencia se mantenía utilizando otra solución amortiguadora, eligiendo el amortiguador Tris- HCl 50 mM pH 9, el cual tiene un rango de amortiguamiento mayor (pH 7-9). Además, se notó que las reacciones anteriores habían iniciado en un pH cercano al 7 por lo que también se

optó por evaluar el comportamiento de la reacción de hidrólisis bajo esas condiciones y utilizando la cutinasa AN CUT 1 (A1), que fue la que mejores resultados mostró, como había reportado Alvarado (2023). Se monitoreó la reacción por 7 días, en condiciones estáticas a 40 °C, agregando 3% de enzima con respecto al peso del polímero, se registró la pérdida de peso y se cuantificó la concentración de AL liberado al medio. La tabla 13 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 13. Efecto de la naturaleza y pH del amortiguador en la pérdida de peso y liberación de ácido láctico por cutinasa AN CUT1

Amortiguador	Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
Fosfatos	Blanco	10.30	10.29	0.01	0.10	0.02
	A1 pH 7	9.90	7.40	2.50	25.25	15.23
	A1 pH 9	9.80	7.45	2.35	23.98	18.78
TRIS-HCl	Blanco	10.30	10.22	0.08	0.78	0.39
	A1 pH 7	10.30	7.20	3.10	30.10	25.40
	A1 pH 9	9.90	6.70	3.20	32.32	21.39

Con estos resultados podemos observar una tendencia a que el amortiguador TRIS-HCl genera un mejor rendimiento en la reacción pues se nota una mayor pérdida de peso y, por consecuencia, una mayor liberación de ácido láctico. Por su parte el comportamiento del pH se registra en las figuras 9 y 10:

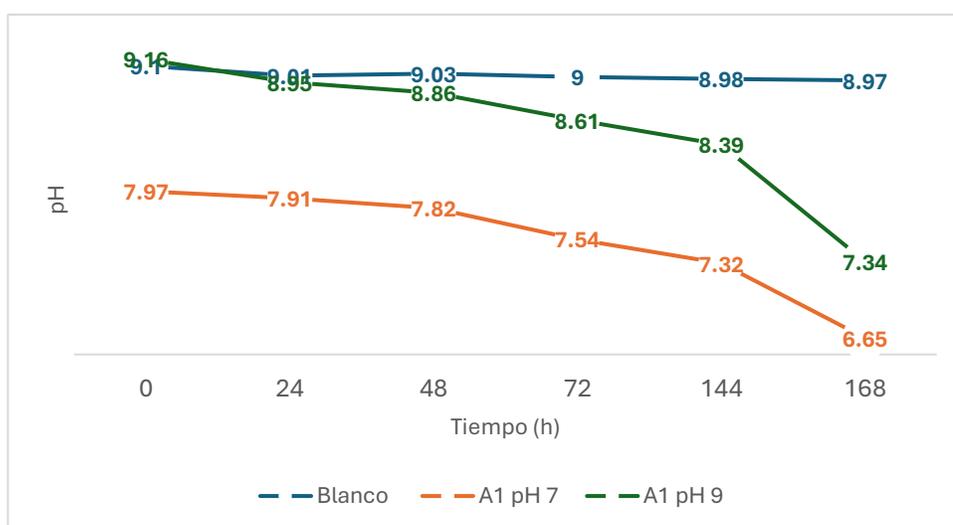


Figura 9. Disminución de pH empleando amortiguador Tris/HCl para la reacción con AN CUT 1 (A1) a lo largo de 7 días (168 h).

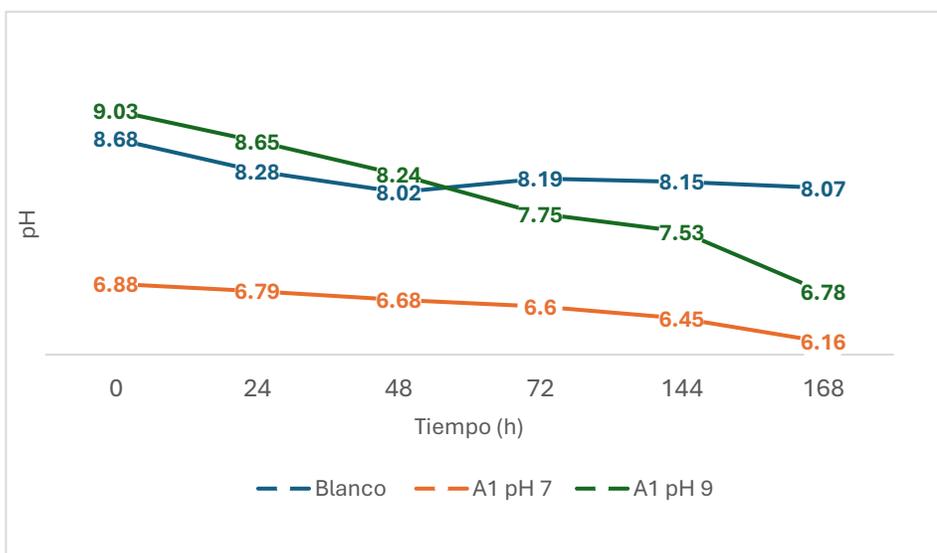


Figura 10. Disminución de pH empleando amortiguador de fosfatos de sodio para la reacción con ANCUT 1 (A1) a lo largo de 7 días de reacción (168 h).

Por lo que se puede observar en las gráficas, el amortiguador TRIS-HCl mantiene un pH estable a lo largo del tiempo de reacción mientras que el amortiguador de fosfatos disminuye el pH, lo que podría contribuir a que la enzima se vea afectada y, por lo tanto, el curso de la reacción. Esto se puede suponer debido a que se muestra una tendencia similar para ambos amortiguadores a lo largo de la reacción, pero en las reacciones en las cuales se utilizó el amortiguador TRIS-HCl se obtuvo una mayor liberación de ácido láctico. En ambos amortiguadores se obtuvo una mejor respuesta a la hidrólisis cuando el pH comenzó en 7 y, de las condiciones evaluadas, fue con el amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 7 con el que se obtuvo una mayor pérdida de peso y una concentración mayor de AL.

En este experimento se mantuvo el protocolo de utilizar 3% de enzima con respecto al peso del polímero, lo que representó agregar 402.63 μ L de extracto enzimático conteniendo 6204.87 U de enzima. Esto obligó a replantear la forma de adición de la enzima, puesto que el 3% de extracto con respecto al peso del polímero resulta ambiguo ya que en cada producción enzimática los valores obtenidos, aunque son similares, pueden llegar a presentar variaciones en la cantidad de proteína y también las unidades de enzima activa presentes por mililitro de la solución. Se determinó estandarizar que para cada reacción de hidrólisis enzimática se utilizaran 10,000 U, pues así se tendría una variación en el volumen de extracto enzimático agregado, pero no en las unidades de enzima activa, permitiendo así mejorar repetibilidad y reproducibilidad de las reacciones. Por lo tanto, se llevó a cabo un nuevo experimento para comprobar si existían diferencias entre la reacción a un pH 7 o 9. con monitoreo del pH durante el tiempo de reacción y se controló en algunas muestras para evitar su descenso. La variable en este caso resulta ser la forma de

adición de la enzima, con una cantidad conocida de unidades de actividad. La tabla 14 muestra los resultados obtenidos.

Tabla 14. Efecto de la adición de 10,000 U de enzima por mililitro sobre la pérdida de peso y liberación de ácido láctico empleando el mismo amortiguador a dos pH de reacción.

Amortiguador	Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
TRIS-HCl	Blanco	10.40	10.20	0.2	1.92	0.66
	A1 pH 7	10.4	7	3.4	32.69	31.40
	A1 pH 9	10.5	7.9	2.6	24.76	27.47
	A1 pH 7 control	10.1	6.3	3.8	37.62	33.09
	A1 pH 9 control	10.6	7.6	3	28.30	32.48

Las reacciones a un pH de 7 se ven favorecidas en ambos casos sobre las que se desarrollaron a un pH de 9 presentando una mayor pérdida de peso y una mayor liberación de AL. Para el caso de las reacciones de pH controlado la diferencia de la concentración de ácido láctico no refleja una diferencia considerable, sin embargo, la pérdida de peso sí, ya que en la reacción a pH 7 se tiene un 9% más de pérdida de peso. Lo que lleva a suponer que se favorece la hidrólisis del polímero, pero no se llega a la formación de los monómeros, teniéndose probablemente oligómeros en la mezcla de reacción.

Los resultados se sintetizan en las figuras 11 y 12, en donde se aprecian las diferencias que existen en concentración de AL liberado al aplicar diferentes cantidades de Unidades de enzima en el medio de reacción, así como la diferencia del pH y cuando el pH se controla a lo largo del tiempo de reacción.

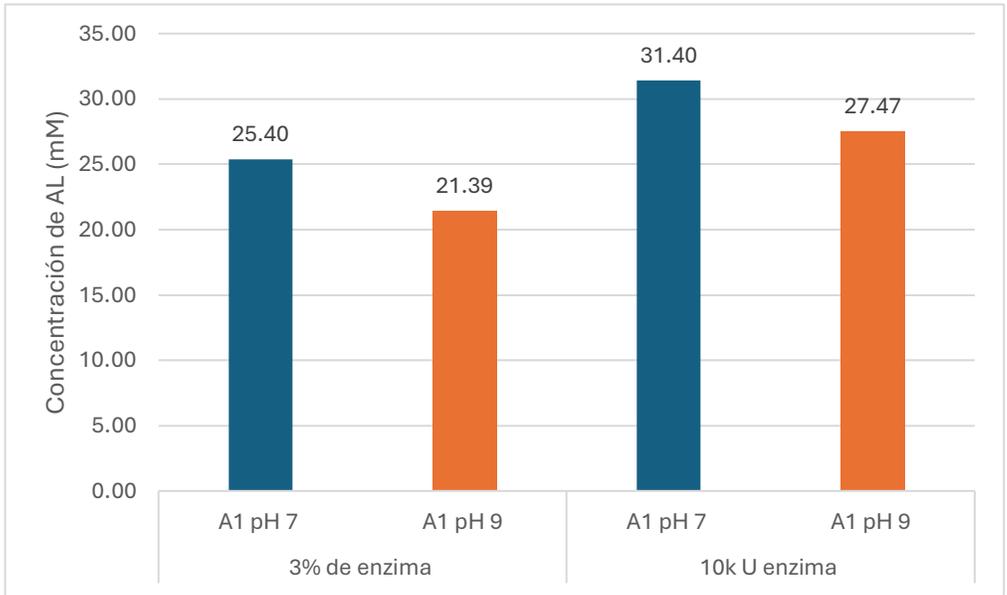


Figura 11. Concentración de ácido láctico (AL) obtenido después de utilizar diferentes cantidades de enzima y valores de pH en la reacción.

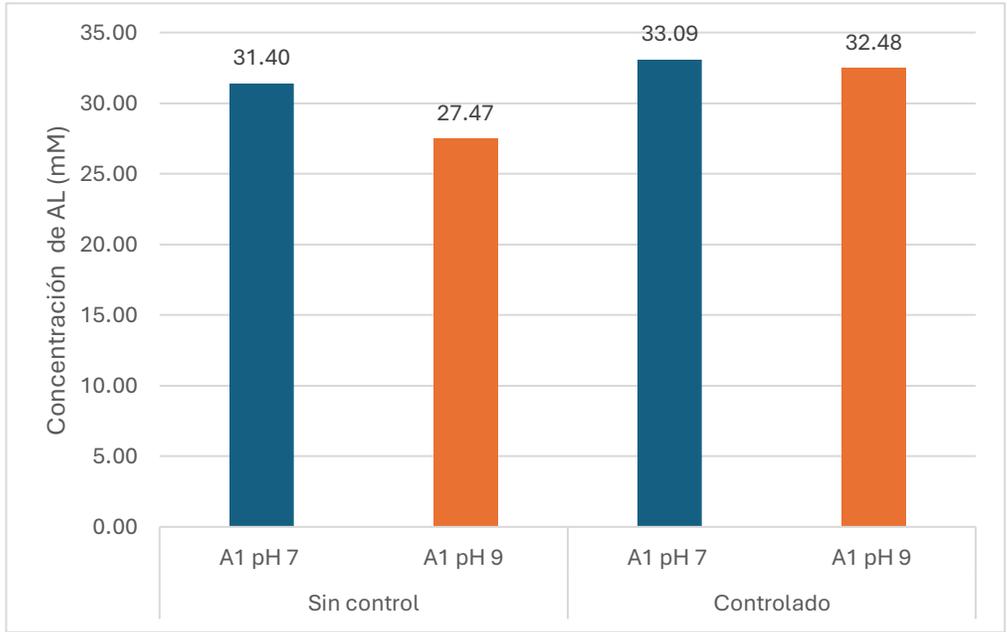


Figura 12. Diferencias en la concentración de ácido láctico (AL) obtenida a diferentes pH, con y sin control del mismo utilizando la enzima AN CUT 1 (A1).

Con esto se decidió que las condiciones más favorables para la reacción serían a un pH de 7 controlado, agregando 10,000 Unidades de enzima por mL a la mezcla de reacción. El pH se ajustó cada 48 h con NaOH 1 M agregando 10 µL.

9.6. Evaluación del aumento en la temperatura de reacción

Utilizando las nuevas condiciones establecidas: 10k U de enzima, pH 7 controlado y 10 mg de polímero se decidió modificar la temperatura de reacción, pasando de 40

a 50 °C. Algunas investigaciones han demostrado que el acercarse a la temperatura de transición vítrea la hidrólisis se ve favorecida por el movimiento de las cadenas que constituyen el polímero y de esta forma contribuyen a una mejor difusión dentro de la matriz polimérica. La temperatura de transición vítrea en el PLA ronda en un promedio de 55 °C, por lo que se decidió trabajar a 50 °C (Zhang, *et. al.*, 2008).

Los resultados de esta reacción no fueron favorables pues no se tuvo una pérdida de peso en el polímero y tampoco se detectó ácido láctico por medio del kit enzimático. Esto puede deberse a que la temperatura inactiva a la enzima provocando que no tenga efecto sobre el sustrato, aunque se tienen reportes de estabilidad a temperaturas superiores (Chen, 2013) es posible que el tiempo de reacción sea superior al tiempo en que la enzima se mantiene activa por lo que no se obtienen resultados favorables.

9.7. Evaluación de los pretratamientos sobre el polímero

Se sometieron las muestras de PLA triturado de la marca Goodfellow® a un pretratamiento de ultrasonido, con una frecuencia de 30 kHz con pulsos de 30 segundos por 30 segundos de descanso por 5 min. Además, a una de las muestras se le aplicó calor por microondas durante 3 min y, posteriormente, el ultrasonido bajo las mismas condiciones.

Las muestras se filtraron y se dejaron secar por una noche en un horno a 37 °C. Posteriormente se preparó el medio de reacción agregando 10k U de enzima, se aforó a 1 mL con amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 9, se adicionaron 10 mg de polímero en condiciones estáticas a 40 °C. El pH se monitoreó durante los 7 días de reacción.

Después del tiempo establecido para la reacción, los resultados fueron nuevamente negativos, no se tuvo pérdida de peso y tampoco se detectó ácido láctico. El pH de reacción se mantuvo constante debido a que no hubo liberación de productos. Las muestras sin reaccionar se observaron al microscopio y se encontró una apariencia similar a las que han sido sometidas a la reacción de hidrólisis enzimática, lo que hace pensar que el pretratamiento pudo ser muy agresivo con las muestras provocando una alteración en su estructura, reduciendo las regiones amorfas del polímero y dejando más zonas cristalinas con ello disminuyendo la capacidad de degradación, pues según Zhou (2008) la velocidad de degradación aumenta al tener una mayor cantidad de regiones amorfas lo que se ve reflejado en un menor porcentaje de cristalinidad. Por lo tanto, un porcentaje elevado de cristalinidad dificulta la acción de las cutinasas las cuales han mostrado una mayor afinidad a regiones amorfas.

9.8. Evaluación de las condiciones de incubación estáticas vs agitación

En la literatura se ha reportado que el uso de agitación en los sistemas de hidrólisis favorece la difusión de agua en la matriz y, por consecuencia, la difusión enzimática. El proceso permite a la enzima acceder a áreas a las cuales no es posible ingresar con facilidad en un sistema estático. Además, la agitación propicia tener una mayor superficie de contacto entre el polímero y el sitio activo de la enzima. La reacción se

desarrolló aplicando 800 rpm en un termobloque a una temperatura de 40 °C a las mejores condiciones reportadas con anterioridad y con la cutinasa AN CUT 1 (A1). En la tabla 15 se muestran los resultados:

Tabla 15. Pérdida de peso y ácido láctico obtenidos en reacción enzimática con agitación.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
Blanco	10.50	9.90	0.60	5.71	1.43
A1 pH 7 1	10.50	5.30	5.20	49.52	42.81
A1 pH 7 2	10.60	5.70	4.90	46.223	45.03
A1 pH 7 3	10.50	6.40	4.10	39.05	44.35
Promedio	10.53	6.82	4.73	44.93	44.06
Desviación	0.06	0.56	0.57	5.36	1.13

Con los datos anteriores se realizó una comparación entre la reacción de hidrólisis del procedimiento estático y el procedimiento con agitación plasmado en la figura 13.

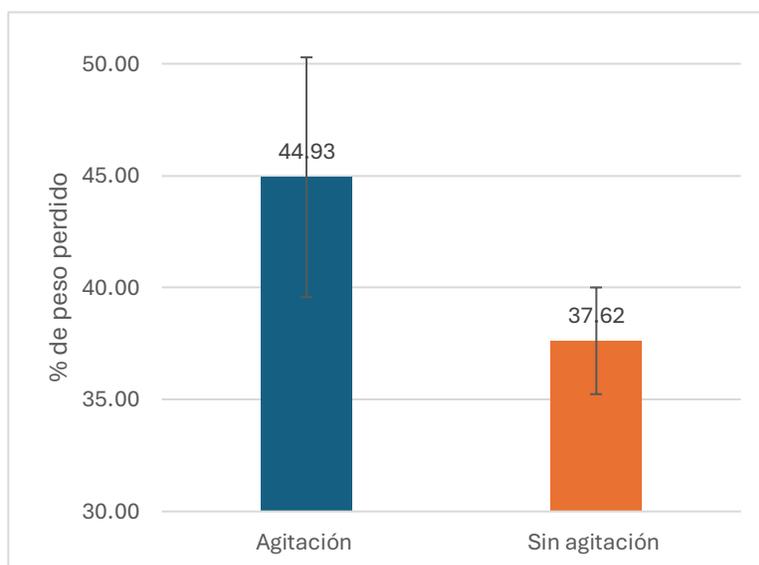


Figura 13. Comparación de peso del polímero perdido en la reacción enzimática con agitación y sin agitación.

Con esta reacción se comprobó que la agitación si favorece la liberación de ácido láctico y aumenta la pérdida de peso de las muestras. Por lo tanto, esta condición se aplicará en los experimentos subsecuentes.

9.9. Degradación de PDLLA en condiciones estáticas y con agitación

Se buscó corroborar la influencia de la agitación en las muestras, haciendo uso de un polímero que contuviera los dos isómeros posibles (L y D) utilizándose una muestra de referencia de poli-D, L-(ácido láctico) de Sigma Aldrich de peso molecular de 10,000 g/mol. Con este experimento también se evaluó la capacidad de la enzima para reconocer los isómeros del polímero y, a partir de los resultados, descartar que cuenta con enantioselectividad. Los resultados se muestran en las tablas 16 y 17:

Tabla 16. Reacción de degradación de PDLLA en condiciones estáticas.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	L-AL (mM)	D-AL (mM)
Blanco	11.00	10.4	0.60	5.45	8.84	2.40
DL-1	10.20	6.70	3.50	34.30	23.8	28.09
DL-2	10.90	7.10	3.80	34.90	27.3	30.30
DL-3	10.30	6.50	3.80	36.90	35.40	27.90
Promedio	10.47	6.77	3.70	35.40	28.8	28.76
Desviación	0.38	0.31	0.17	1.36	5.97	1.34

Tabla 17. Reacción de degradación de PDLLA en condiciones de agitación.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	L-AL (mM)	D-AL (mM)
Blanco	10.90	10.70	0.20	1.83	0.51	0.07
DL-1	10.60	2.80	7.80	73.58	37.51	53.68
DL-2	10.50	2.30	8.20	78.09	36.74	61.95
DL-3	10.10	2.00	8.10	80.20	30.20	5.99
Promedio	10.4	2.37	8.03	77.29	34.81	57.20
Desviación	0.26	0.40	0.21	3.38	4.02	4.27

En las dos reacciones se nota la liberación de ambos monómeros comprobando que la enzima ANCUT 1 no presenta enantioselectividad al momento de realizar los cortes en el polímero a diferencia por ejemplo de las proteasas aisladas de *Bacillus clausii* específica para PLLA y lipasas obtenidas de la cepa S-2 de *Cryptococcus* sp. específicas de PDLA, ambas reportadas por Kawai (2011).

Sin embargo, en la reacción con agitación la pérdida de peso y la liberación de los monómeros se ven beneficiadas. Con esto reforzamos que la agitación es un factor que influye de manera positiva en la reacción de hidrólisis. Este tipo de polímero pierde más peso, aproximadamente 30%, por lo cual, es posible que el peso molecular del polímero influye en el efecto de interacción enzima sustrato. La figura 14 muestra una comparación de la concentración de AL obtenido para cada uno de los experimentos.

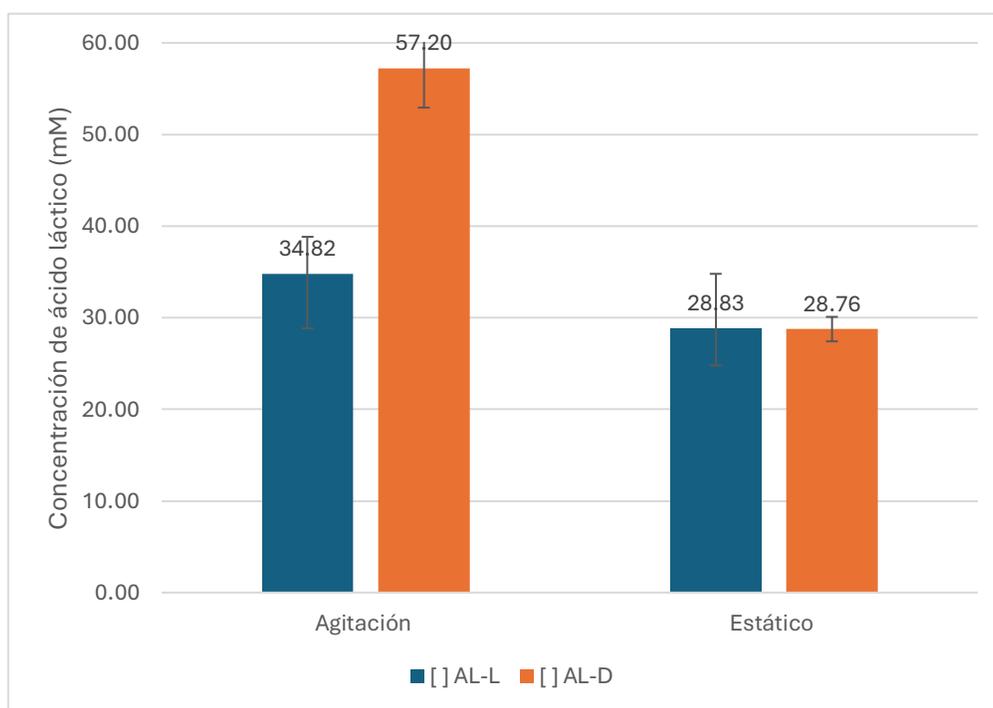


Figura 14. Comparación de la degradación de PDLLA en condiciones de agitación y estático midiendo la concentración del ácido láctico (AL) para los dos isómeros (D y L).

9.10. Evaluación de pretratamiento sobre la mezcla de reacción

Se preparó la mezcla de reacción con las nuevas condiciones obtenidas hasta el momento: agitación a 800 rpm, temperatura a 40 °C, agregar 10k Unidades de enzima, 10 mg de polímero, aforar la reacción a 1 mL con amortiguador TRIS-HCl 50 mM pH 9 y mantener la reacción a un pH de 7 a lo largo de 7 días. Una vez lista la mezcla de reacción esta se sometió a un pretratamiento en un baño de ultrasonido de 40 kHz por 10 min a temperatura ambiente. Esto por lo reportado por Brackmann, *et al.* 2023, busca favorecer la difusión de agua y por ende del extracto enzimático ya que el ultrasonido crea microburbujas de cavitación lo que provoca ligeras implosiones en las diferentes regiones del polímero, lo que resulta en una mejor

interacción entre el sustrato y la enzima. Además, esta energía liberada por el ultrasonido puede contribuir a la disminución en la energía de activación y la entalpía de las reacciones enzimáticas. A continuación, la tabla 18 muestra los resultados obtenidos y figura 15 da una comparación entre la cantidad de ácido láctico liberado y la diferencia en la pérdida de peso sin la aplicación y con la aplicación del pretratamiento.

Tabla 18. Aplicación de pretratamiento de sonicación sobre la mezcla de reacción.

Muestra	Peso inicial (mg)	Peso final (mg)	Diferencia de peso (mg)	% pérdida de peso	AL (mM)
Blanco	10.60	10.20	0.40	3.77	0.41
A1 pH 7 1	10.30	6.70	3.60	34.95	49.05
A1 pH 7 2	10.00	6.50	3.50	35.00	53.10
A1 pH 7 3	10.60	6.00	4.60	43.40	47.32
Promedio	10.30	6.40	3.90	37.78	49.83
Desviación	0.30	0.36	0.61	4.86	2.96

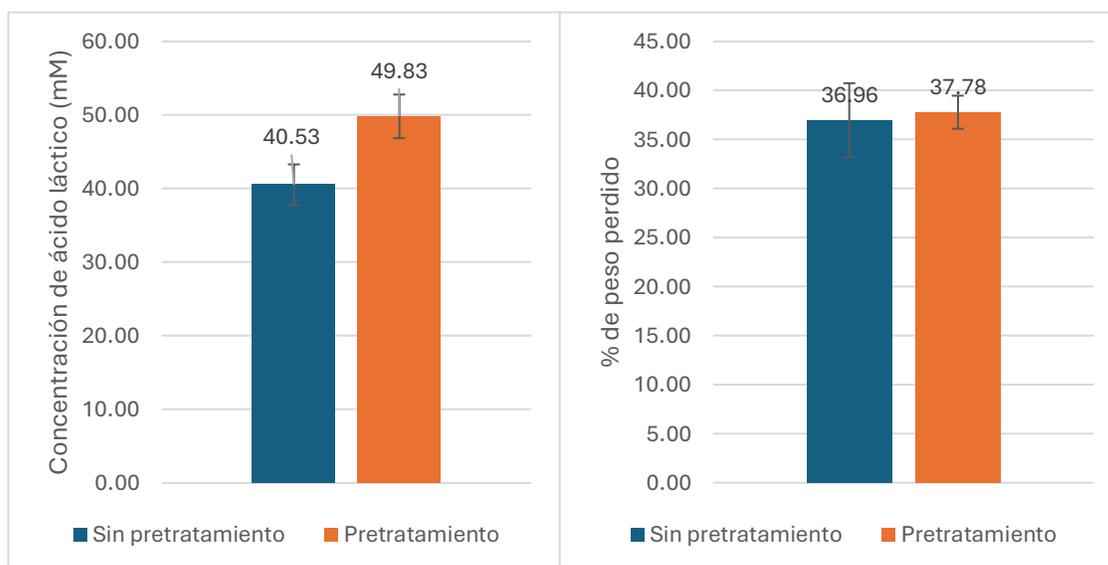


Figura 15. Comparación entre la cantidad de ácido láctico liberado y la diferencia en la pérdida de peso sin la aplicación y con la aplicación del pretratamiento.

Como se puede observar se tiene una mejor liberación de ácido láctico en la reacción con la aplicación del pretratamiento, lo que puede atribuirse a la creación de mejores condiciones de interacción entre enzima y sustrato favoreciendo una mejor difusión del extracto en la matriz polimérica que resulta en el rompimiento de las cadenas

poliméricas, además se favorece, aunque de manera menos representativa, la pérdida de peso en la cual no se nota una diferencia considerable como lo expone en su artículo Brackmann, *et al.* (2023), sin embargo, se observa una mejora del proceso con el pretratamiento pues aunque se pierde de manera muy similar el peso del polímero se tiene una mejor liberación y cuantificación de los monómeros, aumentando los rendimientos de la reacción.

Sin embargo, es posible que exista inactivación enzimática por parte del proceso de pretratamiento lo que puede influir en la mínima diferencia de la pérdida de peso. La inactivación enzimática se comprobó realizando la medición de la actividad específica de la proteína momentos después del pretratamiento, observándose una disminución de hasta 2000 Unidades. Esto confirmó que el pretratamiento es efectivo, pues se obtiene una mayor liberación de ácido láctico y una pérdida de peso similar con una menor cantidad de enzima disponible en el medio de reacción.

9.11. Evaluación de las mejores condiciones de reacción sobre polímeros comerciales derivados del poli(ácido láctico)

Se utilizaron las nuevas condiciones de reacción para realizar la hidrólisis enzimática de los derivados de poli(ácido láctico). Se evaluaron tres muestras de polímeros comerciales, el primero de ellos fue el filamento para la impresión 3D el cual en sus especificaciones nos indican que es un material compuesto por PLA, el segundo fueron envases recuperados de la marca Starbucks® en los cuales se indica que es un material biocompostable derivado del PLA y por último envases comerciales utilizados como recipientes o tapas en los servicios de comida para llevar.

Una vez que se molieron los materiales se preparó la mezcla de reacción la cual consistió en 10 mg del polímero, 10 kU de enzima, se aforó la muestra a 1 mL de reacción con amortiguador TRIS-HCl pH 9, la mezcla se sometió al pretratamiento con ultrasonido por 10 min a temperatura ambiente y se llevó al termobloque con una agitación de 800 rpm a una temperatura de 40 °C por siete días con monitoreo y control de pH.

Una vez transcurrido el tiempo de reacción, no se obtuvieron resultados favorables, pues no hubo pérdida de peso en las muestras, además de que no se registró variación en el pH, lo que hace suponer que no hubo liberación de ácido láctico en el medio. Esto puede deberse a que los materiales que se evaluaron no cuentan una pureza del 100%, el uso de aditivos para su resistencia y termoestabilidad puede influir en la interacción enzima sustrato lo que vuelve más complicada la reacción. Además, se pueden tener la presencia de algún otro polímero en mezcla con el PLA para volverlo un material más maleable y que cumpla con las especificaciones que se requieren para su uso comercial ya que según Nagarajan (2016) la industria se encuentra en constante búsqueda de obtener fórmulas de polímeros superreforzados aumentando la dureza y por ende su resistencia al impacto, volviéndolos más flexibles y con una mayor adaptabilidad a los cambios de temperatura. Es importante, en el futuro, conocer mejor la composición de los materiales para crear estrategias que puedan contribuir a la degradación enzimática.

9.12. Cinéticas de reacción de las tres cutinasas recombinantes.

Para este experimento se utilizaron las condiciones de reacción encontradas hasta el momento, se decidió agregar la cantidad necesario de extracto para compensar la pérdida por el pretratamiento de alrededor de 2000 Unidades y se realizó una cinética para determinar si es posible reducir el tiempo de reacción, así como conocer el comportamiento que tiene la enzima con el sustrato a lo largo del tiempo. El pH se mantuvo constante y se registró la pérdida de peso, así como la actividad residual de las cutinasas. Para el caso de la ANCUT 1, que hasta el momento han mostrado el mejor desempeño, se optó por cuantificar los productos liberados de la reacción a lo largo de los siete días.

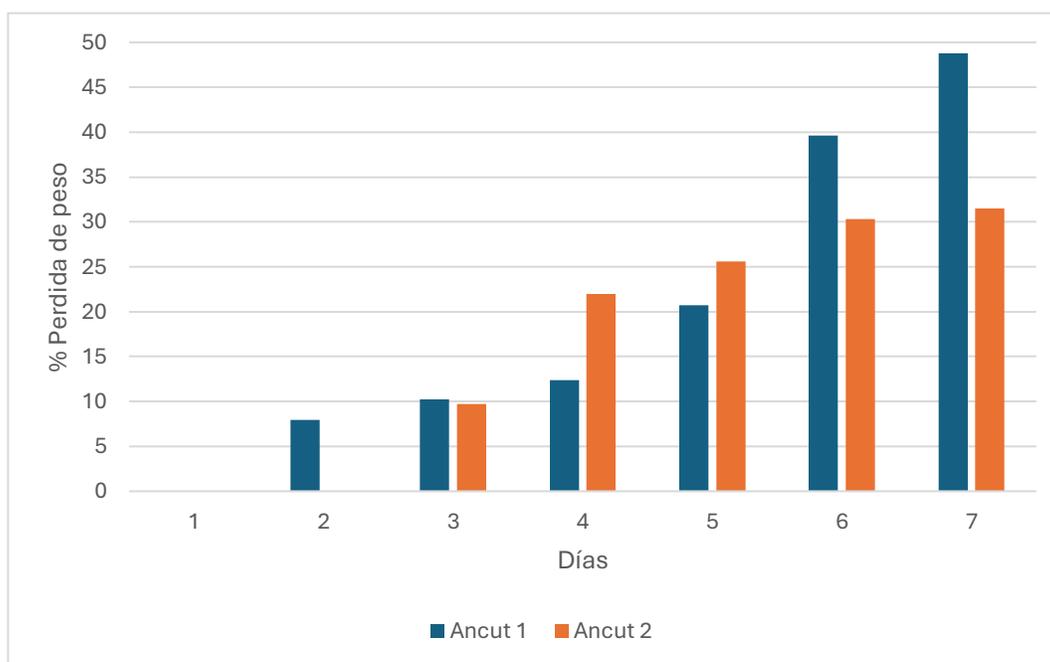


Figura 16. Comparación de la pérdida de peso provocada por ANCUT 1 y ANCUT 2 a lo largo de siete días de reacción.

En la figura 16 se hace la comparación de la pérdida de peso entre la ANCUT 1 (barras azules) y la ANCUT 2 (barras naranjas). En la gráfica no aparece la ANCUT 3 ya que no se obtuvo pérdida de peso durante la reacción. Se observa que para ANCUT1 la pérdida de peso comienza desde el día 2 mientras que para la ANCUT2 la pérdida de peso comenzó hasta el día tres, donde la ANCUT1 muestra una mayor pérdida de peso. Al cuarto y quinto día la ANCUT2 supera a la ANCUT1 en la pérdida de peso, pero se queda atrás para el día 6 y 7 donde la A1 tiene una marcada diferencia, incluso entre el día 6 y 7 para ANCUT2 no se nota diferencia.

La figura 17 muestra el comportamiento que tiene la actividad residual para las 3 cutinasas. Cabe resaltar el comportamiento que tiene la ANCUT1, la cual comienza a registrar una menor cantidad de Unidades de enzima disponibles; a partir del día 3 se sufre un aumento, para volver a descender en el día 4 y aumentar nuevamente en el día 6, a partir de ese momento el descenso es continuo. Esto puede hablar de la capacidad de la enzima para unirse al sustrato, realizar el corte del enlace y

liberarse nuevamente al medio de reacción para buscar una nueva cadena, sin embargo, llega un punto en el que la enzima deja de repetir ese proceso y se inactiva. Para el caso de la ANCUT2 la disminución de la actividad se da desde el día uno y continúa así hasta el día seis, cuando presenta un ligero aumento, pero para el día 7 ya se registra muy poca actividad. Por último, para la ANCUT3 la actividad desde el día 0, es decir, después del pretratamiento se ve afectada la actividad en gran medida. La influencia de la temperatura y la agitación sobre la ANCUT2 y ANCUT3 pueden provocar una disminución en su estabilidad y, por consecuencia, en su actividad.

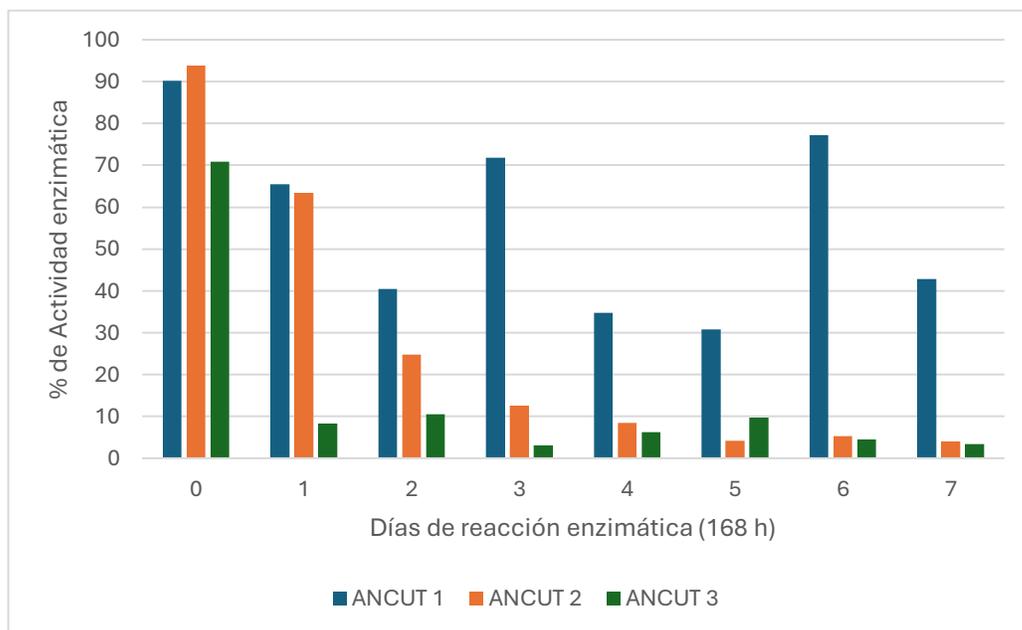


Figura 17. Comparación del % de actividad enzimática de las cutinasas ANCUT 1, 2 y 3 durante los 7 días de reacción.

9.13. Degradación química de PLA

La degradación química se desarrolló utilizando PLA recuperado de vasos y envases comerciales los cuales fueron recortados, dándoles una forma cuadrada de 10x10 mm. Se pesaron 30 y se agregaron 30 de NaOH en un medio de reacción de 100 mL de agua y 50 mL de etanol a una temperatura de la parrilla a 230 °C por alrededor de 1 hr. La reacción se detuvo una vez que el medio de reacción se encontraba translúcido y sin partículas de tamaño considerable. Una vez terminada la reacción se ajustó el pH a 3 y se saturó la solución con NaCl para favorecer la extracción del ácido láctico. La muestra se filtró para eliminar las partículas suspendidas recuperándose un polvo blanco que posiblemente se trate de un aditivo u otro polímero para ayudar a la estabilidad de los productos. Además, se centrifugó el filtrado para posteriormente realizar la extracción líquido-líquido utilizando como solvente acetato de etilo, el cual con ayuda de un rotavapor se separó de nuestro producto de interés.

De la reacción de 30 g de polímero se obtuvo una pérdida de peso de 28.8 g lo que representa un 96% del polímero inicial. A partir de la mezcla de reacción se

recuperaron 24 mL de ácido láctico. La recuperación del producto de interés se comprobó realizando una cromatografía de capa fina y usando un reactivo de referencia. La figura 18 de la placa se muestra a continuación.

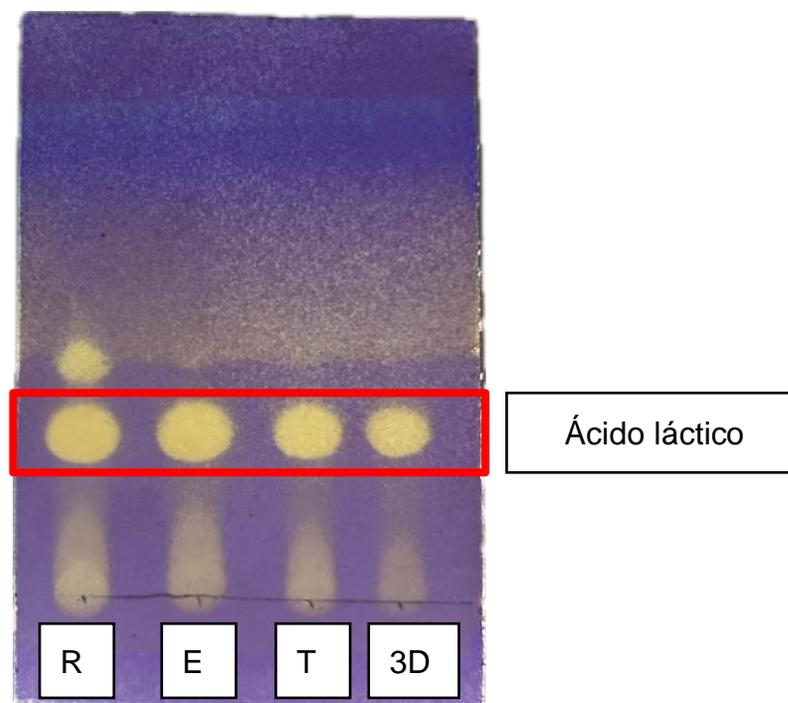


Figura 18. Placa de cromatografía de capa fina. R=Referencia, E=Envases PLA, T=Tapas PLA, 3D=filamento de impresión 3D.

9.14. Curva de calibración y cuantificación de PLA por cromatografía en fase reversa en un sistema HPLC

Se realizó una curva de calibración de siete puntos con las siguientes concentraciones de ácido láctico en %: 5, 2.5, 1.25, 0.6, 0.3, 0.15, 0.075. El tiempo de corrida se ajustó a 15 min y el tiempo de retención fue de 3.52 min. Se obtuvo la ecuación de la recta siendo esta $y=6 \times 10^6 x + 689800$ y un coeficiente de correlación del 0.9972.

Se inyectó la muestra recuperada de la degradación química, que mostró un valor de 81.51%, lo que quiere decir que, de 24 mL recuperados de la reacción de hidrólisis, 19.56 mL corresponden al monómero ácido láctico, mientras que los 4.44 mL restantes corresponden a impurezas, las cuales pueden tratarse de aditivos en la muestra o de la presencia de oligómeros, que se mostrarían en el cromatograma en un tiempo de retención muy cercano a nuestra muestra.

También se inyectaron muestras de las reacciones enzimáticas que no se pudieron cuantificar por medio del kit enzimático (PLA 3D= muestra de filamento para la impresión 3D, PLA MUS= muestra de PLA Goodfellow tratada con ultrasonido y

aplicación de microondas, PLA US= muestra de PLA Goodfellow tratada con ultrasonido únicamente, PLA Star= muestra de residuos de envases de la marca Starbucks® tratados enzimáticamente) y que con ayuda de la cromatografía de capa fina se pudo apreciar la presencia del ácido láctico. Los resultados se presentan en la tabla 19:

Tabla 19. Resultados del análisis de HPLC de las reacciones de degradación de polímeros derivados de PLA.

Muestra	AL en %	AL en mM
PLA 3D	5.32	0.58
PLA MUS	0.67	0.07
PLA US	2.76	0.31
PLA Star	0.96	0.11

Podemos apreciar que la cantidad de AL liberado es mínima, pero se comprueba la sensibilidad que tiene la técnica de HPLC para la detección del monómero. Sin embargo, su limitante es que no se puede diferenciar entre cada uno de los isómeros.

9.15. Reacción de esterificación

Una vez identificado el ácido láctico en la cromatografía de capa fina, se decidió realizar una reacción de esterificación utilizando etanol y como catalizador ácido sulfúrico concentrado. La reacción se desarrolló durante 2 h con un sistema de recirculación para favorecer la formación de los productos. La mezcla se llevó a un rotavapor para eliminar el exceso de etanol y ácido láctico recuperándose el producto, el lactato de etilo.

De los 24 mL de ácido láctico que se agregaron a la reacción se recuperaron 13 mL de lactato de etilo, por lo tanto, a partir de 30 g de polímero se tiene un rendimiento de reacción del 43%. Es necesario caracterizar el producto obtenido y determinar su pureza.

9.16. Caracterización del producto de esterificación por RMN y espectrometría de IR

A continuación, se muestran los espectros generados a partir del análisis de la muestra recuperada de lactato de etilo comparadas con un patrón de referencia.

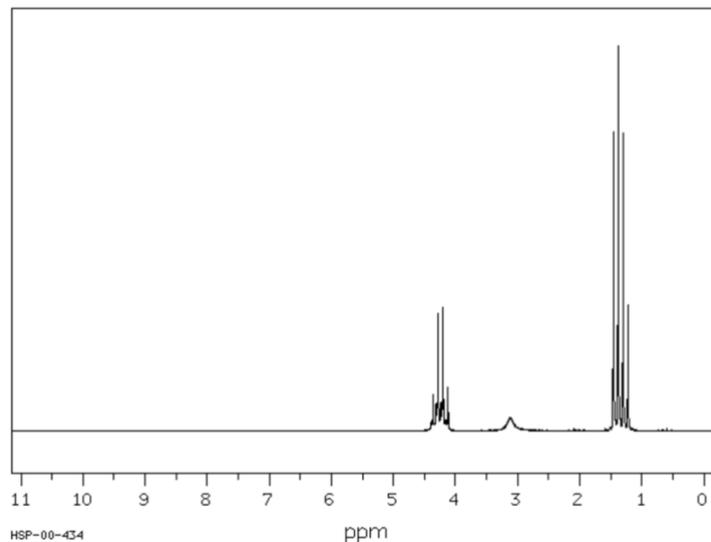


Figura 19. Espectro de RMN de Lactato de Etilo (Bykowski et. al., 2014)

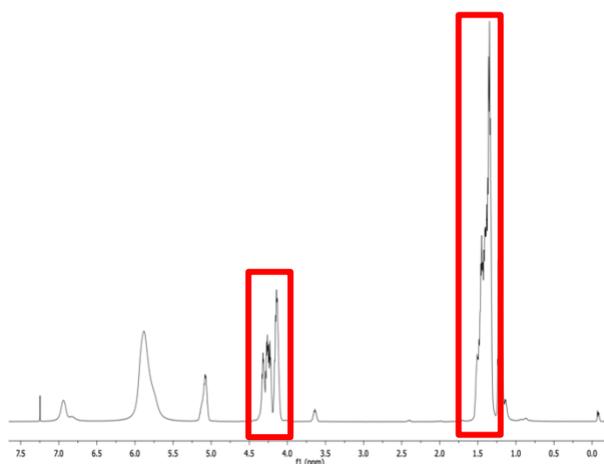


Figura 20. Espectro de RMN $1H$ de la reacción de esterificación de ácido láctico.

En la figura 19 se puede observar el espectro de resonancia cuando el lactato de etilo se encuentra puro, mostrando picos bien definidos, contrario a lo que muestra la figura 20 que se trata del producto de la reacción de esterificación, el cual no se encuentra purificado. Los picos señalados corresponden al lactato de etilo y se encuentran en aproximadamente 4.2 ppm y en 1.2 ppm. No se encuentra bien definido por la presencia de señales de interferencia, las cuales se pueden atribuir a la presencia de otras sustancias como ácidos carboxílicos, aldehídos y etanol correspondientes residuos sin reaccionar de ácido láctico o por la presencia de oligómeros del mismo los cuales se pueden encontrar en mezcla con el producto recuperado la igual que con el etanol y debido a la alta sensibilidad con la que cuenta la técnica pueden provocar las señales que no se aprecian en un producto puro. Se

realizó un análisis por IR para tener más evidencia de la obtención del producto de interés.

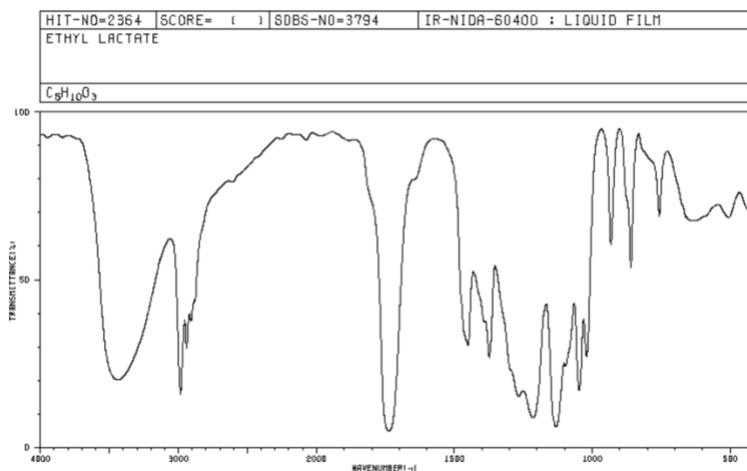


Figura 21. Espectro IR de Lactato de Etilo (Ankaiah et. al., 2024)

Con este análisis de IR (Fig. 22) se puede hacer más evidente la presencia del producto de interés, al tratarse de una técnica menos sensible, en comparación con la RMN, nos muestra la presencia del producto mayoritario que se trata del Lactato de Etilo, siendo la huella del espectro muy similar al de referencia (Fig. 21), ubicándose en longitudes de onda de 3424 cm⁻¹ la presencia del grupo -OH y en 1727 cm⁻¹ la presencia del grupo carbonilo característico para los ésteres, confirmando de esta manera la reacción de esterificación.

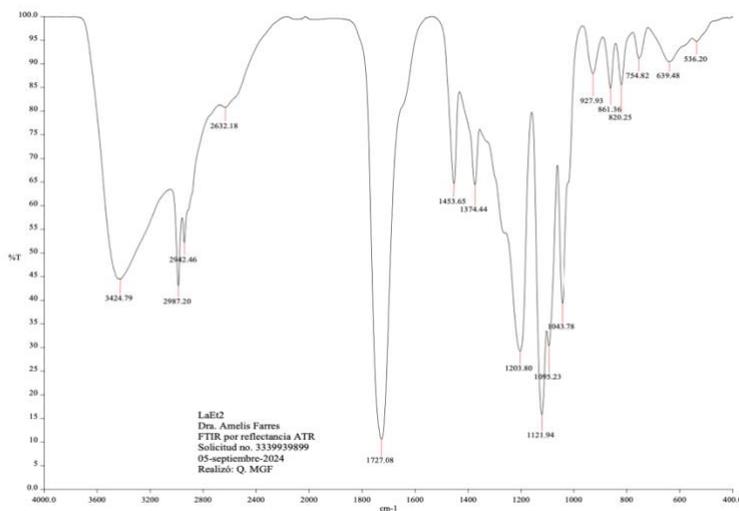


Figura 22. Espectro de IR de la reacción de esterificación de ácido láctico.

9.17. Obtención de la cristalinidad de las muestras de poli(ácido láctico) utilizando la técnica de Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Una vez se obtuvieron los datos se procedió con el cálculo del % de cristalinidad, la información se encuentra condensada en la tabla 20.

Tabla 20. Entalpía de cristalización (ΔH_c), entalpía de fusión (ΔH_m) y % de cristalinidad de las muestras de poli(ácido láctico). Muestra de filamento para impresión 3D=PLA 3D, muestra de PLA Goodfellow con pretratamiento de microondas=PLA MUS, muestra de PLA Goodfellow con pretratamiento de ultrasonido=PLA US, muestra de PLA recuperado de envases de la marca Starbucks®=PLA Star, muestra de PLA Goodfellow triturado=PLA GF, muestra de PLA Goodfellow triturado con degradación enzimática=PLA GFE, muestra de PLA Goodfellow triturado con pretratamiento sobre la mezcla de reacción y degradación enzimática=PLA GFEP.

Muestra	ΔH_c	ΔH_m	% de Cristalinidad
PLA 3D	0.83	33.50	34.90
PLA MUS	1.58	38.33	39.36
PLA US	0.00	37.58	40.15
PLA Star	15.11	24.30	9.81
PLA GF	19.10	43.32	25.88
PLA GFE	0.83	33.5	34.90
PLA GFEP	1.03	31.77	32.23

Con estos datos se puede observar el aumento en la cristalinidad del polímero de partida (PLA GF) el cual tiene un % de cristalinidad de 25.88% esto quiere decir que tanto los procesos de pretratamiento como el proceso de degradación enzimática tienen efecto en la estructura del polímero aumentando el % de cristalinidad en todos los casos por encima del 30%, esto quiere decir que por lo menos se ha eliminado un 5% de regiones amorfas del polímero. Para el caso de los pretratamientos resultaron ser muy agresivos sobre el polímero provocando el aumento en la cristalinidad, lo que significa una disminución de las regiones amorfas, estas regiones amorfas se encuentran en los polímeros de manera superficial comprobado en el análisis de Lan *et. al.* (2022), sin embargo, se tienen regiones dentro de la matriz polimérica que resultan de difícil acceso, razón por la cual es necesaria la aplicación de un pretratamiento que exponga estas regiones susceptibles a la degradación sin modificar su estructura. Por lo anterior al momento de colocar la enzima esta no tuvo efectos en la liberación de monómero de ácido láctico ni en la pérdida de peso debido a la menor disponibilidad de dichas regiones amorfas, lo cual se comprueba en los análisis realizados al polímero después del desarrollo de la reacción de degradación enzimática donde se aprecia un incremento similar en la cristalinidad.

Para el caso de las muestras comerciales del poli(ácido láctico) se tiene un contraste considerable, para la muestra de filamento para impresión 3D (PLA 3D) la cual tiene un 34.90% de cristalinidad contra el 9.80% de la muestra recuperada en los envases de la marca Starbucks® (PLA Star), para ambos casos al momento de desarrollar la reacción de degradación enzimática no se tuvo pérdida de peso ni obtención de monómeros de ácido láctico, para el primer caso podría esperarse este resultado

por el porcentaje de cristalinidad, sin embargo, para el otro se esperaría mayor efecto de la enzima a tener mayor disposición de regiones amorfas pero no fue el caso por lo tanto es posible que estos materiales tengan un aditivo o un copolímero que impide la acción enzimática.

Realizando una comparación de la capacidad de degradación de la ANCUT 1 con otras investigaciones se tiene que la cutinasa del grupo de trabajo presenta valores superiores de pérdida de peso con el 37.78% para PLA de alto peso molecular mientras que para un PLA de peso molecular bajo de 10,000 g/mol se tiene una pérdida de peso de 77.29% en un tiempo de reacción de siete días contrastando con otras investigaciones como lo reportado por Mistry, *et. al.* (2022) en donde por acción de un consorcio bacteriano productor de proteasas, lipasas y esterases se logra únicamente el 9.68% de pérdida de peso en 35 días de reacción o lo reportado por Wang, *et. al.* (2023) con un 8% de pérdida de peso en 30 días por la bacteria *Bacillus sotensis*. Sin embargo, se tienen otros reportes como Karimi, *et. al.* (2021) en donde se tiene una pérdida de peso de entre 55 a 61% en 55 días de reacción por acción de una celulasa promiscua, mientras que Peng, *et. al.* (2023) reporta una pérdida de peso de hasta el 78% en 42 días por acción de la larva de *Tenebrio malitor* y por último Boonluksiri, *et. al.* (2021) presenta una pérdida de peso del 100% en condiciones de enterramiento en suelo con una mezcla de estiércol y un consorcio microbiano. En retrospectiva, se considera un punto a favor de la cutinasa ANCUT 1 empleada en esta investigación, la pérdida de peso en un tiempo reducido en comparación a las investigaciones anteriormente mencionadas considerando el ritmo de degradación se podría obtener un % de pérdida de peso mucho mayor, sin embargo, se tiene como limitante la inactivación enzimática por lo que sería necesario plantear un sistema en el cual se pueda adicionar nueva enzima que permita el desarrollo de la reacción por un tiempo mayor.

Esta investigación con cutinasas además de buscar la pérdida de peso del polímero se enfocó en la generación y cuantificación de ácido láctico generado a partir de la reacción de degradación enzimática, estableciendo un precedente ya que las investigaciones recientes se han centrado únicamente en la pérdida de peso sin identificar los productos de la reacción de degradación, algo que resulta fundamental si se quiere buscar que el polímero se adapte a un modelo de economía circular.

10. Conclusiones y perspectivas

En este trabajo se establecieron nuevas condiciones para incrementar la liberación de ácido láctico y generar una mayor pérdida de peso en el proceso de degradación enzimática de PLA por las cutinasas recombinantes de *A. nidulans* (ANCUT 1, ANCUT 2 y ANCUT 3). Las nuevas condiciones de reacción se establecieron con los siguientes parámetros:

- Agregar 12,000 Unidades de enzima.
- Amortiguador TRIS-HCl 50 Mm y controlar el pH a 7 durante los 7 días (168 h) de reacción.
- Temperatura de reacción a 40 °C.
- Agitación a 800 rpm.
- Una vez preparada la mezcla de reacción se confirmó la ayuda del pretratamiento de ultrasonido por 10 min a temperatura ambiente. La aplicación directa de los pretratamientos al polímero debe de cuidarse pues condiciones extremas pueden provocar cambios en la morfología de la matriz polimérica disminuyendo la eficiencia en la reacción.

Los cambios anteriores en el proceso de degradación permitieron un incremento mínimo del 16% en el rendimiento de la reacción con respecto a la liberación del monómero de ácido láctico en comparación con lo reportado por Alvarado (2023). La magnitud del incremento depende del tipo de polímero utilizado. Por ejemplo, para la muestra de PDLLA, la cual presenta un menor peso molecular, el rendimiento de la reacción se ve incrementado en un 54%, con lo que se propone que disminuyendo el peso molecular del polímero el rendimiento se verá incrementado. Este incremento en el rendimiento de la reacción también se ve reflejado en el aumento de la cristalinidad del polímero después de 7 días de reacción enzimática, comprobando también que la enzima tiene preferencia por las zonas amorfas del polímero. Además, se determinó que la enzima no es enantioselectiva ya que rompe la cadena que contiene ambos isómeros del ácido láctico, lo que permite que tenga aplicaciones para tratamiento tanto de PLA puro y en mezcla, como generalmente se encuentra comercialmente.

Se confirmó que ANCUT 1 es la mejor enzima de las tres con las que se cuenta en el grupo de trabajo, mejorándose su actividad y comprobando su retención de actividad a lo largo de siete días. Sin embargo, las nuevas condiciones de degradación favorecieron la actividad de ANCUT 2 con respecto al trabajo anterior, aunque sólo alcanza a producir el 50 % del ácido láctico generado con ANCUT 1.

La degradación enzimática de los productos derivados del PLA utilizando las cutinasas del grupo de trabajo aún no permite la obtención de cantidades significativas de ácido láctico, aunque si logra una pérdida de peso del polímero. Es posible que estos polímeros comerciales cuenten con aditivos o estén combinados con otros polímeros para la formación de copolímeros para una mejor resistencia mecánica de estos materiales, lo que dificulta el ataque enzimático.

La degradación química tiene un rendimiento del 96% con respecto a la pérdida de peso, y un tiempo de reacción corto. Esto indica que la degradación enzimática aún se encuentra limitada por la escala en la que se realiza la reacción, en la cual, la recuperación del monómero de ácido láctico no resulta significativa para realizar nuevas reacciones a partir de dicho producto y no es comparable con lo recuperado en la reacción química, además, la pérdida de peso a esa escala no contribuye a resolver el problema de acumulación de plásticos. En contraste, la degradación química, que se puede llevar a cabo a mayores escalas, permite obtener mejores rendimientos en la recuperación del monómero y presenta una evidente reducción en el peso del polímero lo que resuelve más rápido el problema de acumulación de residuos de PLA. Sin embargo, es importante mantener las investigaciones en esta alternativa de degradación biotecnológica, buscando el alineamiento con la agenda 2030 y promoviendo la sostenibilidad.

Los productos recuperados tanto de la reacción de hidrólisis química como de la enzimática se pueden emplear en reacciones secundarias como en la esterificación para la generación de productos con valor agregado, contribuyendo así al ciclo virtuoso de la economía circular. En el presente trabajo se logró la síntesis de lactato de etilo a partir de una reacción de esterificación del ácido láctico recuperado.

Por lo tanto, se tienen como perspectivas la mejora de los pretratamientos sobre la muestra, con la finalidad de reducir la cristalinidad y crear mayores zonas amorfas, así como reducir el peso molecular del polímero para permitir una mejor interacción entre el sustrato y la enzima, por lo tanto, es necesario determinar el peso molecular de los polímeros comerciales del PLA para mejorar la eficiencia en las reacciones de degradación. Así también es necesario mejorar las condiciones de reacción para ANCUT 2 y ANCUT 3 ya que éstas presentan una inactivación más rápida con respecto a ANCUT 1 a las condiciones establecidas, por lo que será necesario establecer protocolos para cada una y explorar nuevas alternativas que contribuyan a la estabilidad de la proteína, como son la acción de líquidos iónicos (Park, *et. al.*, 2009), la aplicación de ingeniería de proteínas como lo demuestra Pang, *et. al.* (2023) donde por medio de programas de simulación se ha logrado la mejora de la interacción de la proteínasa k con PLA y policaprolactona para su degradación. Actualmente en el grupo de trabajo Castro (trabajo en curso) plantea realizar mutaciones para mejorar la estabilidad y la interacción enzima sustrato de las cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans*, empleadas en el presente trabajo.

Es importante mejorar los procesos de hidrólisis del polímero por la vía química para aumentar la eficiencia, así como probar nuevos métodos de separación con el fin de poder incrementar el porcentaje de monómero recuperado al igual que su pureza lo que se verá reflejado en mejores condiciones de la reacción de esterificación incrementando la eficiencia de transformación de los reactivos al producto de interés.

Por último, será necesario realizar la evaluación de la degradación enzimática en un reactor bajo condiciones más controladas de temperatura, agitación y regulación del

pH, con la finalidad de escalar el proceso y tener obtener mejores datos para comparar los dos procesos de degradación, el químico y el enzimático.

11. Bibliografía

Alonso, J. y Méndez, M. (2010). Relación estructura-propiedades de polímeros. *Educación Química*, 21 (4), pp. 291-299.

Altammar, K. A., Ling, J. G., Al-Bajalan, H. M., Chin, I.-S., Mackeen, M. M., Mahadi, N. M., Murad, A. M. A., & Bakar, F. D. A. (2022). Characterization of AnCUT3, a plastic-degrading paucimannose cutinase from *Aspergillus niger* expressed in *Pichia pastoris*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 222, 2353–2367.

Alvarado, E. (2023). Degradación de ácido poliláctico con cutinasas recombinantes. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

ANIPAC. (2020). 1er Informe del Acuerdo Nacional para la Nueva Economía del Plástico en México. Asociación Nacional de Industrias del Plástico, A.C.

Ankaiah, T., Karlapudi, S., Nagulshareef, S., Battuluri, S., Kumar, D. B. K., Siva Kumar, K., Bahadur, I., Hernández, A., Mohammad, F., Soleiman, A. A., & Yugandhar Sreedhar, N. (2024). Interactions between ethyl lactate and substituted ethanols or ethyl acetate: Thermodynamic, FT-IR spectroscopic, DFT method, and PC-SAFT EoS studies. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 69 (4), pp.1423–1447.

Argáez, M. (2016). Efecto de la modificación de celulosa de hule natural epoxidado sobre las propiedades dinámico-mecánicas de biocompuestos PLA/Celulosa. Tesis para el título de maestro en ciencias en materiales poliméricos. Centro de investigación científica de Yucatan, A. C.

Auras, R., Lim, L.-T., Selke, S. E. M., & Tsuji, H. (2010). Chapter 1 Production and Purification of Lactic Acid and Lactide. *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Wiley, pp. 1-18.

Beltrán, M. y Marcilla, A. (2012) Tecnología de polímeros. Procesado y Propiedades. Ed. Universidad de Alicante. Capítulo I, Estructura y propiedades de los polímeros pp. 276.

Bermúdez-García, E.; Peña-Montes, C.; Martins, I.; Pais, J.; Pereira, C.; Sánchez, S.; Farrés, A. (2019) Regulation of the cutinases expressed by *Aspergillus nidulans* and evaluation of their role in cutin degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 103, 3863–3874.

Boonluksiri, Y., Prapagdee, B., & Sombatsompop, N. (2021). Promotion of polylactic acid biodegradation by a combined addition of PLA-degrading bacterium and

nitrogen source under submerged and soil burial conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 188 (109562), 109562.

Borshchevskaya, L., Gordeeva, T., Kalinina, A., y Sineokii, S. (2016). Spectrophotometric determination of lactic acid. *Journal of Analytical Chemistry*, 71 (8), 755–758.

Brackmann, R., de Oliveira Veloso, C., de Castro, A. M., y Langone, M. A. P. (2023). Enzymatic post-consumer poly(ethylene terephthalate) (PET) depolymerization using commercial enzymes. *3 Biotech*, 13 (5), 135.

Bradford, 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.

Buteler, M. (2019). El problema del plástico. ¿Qué es la contaminación por plástico y por qué nos afecta a todos?. *Desde la Patagonia Difundiendo Saberes*, 16 (28), pp. 56-60.

Bykowski, D., Grala, A., & Sobota, P. (2014). Conversion of lactides into ethyl lactates and value-added products. *Tetrahedron Letters*, 55 (38), pp. 5286–5289.

Calabia, B., Tokiwa, Y., Ugwu, C. y Aiba, S. (2010). Chapter 25. Biodegradation. Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications. *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications* Wiley, pp. 423-430.

Camacho, Y. y Lizarazo, Y. (2021). Producción de ácido láctico a partir del proceso de fermentación de la pulpa de café. Tesis para la obtención del título de Ingeniera Ambiental. Universidad Libre de Colombia.

Campaña G., Uquillas S., Villamarín B., Yáñez, G., Romero, D. y Pilaquina, F. (2022). Potencial uso de nanomateriales combinados con ácido poliláctico (PLA) en prótesis ortopédicas: Una revisión. *Infoanalítica (Quito - Impresa)*, 10(1), 15–41.

Camposano, I. y Riera, M. (2022). Ácido poliláctico: una revisión de los métodos de producción y sus aplicaciones. *Publicaciones en Ciencias y Tecnología*, 16 (1), pp. 42-53.

Carvalho, C., Aires, M. y Cabral, J. (1999). Cutinase: from molecular level to bioprocess development. *Biotechnology and Bioengineering*, 66 (1), 17-34

Casalini, T., Rossi, F., Castrovinci, A., y Perale, G. (2019). A perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 259.

Castillo, Y. (2015). Degradación de ácido poliláctico (PLA) a diferentes dosis de radiación gamma. Tesis para obtener el título de Ingeniería Industrial. Universidad Mexiquense del Bicentenario.

Castro-Rodríguez, J. A., Rodríguez-Sotres, R., & Farrés, A. (2023). Determinants for an efficient enzymatic catalysis in poly(ethylene terephthalate) degradation. *Catalysts*, 13 (3), 591.

Castro, J. (2017). Mejoramiento de la producción de la cutinasa ANCUT 1 utilizando el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cerdá, E. y Khalilova, A. (2016). Economía circular. *Empresa, medio ambiente y competición*, 401, pp. 11-20.

Cereghino, J., y Cregg, J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS microbiology reviews*, 24 (1), 45-66.

Chen, S., Su, L., Chen, J., & Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31 (8), 1754–1767.

Chen, S., Su, L., Chen, J., y Wu, J. (2013). Cutinase: Characteristics, preparation, and application. *Biotechnology Advances*, 31 (8), 1754–1767.

Cregg, J., Tolstorukov, I., Kusari, A., Sunga, J., Madden, K. y Chappell, T. (2009). Expression in the Yeast *Pichia pastoris*. *Methods in Eenzymology*, 463, 169-189.

Datta, R., y Henry, M. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology (Oxford, Oxfordshire: 1986)*, 81 (7), 1119–1129.

Dey, P., Linnanen, L., y Pal, P. (2012). Separation of lactic acid from fermentation broth by cross flow nanofiltration: Membrane characterization and transport modelling. *Desalination*, 288, 47–57.

Diego, A. (Trabajo en revisión). Caracterización y optimización de la expresión de ANCUT 1 de *Aspergillus nidulans* en *Escherichia coli*. Tesis para obtener el grado de Mmaestra en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

Din, N., Lim, S., Maskat, M., Mutalib, S. y Zaini, N. (2021). Lactic acid separation and recovery from fermentation broth by ion-exchange resin: A review. *Bioresources and Bioprocessing*, 8 (1), 31.

DiTullio, D. (2022). Capítulo 8. Metabolismo de los lípidos. *Notas de Bioquímica*. McGraw Hill.

Drumright, R., Guber, P. y Henton, D. (2000). Polylactic Acid Tecnology. *Advanced Materials*, 12 (23), 1841-1846.

Eş, I., Mousavi, A., Barba, F., Saraiva, J., Sant'Ana, A. y Hashemi, S. (2018). Recent advancements in lactic acid production - a review. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 107, 763–770.

Espezúa, E. y Ponce, E. (2014). Obtención y caracterización mecánica de compósitos con matriz de biopolímero termoplástico de PLA. Tesis para obtener el título de Ingeniero Mecánico. Universidad Católica de Santa María.

Evangelista, S., Silva, C., Miguel, M., Cordeiro, C., Pinheiro, A., Duarte, W. y Schwan, R. (2014). Improvement of coffee beverage quality by using selected yeasts strains during the fermentation in dry process. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 61, 183–195.

Farah, S., Anderson, D. y Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications-A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367-392.

Felfel, R. M., Hossain, K. M. Z., Parsons, A. J., Rudd, C. D., & Ahmed, I. (2015). Accelerated in vitro degradation properties of polylactic acid/phosphate glass fibre composites. *Journal of Materials Science*, 50 (11), 3942–3955.

Flores, P. (2020). The issue of plastic use during the Covid-19 pandemic. *South Sustainability*, 1 (2), pp. 1-9.

Galagan, J., Calvo, S., Cuomo, C., Ma, L., Wortman, J., Batzoglou, S. y Birren, B. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438 (7071), 1105-1115.

Garlotta, D. (2001). A Literature Review of Poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9, 63-84.

Hermida, É. (2011). Polímeros. Guía Didáctica. Capítulo 9. Editorial Encuentro. Ministerio de Educación. Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

Herryman, M. y Blanco, G. (2005). Ácido láctico y poliláctico: Situación actual y tendencias. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 39 (1), pp. 49-59.

Hujanem, M. y Linko, S. (1996). Effect of temperature and various nitrogen sources on L (+) lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology Biotechnology*, 45, pp. 307-313.

Hwang, S. W., Shim, J. K., Selke, S. E. M., Soto-Valdez, H., Matuana, L., Rubino, M., y Auras, R. (2012). Poly(L-lactic acid) with added α -tocopherol and resveratrol: optical, physical, thermal and mechanical properties. *Polymer International*, 61 (3), 418–425.

Ignatyev, I., Thielemans, W. y Beke, B. (2014). Recycling of Polymers: A Review. *ChemSusChem Reviews*. 7, pp. 1579-1593.

Inkinen, S., Hakkarainen, M., Albertsson, A. y Södergard, A. (2011). From Lactic Acid to Poly (lactic acid) (PLA): Characterization and Analysis of PLA and Its Precursors. *Biomacromolecules*, 12, 523-532.

Iwata, T., Abe, H. y Kikkawa, Y. (2010). Chapter 22. Enzymatic Degradation. Poly (lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications. Wiley, pp. 383-399

Jia, X., Qin, C., Friedberger, T., Guan, Z. y Huang, Z. (2016). Efficient and selective degradation of polyethylenes into liquid fuels and waxes under mild conditions. *Science advances*, 2 (6), pp. e1501591–e1501591.

Karimi-Avargani, M., Bazooyar, F., Biria, D., Zamani, A., & Skrifvars, M. (2021). The promiscuous potential of cellulase in degradation of polylactic acid and its jute composite. *Chemosphere*, 278 (130443), 130443.

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), pp. 59–69.

Kawai, F., Nakadai, K., Nishioka, E., Nakajima, H., Ohara, H., Masaki, K., & Iefuji, H. (2011). Different enantioselectivity of two types of poly(lactic acid) depolymerases toward poly(l-lactic acid) and poly(d-lactic acid). *Polymer Degradation and Stability*, 96 (7), 1342–1348.

Komesu, A., Martins, P., Lunelli, B., Oliveira, J., Maciel Filho, R. y Wolf Maciel, M. (2014). Evaluation of lactic acid purification from fermentation broth by hybrid short path evaporation using factorial experimental design. *Separation and Purification Technology*, 136, 233–240.

Komesu, A., Wolf Maciel, M. y Maciel Filho, R. (2017). Separation and purification technologies for lactic acid- A brief review. *BioResources*, 12 (3), 6885-6901.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), pp. 680–685.

Lee, S., Kim, I., y Song, W. (2014). Biodegradation of polylactic acid (PLA) fibers using different enzymes. *Macromolecular Research*, 22 (6), 657–663.

Li, G., Zhao, M., Xu, F., Yang, B., Li, X., Meng, X., Teng, L., Sun, F., y Li, Y. (2020). Synthesis and biological application of polylactic acid. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25 (21), 5023.

Li, Y., Shahbazi, A. y Kadzere, C. T. (2006). Separation of cells and proteins from fermentation broth using ultrafiltration. *Journal of Food Engineering*, 75 (4), 574–580.

Lin, C., Chen S., Kou, G. y Kou., C. (1999). An Enzymatic Microassay for Lactate Concentration in Blood and Hemolymph. *Acta Zool Taiwanica*, 10 (2), 91-101.

Litchfield, J. H. (1996). Microbiological production of lactic acid. In *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Science. pp. 45–95

Llanos, A. (2018). Aplicación de las cutinasas recombinantes AN CUT 3 y AN CUT 4 provenientes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

López, F., Mijares, E. y Gudiño, P. (2015). Introducción a la ciencia de los polímeros. Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías. Universidad de Guadalajara, pp. 2-5

Lovera, D. y Torres, M. (2019). Optimización de condiciones para mejorar la producción y degradación del tereftalato de polietileno (PET) por la cutinasa AN CUT 3 expresada en *Pichia pastoris*. Tesis mancomunada para obtener el título de Químicas de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Lu, Z., Wei, M. y Yu, L. (2012). Enhancement of pilot scale production of l(+)-lactic acid by fermentation coupled with separation using membrane bioreactor. *Process Biochemistry (Barking, London, England)*, 47 (3), 410–415.

Luo, Y., Lin, Z., y Guo, G. (2019). Biodegradation assessment of poly (lactic acid) filled with functionalized Titania nanoparticles (PLA/TiO₂) under compost conditions. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 1-10.

Marbach, E. P., y Weil, M. H. (1967). Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Use and significance of metaphosphoric acid as a common precipitant. *Clinical Chemistry*, 13 (4), 314-325

Mayolo, K., Martínez, L. y Rito, M. (2012). Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y replegamiento de proteínas. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 11 (3), 415-429.

McKeown, P. y Jones, M. (2020). The chemical recycling of PLA: A review. *Sustainable Chemistry*, 1(1), pp. 1–22.

Meira, G. y Gugliotta, L. (2019). Polímeros. Introducción a su caracterización y a la ingeniería de polimerización. Universidad Nacional del Litoral. Colección Cátedra.

Mistry, A. N., Kachenchart, B., Wongthanaroj, A., Somwangthanaroj, A., & Luepromchai, E. (2022). Rapid biodegradation of high molecular weight semi-crystalline polylactic acid at ambient temperature via enzymatic and alkaline hydrolysis by a defined bacterial consortium. *Polymer Degradation and Stability*, 202 (110051), 110051.

Morales, S. (2015). Purificación y caracterización de la enzima recombinante ANCUT 2 de *Aspergillus nialans*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Química de alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Moreno, E. (2020). Viabilidad técnica y económica del reciclado mecánico de poli (ácido láctico) (PLA) para impresión 3D. Tesis para obtener el título en Ingeniería en Tecnologías Industriales. Universidad Politécnica de Madrid.

Murphy, E., Bernard, M., Lacona, G., Borrelle, S., Barnes, M., McGivern, A., Emmanuel, J., Gerber, L. (2021) A decision framework for estimating the cost of marine pollution interventions. *Conservation Biology*, 36 (2), pp. 1-11

Naciones Unidas (NNUU) (2000). Nosotros los pueblos: La función de las Naciones Unidas en el siglo XX. Asamblea de las Naciones Unidas dedicada al Milenio. Editorial Organización de las Naciones Unidas.

Nagarajan, V., Mohanty, A. K., & Misra, M. (2016). Perspective on polylactic acid (PLA) based sustainable materials for durable applications: Focus on toughness and heat resistance. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4 (6), 2899–2916.

Nampoothiri, K., M Nair, N. R., y John, R. P. (2010). An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*, 101 (22), pp. 8493–8501.

Nova-Institute. (2022). Bioplastics market development update 2023. European Bioplastic. Recuperado el 23 de Agosto 2024 de <https://www.european-bioplastics.org/market/>

Odian, G. (2004). Chapter 9. Reactions of Polymers. *Principles of Polymerization*. Wiley-Interscience. pp. 731.

Ohkita, T., y Lee, S.-H. (2006). Thermal degradation and biodegradability of poly (lactic acid)/corn starch biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science*, 100 (4), 3009-3017.

Olszewska-Widdrat, A., Alexandri, M., López-Gómez, J. P., Schneider, R., Mandl, M., y Venus, J. (2019). Production and purification of L-lactic acid in lab and pilot scales using sweet sorghum juice. *Fermentation*, 5 (2), 36.

Pang, W., Li, B., Wu, Y., Tian, S., Zhang, Y., & Yang, J. (2023). Optimization of degradation behavior and conditions for the protease K of polylactic acid films by simulation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253 (127496),

Park, K. I., & Xanthos, M. (2009). A study on the degradation of polylactic acid in the presence of phosphonium ionic liquids. *Polymer Degradation and Stability*, 94 (5), 834–844.

- Pawar, P. y Purwar, A. (2013). Biodegradable Polymers in Food Packaging. *American Journal of Engineering Research (AJER)*, 2 (5), pp. 151-164.
- Peng, B.-Y., Sun, Y., Li, P., Yu, S., Xu, Y., Chen, J., Zhou, X., Wu, W.-M., & Zhang, Y. (2023). Biodegradation of polyvinyl chloride, polystyrene, and polylactic acid microplastics in *Tenebrio molitor* larvae: Physiological responses. *Journal of Environmental Management*, 345 (118818), 118818.
- Peña-Montes, C., Bermúdez-García, E., Castro-Ochoa, D., Vega-Pérez, F., Esqueda-Domínguez, K., Castro-Rodríguez, J. A., González-Canto, A., Segoviano-Reyes, L., Navarro-Ocaña, A., & Farrés, A. (2024). ANCUT1, a novel thermoalkaline cutinase from *Aspergillus nidulans* and its application on hydroxycinnamic acids lipophilization. *Biotechnology Letters*, 46(3), 409–430.
- Perego, G. y Domenico G. (2010). Chapter 11. Mechanical Properties. *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Wiley, pp. 141-153
- Pérez, J. (2020). Biodegradación de tereftalato de polietileno: microorganismos, enzimas y perspectivas futuras. Universidad de La Laguna.
- Phanthumchinda, N., Rampai, T., Prasirtsak, B., Thitiprasert, S., Tanasupawat, S. y Assabumrungat, S. (2018). Alternative reverse osmosis to purify lactic acid from a fermentation broth. *Chemical Industry y Chemical Engineering Quarterly*, 24 (2), 179–90.
- Plastics Europe. (2022). Plásticos-Situación en 2022. Plastics Europe Enabling a Sustainable future AISBL
- Plou, F. (2016). Capítulo 2. ¿Qué son las enzimas?. *¿Qué sabemos de? Las enzimas*. (1a edición). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), pp. 23-35.
- Rahman, H. y Bhoi, P. (2021) An Overview of non-biodegradable bioplastics. *Journal of Cleaner Production*, 294, 126218.
- Ravve, A. (2013). Chapter 1. Introduction: Definitions. *Principles of Polymer Chemistry*. Springer US, pp. 1-5.
- Rittenour, W. R., Si, H. y Harris, S. D. 2009. Hyphal morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *Fungal biology reviews*, 23(1), 20-29.
- Rivas, M. y Garelli, O. (2021). Impacto de la contaminación por plásticos en la biodiversidad y patrimonio biocultural de México. Heinrich Böll Stiftung. <https://mx.boell.org/es/2021/03/10/impacto-de-la-contaminacion-por-plasticos-en-la-biodiversidad-y-patrimonio-biocultural>

Rodwell, V., Kennelly, P., Botham, K. y Weil, P. (2023). Capítulo 7: Enzimas, mecanismo de acción. *Harper Bioquímica ilustrada* (32a edición). McGrawHill, pp. 57-79.

Romanos, M., Scorer, C., y Clare, J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8 (6), 423-488.

Ronner, P. (2019). Capítulo 10: Enzimas y consecuencias de las carencias enzimáticas. *Netter Bioquímica Esencial*. (1a edición). ELSEVIER, pp. 96-107.

Sakai, W. y Tsutsumi, N. (2010). Chapter 24. Photodegradation and Radiation Degradation. *Poly (lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Wiley, pp. 413-421.

Saldívar, E. y Vivaldo, E. (2013). Introduction to polymers and polymer types. Chapter 1. *Handbook of Polymer Synthesis, Characterization and Processing*.

Sanahuja, J. y Vázquez, S. (2017). Del milenio a la sostenibilidad: retos y perspectivas de la Agenda 2030 para el desarrollo sostenible. *Política y Sociedad*, 54 (2), pp. 533-555.

Sánchez, M. (2015). Aplicación de las cutinasas AN CUT 1 y AN CUT 2 recombinantes de *Aspergillus nidulans* en la degradación de poliésteres. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sandoval, V., Jaca, C. y Ormazabal, M. (2017). Economía circular. *Ingeniería*, 15, pp. 85-95.

Schneider, A., Gerbi, V. y Redoglia, M. (1987). A rapid HPLC method for separation and determination of major organic acids in grape musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38 (2), 151–155.

SDGS 2015 P8 The Sustainable Development Goals (SDGs). (2015). Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Sustainable Development. <https://sdgs.un.org/publications/transforming-our-world-2030-agenda-sustainable-development-17981>

Shalem, A., Yehezkeli, O., & Fishman, A. (2024). Enzymatic degradation of polylactic acid (PLA). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108 (1), 413.

SIGMA ALDRICH (2014). Lactate assay kit product information. Catalog number MAK064

Solis, I. (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante AN CUT 1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis para obtener el título de Química de Alimentos.

- Solís, I. (2015). Producción, purificación y caracterización de la cutinasa recombinante ANCUT 1 producida en *Pichia pastoris*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Química de Alimentos. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Steffen, W., Richardson, K., Rockström, J., Cornell, S., Fetzer, I., Bennett, E., Biggs, R., Carpenter, S., Vries, W., Wit, C., Folke, C., Gerten, D., Heinke, J., Mace, G., Persson, L., Ramanathan, V., Reyers, B. y Sörlin, S. (2015). Planetary boundaries: Guiding human development on a changing planet. *Science*, 347, pp. 736-747.
- Suman, S., Singhal, R., Sharma, A. L., Malthotra, B. D., y Pundir, C. S. (2005). Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. *Sensors and Actuators. B, Chemical*, 107 (2), 768–772.
- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (2), 211-222.
- Thumsorn, S., Yamada, K., Wei Leong, Y., & Hamada, H. (2012). Effect of pellet size and compatibilization on thermal decomposition kinetic of recycled polyethylene terephthalate/recycled polypropylene blend. *Journal of Applied Polymer Science*, 124 (2), 1605–1613.
- Torres, G. y Gómez, L. (2019). Ácido láctico: Una revisión sobre los métodos de Determinación y purificación, *Biociencias*, 14 (2), 111-141.
- Tsuji, H. (2010). Chapter 21. Hydrolytic Degradation. *Poly(lactic acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. Wiley, pp. 343-381
- Van Krevelen, D. y Te Nijenhuis, K. (2009). Properties of Polymers. Their Correlation with Chemical Structure; Their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions. Elsevier Science.
- Wang, Y., Hu, T., Zhang, W., Lin, J., Wang, Z., Lyu, S., & Tong, H. (2023). Biodegradation of polylactic acid by a mesophilic bacteria *Bacillus safensis*. *Chemosphere*, 318 (137991), 137991.
- Weber, C. (2000). Biobased Packaging Material for the Food Industry. The Royal Veterinary and Agricultural University
- WEF. World Economic Forum. (2016). The New Plastics Economy. Rethinking the Future of Plastics, Geneva, pp. 1-36.
- Zaini, N. A. M., Chatzifragkou, A., Tverezovskiy, V., y Charalampopoulos, D. (2019). Purification and polymerisation of microbial d-lactic acid from DDGS hydrolysates fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 150 (107265), 107265.

Zapata, D., Pujol, R. y Coda, F. (2012). Polímeros biodegradables: una alternativa del futuro a la sostenibilidad del medio ambiente. *Técnica Industrial*, 297, pp. 76-80f

Zhang, L., Huang, C., Xu, Y., Huang, H., Zhao, H., Wang, J., y Wang, S. (2020). Synthesis and characterization of antibacterial polylactic acid film incorporated with cinnamaldehyde inclusions for fruit packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 164, pp. 4547–4555.

Zhang, X., Espiritu, M., Bilyk, A., & Kurniawan, L. (2008). Morphological behaviour of poly(lactic acid) during hydrolytic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93 (10), 1964–1970.

Zhou, Q., & Xanthos, M. (2008). Nanoclay and crystallinity effects on the hydrolytic degradation of polylactides. *Polymer Degradation and Stability*, 93 (8), 1450–1459.

Zia K, Bhatti, H. y Bhatti, A. (2007). Method for polyurethane and polyurethane composites, recycling and recovery: A review. *Reactive and Functional Polymers*. 67 (8), pp. 675-692.

Zuluaga, F. (2013). Algunas aplicaciones del ácido Poli-L-láctico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias*. 37 (142), pp. 125-142.

12. Trabajos generados a partir de esta investigación.

Presentación en la sesión de trabajos libre orales en el XX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería con el resumen “Degradación de ácido poliláctico por cutinasas recombinantes de *Aspergillus nidulans*”.

Publicación del artículo titulado “Poly(lactic acid) Degradation by Recombinant Cutinases from *Aspergillus nidulans*” en la revista polymers 2024, 16, 1994.

13. ANEXOS

13.1. Índice de figuras

Figura 1. Código de identificación de resinas plásticas	16
Figura 2. Poli(ácido láctico) como plataforma de obtención de nuevos productos	32
Figura 3. Reacción típica de hidrólisis del poli(ácido láctico).....	33
Figura 4. Modelo de la cutinasa de ANCUT 1 de A. nidulans	37
Figura 5. Perfil de proteínas obtenido por electroforesis (SDS-PAGE).....	54
Figura 6. Zimograma de actividad enzimática.....	55
Figura 7. Disminución de pH en la reacción 1.....	57
Figura 8. Disminución del pH en reacción de degradación con lote 2 de producción.	59
Figura 9. Disminución de pH empleando amortiguador Tris/HCl	60
Figura 10. Disminución de pH empleando amortiguador de fosfatos de sodio.....	61
Figura 11. Concentración de ácido láctico (AL) obtenido después de utilizar diferentes cantidades de enzima y valores de pH en la reacción.....	63
Figura 12. Diferencias en la concentración de ácido láctico (AL) obtenida a diferentes pH	63
Figura 13. Comparación de peso del polímero perdido en la reacción enzimática con agitación y sin agitación.	65
Figura 14. Comparación de la degradación de PDLLA en condiciones de agitación y estático.....	67
Figura 15. Comparación entre la cantidad de ácido láctico liberado y la diferencia en la pérdida de peso sin la aplicación y con la aplicación del pretratamiento.....	68
Figura 16. Comparación de la pérdida de peso provocada por las cutinasas	70
Figura 17. Comparación del % de actividad enzimática de las cutinasas.....	71
Figura 18. Placa de cromatografía de capa fina	72
Figura 19. Referencia espectro de RMN de Lactato de Etilo.....	74
Figura 20. Espectro de RMN 1H de la reacción de esterificación de ácido láctico.	74
Figura 21. Referencia espectro IR de Lactato de Etilo	75
Figura 22. Espectro de IR de la reacción de esterificación de ácido láctico.	75

13.2. Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de diversos métodos para la determinación y cuantificación de ácido láctico.....	20
Tabla 2. Técnicas para el aislamiento y purificación del ácido láctico.	22
Tabla 3. Ventajas y desventajas del uso de PLA.	26
Tabla 4. Propiedades mecánicas del poli(ácido láctico).	29
Tabla 5. Diferentes procesos de degradación de poli(ácido láctico).	30
Tabla 6. Caracterización de las cutinasas de Aspergillus nidulans.	36
Tabla 7. Mezcla de reacción utilizada para la determinación colorimétrica de ácido láctico.....	47
Tabla 8. Actividad volumétrica de los extractos enzimáticos y su factor de concentración.	53
Tabla 9. Actividad volumétrica y volumen para las condiciones descritas por Alvarado, 2023.....	56

Tabla 10. Resultados obtenidos en la reacción 1.	56
Tabla 11. Actividad volumétrica (U/mL) y volumen de extracto (μ L) para lote 2 de Extractos enzimáticos.	58
Tabla 12. Pérdida de peso y liberación de ácido láctico con lote 2 de las tres cutinasas de interés.....	58
Tabla 13. Efecto de la naturaleza y pH del amortiguador en la pérdida de peso y liberación de ácido láctico por cutinasa ANCUT1	60
Tabla 14. Efecto de la adición de 10,000 U de enzima por mililitro sobre la pérdida de peso y liberación de ácido láctico empleando el mismo amortiguador a dos pH de reacción.	62
Tabla 15. Pérdida de peso y ácido láctico obtenidos en reacción enzimática con agitación.....	65
Tabla 16. Reacción de degradación de PDLLA en condiciones estáticas.	66
Tabla 17. Reacción de degradación de PDLLA en condiciones de agitación.....	66
Tabla 18. Aplicación de pretratamiento de sonicación sobre la mezcla de reacción.	68
Tabla 19. Resultados del análisis de HPLC de las reacciones de degradación de polímeros derivados de PLA.	73
Tabla 20. Resultados DSC.....	76

13.3. Equipos

- Autoclave, Yamato® SM300.
- Balanza analítica, Ohaus®.
- Balanza granataria, Adam®.
- Cámara de electroforesis, MiniProtean II y IV, BioRad®.
- Campana de flujo laminar, Adler®.
- Celda para ultraconcentración, Millipore®.
- Centrifuga, Biofuga, Heraeus®.
- Congelador, Lab Line Instruments®.
- Equipo de ultrafiltración, Amicon®.
- Espectrofotómetro para celda Thermo Scientific® Biomate 3.
- Espectrofotómetro para microplaca Epoch, Biotek®.
- Estufa estática, BG®.
- Estufa estática, Gravity Convection®.
- Fuente de poder modelo 164-5070, BioRad®.
- Incubadora con agitación, Innova 40, New-Brunswick®.
- Micropipetas, Gilson®.
- Potenciómetro, Hanna®.
- Refrigerador y congelador, Hisense®.
- HPLC, Waters 1512.
- Molino de rotor, modelo Werke, IKA®

13.4. Reactivos

- Acetona, grado HPLC, Sigma- Aldrich®.

- Acetato de α -naftilo, grado analítico, Sigma-Aldrich®.
- Acetato de p-nitrofenilo, grado analítico, Sigma-Aldrich®.
- Butirato de p-nitrofenilo, grado analítico, Sigma-Aldrich®.
- Ácido acético glacial, grado reactivo analítico, Baker®.
- Ácido clorhídrico, grado reactivo analítico, Baker®.
- Acrilamida/Bis, 30%, Bio-Rad®.
- Alcohol etílico, grado reactivo analítico, Baker®.
- Agar, Bacto, Becton Dickinson Company®.
- Azida de sodio, grado HPLC, Sigma-Aldrich®.
- Azul de bromofenol, Bio-Rad.
- β -mercaptoetanol, grado HPLC, Sigma-Aldrich®.
- Cloruro de sodio, grado reactivo, Baker®.
- Dextrosa, grado reactivo analítico, Baker®.
- Envases de la marca Starbucks ®.
- Envases de PLA
- Filamento de impresión 3D.
- Extracto de levadura, Becton Dickinson Company®.
- Fast Red TR, grado reactivo analítico, Sigma-Aldrich®.
- Fosfato de potasio monobásico, grado reactivo analítico, Baker®.
- Fosfato de sodio dibásico, grado reactivo analítico, Baker®.
- Fosfato de sodio monobásico, grado reactivo analítico, Baker®.
- Glicerol, grado reactivo analítico, Baker®.
- Hidróxido de sodio, grado reactivo analítico, Baker®.
- L-lactato kit de ensayo (L-Lactate Assay Kit), Sigma-Aldrich®.
- D-lactato kit de ensayo (L-Lactate Assay Kit), Sigma-Aldrich®.
- Marcador de peso molecular "Precisión plus protein standards", Bio-Rad®.
- Metanol, grado reactivo analítico, Baker®.
- Peptona, Bacto, Oxoid®.
- Poli (ácido L-láctico) (HMW) (Poly L Lactic Acid- Biopolymer), Good Fellow®.
- Reactivo de Bradford "Quick Start Bradford 1x Dye reagent", Bio-Rad®.
- SDS (Dodecil Sulfato de Sodio), grado reactivo analítico, Bio-Rad®.
- TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina), grado reactivo analítico, Bio-Rad®.
- Tris base (tris(hidroximetil)aminometano), grado analítico, Bio-Rad®.
- Triton X-100, Sigma-Aldrich®.
- Acetato de etilo, grado reactivo analítico, J.T. Baker®.
- Cloroformo, grado reactivo analítico, J.T. Baker®.
- Hidróxido de amonio, grado reactivo analítico, J.T. Baker®.
- Etanol, grado reactivo, Alvi®
- Sal yodada, La fina®.
- Poli (D, L) láctico (Mw=15000) (Poly D,L lactic Acid), Sigma-Aldrich®.

13.5. Preparación de medios de cultivo utilizados para la producción de la cutinasa recombinante.

Medio YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium)

- Extracto de levadura 1%
- Peptona 2%Dextrosa (glucosa) 2%
- Para 1 L de medio disuelve 10 g de extracto de levadura, 20 g de peptona y 20 g de dextrosa en 1000 mL de agua, esteriliza en autoclave.
- Si vas a hacer medio YPD sólido, agrega 20 g de agar antes de esterilizar
- Si vas a hacer medio YPD/zeocina 0.01 %, después de esterilizar en autoclave, deja enfriar (~60°C) y agrega 1 mL de un stock de zeocina (100 mg/mL) para obtener una concentración final de 100 µg/mL.

Medio Y

- Extracto de levadura a 3 %

Medio LOTO con glicerol al 1% para 25 mL

Todo el material se esteriliza en autoclave (matraces, medio Y, amortiguador, glicerol) y esterilizar por filtración (solución de vitaminas y elementos trazas) y se mezclan las siguientes cantidades:

- Medio Y 20 mL
- Fosfatos de potasio 100 mM, pH 6.0 2.5mL
- Solución vitaminas 0.1 mL
- Solución de elementos trazas 0.1 mL
- Glicerol 10% 2.5 mL
- Mezclar bien y almacenar a 4°C, la vida útil del medio es aproximadamente dos meses.

Medio LOTO con metanol al 3%

Todo el material se esteriliza en autoclave (matraces, medio Y, amortiguador, glicerol) y esterilizar por filtración (solución de vitaminas y elementos trazas) y se mezclan las siguientes cantidades:

- Medio Y 21.75 mL
- Fosfatos de potasio 100 mM, pH 6.0, 2.5 mL
- Solución vitaminas 0.1 mL
- Solución de elementos trazas 0.1 mL
- Metanol 100% 0.75 mL
- Mezclar bien y almacenar a 4°C, la vida útil del medio es aproximadamente dos meses sin añadir el metanol.

Soluciones stock

Glicerol 10%

Mezcla 126 g de glicerol con 900 ml de agua y esteriliza por autoclave. Almacena a temperatura ambiente, la vida media de esta solución es un poco más de un año.

Vitaminas (para 100 mL)

Pantotenato de calcio 80 mg, myo-inositol 800 mg, dicloruro de tiamina 80 mg, hidrocloreuro de piridoxina 80 mg, ácido nictínico 20 mg, D(+) biotina 80 mg K₂HPO₄ 400 mg.

Cada vitamina se va disolviendo una a una en el 70% del volumen de la solución y se esteriliza por filtración.

Elementos trazas (para 100 mL)

FeSO₄ 7H₂O 6.5 g, CuSO₄ 5H₂O 0.6 g, ZnSO₄ 7H₂O 2 g, MnSO₄•H₂O 0.3 g, KI 0.042 g, H₃BO₃ 0.01 g, Na₂MoO₄•2H₂O 0.1 g, H₂SO₄ 98% (v/v) 1 mL

Cada compuesto se va disolviendo uno a uno en el 70% del volumen de la solución y se esteriliza por filtración.

13.6. Preparación de soluciones amortiguadoras y soluciones stock

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

Amortiguador de fosfatos de sodio pH 7 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 50 mM: Disolver 0.426 g de fosfato de sodio monohidratado y 0.522 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 7 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

Amortiguador de fosfatos de sodio pH 9 (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄) 50 mM: Disolver 0.01084 g de fosfato de sodio monohidratado y 1.3284 g de fosfato dibásico de sodio heptahidratado en 70 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 9 con NaOH y potenciómetro, aforar a 100 mL.

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